

[文章编号] 1007-3949(2007)15-03-0229-04

• 流行病学研究 •

湖南苗族人群载脂蛋白 A (A) 基因多态性与血脂的关系

钱招昕¹, 李洁¹, 孙明²

(中南大学湘雅医院 1. 急诊科, 2. 心内科, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 流行病学; 载脂蛋白 A (A) 单核苷酸多态性; 甘油三酯; 低密度脂蛋白; 湖南苗族人群

[摘要] 目的 研究中国湖南苗族人群载脂蛋白 A (A) 基因 S19W 和 SNP4 多态性与血脂的关系。方法 收集湖南湘西无血缘关系的苗族健康人 241 例, 用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性分析 S19W 和 SNP4 单核苷酸多态。分析基因型与血脂的关系。结果 S19W 位点都为 56C/C 型。SNP4 位点具有 -12238T/C 和 T/T 和 C/C 三种基因型, 等位基因 T、C 频率分别为 0.45 和 0.55。苗族 -12238T/C 型的人群血浆甘油三酯显著高于其他基因型人群 (T/C 型、T/T 型和 C/C 型分别为 2.15 ± 1.52 、 1.63 ± 0.89 和 1.41 ± 0.84 mmol/L, $P < 0.05$), 低密度脂蛋白水平亦显著高于其他基因型人群 (T/C 型、T/T 型和 C/C 型分别为 2.93 ± 0.84 、 2.44 ± 0.70 和 2.37 ± 0.85 mmol/L, $P < 0.05$)。结论 载脂蛋白 A (A) 基因 S19W 位点在湖南苗族健康人群中为非多态性位点。载脂蛋白 A (A) 基因 SNP4 位点在湖南苗族健康人群中为多态性位点, T/C 型血浆甘油三酯和低密度脂蛋白水平高于其他基因型。

[中图分类号] R18

[文献标识码] A

The Relationship Between the Polymorphism of Apolipoprotein A (A) Gene and the Levels of Serum Lipids in Hunan Miao Population

QIAN Zhao Xin, LI Jie, and SUN Ming

(Department of Emergency, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A (A) Single Nucleotide Polymorphism; Triglyceride; Low Density Lipoprotein; Hunan Miao Population

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the single nucleotide polymorphism (SNP) SNP4 and S19W of the apolipoprotein A (A) (ApoA (A) gene possible association with serum lipids in Hunan Miao population. **Methods** 241 normal subjects were collected to determine the genotypes by using polymerase reaction restriction fragments length polymorphisms. **Results** Only one genotype, 56C/C of S19W was found in 241 subjects. Three genotypes, -12238T/C, T/T and C/C of SNP4 were found in 241 subjects. Allelic frequencies of T and C were 0.45 and 0.55. The level of serum triglyceride (TG) in subjects with T/C genotype were significantly higher than those in subjects with other genotypes (T/C vs T/T vs C/C: 2.15 ± 1.52 mmol/L vs 1.63 ± 0.89 mmol/L vs 1.41 ± 0.84 mmol/L, $P < 0.05$). The level of serum low density lipoprotein (LDL) in subjects with T/C genotype was significantly higher than those in subjects with other genotypes too (T/C vs T/T vs C/C: 2.93 ± 0.84 mmol/L vs 2.44 ± 0.70 mmol/L vs 2.37 ± 0.85 mmol/L, $P < 0.05$). **Conclusions** S19W is not a polymorphism place in ApoA (A) gene of Hunan Miao population. The polymorphism of SNP4 in ApoA (A) gene is associated with level of serum lipids in Hunan Miao population. T/C type might be associated with higher level of serum TG and LDL ($P < 0.05$).

载脂蛋白 A (A) (apolipoprotein A (A) ApoA (A) 是由两个独立的课题组在 2001 年同期发现并证实的一个载脂蛋白基因^[1-3], 该基因存在 13 个单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点, 对位于启动子区的 -1131T[→]C (SNP3)、位于载脂蛋白 A (A) 载脂蛋白 A (A) 基因交界区域的 -12238T[→]C (SNP4) 和位于第 2 外显子中的 56C[→]G (S19W) 位点研究较多^[4-8]。近期不同的课题组采用不同的实验设计研

究不同种族载脂蛋白 A (A) 多态性与血脂的关系时均发现, 在绝大多数种族人群中 56C[→]G 和 -12238T[→]C 多态性的改变都会极大地影响人血浆甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平, 而对胆固醇的影响互不相同。而几项关于中国汉族人群的研究发现 56C[→]G 位点不是多态位点^[9,10]。本研究以中国湖南苗族健康人为对象, 分析载脂蛋白 A (A) 基因 S19W 和 SNP4 多态性与血脂的关系。

[收稿日期] 2006-10-25 [修回日期] 2007-02-08

[作者简介] 钱招昕, 博士, 主治医师, 主要研究方向为心力衰竭、冠心病和心血管急症, E-mail 为 qianzhx2004@sina.com。李洁, 硕士, 主治医师, 主要研究方向为高血脂与脑血管疾病。孙明, 教授, 博士生导师, 研究方向为高血压病、冠心病、血脂代谢和心力衰竭。

1 对象和方法

1.1 研究对象

收集湖南湘西无血缘关系的健康苗族健康人 241 例, 男 140 例, 女 101 例, 平均年龄 61.7 ± 9.8 岁。

1.2 试剂和主要仪器

限制性内切酶 TaqI (MBI 公司), dNTP、DNA 聚合酶 (生物晶美有限公司), Marker (鼎国生物技术有限公司), DNA 扩增仪 (PE4800 型, Perkin2Elmer 公司), 岛津 CL27200 全自动生物化学分析仪。

1.3 引物的设计与合成

参照文献[6]设计引物, S19W 的正向引物为 5'-GGC TCT TCT TTC AGG TGG GTC TCC G-3', 反向引物为 5'-GCC TTT CCG TGC CTG GGT GGT-3', 特异性扩增载脂蛋白 A (Apo) 基因编码区第三外显子内第 7 bp 处 C/G 多态性位点, 产物长度为 157 bp。SNP4 的正向引物为 5'-GTG CCT GTC ACC ACC GTT TGG-3', 反向引物为 5'-ATG CAT TAG CCT CTG CTG TTC-3', 特异性扩增载脂蛋白 A (Apo) 基因位于载脂蛋白 A (Apo) 载脂蛋白 A (Apo) 基因交界区的 -12238T/C 多态性位点, 产物长度为 162 bp。

1.4 模板 DNA 的提取

采用常规氯仿/酚提取法。取肝素抗凝血 2 mL, 加入 3 倍体积 1× 红细胞裂解液混匀, 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 加 1 mL 细胞核裂解液混匀, 加 20% SDS 150 μL 和蛋白酶 K 15 μL 混匀后 37℃ 消化过夜, 加等体积苯酚于室温 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清至另 EP 管加入苯酚、氯仿各 1:1 至原体积, 混匀室温 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清至另 EP 管, 加入 2 倍体积无水乙醇充分摇匀, 见白色 DNA 析出, 吸出 DNA 加 1 mL 无水乙醇至 -20℃ 保存。

1.5 聚合酶链反应—限制片长多态性

反应总体积 25 μL, ddH₂O 15 μL, dNTP 0.5 μL, MgCl₂ 2 μL, 10× buffer 2.5 μL, 正向引物和反向引物各 1 μL, TaqDNA 聚合酶 2 μL, 模板 DNA 1 μL。S19W 的反应条件为 96℃ 预变性 5 min, 按 96℃ 变性 15 s → 67℃ 退火 20 s → 72℃ 延伸 20 s, 循环 30 次, 末次循环后延伸 5 min。取 PCR 扩增产物 10 μL, 加入限制性内切酶 TaqI 10 u, 65℃ 消化 12 h, 酶切产物用 3% 琼脂糖电泳分析鉴定。SNP4 的反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 按 95℃ 变性 30 s → 62℃ 退火 30 s → 72℃ 延伸 30 s, 循环 30 次, 末次循环后延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 10 μL, 加入限制性内切酶 MspI 10 u, 37℃ 消化 12 h, 酶切产物用 3% 琼脂糖电泳分析鉴定。

1.6 血脂及载脂蛋白的测定

采用氧化酶法测定 TG、总胆固醇 (total cholesterol, TC); 测定高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 先用沉淀剂沉淀, 再用氧化酶法测定上清液中的胆固醇; 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein,

LDL) 由公式 $LDL = TC - HDL - TG/5$ 得出; 免疫法测定载脂蛋白 A 和 B。

1.7 统计学处理

统计学分析采用 SPSS11.0 软件包, 组间基因型频率用 χ^2 检验, 组间血脂水平比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 载脂蛋白 A (Apo) 基因多态性分析

S19W 多态性扩增片段为 157 bp, 酶切后片段有 3 种, 为 157 bp、134 bp 和 23 bp。若为 56C/C, TaqI 酶切位点可见 134 bp 和 23 bp 两条带; 若为 56G/G, 则无 TaqI 酶切位点, 只有 157 bp 一条带; 若是 56C/G 杂合, 则见 157 bp、134 bp 和 23 bp 三条带。241 例个体全部为 56C/C 型, 无 56C/G 型 (图 1)。

SNP4 多态性扩增片段为 162 bp, 酶切后片段有 3 种, 为 162 bp、141 bp 和 21 bp。若为 C/C 基因纯合子, 则无 MspI 酶切位点, 只可见 162 bp 一条带; 若为 T/C 基因杂合子, 被 MspI 酶切后, 出现 162 bp 和 141 bp 两条带; 若是 T/T 基因纯合子, 被 MspI 酶切后, 则仅有 141 bp 一条带。在 241 例样本中, 该位点基因型以 T/C 型最多 (109 例, 45.2%), C/C 型次之 (78 例, 32.4%), T/T 型最少 (54 例, 22.4%), C 的频率大于 T (0.45:0.55, 图 2)。

2.2 载脂蛋白 A (Apo) 基因多态性与血浆脂质的关系

在 241 例样本中未发现 1 例 56C/G 杂合子, 无法对 S19W 多态性与血脂的关系进行统计分析。SNP4 位点的三种基因型中, 血浆 TG 在 T/C 基因型组最高, C/C 基因型组最低, 两者差异有显著性 ($P < 0.05$); LDL 水平也是 T/C 基因型组最高, T/T 基因型组次之, C/C 基因型组最低, 其中 T/C 型组与 C/C 型组及 T/T 型组比差异均有显著性 ($P < 0.05$); 而 HDL 水平自 T/C 型组、T/T 型组和 C/C 型组逐渐递减, 但三者间差异无统计学意义 (表 1)。

表 1. 载脂蛋白 A (Apo) 基因-12238T/C 位点多态性血脂比较 (mmol/L)

血脂	T/T 型	T/C 型	C/C 型
总胆固醇	4.40 ± 0.86	4.71 ± 1.10	4.50 ± 0.97
甘油三酯	1.63 ± 0.89 ^a	2.15 ± 1.52 ^b	1.41 ± 0.84
高密度脂蛋白	1.15 ± 0.32	1.16 ± 0.26	1.04 ± 0.27
低密度脂蛋白	2.44 ± 0.70 ^a	2.93 ± 0.84 ^b	2.37 ± 0.85
载脂蛋白 A	1.22 ± 0.40	1.19 ± 0.32	1.21 ± 0.34
载脂蛋白 B	1.10 ± 0.28	1.02 ± 0.25	1.10 ± 0.33

a 为 $P < 0.05$, 与 T/C 型比较; b 为 $P < 0.05$, 与 C/C 型比较。

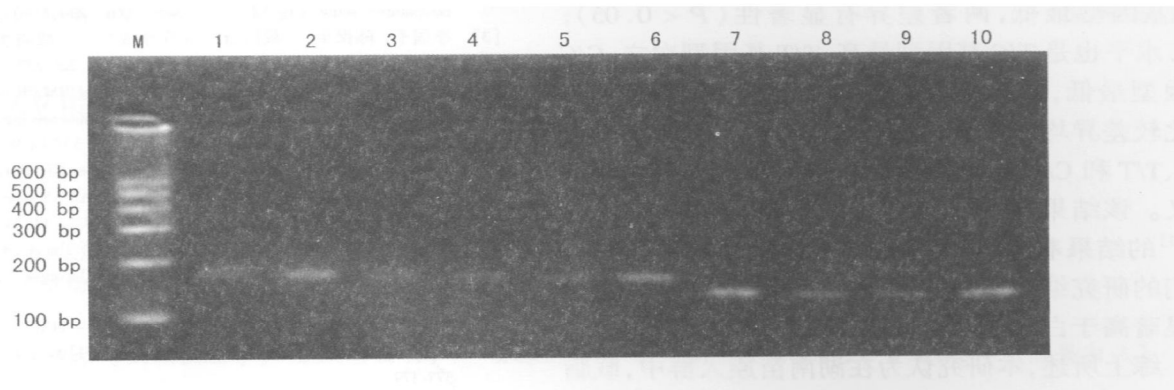


图 1. 载脂蛋白 A (Ⅱ)S19W 位点 PCR 扩增及酶切产物 1~6 为含 S19W 未做酶切的扩增产物, 产物长度为 157 bp; 7~10 为此位点的酶切产物, 产物长度为 134 bp, 还有一 23 bp 片段因分子量小, 已泳出胶外。

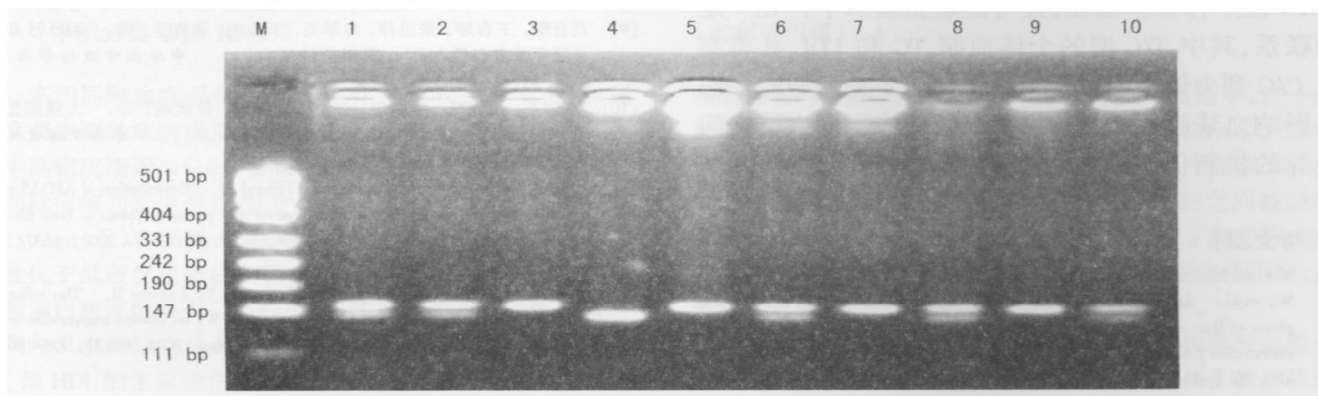


图 2. 载脂蛋白 A (Ⅱ)SNP4 位点 PCR 扩增及酶切产物 1、2、6、8、10 显示有 162 bp 和 141 bp 两条带, 为- 12238T/C 杂合子; 3、5、7、9 只显示有 162 bp 一条带, 为 C/C 纯合子; 4 只显示有 141 bp 一条带, 为 T/T 纯合子。21 bp 因分子量小, 已泳出胶外。

3 讨论

本研究采用传统的聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测方法, 该方法因成功率高、灵敏、花费低和操作简单等优点已得到广泛应用。为确保检测结果的真实性、客观性与可靠性, 电泳结果分别由两个研究人员独立判定, 然后把两个人的判定结果比较得出。载脂蛋白 A (Ⅱ)基因定位于 11 号染色体长臂 q23 区, 与载脂蛋白 A iv/C (Ⅳ)A (Ⅴ)基因簇紧密相连, 共同组成一个基因家族。载脂蛋白 A (Ⅱ)比 A (Ⅴ)有更高的球形疏水区, 容纳更多的 α 螺旋结构, 这预示载脂蛋白 A (Ⅱ)有更强表面排斥力和高脂质亲和力, 正是由于这种表面特性使载脂蛋白 A (Ⅱ)调控极低密度脂蛋白在肝脏内的装配和分泌, 从而影响 TG 水平。

近期在高加索人^[2]、白人^[11]和捷克斯洛伐克人^[12]中的研究表明载脂蛋白 A (Ⅱ)基因的 S19W 这一多态位点能明显影响血浆 TG 水平。而有关中国汉族人的研究发现 S19W 并非多态位点^[9,10]。本研究 241 例苗族个体中 S19W 位点都为 56C/C, 与前述研

究中的汉族人群类似, 可见 S19W 在苗族人群中也不是多态位点, 因此无法确立该位点对苗族人群血浆脂质的影响。这一结果明显不同于在高加索人、白人和捷克斯洛伐克人中的研究, 说明遗传背景的差异可能造成不同种族和不同地区间载脂蛋白 A (Ⅱ)基因多态性等位基因的分布存在明显差异。

Talmud 等^[5]在对 2 808 名欧洲健康中年男性筛查时发现载脂蛋白 A (Ⅱ)基因 SNP4 的 C 等位基因频率为 33.7%。与 T/T 基因型血浆 TG 水平相比, C/C 基因型血浆 TG 水平降低, 而 T/C 基因型却升高。Martin 等^[11]发现, 载脂蛋白 A (Ⅱ)基因 SNP4 位点多态性在父辈有心肌梗死史的健康个体与对照组中的分布频率无统计学差异, 对血浆 TG 水平无显著影响, 但 T/C 基因型与血浆总胆固醇水平和低密度脂蛋白胆固醇水平降低密切相关。本研究的 241 例苗族个体中, SNP4 位点存在多态性, 即有 T/T、T/C 和 C/C 三种基因型。基因型及等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡检验 ($P > 0.05$), 表明样本来自同一群体, 群体达到遗传平衡, 可代表所在地区的人群分布。三种基因型血浆 TG 水平 T/C 基因型最高,

C/C 基因型最低, 两者差异有显著性 ($P < 0.05$); LDL 水平也是 T/C 基因型最高, T/T 基因型次之, C/C 基因型最低, 其中 T/C 型与 C/C 型及 T/C 型及 T/T 型比较差异均有显著性 ($P < 0.05$); 而 HDL 水平自 T/C、T/T 和 C/C 逐渐递减, 但三者间差异无统计学意义。该结果与 Talmud 等^[5] 的结论类似, 与 Martin 等^[11] 的结果有差异, 可能与研究对象的不同有关。我们的研究结果还表明, 苗族人群等位基因 C 的频率显著高于白人(0.55 比 0.337, $P < 0.01$)。

综上所述, 本研究认为在湖南苗族人群中, 载脂蛋白 A 的基因 S19W 位点不存在多态性, 与血浆脂质无明确的关系, 这点与中国汉族人群一样。而 SNP4 位点存在多态性, 且与血浆脂质水平存在一定的联系, 其中 T/C 型的个体血浆 TG 和 LDL 显著高于 C/C 型个体。但对于载脂蛋白 A 的基因型的多态性影响血浆脂质的具体机制以及造成不同人群之间差异的机制仍不清楚, 有待进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] Van der Vliet HV, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(48): 44 512-520.
- [2] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by

comparative sequencing [J]. *Science*, 2001, **294**(5540): 169-173.

- [3] 李国平, 陈保生. 载脂蛋白家族新成员——载脂蛋白 A5 基因研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12**(2): 229-232.
- [4] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**(24): 3 031-038.
- [5] Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A3/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**(24): 3 039-046.
- [6] Nabika T, Nasreen S, Kobayash S, Masuda J. The genetic effect of the apoprotein A gene on the serum triglyceride level in Japanese [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **165**(2): 2 012-014.
- [7] Baum L, Tomlinson B, Thomas GN. APOA5 - 1131T> C polymorphism is associated with triglyceride levels in Chinese men [J]. *Clin Genet*, 2003, **63**(5): 377-379.
- [8] Endo K, Yanagi H, Araki J, Hirano C, Yamakawa Kobayashi K, Tomura S. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride leveling Japanese school children [J]. *Hum Genet*, 2002, **111**(6): 570-572.
- [9] 刘合琨, 王春婷, 张思仲, 肖翠英, 李雪飞, 张克兰, 等. APOA5 基因单核苷酸多态性与冠心病相关性研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2004, **21**(4): 335-338.
- [10] 李国平, 王建跃, 鄂盛恺, 张立军, 薛红, 曾武威, 等. 人载脂蛋白 A5 基因多态性 S6C-G 与血浆甘油三酯的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12**(5): 574-576.
- [11] Martin S, Nicand V, Humphries SE, Talmud PJ. Contribution of APOA5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2003, **1637**(3): 217-225.
- [12] Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Poledne R. The influence of APOAV polymorphisms (- 1131T-G and S19-W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction [J]. *Clin Genet*, 2004, **65**(2): 126-130.

(此文编辑 许雪梅)