

低密度脂蛋白受体基因型检测及其应用

郑芳 周新 鲁敏翔 胡波

(湖北医科大学附属第二医院检验科, 武汉 430071)

主题词 受体, 低密度脂蛋白; 载脂蛋白 E; 基因型; 多态性, 限制片长; 聚合酶链反应; 高胆固醇血症; 患者

摘要 为分析低密度脂蛋白受体基因多态性对血脂水平的影响, 用聚合酶链反应—限制片长多态性技术检测了 81 例血脂正常者和 51 例高胆固醇血症患者的低密度脂蛋白受体、载脂蛋白 E 基因型, 并测定其血清脂质水平。结果表明“+”等位基因与高总胆固醇和高低密度脂蛋白胆固醇有关。在同一载脂蛋白 E 基因型背景下, 低密度脂蛋白受体基因多态性对血脂水平影响模式不变。结果提示, 低密度脂蛋白受体基因多态性影响人群的血清胆固醇水平, 低密度脂蛋白受体和载脂蛋白 E 基因多态性可能是相互独立地影响血脂水平。

A Method for Low Density Lipoprotein Receptor Genotype

ZHENG Fang, ZHOU Xin, LU Min-Xiang and HU Bo

(Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

MeSH Receptors, LDL; apolipoprotein E; Genotype; Polymorphism, Restriction Fragment Length; Polymerase Chain Reaction; Hypercholesterolemia; Patients

ABSTRACT **Aim** To establish a method for low density lipoprotein receptor (LDLR) genotyping and research the relationship between genetic polymorphism of LDLR and variation in serum lipid levels. **Methods** The frequency distribution of LDLR, apo E genotypes and alleles were analysed in the method for LDLR, apo E genotyping using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), in samples of 81 unrelated normallipidaemic individuals and 51 hypercholesterolemia patients. And to examine the interaction effect on lipid level between the LDLR/Ava II and apolipoprotein E polymorphisms. **Results** There is a significant relationship between “+” allele and high total cholesterol, LDL cholesterol levels. The apo E 3/2 and LDLR Ava II (—/—) individual's cholesterol level was lower than apo E 4/3 and LDLR Ava II (+/+) individual's. **Conclusions** The present study suggests that the LDLR polymorphism may be associated with interindividual variation in plasma cholesterol level. The effects of apo E and LDLR genes on cholesterol levels were independent from each other.

低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)是一种细胞介导低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的摄取和代谢的跨膜糖蛋白。

参与脂代谢的基因多态性会影响普通人群血脂水平的变化, 决定了人群对动脉粥样硬化的易感性或抵抗性。已知载脂蛋白 E (apolipoprotein E, Apo E)、LDLR 基因多态性均会影响人群中的血脂水平^[1,2], 其中 LDLR 基因 Pvu II 位点多态性和血脂水平的关系已在多个人群中得到证实^[2]。最近国外报导, LDLR 基因外显子 13 Ava II 位点 RFLP 和普通人群中的血脂水平有显著关系^[3]。

本文用聚合酶链式反应—限制片长多态性 (polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism, PCR—RFLP) 技术检测了湖北地区 81 名健康汉族人和 51 例高胆固醇血症患者

LDLR 基因 Ava II 位点 RFLPs 和载脂蛋白 E 基因型, 以探讨 LDLR 基因多态性与血脂水平的关系, 并分析载脂蛋白 E 基因多态性和 LDLR 基因多态性共同影响血脂水平的作用方式。

1 材料和方法

1.1 研究对象

正常血脂者 81 例 (TC < 5.20 mmol/L, TG < 1.70 mmol/L, LDLC < 3.12 mmol/L, HDLC > 1.04 mmol/L, 脂蛋白(a) < 3 g/L), 均为随机选自体检健康者。其中男性 44 例, 女性 37 例, 平均年龄 50.1 ± 11.3 岁。高胆固醇血症患者 51 例 (TC > 5.72 mmol/L, TG > 1.70 mmol/L, LDLC > 3.64 mmol/L, 脂蛋白(a) > 3 g/L), 均为湖北医科大学附属第二医院门诊及住院部患者。其中男性 23 例, 女性 28 例, 平均年龄 56.4 ± 13.5 岁。以上受检者均为无血缘关系的

湖北地区汉族人,并排除肝、肾、内分泌等影响脂质代谢的疾病。

1.2 引物设计与合成

参照文献[3]设计一对扩增 LDLR 基因的引物,序列为 P1: 5'-GTC ATC TTC CTT GCT GCC TCT TTA G-3', P2: 5'-GTT TCC ACA AGG AGG TTA CAA GGT T-3'。参照文献[4]报道设计一对扩增载脂蛋白 E 基因的引物,序列为 P3: 5'-AAC AAC TGA CCC CGC TGG CG-3', P4: 5'-ATG GCG CTG AGC CCG CGC TC-3'。

1.3 多聚酶链式反应—限制片长多态性分析

采用碘化钠法^[4],提取模板 DNA。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)总体系为50 μ L,含10 \times buffer 5 μ L,dNTPs 各200 μ mol/L。基因组 DNA 0.5 μ g。Taq 酶2 u。加入引物 P1和 P2 15 pmol(0.3 μ mol/L),用于扩增 LDLR 基因。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 68 $^{\circ}$ C 2 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min,循环28次,末次循环后延伸5 min。加入引物 P3和 P4 30 pmol(0.6 μ mol/L)用于扩增载脂蛋白 E 基因。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 12 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 3 min,循环5次;然后94 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 65 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min,循环30次;末次循环后延伸10 min。

低密度脂蛋白受体(LDLR)基因扩增产物用Ava II 内切酶消化,以复华小分子量 Marker 为DNA 分子量标准,用2%琼脂糖电泳鉴定。载脂蛋白 E 基因扩增产物用Hha I 内切酶消化,经10%聚丙烯酰胺电泳鉴定,以pBR 322 DNA/Hae III Marker 为DNA 分子量标准。EB 染色后,紫外灯下可见: ϵ 2/2出现3条带(91 bp, 83 bp, 61 bp), ϵ 3/2出现5条带(91 bp, 83 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp), ϵ 3/3出现4条带(91 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp), ϵ 4/2出现6条带(91 bp, 83 bp, 72 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp), ϵ 4/3出现5条带(91 bp, 72 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp), ϵ 4/4 出现 4 条 带 (72 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp)。

1.4 血脂及载脂蛋白的测定

用酶法测定 TC 和 TG;选择遮蔽直接测定法测定 HDLC;直接测定法测定 LDLC;载脂蛋白 A I、载脂蛋白 B 及脂蛋白(a)用双波长免疫透射比浊法测定。

1.5 统计学处理

基因型及等位基因频率比较用 u 检验、 χ^2 检验;组间血脂水平比较采用 F 检验;所选标本是否符合 Hardy—Weiberg 遗传平衡用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白受体基因外显子13 Ava II 酶切片段

低密度脂蛋白基因外显子13 Ava II 酶切片段有3种,片段大小分别为228 bp、141 bp、87 bp。等位基因如有Ava II 酶切位点,得到141 bp 和87 bp 酶切片段,即等位基因Ava II (+);无Ava II 酶切位点的等位基因为228 bp 的条带,即等位基因Ava II (—)。据此分析,基因型有3种Ava II (—/—)、Ava II (+/—)、Ava II (+/+),见图1(Figure 1)。

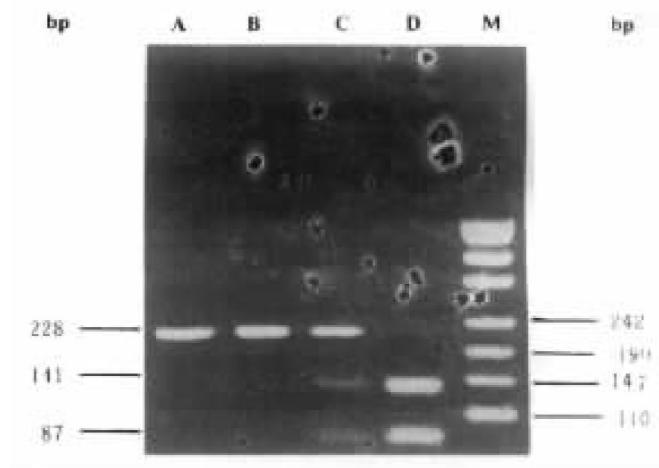


图1. 低密度脂蛋白受体基因外显子13 Ava II 限制片长多态性

Figure 1. RFLP patterns of the PCR products digested with Ava II. M: FuHua small Markers; A: PCR product; B: Ava II (—/—); C: Ava II (+/—); D: Ava II (+/+).

2.2 低密度脂蛋白受体基因多态性分析

正常血脂者与高胆固醇血症患者 LDLR 基因型及等位基因频率的比较见表1 (Table 1)。

表1. 正常血脂者与高胆固醇血症患者低密度脂蛋白受体基因型及等位基因频率比较(%)

Table 1. Comparison of polymorphic LDLR gene frequencies between control group and hypercholesterolemia group

Groups	n	frequency of genotype			frequency of allele	
		—/—	—/+	+/+	—	+
Control	81	0.568	0.383	0.049	0.759	0.241
HC	51	0.353 ^a	0.588 ^a	0.059	0.647 ^a	0.353 ^a

a: $P<0.05$, compared with control group.

2.3 载脂蛋白 E 基因型多态性分析

本群体载脂蛋白 E 基因型分布符合 Hardy—Weiberg 遗传平衡,具群体代表性(表2,Table 2)。

表2. 正常血脂者与高胆固醇血症患者载脂蛋白 E 基因型及等位基因频率的比较(%)

Groups	n	frequency of genotype						frequency of allele		
		ε2/2	ε3/2	ε3/3	ε4/2	ε4/3	ε4/4	ε2	ε3	ε4
Control	81	0	14.8	69.1	3.7	12.3	0	9.3	82.7	8.0
HC	51	0	15.7	51.0 ^a	2.0	29.4 ^a	2.0	8.8	13.5	17.6 ^a

a: $P<0.05$, compared with control group.

2.4 低密度脂蛋白受体基因多态性与血清脂质水平的关系

由表3(Table 3)可见,正常血脂者 TC、LDLC 的均值在 LDLR Ava II (-/-)、Ava II (+/-)、Ava II (++)基因型个体中有渐升的趋势,但无统计学意义。

表3. 正常血脂者不同低密度脂蛋白受体基因型间血脂水平的比较

Table 3. Lipid values of quantitative variables among LDLR/Ava II genotypes in normal person ($\bar{x}\pm s$)

Index	-/- (n=46)	+/- (n=31)	++ (n=4)
TC (mmol/L)	4.06±0.68	4.17±0.81	4.47±0.35
TG (mmol/L)	1.11±0.57	1.15±0.36	1.04±0.24
Lp(a) (mmol/L)	15.42±1.88	15.38±1.97	20.09±1.77
HDLc (mmol/L)	1.20±0.32	1.19±0.36	1.19±0.11
LDLC (mmol/L)	2.35±0.67	2.39±0.66	2.87±0.30
Apo A I (g/L)	1.26±0.09	1.24±0.09	1.24±0.08
Apo B (g/L)	0.93±0.19	0.86±0.19	0.94±0.20
A I /B	1.14±0.25	1.52±0.45	1.37±0.30

由表4(Table 4)可见,高胆固醇血症患者 TC、LDLC 的均值在 Ava II (-/-)和 Ava II (+/-)、Ava II (++)基因型个体中也有渐升的趋势,且组间比较有统计学意义($P<0.05$)。

表4. 高胆固醇血症患者不同 LDLR 基因型间血脂水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4. Lipid values of quantitative variables among LDLR/Ava II genotypes in hypercholesterolemia patients

Index	-/- (n=18)	+/- (n=30)	++ (n=3)
TC (mmol/L)	6.44±0.37	6.80±0.86 ^a	8.12±1.03 ^a
TG (mmol/L)	1.86±0.84	2.36±1.25	3.44±1.12
Lp(a) (mmol/L)	165.6±22.5	182.0±19.2	167.9±1.32
HDLc (mmol/L)	1.33±0.43	1.14±0.29	1.23±0.44
LDLC (mmol/L)	3.90±1.25	4.76±1.09	5.33±1.12
Apo A I (g/L)	1.29±0.19	1.29±0.41	1.47±0.30
Apo B (g/L)	1.24±0.26	1.35±0.34	1.45±0.20
A I /B	1.08±0.27	1.00±0.33	1.03±0.29

a: $P<0.05$, compared among the LDLR/Ava II genotypes.

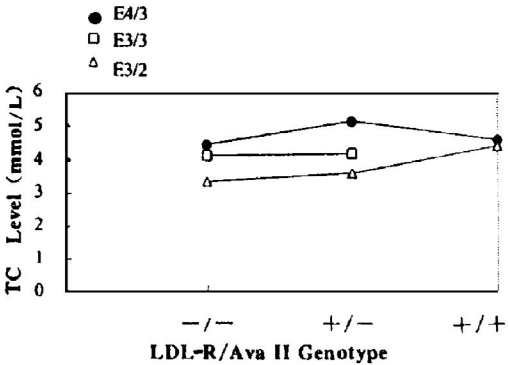


图2. 正常血脂者 LDLR/Ava II 和载脂蛋白 E 基因型总胆固醇均值

Figure 2. Group means for TC levels by LDLR/Ava II and apo E genotypes in normal persons

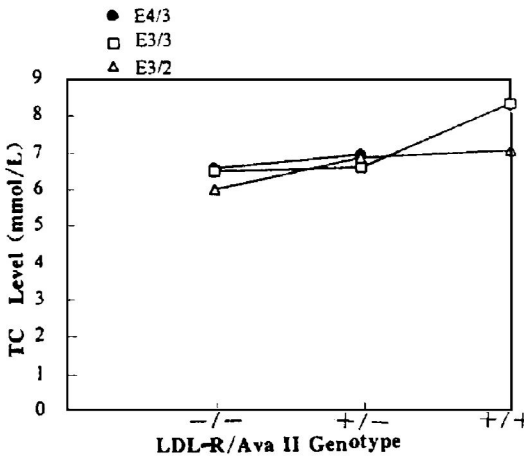


图3. 高胆固醇血症组 LDLR/Ava II 和载脂蛋白 E 基因亚型总胆固醇均值

Figure 3. Group means for TC levels by LDLR/Ava II and Apo E genotypes in hypercholesterolemia patients

2.5 低密度脂蛋白和载脂蛋白 E 基因多态性对血脂水平影响的相互作用

为了确定载脂蛋白 E 基因和 LDLR 基因对胆固醇水平是否联合发生作用。本文观察了载脂蛋白 E 三种常见基因型 (ε3/2、ε3/3 和 ε4/3) 背景下, LDLR 基因型 Ava II (-/-)和 Ava II (+/-)、Ave II (++)的血清总胆固醇均值。发现 Ava II (-/-)基因型合并 ε3/2基因型的个体具有最低的胆固

醇值,而Ava II(+ / +)基因型合并 ϵ 4/3基因型的个体有最高的胆固醇值(图2和图3, Figure 2 and Figure 3)。

3 讨论

本文建立了用PCR-RFLP检测LDLR基因型的方法,并用此法研究LDLR基因酶切多态性和血清脂质水平的关系。用以上方法检测了51例高胆固醇血症患者和81例正常血脂者LDLR基因多态性。结果发现,LDLR基因酶切多态性和人群中胆固醇水平差异显著相关。其中,Ava II(+)等位基因与高TC、高LDLC水平有关,Ava II(-)等位基因与低TC、低LDLC水平相关。TC、LDLC相对基因型由“- / -”、“+ / -”向“+ / +”型变化有递增的趋势。这一递增趋势在正常血脂组中无统计学意义,但在高胆固醇血症组中有统计学意义,而且高胆固醇血症组Ava II(+)等位基因频率显著高于正常血脂组。这可能是因为样本例数不够多所致。但这些结果都已提示参与胆固醇代谢的LDLR基因的普遍多态性会影响人群的血清胆固醇水平。基因多态性影响血脂水平的原因是Ava II和Pvu II位点连锁导致基因共同作用影响血脂水平,还是LDLR不同等位基因和载脂蛋白E不同等位基因间相互作用所致,或者是Ava II和LDLR基因某种致功能缺陷的基因突变相连锁,目前我们还不清楚。

为此,本文进一步对研究对象进行了载脂蛋白E基因分型,以便研究相同载脂蛋白E基因背景下,LDLR基因型对血脂水平的作用,结果发现,在同一载脂蛋白E基因型背景下,血脂水平仍按LDLR基因型由“- / -”、“+ / -”向“+ / +”型变化有递增的趋势,但由于样本例数不大,进行载脂蛋白E基因分型后,每一亚型的例数更少,不便进行统计分析。就现有的数据看来,仅少数组如高胆固醇血症组E3/3亚型的血脂水平相对LDLR Ava II基因型的变化有显著性意义($P < 0.01$)。提示载脂蛋白E和LDLR是各自独立地均对血脂水平发生作用。

参考文献

- 1 Davignon J, Gregg ER, Sing CF. Apolipoprotein E Polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1989, **9**: 1-5
- 2 范乐明,蔡海江,姜传仓,等. 低密度脂蛋白受体基因多态性及其与血清胆固醇水平的关系. *中华医学杂志*, 1993, **73**: 242-244
- 3 Ahn YI, Ilyas Kamboh M, Aston CE, et al. Role of common genetic polymorphisms in the LDL receptor gene in affecting plasma cholesterol levels in the general population. *Arterioscler Thromb*, 1995, **44**: 663-270
- 4 鄢盛恺,周新,哈黛文,等. 聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测载脂蛋白E基因型. *中华医学检验杂志*, 1997, **20**: 28-31

(此文1998-08-26收到,1999-01-25修回)

(此文编辑 文玉珊)