

# 高胆固醇血症患者枯草溶菌素转化酶 9 基因突变研究

宋光耀<sup>1</sup>, 张明明<sup>2</sup>, 孙海娟<sup>3</sup>, 王俊明<sup>4</sup>, 帖彦清<sup>2</sup>, 郝志华<sup>3</sup>, 马倩<sup>2</sup>

(河北省人民医院 1. 内分泌科, 2. 检验科, 3. 整形外科, 4. 体检中心, 河北省石家庄市 050051)

[关键词] 高胆固醇血症; 基因多态性; 枯草溶菌素转化酶 9

[摘要] **目的** 探讨国人单纯性高胆固醇血症患者人类枯草溶菌素转化酶 9 基因突变情况。**方法** 排除载脂蛋白 B100 基因 Q3500R 位点突变及低密度脂蛋白受体基因突变后的 100 例单纯性高胆固醇血症患者, 提取其基因组 DNA, 采用聚合酶链反应方法扩增枯草溶菌素转化酶 9 基因的 12 个外显子, 进行 DNA 测序分析, 同时选 100 例健康人群作为对照。**结果** 100 例高胆固醇血症患者中, 6 例发现 3 处错义突变 (D320N、V312F、R319E)、1 处框移突变 (934delGV312S)、3 处同义突变 (A305A、Q342Q、K125K) 和 1 处剪接点突变 (第 2 内含子 5' 剪接位点突变)。**结论** 枯草溶菌素转化酶 9 基因在以上位点发生的突变可引起单纯性高胆固醇血症。枯草溶菌素转化酶 9 基因突变可能与国人高胆固醇血症有关。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

## Research of Gene Mutation of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 in Hypercholesterolemia

SONG Guang-Yao<sup>1</sup>, ZHANG Ming-Ming<sup>2</sup>, SUN Hai-Juan<sup>3</sup>, WANG Jun-Ming<sup>4</sup>, TIE Yan-Qing<sup>2</sup>, HAO Zhi-Hua<sup>3</sup>, and MA Qian<sup>2</sup>

(1. Department of Endocrinology, 2. Department of Medical Laboratory, 3. Plastic Surgery, 4. Department of Medical Centre, The People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

[KEY WORDS] Hypercholesterolemia; Gene Polymorphism; Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9

[ABSTRACT] **Aim** To investigate proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) gene mutations in Chinese with hypercholesterolemia. **Methods** Genomic DNA was extracted from 100 cases of hypercholesterolemia and 100 healthy normal individuals with age and sex matched. Apolipoprotein B100 (Apo B100) and low density lipoprotein receptor (LDLR) mutations were excluded. All of the 12 exons of PCSK9 gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were sequenced directly. **Results** Three missense mutation (D320N, V312F and R319E), one frameshift mutation (934delGV312S), three samesense mutation (A305A, Q342Q, K125K) and one splice junction mutation (5' splice junction site mutation in intron 2) were found in PCSK9 gene in six patients among 100 patients. **Conclusion** The mutations of PCSK9 gene are maybe one reason to cause Chinese hypercholesterolemia.

心脑血管疾病是对人类危险最大的一类疾病, 血脂异常, 尤其是高胆固醇血症已经成为它的独立危险因素。虽然目前降低胆固醇的药物很多, 如他汀类, 也只是对轻度升高的患者效果明显, 其原因是血中胆固醇的升高受饮食影响较小, 而与体内生成增加或排泄减少有关, 与胆固醇代谢有关的酶与蛋白的活性和基因突变有关。因此了解影响胆固

醇代谢相关的基因突变对于早期防治动脉硬化有重要意义。新近研究发现人类枯草溶菌素转化酶 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9, PCSK9) 是与高胆固醇血症有关的基因<sup>[1,2]</sup>, 但国内研究较少。本研究为寻找 PCSK9 基因突变与高胆固醇血症发生发展相关的证据, 采用直接测序的方法对 100 例排除低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein rece-

[收稿日期] 2010-08-26

[基金项目] 河北省科技厅科技支撑项目 (10276105D-57)

[作者简介] 宋光耀, 硕士, 教授, 研究方向为脂代谢疾病的基础与临床, E-mail 为 sguangyao@sohu.com。张明明, 博士, 主管检验师, 研究方向为血脂异常的分子生物学机制, E-mail 为 zhangmm197612@126.com。孙海娟, 主管护师, 研究方向为血脂异常的护理, E-mail 为 yangyongjun1998@163.com。

ptor, LDLR) 和载脂蛋白 B100 (Apolipoprotein B100, Apo B100) 基因突变的高胆固醇血症患者 PCSK9 基因的 12 个外显子进行筛查, 以期发现新的突变位点, 为揭示高胆固醇血症与 PCSK9 基因突变之间的关系提供遗传学依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

从 1 300 例来自我院体检中心的高胆固醇血症患者, 按照我们前期的研究方法<sup>[1]</sup>对 Apo B100 基因 Q3500R 位点突变检测和 LDLR 基因启动子及 18 个外显子直接测序, 从中筛选出上述 2 种基因未发现突变的 100 例高胆固醇血症 (hypercholesterolemia, HC) 患者。血脂水平符合 2007 年《中国成人血脂异常防治指南》<sup>[3]</sup>高胆固醇血症的诊断标准, 年龄 27~58 岁, 平均年龄  $43.92 \pm 11.60$  岁, 男 61 例、女 39 例。同法筛选健康对照组 100 人, 性别、年龄匹配。所有研究对象经血、尿、便常规、心电图、B 超等检查均未发现异常。且所有受试对象均除外甲状腺功能亢进症、甲状腺机能减退、慢性肝病、糖尿病、糖尿病肾病、肾病综合征、肾移植术后等影响脂类代谢的疾病, 排除应用影响糖脂代谢药物者。

### 1.2 一般指标测量

测量身高、体重、腰围和血压, 计算体质指数 (body mass index, BMI) = 体重 (kg) / 身高<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)。

### 1.3 血脂测定

高胆固醇血症患者及正常对照者空腹 12 h 后抽取肘静脉血, 留取 4 mL 置于促凝管中, 分离血清待测血脂; 另取 4 mL 置于 EDTA 抗凝管中, -80℃ 保存, 用于提取 DNA。总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 采用酶法, 由 Beckman 全自动生化分析仪测得, 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 按 Friedwald 公式计算得出,  $LDLC = TC - (HDLC + TG/2.2)$ 。

### 1.4 血液基因组 DNA 的提取

EDTA 抗凝血 400  $\mu$ L, 按照天根 TIANap Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 说明书提取患者基因组 DNA。

### 1.5 枯草溶菌素转化酶 9 基因核苷酸序列分析

将 100 名高胆固醇血症患者及 100 名正常对照者采用降落 PCR 技术<sup>[4]</sup>对 PCSK9 基因 12 个外显子进行扩增, 引物设计采用生物学软件 Primer 5.0, 并与 GenBank 进行比对 (表 1)。PCR 反应体系: DNA 模板 1  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, KOD plus 0.5  $\mu$ L, Buffer 2  $\mu$ L, dNTP Mixture 1  $\mu$ L, 双蒸水 13.5  $\mu$ L。PCR 扩增产物纯化后直接测序。为保证测序结果的可靠性, 均双向测序。测定结果用 DNAMAN 软件与 GenBank 公布的 PCSK9 基因序列进行比对。

表 1. 扩增 PCSK9 基因的 12 对引物

Table 1. 12 pairs of primers for PCSK9 gene exon

外显子	5'端引物序列(5'→3')	3'端引物序列(5'→3')	片段长度
1	GGCGTGGACCGCGCACGGCCTCTAGG	CCGCACCGTCCC GGCTGCGGGTTCG	323 bp
2	TTTGCTGGGTTTCTTCCATGTCATC	CAGTGGCCCAGCCCTATCAGGAAGT	291 bp
3	GGGACAAGGTGGGAGGCTGCTGGGCTGG	CCAGGGCAGAGCAAATGGATTCAGC	316 bp
4	TCCCTCCTCTCCACAAATGTGCC	GCAGCCCTCCCATCAGACGGCCGTG	197 bp
5	TTTCATGTGGTCTTGTGTTTCGTT	CAGGTCCAGATGGAGAGAGACCAGC	217 bp
6	CAAGGGGTGACCTTGGCTTTGTTCC	GCCCCTCTCCCCTCCGCCCTCCGCC	298 bp
7	CTGCCACCCACCTCCTCACCTTTCC	GTGGCCGGAGGCAGTGGGGTGGTGAC	240 bp
8	GGGCCGGGCCATCACCATCTTTACAC	CCAGCCTGGACTTGCCCACCCTGCC	253 bp
9	ACTCCCAGCACCCCTCCTCATCCC	GGTCCCTGAGGGCCAGCACTGAC	283 bp
10	AGCAGATTCCTATTTCCGCTTTTGA	GTGGGTGCATAAGGAGAAAGAGAC	268 bp
11	ACGGAGCATCCCAGCATTTTCACATC	GCAGGAGAGACACGCAGCACCCAC	282 bp
12	CGCTAGACATGTGCTTCTTTTCTCT	GGAGGCACCCAGACTGAGTGAGTTC	453 bp

## 2 结果

### 2.1 血脂水平

筛选出的高胆固醇血症患者与正常对照者血脂水平比较,总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平明显升高(表 2)。

### 2.2 枯草溶菌素转化酶 9 基因突变检测情况

本研究共分析 PCSK9 基因的 12 个外显子,其中在 6 名患者中发现 PCSK9 基因的变异(表 3)。第 72 号患者第 958 位核苷酸存在 G→A 错义突变,导致第 6 外显子第 320 位天冬氨酸被天冬酰胺取代(D320N)(图 1);第 42 号患者第 934 位核苷酸存在

G→T 错义突变,导致第 6 外显子第 312 位缬氨酸被苯丙氨酸取代(V312F)(图 2);第 29 号患者第 934 位核苷酸缺失,出现移码突变,导致第 6 外显子第 312 位缬氨酸被丝氨酸取代(934delGV312S),同时第 957 位核苷酸存在 G→A 错义突变,导致第 6 外显子第 319 位精氨酸被谷氨酸取代(R319E)(图 3)。第 66 号患者第 915 位单核苷酸 A 被 G 取代(A305A),第 83 号患者第 1026 位单核苷酸 A 被 G 取代(Q342Q),第 75 号患者第 375 位单核苷酸 G 被 A 取代(K125K),但均无氨基酸改变。同时在第 2 内含子的第 2 位单核苷酸 T 被 G 取代(图 4~6)。正常对照组中未发现 PCSK9 基因的突变。

表 2. 高胆固醇血症患者与正常对照者临床资料对比

Table 2. Comparison of clinical data between hypercholesterolemia group and normal control group

分 组	例数	年龄(岁)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)
HC 组	100	43.92 ± 11.60	9.66 ± 1.22 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.28	1.30 ± 0.51	7.90 ± 1.29 <sup>a</sup>
正常对照组	100	42.10 ± 9.83	4.32 ± 1.04	1.01 ± 0.27	1.35 ± 0.56	2.31 ± 0.73

a 为 P < 0.05,与正常对照组比较。

表 3. 高胆固醇血症患者中发现的基因突变

Table 3. The gene mutation found in 100 hypercholesterolemia patients and 100 normal controls

患者 序号	性别	年龄	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	外显子	核苷酸 序号	突变	突变类型	突变	既往史	家族史	报道病例
72	男	39	13.34	1.40	0.87	11.83	6	958	G to A	错义突变	D320N	高血压	父高血压	未报道
42	女	35	12.05	1.18	0.94	10.57	6	934	G to T	错义突变	V312F	无	父高血脂	未报道
29	男	27	13.56	1.04	0.79	12.30	6	934	Del G	缺失	V312S	无	母冠心病	未报道
29	男	27	13.56	1.04	0.79	12.30	6	957	G to A	错义突变	R319E	无	母冠心病	未报道
66	男	46	8.12	1.19	0.98	6.60	6	915	A to G	同义突变	A305A	胆囊炎	—	未报道
83	男	33	9.01	1.52	0.87	7.45	7	1026	A to G	同义突变	Q342Q	无	—	未报道
75	男	40	8.76	1.38	0.96	7.17	2	375	G to A	同义突变	K125K	无	—	未报道
75	男	40	8.76	1.38	0.96	7.17	内含子 2		T to G	剪接突变		无	—	未报道

TG CCGGCAACTT CCGGG ACGATGCCTGCCTC  
TG CCGGCAACTT CCGGA ACGATGCCTGCCTC

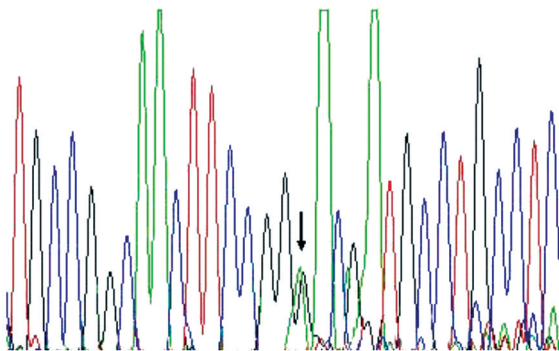


图 1. 72 号患者外显子 6 的 DNA 序列 发现了一个错义突变 Asp320Asn(c. 958G > A, D320N)。

Figure 1. The DNA sequencing result of exon 6 in No. 72 patient

G G G G T C G T G C T G G T C A C C G C T G  
G G G G T C G T G C T G T T C A C C G C T G

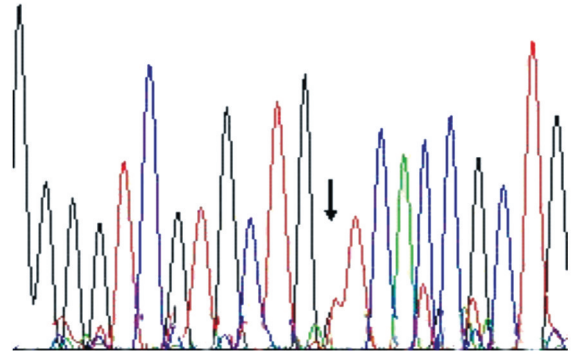


图 2. 42 号患者外显子 6 的 DNA 序列 发现了一个错义突变 Val312Phe(c. 934G > T, V312F)。

Figure 2. The DNA sequencing result of exon 6 in No. 42 patient

GGGTCGTGCTGGTCACCGCTGCCGGCAACTTCCGGGACGATG  
GGGTCGTGCTG TCACCGCTGCCGGCAACTTCCGAGACGATG

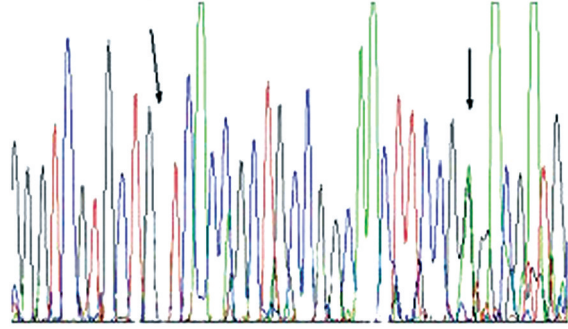


图3. 29号患者外显子6的DNA序列 发现了一个移码突变 Val312Ger (c. 934delG) 和一个错义突变 Arg319Glu (c. 957G > A, R319E)。

Figure 3. The DNA sequencing result of exon 6 in No. 29 patient

GCGTCCTCAACGCGCCTGCCAGCGCCTGGCAAGGGCT  
GCGTCCTCAACGCGCCTGCCAGCGCCTGGCGAAGGGCT

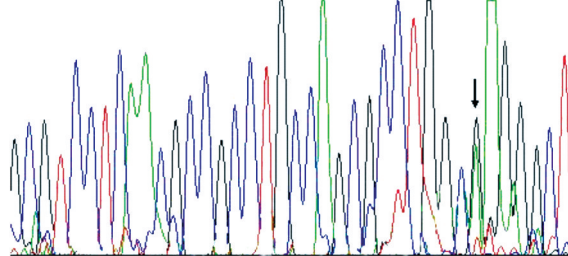


图4. 66号患者外显子6的DNA序列 发现了一个同义突变 Gla305Gla (c. 915A > G, A305A)。

Figure 4. The DNA sequencing result of exon 6 in No. 66 patient

C C A A T G C C C A A G A C C A G C C G G  
C C A A T G C C C A G G A C C A G C C G G

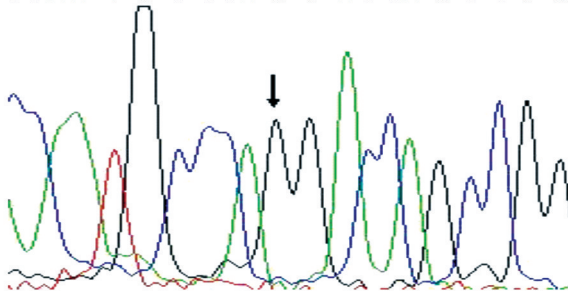


图5. 83号患者外显子7的DNA序列 发现了一个同义突变 Gln342Gln (c. 1026A > G, Q342Q)。

Figure 5. The DNA sequencing result of exon 7 in No. 83 patient

### 3 讨论

高胆固醇血症的发病率逐年升高,已成为心脑血管疾病独立危险因素之一,且在人群中的分布越

TCCTGGTGAAGATGAGTGGCGACCTGCTGGAGCTGGTGAGCCA  
TCCTGGTGAAAATGAGTGGCGACCTGCTGGAGCTGGGGAGCCA

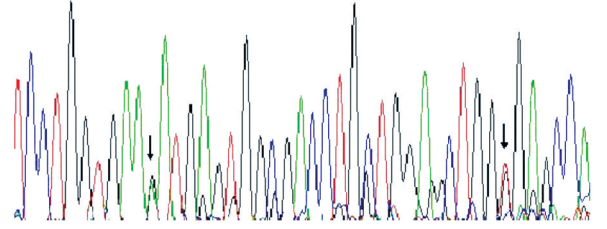


图6. 75号患者外显子2和内含子2的DNA序列 发现了外显子2一个同义突变 Lys125Lys (c. 375G > A, K125K) 和内含子2的一个剪接点突变(第2内含子的第2位单核苷酸T被G取代)。

Figure 6. The DNA sequencing result of exon 2 in No. 75 patient

来越趋向于中青年人<sup>[5]</sup>,因此高胆固醇血症的相关研究已成为当前的热点,其发病与遗传及环境因素均有关。由于载脂蛋白 Apo B100-3500 突变及 LDLR 基因突变可引起与 PCSK9 基因突变相似的表现型(高胆固醇血症)<sup>[6-8]</sup>,因此本研究采用我们前期的研究方法<sup>[1]</sup>对 1 300 例高胆固醇血症患者筛查了 Apo B100-3500 突变及 LDLR 基因启动子和 18 个外显子的表达,将其中 100 例无突变位点的患者作为研究对象。

PCSK9 主要表达于肝脏,基因定位于 1p33 ~ p34.4,共有 12 个外显子,cDNA 全长 3 617 个碱基,编码含 692 个氨基酸残基的蛋白质。其蛋白初合成时为可溶性的酶原状态,在内质网经过分子内自身催化,在特异性作用位点(Y,I)VV(V,L)(L,M)↓基序处发生断裂,前片段的断裂对于 NARC-1 从内质网的脱离十分重要<sup>[9]</sup>,可参与肝再生和神经分化,负调节 LDLR,使血液中 LDL 不能被清除而导致高胆固醇血症,对细胞内胆固醇的代谢起着很大的作用<sup>[10]</sup>,是血浆胆固醇代谢的主要调节因子之一。

人类 PCSK9 基因存在多种序列变异,这些变异导致机体呈现不同的表型。PCSK9 基因突变与血浆胆固醇水平之间的关系国外已有报道,PCSK9 第 1 内含子 C(-161)T 与第 9 外显子 I474V 多态性<sup>[11]</sup>,第 2 外显子 S127R<sup>[12]</sup>、第 4 外显子 F216L<sup>[13]</sup>、第 7 外显子 D374Y<sup>[12]</sup>、第 12 外显子 E670G<sup>[14]</sup>与高胆固醇血症密切相关。国内报道的 PCSK9 基因突变尚少见,蔺洁<sup>[15]</sup>在家族性高胆固醇血症患者检测到 PCSK9 基因 R306S 错义突变,认为该突变可能引发 PCSK9 功能增强,进而导致患儿 LDLR 代谢异常并出现心血管系统早发动脉硬化。

本研究在 100 例高胆固醇血症患者的基因组中共发现了 3 处错义突变、1 处框移突变、3 个同义突变

和 1 处剪接点突变;同时还发现了 3 种同义突变。其中 D320N、934delGV312F、934delGV312S 和 R319E 突变均是在高胆固醇血症患者中发现的,可见它们与血浆 TC、LDLC 的升高密切相关,可以推断这几种错义突变可能引发 PCSK9 功能增强,进而导致 LDLR 代谢异常,血浆中胆固醇水平升高,迄今国内外均未报道过这几个突变位点;这 4 种突变中其中有 3 处为点突变,只有 1 处为缺失突变,导致移码。点突变的比例占到了 75%,这与国外有关 PCSK9 基因突变也以点突变为主的现状是吻合的。而且发生突变的 3 名患者中,有 2 名为男性,其中 1 名男性的 PCSK9 基因中发现 2 处突变。这与 Mayne 等<sup>[16]</sup>的研究有相似之处,推测与所选样本的种类、男女体内激素水平的不同有关。另外在发现的这 4 处突变中均发生在第 6 外显子,由此可见第 6 外显子是突变的高发区域,第 6 外显子位于催化域,基因突变改变了该区域的空间构象,从而改变了 PCSK9 的正常功能。本研究中还发现了 3 种同义突变,即 A305A、Q342Q、K125K,引起血浆胆固醇水平中等程度的升高。其中携带 K125K 同义突变的 75 号患者在第 2 内含子发现 5 剪接供体位点突变 T→G,该位点位于内含子中,从理论上讲其遗传变异不影响 PCSK9 的氨基酸序列,不可能是功能性变异,它可能影响外显子的剪接,使未成熟的 mRNA 剪接时第 2 内含子全部或部分保留在成熟 mRNA 中,从而影响基因的编码序列<sup>[11]</sup>,但具体的作用机制还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 张明明,宋光耀,张新,等. LDL 受体基因第 4 外显子 XspI 位点多态性与高胆固醇血症的相关性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2009, 25(1): 49-51.
- [2] 刘舒,蔺洁,王绿娅,等. 家族性高胆固醇血症新致病基因——枯草溶菌素转化酶 9 的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(3): 260-262.
- [3] 中国成人血脂异常防治指南制定联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中华心血管杂志, 2007, 35(5): 390-409.
- [4] 王绿娅,曹守春,蔺洁,等. 降落聚合酶链反应技术在低密度脂蛋白受体基因点突变研究中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(7): 403-406.
- [5] 钱伟,钱志远. 高胆固醇血症的危害与现行对策[J]. 实用预防医学, 2009, 16(2): 632-634.
- [6] Soria F, Ludwig EH, Clarke HRG, et al. Association between a specific apolipoprotein B and familial defective apolipoprotein B-100[J]. Proc Natl Acad Sci SA, 1989, 86(2): 587-591.
- [7] Chiou KR, Charng KJ, Chang HM, et al. Array-based resequencing for mutations causing familial hypercholesterolemia[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(2): 383-389.
- [8] Mabuchi H, Nohara A, Noguchi T, et al. Molecular genetic epidemiology of homozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan [J]. Atherosclerosis, 2011, 214(2): 404-407.
- [9] Cao G, Qian YW, Kowala MC, et al. Further LDL cholesterol lowering through targeting PCSK9 for coronary artery disease[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2008, 8(4): 238-243.
- [10] 刘录山,程艳丽,谢闵,等. LDL、ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞 PCSK9、LDLR 表达的影响研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(5): 540-547.
- [11] Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, et al. Genetic variants in PCSK9 affect the cholesterol level in Japanese [J]. J Hum Genet, 2004, 49(2): 109-114.
- [12] Pandit S, Wisniewski D, Santoro JC, et al. Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia[J]. J Lipid Res, 2008, 49(6): 1333-1343.
- [13] Nassoury N, Blasiolo DA, Tebon Oler A, et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR[J]. Traffic, 2007, 8(6): 718-732.
- [14] Evans D, Beil FU. The E670G SNP in the PCSK9 gene is associated with polygenic hypercholesterolemia in men but not in women[J]. BMC Med Genet, 2006, 31(7): 66.
- [15] 蔺洁,王绿娅,夏军辉,等. 家族性高胆固醇血症患者新的致病基因——PCSK9 基因突变分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(7): 518.
- [16] Mayne J, Raymond A, Chaplin A, et al. Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(2): 451-456.

(此文编辑 曾学清)