

脂蛋白脂肪酶基因 Ser⁴⁴⁷→stop 变异对血脂水平的影响

赵 郁, 杨宇虹, 穆云翔, 汪军梅, 赵莉莉, 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; Ser⁴⁴⁷→stop 变异有较弱降低甘油三酯的作用; 聚合酶链反应—单链构象多态性; 限制片段长度多态性; 脂蛋白脂肪酶; 基因突变; 甘油三酯

[摘要] 目的 探讨国人脂蛋白脂肪酶基因外显子 9 特别是 Ser⁴⁴⁷→stop 变异对血脂水平的影响。方法 利用聚合酶链反应—单链构象多态性技术筛查基因突变, 利用 DNA 测序和聚合酶链反应—限制片段长度多态性技术确定突变的性质, 并分析突变与血脂水平的关系。结果 在 420 例甘油三酯正常(< 1.7 mmol/L) 人群检出 78 例突变, 其中 1 例为纯合子, 77 例为杂合子; 经 DNA 测序和聚合酶链反应—限制片段长度多态性技术分析突变均为 Ser⁴⁴⁷→stop 无义突变。Stop⁴⁴⁷携带频率和等位基因频率分别为 18.6% 和 9.4%。Stop⁴⁴⁷携带组的甘油三酯水平(1.05±0.32 mmol/L) 低于 Stop⁴⁴⁷非携带组(1.13±0.28 mmol/L) ($P < 0.05$); Stop⁴⁴⁷携带组的高密度脂蛋白胆固醇水平(1.28±0.28 mmol/L) 虽然高于 Stop⁴⁴⁷非携带组(1.25±0.27 mmol/L), 但无统计学差异($P > 0.05$)。结论 国人基因外显子 9 突变单一, 仅表现为 Ser⁴⁴⁷→stop 多态性, Ser⁴⁴⁷→stop 变异可能有较弱的降低甘油三酯的作用。

[中图分类号] Q54

[文献标识码] A

Effect of Ser⁴⁴⁷→stop Mutation in Lipoprotein Lipase Gene on the Triglyceride Level

ZHAO Yu, YANG Yur-Hong, MU Yur-Xiang, WANG Jun-Mei, ZHAO Li-Li, and XIE Yong-Hong

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

[KEY WORDS] Lipoprotein Lipase; Gene Mutation; Triglyceride; Polymerase Chain Reaction/Single Strand Conformation Polymorphism; Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism; Ser⁴⁴⁷→stop

[ABSTRACT] **Aim** To screen the mutations in lipoprotein lipase (LPL) gene exon 9 and to investigate the effect of mutation on triglyceride (TG) and high density lipoprotein cholesterol (HDL) level. **Methods** The exon 9 of LPL gene was amplified by PCR and the mutations were examined by polymerase chain reaction/single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP); the natures of mutations were identified by DNA sequencing and polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** Only nonsense mutation Ser⁴⁴⁷→stop was screened by PCR-SSCP, one subject was homozygous and 77 subjects were heterozygous. The frequency of stop⁴⁴⁷ allele is 9.4% and the incidence of Ser⁴⁴⁷→stop was 18.6% in the 420 subjects with normal TG level. The triglyceride level in LPL stop⁴⁴⁷ carriers(1.05±0.32 mmol/L) was lower than that in LPL stop⁴⁴⁷ non carriers(1.13±0.28 mmol/L) ($P < 0.05$); HDL level in the former(1.28±0.28 mmol/L) was higher than the latter(1.25±0.27 mmol/L) ($P > 0.05$). **Conclusions** Only Ser⁴⁴⁷→stop mutation exists in LPL exon 9 of 420 subjects with normal TG and the Ser⁴⁴⁷→stop mutation have the minor effect on lowering TG level.

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL; EC 3.1.1.34) 是脂蛋白代谢的关键酶之一, 其主要功能是将血液循环中的乳糜微粒和极低密度脂蛋白转运的甘油三酯(triglyceride, TG) 水解为甘油和脂肪酸供机体组织利用^[1]。脂蛋白脂肪酶是基因变异比较丰富的蛋白质之一, 突变已达 110 种之多^[2], Hata 等^[3] 1990

年首先报告的 LPL Ser⁴⁴⁷→stop 变异是由于外显子 9 第 1595 位碱基由 C 颠换为 G 造成的, 上述的碱基颠换使丝氨酸密码 TCA 转变为终止密码子 TGA, 最终产生少两个氨基酸(Ser-Gly) 截短型的 LPL。与发生在 LPL 的其它多数变异造成高甘油血症不同, Ser⁴⁴⁷→stop 不仅不造成变异携带者甘油三酯水平明显升高, 反而可能降低。虽然国内外的研究不乏支持的结果^[4-7], 但也存在有相当的争议甚至相反观点的报告^[8-10]。为探讨国人脂蛋白脂肪酶基因外显子 9 基因变异的特点, 特别是 Ser⁴⁴⁷→stop 变异对血脂水平的影响, 我们在总结前人工作的基础上对 420 例甘油三酯正常人群进行了外显子 9 的基因检测和分析。

[收稿日期] 2005-03-25 [修回日期] 2005-10-30

[基金项目] 天津市自然科学基金(033607311) 资助

[作者简介] 赵郁, 硕士研究生, 讲师, 从事分子生物学和脂代谢研究, 联系电话为 022-23542521, E-mail 为 yu.zhao@eyou.com。杨宇虹, 博士研究生, 助理研究员, 从事分子生物学和脂代谢研究, 联系电话为 022-23542521, E-mail 为 joieyang@hotmail.com。通讯作者解用虹, 教授, 硕士研究生导师, 从事分子生物学和脂代谢研究, 联系电话为 022-23542521, E-mail 为 tjxieyh@sina.com。

1 材料和方法

1.1 材料

随机收集的甘油三酯正常($TG < 1.7 \text{ mmol/L}$)的健康体检人群 420 例, TG 范围是 $0.50 \sim 1.67 \text{ mmol/L}$, 彼此无亲缘关系。 TG 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 均采用酶学测定方法。

1.2 基因组 DNA 的提取

取乙二胺四乙酸 (1/10 体积的 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸) 抗凝的空腹静脉血, 用 TKM 法^[11] 提取基因组 DNA。

1.3 目的基因的扩增

引物序列上游引物为 $5'\text{-GTT CTA CAT GGC ATA TTC AC-3'}$, 下游引物为 $5'\text{-TCA GGA TGC CCA GTC AGC TT-3'}$ 。扩增产物全长 180 bp , 包括上游第 8 内含子 38 bp 、第 9 外显子 105 bp 和下游第 9 内含子 37 bp 。扩增条件: 95°C 预变性 5 min $\rightarrow 94^\circ\text{C}$ 变性 1 min $\rightarrow 58^\circ\text{C}$ 退火 1 min $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ 延伸 1 min , 共进行 30 次循环, 最后 72°C 延伸 7 min 。

1.4 单链构象多态性分析

取聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增产物 $15 \mu\text{L}$, 加等体积的上样缓冲液 (由甲酰胺 9.6 mL 、溴酚蓝 5 mg 和 0.5 mol/L EDTA $400 \mu\text{L}$ 组成), 混匀。 95°C 热变性 10 min 后, 迅速置于冰浴中。采用浓度为 10% 交联度为 2% 的聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳 ($16 \text{ cm} \times 18 \text{ cm}$), 5°C 恒温。先以 150 V 10 min 使样品进胶, 继以恒压 300 V 电泳 4 h 。电泳后将凝胶进行银染法染色。

1.5 测序

单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 电泳图谱共显示 3 种带型, 每种选取 1 例 DNA 样品, 采用双脱氧末端链终止法进行 PCR 产物直接测序, 测序工作交由上海生工生物工程有限公司完成。

1.6 聚合酶链反应—限制片段长多态性

外显子 9 聚合酶链反应—限制片段长多态性 (polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 检测发现的 3 种带型, 1 种测序证实为无突变, 其余 2 种测序证实为 $\text{Ser}^{447} \rightarrow \text{stop}$ 变异的纯合子和杂合子。为证实其余电泳图谱异常者是否均为该变异, 上游引物不变, 重新设计下游引物, 引入单一错配碱基, 导入一个限制性酶切位点, 对全部电泳条带异常人群重新进行 PCR-RFLP 分析。下游碱基错配引物的序列为 $5'\text{-TAG CCC}$

$\text{AGA ATG CTC ACC AGA CT-3'}$ 。扩增产物长 160 bp , 扩增条件: 95°C 预变性 5 min $\rightarrow 95^\circ\text{C}$ 变性 1 min $\rightarrow 60^\circ\text{C}$ 退火 1 min $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ 延伸 1 min , 共进行 30 次循环, 最后 72°C 延伸 7 min 。扩增产物用限制性内切酶 Hinf IV 进行酶切: PCR 产物 $17 \mu\text{L}$ 、Hinf IV $1 \mu\text{L}$ (20 u) 和 R-buffer $2 \mu\text{L}$ 混合, 37°C 水浴过夜, 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 90 V , 电泳 40 min 。杂合子 ($\text{Ser}^{447}/\text{stop}^{447}$) 可产生 3 个片段, 分别为 23 bp 、 137 bp 和 160 bp , 纯合子 ($\text{stop}^{447}/\text{stop}^{447}$) 产生 23 bp 和 137 bp 两个片段。

1.7 统计学处理

数据统计用 SPSS11.5 软件, 进行 t 检验。 $P < 0.05$ 认为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 单链构象多态性分析结果

电泳图谱主要呈现 3 种带型。野生型为 2 条单链带, 共 342 例, 其中 1 例测序证实为 $\text{Ser}^{447}\text{Ser}$ 基因型。另 2 种异常带型, 一种为原来的慢带消失, 而代之以新出现的单链带, 只检出 1 例, 测序证实为 $\text{Ser}^{447} \rightarrow \text{stop}$ 纯合子, 即 $\text{stop}^{447}\text{stop}$ 基因型。另一种为在 2 条正常单链外多出一条慢带, 为 3 条单链, 共 77 例, 我们选取了其中一例进行序列测定, 证实为 $\text{Ser}^{447}\text{stop}$ 杂合子 (图 1 和图 2, Figure 1 和 2)。

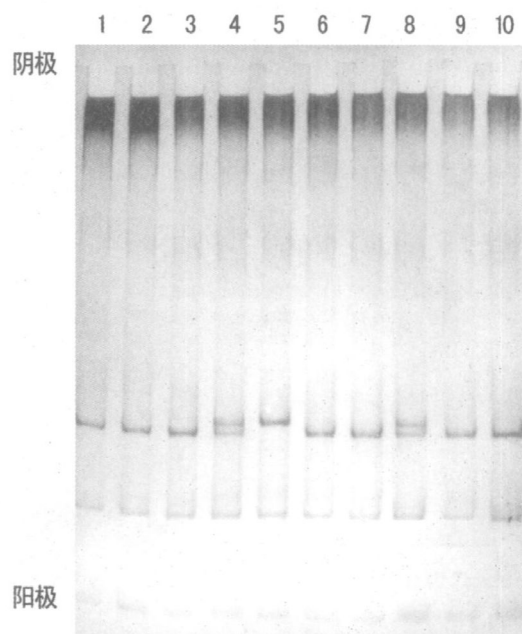


图 1. 外显子 9 扩增片段单链构象多态性分析电泳图 泳道 4 和 8 出现异常单链, 为杂合子突变 ($\text{Ser}^{447}/\text{stop}^{447}$); 泳道 5 单链位置改变, 为纯合子突变 ($\text{stop}^{447}/\text{stop}^{447}$); 其余各道均为 2 条正常单链, 未见突变。

Figure 1. SSCP analysis of the LPL exon 9 PCR products

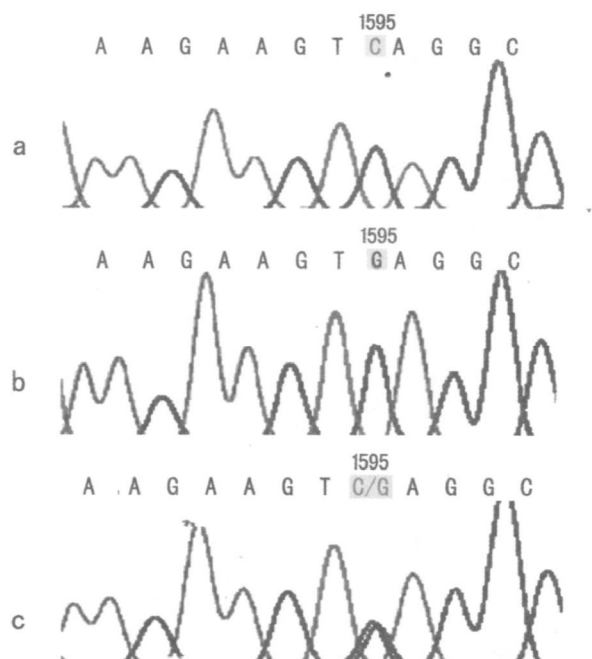


图 2. 外显子 9 测序图(仅显示变异相关部位) a 为 Ser⁴⁴⁷ Ser 野生型, b 为 stop⁴⁴⁷stop 纯合子, c 为 Ser⁴⁴⁷stop 杂合子。

Figure 2. Sequence of the normal, homozygous and heterozygous mutation in LPL exon 9

2.2 聚合酶链反应—限制片段长多态性分析结果

外显子 9 错配引物扩增片段长 160 bp。酶切后, 杂合子可出现 2 条带, 1 条为 160 bp, 1 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 1 条带, 长 137 bp。而野生型则不能被 Hinf iv 切开, 电泳图谱上只出现 160 bp 片段。对全部电泳图谱异常的样品经 RFLP 分析, 除 1 例 stop⁴⁴⁷stop 纯合子外, 其余 77 例均为 Ser⁴⁴⁷stop 杂合子(图 3, Figure 3)。

2.3 外显子 9 Ser⁴⁴⁷→stop 多态性与血脂的相关性

在 420 例人群中, stop⁴⁴⁷携带频率和 stop⁴⁴⁷等位基因频率分别为 18.6% 和 9.4%。外显子 9 Ser⁴⁴⁷→stop 多态性与血脂水平的关系见表 1(Table 1)。

表 1. 外显子 9 Ser⁴⁴⁷→stop 多态性对血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1. The effect of the Ser⁴⁴⁷→stop polymorphism in exon 9 on plasma lipids

基因型	n	甘油三酯	高密度脂蛋白
Ser ⁴⁴⁷ stop/ stop ⁴⁴⁷ stop	78	1.05 ± 0.32	1.28 ± 0.28
Ser ⁴⁴⁷ Ser	342	1.13 ± 0.28 ^a	1.25 ± 0.27

a: $P < 0.05$, 突变组与正常组比较。

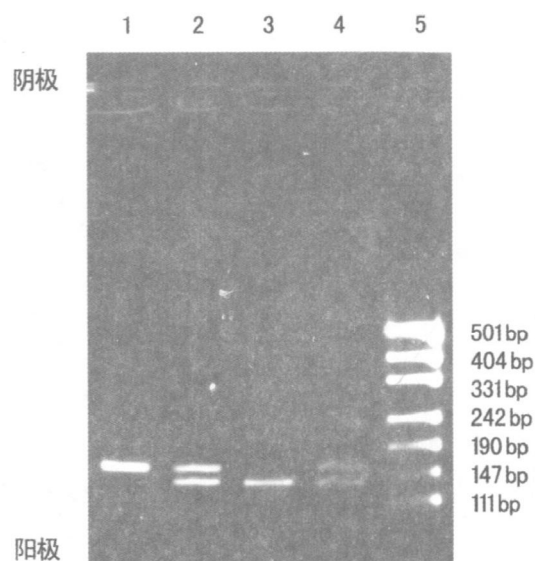


图 3. 外显子 9 错配引物限制片段长多态性电泳图 泳道 1 为 Ser⁴⁴⁷/Ser⁴⁴⁷, 长 160 bp; 泳道 2、4 为 Ser⁴⁴⁷/stop⁴⁴⁷杂合子; 泳道 3 为 stop⁴⁴⁷/stop⁴⁴⁷纯合子, 酶切片段长 137 bp; 泳道 5 为 pUC19 DNA/Msp iv 分子量标准。

Figure 3. RFLP analysis of exon 9

3 讨论

血脂异常是多种遗传因素和复杂环境因素相互作用的结果^[12], 因此研究特定基因变异对血脂可能产生的影响不仅决定于基因变异本身的性质和影响强度, 而且不可避免地受到其它基因变异和复杂环境因素的影响。我们复习和总结前人的工作, 认为检测样本的选择和样本的大小是造成结果差异甚至完全相反的重要原因之一。Kobayashi 等^[8]报告了 1 例 iv 型高脂血症患者, 其血浆甘油三酯水平高达 360 g/L, 对该患者 LPL 基因进行检测后发现其为 LPL Ser⁴⁴⁷→stop 杂合子, 并推论 LPL Ser⁴⁴⁷→stop 变异为其致高甘油三酯血症的病因。我们认为不能确切肯定该例患者致病的真正原因, 应该更多地考虑其它基因变异对血脂可能产生的影响。

尽管增大样本量一般可以获得客观的结果, 但这无疑也增加了人力、物力和财力的支出, 增大了工作量。由于众多基因复杂的相互作用, 入选样本标准的选择就显得非常重要, 在所研究目的基因影响强度较弱的情况下就更为重要和突出。我们总结文献发现 LPL Ser⁴⁴⁷→stop 变异产生的影响较弱, 实验组和对照组的差异一般介于 8% ~ 28%, 其它基因变异, 特别是影响强度明显的其它变异的存在, 很可能强烈的干扰实验的结果。Takeyoshi 等^[9]和林育芳等^[10]与多数研究报告结论相左不仅与样本较小(分

别仅有 176 例和 114 例) 有关, 更可能与选择样本的标准不无关系, 样本中没有排除高甘油三酯血症患者, 这些人群的存在增加了其它明显影响血脂水平基因变异存在的可能, 并最终干扰了研究的结果。尤其是林育芳等^[10] 研究选用的是混和型高脂血症的患者, 不可避免地携带有较多影响血脂水平基因变异的因素, 这些因素的影响极有可能大大的超过 Ser⁴⁴⁷→stop 的作用, 其得出 Ser⁴⁴⁷→stop 无明显降低 TG 水平的结论也就完全可能甚至是必然的了。基于上述的认识, 我们在设计实验和确定入选样本标准时, 仅仅选择甘油三酯水平正常的人群, 最大限度地排除了其它强烈影响甘油三酯水平变异基因的存在, 其次确定了 420 例这一较大样本, 增加了获得较为客观结论的可能。我们研究发现国人外显子 9 基因变异较为单一, 仅仅存在 LPL Ser⁴⁴⁷→stop 多态性, 甘油三酯正常人群的 LPL Ser⁴⁴⁷→stop 等位基因频率为 18.6%, LPL Ser⁴⁴⁷→stop 变异携带组的甘油三酯水平低于非 Ser⁴⁴⁷→stop 携带组, 显示有统计学差异。LPL Ser⁴⁴⁷→stop 仅具有较弱的降低甘油三酯水平的作用, 这与 Wittrop 等^[13] 为消除不同试验组可能存在的偏倚而对 29 项相关研究进行的 meta 分析结果一致, 可以合理的解释国内外文献报告结论不完全一致的事实。

LPL Ser⁴⁴⁷→stop 引起血脂变化的机制尚不明确。截短型 LPL 的主要功能区结构完好, C 末端 Gly 和 Ser 残基的缺失, 可能使 LPL 分泌、转运、结合到内皮细胞或在毛细血管上皮分布及与脂蛋白的结合能力发生改变。这种缺失可能影响底物的识别, 增加 LPL 和其受体的亲和力, 易于亚基之间的相互作用和二聚体的形成。Ser447Ter 携带者 LPL 呈杂二聚体, 可能比野生型二聚体更稳定。这种改变使 LPL 蛋白产量增加, 脂解活性增加, 对致动脉粥样硬化残余颗粒的清除增加。由于基因-基因、基因-环境存在交互作用及其它影响因素的存在, 使得 Ser447Ter 的研究更为复杂。有研究表明, LPL

Ser447Ter 对血脂的影响还与年龄、性别、机能状况、种族等有关, 并且可能与其它基因位点存在连锁不平衡, 因此这种突变是通过改变活性、影响其它有关环节或是直接影响 LPL 功能仍未明确, 需要进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *Lipid Res*, 2002, **43** (12): 1 997-006
- [2] 穆云翔, 解用虹. 脂蛋白脂肪酶基因突变研究进展. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 358-362
- [3] 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. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (18): 5 407-411
- [4] Wei Chen, Sathanur R, Srinivasan, Elkasabanu A, Ellsworth DL, Boerwinkle E. Influence of lipoprotein lipase serine447stop polymorphism on tracking of triglycerides and HDL cholesterol from childhood to adulthood and familial risk of coronary artery disease: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis*, 2001, **159**: 367-373
- [5] Clee SM, Loubser O, Collins J, Kastelein JJP, Hayden MR. The LPL S447X cSNP is associated with decreased blood pressure and plasma triglycerides, and reduced risk of coronary artery disease. *Clin Genet*, 2001, **60**: 293-300
- [6] Oliavi U, Christophe G, Louis P, Bergeron J, Despres J, Rao D, et al. Genetic variation at the lipoprotein lipase locus and plasma lipoprotein and insulin levels in the Quebec Family Study. *Atherosclerosis*, 2001, **158**: 199-206
- [7] 赵水平, 肖志杰, 聂赛, 周宏年. 脂蛋白脂肪酶基因 Ser447Ter 变异对血脂的影响. *中华心血管病杂志*, 2003, **31**: 101-104
- [8] Kobayashi J, Nishida T, Ameis D, Stahnke G, Schotz MC, Hashimoto H, et al. A heterozygous mutation (the codon for Ser447-a stop codon) in lipoprotein lipase contributes to a defect in lipid interface recognition in a case with type I hyperlipidemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **182** (1): 70-77
- [9] Takeyoshi M, Miyashita Y, Yoshiakikito, Satoko T, Yamamori Syunji, Watanabe H, et al. Incidence of lipoprotein lipase genotype for premature termination codon (Ser447Ter) in Japanese and association with dyslipoproteinemia. *Clinica Chimica*, 1998, **275**: 205-213
- [10] 林育芳, 赵迎社, 郑辉, 杨中汉, 周天鸿. 混合性高脂血症患者脂蛋白脂肪酶基因 S447X 的多态性. *暨南大学学报(自然科学版)*, 2002, **23** (5): 71-74
- [11] 杨宇虹, 葛林, 赵郁, 解用虹. 脂蛋白脂肪酶内含子 3C→T 突变. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 570-572
- [12] Lee J, Tan CS, Chia KS, Tan CE, Chew SK, Ordovas JM, et al. The lipoprotein lipase S447X polymorphism and plasma lipids: interactions with APOE polymorphisms, smoking, and alcohol consumption. *J Lipid Res*, 2002, **45**: 1 132-139
- [13] Wittrop HH, Hansen AT, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation*, 1999, **99**: 2 901-907

(此文编辑 朱雯霞)