

国人脂蛋白脂肪酶基因突变的筛查

赵莉莉, 汪军梅, 穆云翔, 杨宇虹, 赵郁, 刘新宇, 解用虹

(天津医科大学生物化学教研室, 天津市 300070)

[关键词] 分子生物学; 脂蛋白脂肪酶的基因突变; 聚合酶链反应—单链构象多态性; 脂蛋白脂肪酶; 基因突变; 高甘油三酯血症

[摘要] 目的 筛查天津地区脂蛋白脂肪酶基因突变情况, 并探讨其对血脂水平的影响。方法 利用聚合酶链反应—单链构象多态性分析技术对 386 例样本(血脂正常组 278 例, 血脂异常组 108 例)的脂蛋白脂肪酶基因进行突变筛查, 对可疑突变的扩增样品进行 DNA 序列测定。对于频率较高的多态性位点, 引入限制性核酸内切酶位点利用聚合酶链反应限制片长多态性进行鉴定。结果 在 386 例样本中, 共检出 4 种突变, 检出率为 14.5%, 其中 1 例为目前国内外未见报道的外显子 3 Leu¹⁰³→Leu 同义突变杂合子, 1 例为目前亚洲首报的外显子 5 Pro²⁰⁷→Leu 突变杂合子, 3 例内含子 3 受体剪接点上游 6 bp 的 C→T 转换的突变杂合子, 1 例 Ser⁴⁴⁷→stop 突变纯合子, 50 例 Ser⁴⁴⁷→stop 突变杂合子。结论 我国天津地区人群存在着广泛的脂蛋白脂肪酶基因变异, 既具有与大多数国家相同的 Ser⁴⁴⁷→stop 多态性位点, 也具有自身的特点。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Genetic Screening of the Lipoprotein Lipase Gene for Mutations in Chinese Peoples

ZHAO Li-Li, WANG Jun-Mei, MU Yun-Xiang, YANG Yu-Hong, ZHAO Yu, LIU Xin-Yu, and XIE Yong-Hong

(Department of Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein lipase; Gene Mutation; Hypertriglycerolimia; Polymorphism; Polymerase Chain Reaction—Single Strand Conformation Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To screen the mutations of lipoprotein lipase gene in Chinese peoples and to study the possible effects of the mutations on the lipoprotein metabolism. **Methods** The lipoprotein lipase fragments were examined with polymerase chain reaction—single strand conformation polymorphism analysis, and the polymerase chain reaction products showing abnormal pattern on single strand conformation polymorphism were sequenced using dideoxy chain termination method. **Results** Four kinds of mutations were found in 386 Chinese people, including one samesense mutation (Leu¹⁰³→Leu in exon 3) in one sample, a C→T transition at 6 bp upstream from acceptor splicing site of intron 3 detected in three samples, a C875→T transition resulting in a P207L mutation in exon 5 in one hypertriglyceridemic patient, and a C1595→G transversion resulting in a Ser⁴⁴⁷→stop mutation. One homozygous and fifty heterozygous mutations were found. **Conclusions** Except for Ser⁴⁴⁷→stop, the character of mutations of the lipoprotein lipase gene occurred in Chinese population is different from the Europe and American population.

脂蛋白脂肪酶(Lipoprotein lipase, LPL)是血浆脂质代谢的关键酶^[1],其主要生理功能是水解乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的甘油三酯(trlyceride, TG)为甘油和游离脂肪酸供组织利用。LPL结构和功能的改变是形成高脂血症特别是高甘油三酯血症(hypertriglycerolimia, HTG)的最重要的原因之一^[2]。随着分子生物学理论的发展和技术的普及, LPL基因变异的研究倍受关注,发现和报告的基因变异迅速增加。为探讨中国人群 LPL 基因常见突变的种类、频率及其可能产生的影响,研究 LPL 基因变异与

HTG 等疾病形成的关系,本文利用聚合酶链反应—单链构象多态性(polymerase chain reaction—single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)分析技术对 LPL 基因转录起始点上游 140 bp 以内的调节区,外显子 2~9(包括内含子—外显子交界区)进行了突变筛查。

1 对象与方法

1.1 对象

386 例样本由收集的 HTG 患者和健康体检人群组成,以血浆 TG 1.7 mmol/L 为界,血浆 TG ≤ 1.7 mmol/L 为血脂正常组,共 278 例;血浆 TG > 1.7 mmol/L 为血脂异常组,共 108 例。

1.2 基因组 DNA 的提取

取空腹静脉血,以乙二胺四乙酸抗凝,应用

[收稿日期] 2006-01-04 [修回日期] 2006-07-14

[基金项目] 天津市自然科学基金(033607311)资助

[作者简介] 赵莉莉,硕士研究生,主要从事分子生物学和脂代谢研究, E-mail 为 tjzhaoll@yahoo.com.cn。汪军梅,硕士研究生,助教,主要从事分子生物学和脂代谢研究。通讯作者解用虹,教授,硕士研究生导师,主要从事分子生物学和脂代谢研究。

TKM 法^[3]提取基因组 DNA。

1.3 目的基因的扩增

利用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增调节区、外显子 2~9, 引物设计参照文献 [4], 由上海生工生物工程有限公司合成, PCR 相关

试剂购自大连宝生物工程有限公司。反应体系的总体积为 25 μ L, 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min \rightarrow 退火 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共进行 30 次循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。引物序列及退火温度见表 1。

表 1. 引物序列及退火温度

目的基因片段	引物序列	扩增片段长度	退火温度
调节区	上游引物 5'-GGGTTGATCCTCATTACTGTTTGG-3' 下游引物 5'-GGGCAGCTAGAAGTGGCCAGC-3'	203 bp (- 142 bp~ + 61 bp)	55 $^{\circ}$ C
外显子 2	上游引物 5'-CTCCAGTTAACCTCATATCCA-3' 下游引物 5'-CAATCCACTCTCCCAAAG-3'	36 bp+ 161 bp+ 32 bp= 229 bp	54 $^{\circ}$ C
外显子 3	上游引物 5'-AAGCITGTGTCATCATCTTG-3' 下游引物 5'-ATAAGTCCCTCTTCTCCCAAGT-3'	25 bp+ 180 bp+ 27 bp= 232 bp	56 $^{\circ}$ C
外显子 4	上游引物 5'-TTGGCAGAACTGTAAGCACCT-3' 下游引物 5'-AGTCITTTACACCTCTTATGATA-3'	43 bp+ 112 bp+ 46 bp= 201 bp	57 $^{\circ}$ C
外显子 5	上游引物 5'-CCTGCITTTTTCCCTTTAAAGCC-3' 下游引物 5'-AATTCGCTTCTAAATAATATTACCTG-3'	20 bp+ 234 bp+ 24 bp= 278 bp	56 $^{\circ}$ C
外显子 6	上游引物 5'-TCTGCCGAGATACAATCITGG-3' 下游引物 5'-CTCCTTGGTTCCCTATTTAC-3'	39 bp+ 243 bp+ 38 bp= 320 bp	56 $^{\circ}$ C
外显子 7	上游引物 5'-CTGAATTGCCTGACTATTTGG-3' 下游引物 5'-GACTGGTGCCATGATGAC-3'	75 bp+ 122 bp+ 40 bp= 238 bp	58 $^{\circ}$ C
外显子 8	上游引物 5'-GCTGATCTCTATACTAACG-3' 下游引物 5'-ATACAGCCCTFAGGTCTGA-3'	43 bp+ 183 bp+ 67 bp= 293 bp	58 $^{\circ}$ C
外显子 9	上游引物 5'-GTTCTACATGGCATATTCAG-3' 下游引物 5'-TCAGGATGCCAGTCAGCTT-3'	38 bp+ 105 bp+ 37 bp= 180 bp	58 $^{\circ}$ C

注: 扩增片段长度= 前一个内含子与该外显子交界区+ 该外显子长度+ 后一个内含子与该外显子交界区。

1.4 单链构象多态性分析

取 15 μ L PCR 产物, 与 15 μ L 变性上样缓冲液 (由 9.6 mL 甲酰胺, 5 mg 溴酚蓝和 400 μ L 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸配制而成) 混合。95 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后立即置于冰浴中。取 30 μ L 变性产物上样, 采用浓度为 8%~10%, 交联度为 2% 聚丙烯酰胺凝胶 (160 mm \times 180 mm \times 1 mm) 垂直电泳, 4 $^{\circ}$ C 或 15 $^{\circ}$ C 恒温。先以 150 V 10 min 使样品进胶, 继以恒功率 5 W 电泳 3~8 h。电泳后凝胶使用硝酸银染色法染色。

1.5 DNA 测序

PCR-SSCP 显示异常带型的扩增片段送上海生物工程有限公司和英骏生物技术有限公司测序。

1.6 聚合酶链反应—限制片长多态性分析

LPL 外显子 9 SSCP 电泳图谱显示异常带型的样品, 仅对其中部分样品扩增 DNA 进行测序, 其余对待测 DNA 样本重新进行扩增, 其中上游引物不变, 下游改用错配引物, 其序列为 5'-TAGC-

CCAGAATGCTCACCAGACT-3'。扩增产物通过限制性内切酶 Hinf I 进行酶切^[5]。

2 结果

2.1 脂蛋白脂肪酶外显子聚合酶链反应—单链构象多态性分析

386 例样品中共检出 56 例异常电泳带型, 涉及 4 种外显子, 其中第 3 外显子 1 例, 第 4 外显子 3 例, 第 5 外显子 1 例, 第 9 外显子 51 例 (图 1)。

2.2 异常 DNA 带型样品序列

2.2.1 外显子 3 1 例异常带型者的扩增片段经 DNA 测序证实为外显子 3 C562T 转换突变杂合子, 由此突变导致 Leu¹⁰³ \rightarrow Leu 同义表达 (图 2)。该突变目前国内外未见报道, 并在 GenBank 上注册成功, 获得注册号为 DQ083390。

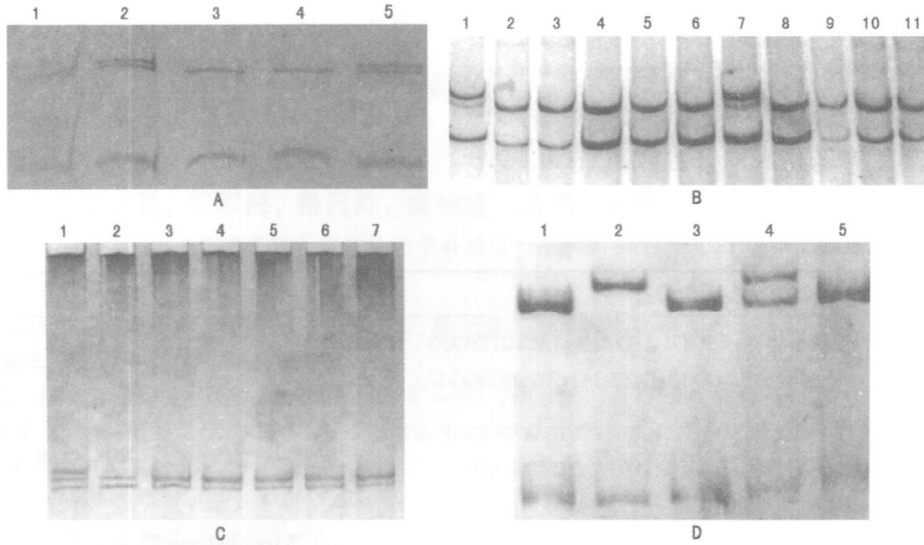


图 1. 脂蛋白脂肪酶外显子 3、4、5 和 9 的聚合酶链反应—单链构象多态性电泳图 A 为外显子 3, 泳道 2、5 出现异常单链带型, 为突变杂合子, 其余各泳道为两条正常单链带型; B 为外显子 4, 泳道 1、7 出现异常单链带型, 其余各道均为正常单链带型; C 为外显子 5, 泳道 1 较正常多出一条异常单链带, 2-7 道为两条正常单链带; D 为外显子 9, 泳道 1、3、5 为两条正常单链带, 2 道为纯合子突变, 4 道较正常多出一条异常单链, 为杂合子突变。

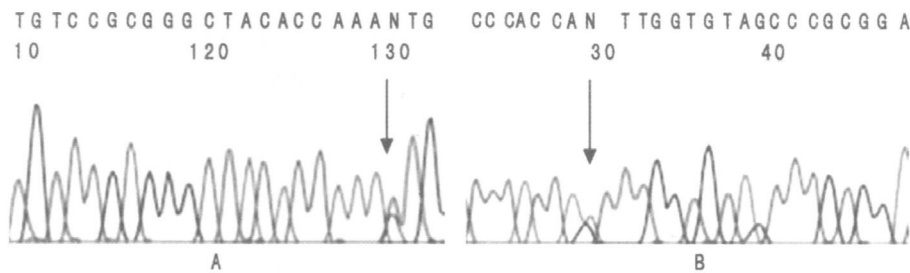


图 2. 外显子 3 突变杂合子的 DNA 双向测序结果 A 为外显子 3 扩增片段正向测序结果; B 为外显子 3 扩增片段反向测序结果; 箭头标记处可见双峰, 为外显子 3 的 C \rightarrow T 转换突变杂合子。

2.2.2 外显子 4 3 例异常带型者的扩增片段经 DNA 测序证实均为内含子 3 的 3'-受体剪接位点 (3'-acceptor splice site, 3'-ass) 上游 6 bp 的 C \rightarrow T 转换的突变杂合子(图 3)。

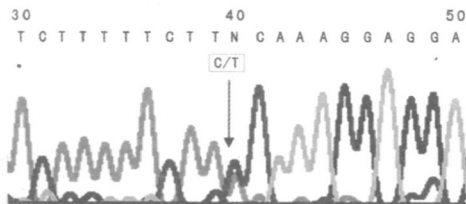


图 3. 内含子 3 突变杂合子的 DNA 测序结果 箭头标记处可见双峰 C/T, 为内含子 3 的 C \rightarrow T 转换突变杂合子。

2.2.3 外显子 5 1 例异常带型者的扩增片段经 DNA 测序证实为外显子 5 C875T 转换突变杂合子, 由此突变导致 Pro²⁰⁷ \rightarrow Leu 错义表达(图 4)。

2.2.4 外显子 9 51 例异常带型可分为两类, 1 例显示为原来的带消失, 而代之以新出现的单链带, 经 DNA 测序证实为 C1595G 颠换纯合子, 50 例表现为在两条正常单链外多出一条慢带, 为三条单链带, 经 DNA 测序或 PCR-RFLP 分析证实均为 C1595G 颠换杂合子, 均导致 Ser⁴⁴⁷ \rightarrow stop 表达, 形成无义突变(图 5)。

2.3 聚合酶链反应—限制片长多态性分析

外显子 9 错配引物扩增片段长 160 bp。酶切后, 杂合子可出现两条带, 一条为 160 bp, 一条为 137 bp, 切开的小片段 23 bp 由于分子量较小, 可能已泳出泳道或因结合 EB 量有限, 紫外灯下不能显示。突变纯合子则出现一条带, 长 137 bp。而野生型则不能被 Hinf I 切开, 电泳图谱上只出现 160 bp 片段(图 6)。

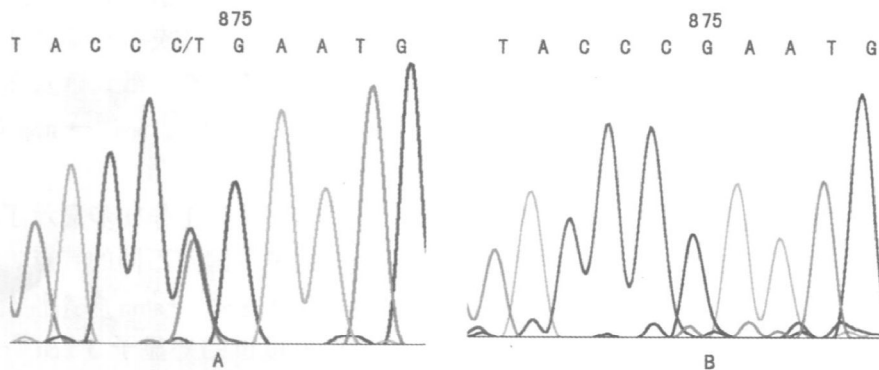


图 4. 外显子 5 杂合子突变及正常测序图 A 为外显子 5 杂合子突变测序图, 基因组第 875 位碱基由正常 C 变为 T, 207 位编码氨基酸由 Pro 变为 Leu; B 为正常甘油三酯者外显子 5 测序结果, 显示为正常序列, 875 位碱基为 C。

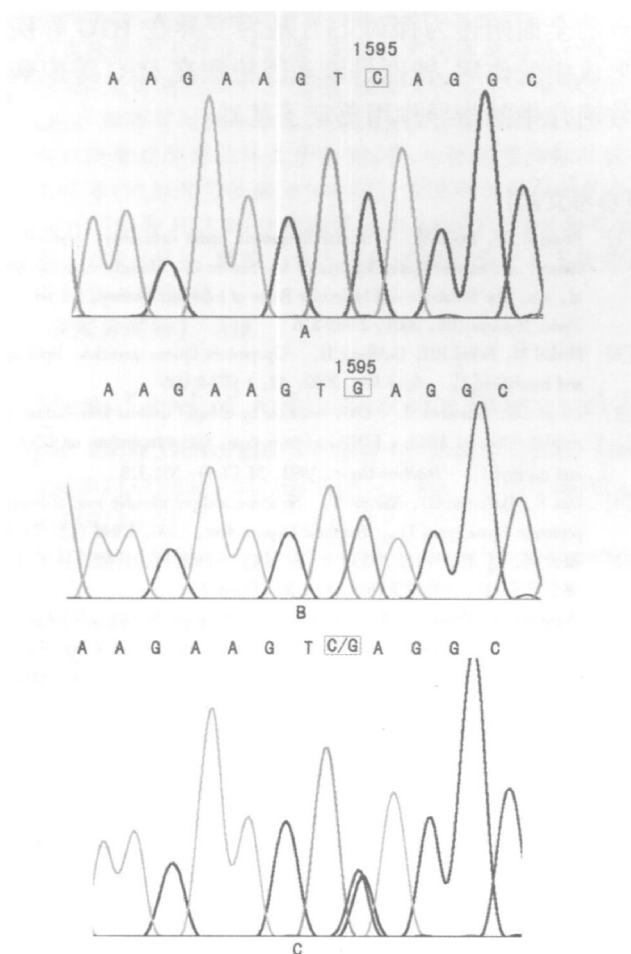


图 5. 外显子 9 测序图 A 为 Ser447Ser, B 为 stop447stop, C 为 Ser447stop。

3 讨论

脂蛋白脂肪酶(LPL)是脂质代谢的关键酶,是人类异常脂蛋白血症发病的最主要原因之一。在日本,LPL与低密度脂蛋白受体和胆固醇酯转移蛋白基因缺陷被列为脂质(胆固醇和甘油三酯)代谢最常见的基因变异,在所报告的15个相关基因的190种突变中,LPL基因突变达到25种,居甘油三酯代谢

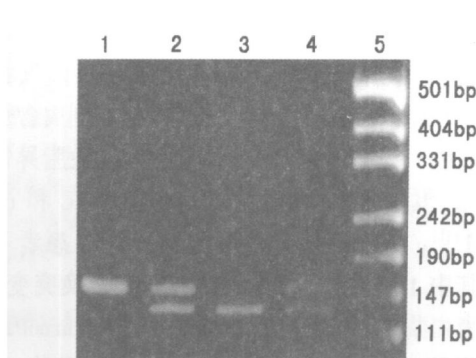


图 6. 外显子 9 限制片长多态性电泳图 Lane 1 为 Ser⁴⁴⁷/Ser⁴⁴⁷野生纯合子, Lane2 和 4 为 Ser⁴⁴⁷/stop⁴⁴⁷杂合子, Lane 3 为 Stop⁴⁴⁷/Stop⁴⁴⁷纯合子, Lane 5 为 marker (pUC19 DNA/Msp iv)。

异常的首位^[6]。基于 LPL 在机体脂质代谢中的重要作用以及分子生物学理论的发展和技术的普及,LPL 基因突变的研究取得了迅猛的发展,人 LPL 已经成为基因突变最为丰富的蛋白质之一。近年来国内一些学者和实验室开始关注 LPL 基因变异的研究并相继有论著发表,如 Chan 等^[7]对 160 例 HTG 患者 LPL 基因变异的筛查,Zhao 等^[8]关于 LPL 丝氨酸 447/终止子多态性和中国脑卒中危险的研究;Yang 等^[9]关于在伴高甘油三酯Ⅱ型糖尿病患者中 LPL 的基因突变研究。

脂蛋白脂肪酶(LPL)外显子 3 Leu¹⁰³→Leu 同义突变检出于 65 岁男性,患者因慢性哮喘入院,无家族性遗传病史,否认曾服用过血脂调整药物。总胆固醇为 3.9 mmol/L, TG 为 2.03 mmol/L,高密度脂蛋白胆固醇为 0.84 mmol/L。经 DNA 测序证实为第 3 外显子 562 位碱基处,单碱基 C→T 转换突变使第 103 位亮氨酸密码子 CTG 转变为 TTT,但因两种密码子均编码亮氨酸,故并不影响 LPL 的氨基酸组成。该突变位于外显子 3 3' 剪接位点上游 39 bp 处,在外显子-内含子交界区之外,并且该突变位点两侧

相邻的碱基分别为 5' 端的 A, 3' 端的 T, 在发生 C \rightarrow T 突变后, 既不会形成 5' 端剪接点 GU 也不会形成 3' 端剪接点 AG, 故不会影响外显子 3 的剪接过程, 因此 LPL 的功能不可能发生明显改变。本例 TG 含量虽略有升高, 但升高并不明显, 说明 LPL 的活性和功能并没有发生明显改变, 其 TG 的升高可能是有其他方面的因素造成。新 LPL 突变(C562 \rightarrow T) 的发现, 对进一步阐述 LPL 结构与功能的关系有重要的参考价值。

脂蛋白脂肪酶(LPL) 基因内含子 3/3'-ass C \rightarrow T 转换突变由日本学者 Nakamura 等^[10] 首次报告。此后有其他学者相继在 HTG 患者中检出该突变, 而在正常对照组中未发现该突变, 因此学者们认为该突变可能是 HTG 患者的遗传易患因子。目前该突变仅发现于日本和中国。我们所发现的 3 例内含子 3/3'- ass C \rightarrow T 转换突变, 其中有 2 例均在血脂异常组中检出, 其血浆 TG 分别为 5.90 mmol/L 和 6.62 mmol/L^[11]。与以往国内外仅发生于 HTG 患者不同的是其中 1 例内含子 3/3'- ass/C \rightarrow T 转换突变^[12], 检出者血浆 TG 值处于正常范围, 为 1.35 mmol/L, 既无血脂异常史, 也否认曾服用过血脂调整药物, 这是至今为止国内外唯一的报告。该突变不仅见于 HTG 患者, 且于血脂正常的人群检出, 对科学全面认识该突变的生理意义和探讨异常脂蛋白血症发生的原因和有效防治均可能有重要的参考价值。

脂蛋白脂肪酶(LPL) Pro²⁰⁷ \rightarrow Leu 变异检出于一位我们跟踪观察长达 15 年的严重 HTG 患者, 曾反复发作胰腺炎腹痛, 血浆 TG 最高曾达到 36 mmol/L。最近经 PCR-SSCP 和测序技术证实为外显子 5 第 875 位碱基 C 转换为 T, 使脯氨酸密码子 CCG 转变为亮氨酸密码子 CTG, 形成了外显子 5 Pro²⁰⁷Leu 杂合子, 经家系分析显示其父也携带这一突变^[13]。该变异最早由 Ma 等^[14] 报告, 在 HTG 组检出而血脂正常对照组未发现, 同时研究发现该变异未影响 LPL 基因的转录但导致 LPL 催化活性明显减低。其后, 这一变异又相继在法国、德国、美国和瑞典等欧美国家的人群中发现, 但尚未见在亚洲国家人群发现的报道。

外显子 9 Ser⁴⁴⁷ \rightarrow stop 多态性位点最早由 Hata 等^[15] 报告, 该突变位于第 9 外显子 1595 碱基处, 单碱基 C \rightarrow G 突变是密码子 TCA 转变为 TGA, 产生一个提前的终止密码子, 导致合成的 LPL 在 C 末端缺少 2 个氨基酸残基(Ser-Gly)。该变异位点是一高发多态性位点。我们所发现的 51 例外显子 9 Ser⁴⁴⁷ \rightarrow stop 突变中有 12 例在血脂异常组中发现, 39 例于血

脂正常组中检出, 其中有 1 例是纯合子突变, 其余皆为杂合子突变。该突变对血脂水平的影响不同研究组的观点尚不完全一致。通过我们的筛查结合文献和统计学分析, 推测 Ser⁴⁴⁷ \rightarrow stop 具有较弱的降低 TG 水平的作用^[15]。

我们的研究工作初步显示了国人 LPL 基因变异具有与欧美等国家不同的特点。例如除与大多数国家相同存在 Ser⁴⁴⁷ \rightarrow stop 多态性外, 发现了现今国内外均未见报道的外显子 3 Leu¹⁰³ \rightarrow Leu 同义突变, 存在目前为亚洲首报的外显子 5 Pro²⁰⁷ \rightarrow Leu 突变杂合子, 也存在较高频率的目前仅见于中日两国的内含子 3/3'- ass C \rightarrow T 转换突变。国人 LPL 基因变异特点的全面阐述为探讨 LPL 基因变异在 HTG 等疾病形成中的作用, 特别是该基因检测在 HTG 等疾病有效治疗中的指导作用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Brunzell JD, Deeb SS. Familial lipoprotein lipase deficiency, ApoC[⊕] deficiency, and hepatic lipase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, 2789-816
- [2] Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation[J]. *lipid Res*, 2002, **43**: 1997-2006
- [3] Lahiri DK, Schmabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality[J]. *Biochem Genet*, 1993, **31** (7-8): 321-328
- [4] Oka K, Tkalecic GT, Nakano T. Structure and polymorphic map of human lipoprotein lipase gene[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1040** (1): 21-26
- [5] 穆云翔, 赵郁, 钟媛, 刘新宇, 解用虹. 脂蛋白脂肪酶外显子 9 基因突变研究[J]. *天津医药*, 2004, **32** (1): 5-7
- [6] Maruyama T, Yamashita S, Matsuzawa Y. Mutations in Japanese subjects with primary hyperlipidemia--results from the research committee of the ministry of health and welfare of japan since 1996[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2004, **11**: 131-145
- [7] Chan LY, Lam CW, Mak YT, Tomlinson B, Tsang MW, Baum L, et al. Genotype-phenotype studies of six novel LPL mutations in Chinese patients with hypertriglyceridemia[J]. *Hum Mutat*, 2002, **20** (3): 232
- [8] Zhao SP, Tong OG, Xiao ZL. The lipoprotein lipase Ser447Ter mutation and risk of stroke in the Chinese[J]. *Clin Chim Acta*, 2003, **330** (1-2): 161-164
- [9] Yang T, Pang CP, Tsang MW, Lam CW, Poon PM, Chan LY, et al. Pathogenic mutation of the lipoprotein lipase gene in Chinese patients with hypertriglyceridemic type 2 diabetes[J]. *Hum Mutat*, 2003, **21** (4): 453-457
- [10] Nakamura T, Suehiro T, Yasuoka N. A novel nonsense mutation in exon 1 and a transition in intron 3 of the lipoprotein lipase gene[J]. *J Atheroscler Thromb*, 1996, **3**: 17-24
- [11] 杨宇虹, 葛林, 赵郁, 解用虹. 脂蛋白脂肪酶内含子 3C \rightarrow T 突变[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 570-572
- [12] 汪军梅, 赵莉莉, 孙静, 刘新宇, 赵郁, 解用虹. 血脂正常人群检出 LPL 3C \rightarrow T 突变[J]. *天津医科大学学报*, 2005, **11** (2): 159-161
- [13] 穆云翔, 杨宇虹, 解用虹. 脂蛋白脂肪酶 Pro²⁰⁷ \rightarrow Leu 突变家系分析[J]. *天津医科大学学报*, 2003, **9** (1): 112-114
- [14] Ma Y, Henderson HE, Murthy MRV. A mutation in the lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in french Canadians[J]. *N Engl J Med*, 1991, **324**: 1761-766
- [15] Hata A, Robertson M, Emi M. Direct detection and automated sequencing of individual alleles after electrophoretic strand separation: identification of a common nonsense mutation in exon 9 of the human lipoprotein lipase gene[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (18): 5407-411

(此文编辑 文玉珊)