

载脂蛋白 E 基因多态性与高脂血症的相关性研究

曾武威 吕新跃 陈保生

(中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院 生物化学室, 北京 100005)

The Study on the Association between Polymorphism of Apolipoprotein E Gene and Hyperlipidemia

ZENG Wu-Wei, LU Xin-Yue and CHEN Bao-Sheng
(Department of Biochemistry, Basic Medical Institute of Chinese Medical Scientific Academy, Beijing 100005, China)

ABSTRACT

Aim The purpose of the present paper is to study the polymorphisms of apolipoprotein E (apo E) gene and their association with hyperlipidemia in Chinese subjects.

Methods Polymorphisms of apo E gene were rapidly detected by using polymerase chain reaction (PCR) in 133 male patients (41~60 years) with hyperlipidemia and 122 healthy individuals matched. The lipids of these subjects were measured with enzyme's methods.

Results Six apo E genotypes, E_2/E_2 , E_3/E_3 , E_4/E_4 , E_2/E_3 , E_2/E_4 , E_3/E_4 and the five genotypes (no E_4/E_4) were examined in patient group and control group respectively. Compared with control group, the distribution of apo E_3 allele's frequencies was significantly decreased ($\chi^2 = 7.25$, $P < 0.01$), but apo E_4 allele increased ($\chi^2 = 4.20$, $P < 0.05$) in hyperlipidemia's group. There was marked difference in plasma total cholesterol among the patients with different apo E genotypes.

Conclusions These data suggest that polymorphisms of apo E gene are associated with the development of hyperlipidemias. The E_4 allele may be a hereditary susceptible factor to hyperlipidemia.

KEY WORDS Apolipoprotein E; Genotype; Polymorphism; Hyperlipidemia

摘要 选取 133 例高脂血症患者及 122 例正常对照人群,用多聚酶链反应方法快速鉴定其载脂蛋白 E 的基因型,结合血脂分析,研究载脂蛋白 E 基因多态性与高脂血症的关系。结果表明, E_3 等位基因的分布频率在病例组中明显低于对照组 ($P < 0.01$),病例组中 E_4 等位基因的分布频率明显高于对照组 ($P < 0.05$),表明 E_4 等位基因与高脂血症显著相关。

关键词 载脂蛋白 E; 基因型; 多态性; 高脂血症

载脂蛋白 E (apolipoprotein E) 是血浆脂蛋白的一种重要组成部分,主要在肝脏中合成^[1],存在于血浆极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 中^[2]。人的载脂蛋白 E 基因全长 3 597 个碱基对 (base pairs, bp), 包括四个外显子和三个内含子^[3]。载脂蛋白 E 基因及蛋白呈明显多态性 (polymorphism), 它们是由在同一个载脂蛋白 E 基因位点上的三个等位基因 (E_2 , E_3 和 E_4) 决定的, 这三个等位基因组成六种基因型, 包括三个纯合子: E_2/E_2 、 E_3/E_3 、 E_4/E_4 及三个杂合子 E_2/E_3 、 E_2/E_4 和 E_3/E_4 ; 同时编码三种蛋白异构体载脂蛋白 E_2 、 E_3 和 E_4 , 并由此形成相应的六种蛋白表型。正常人群中 E_3 出现频率最高为 74%~78%^[4]。载脂蛋白 E 基因多态性在 II 型高脂血症中起重要作用。本实验利用多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法扩增高脂血症患者及正常人基因组 DNA 中含多态位点的载脂蛋白 E 片段, 以 HhaI 酶切扩增产物, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 上直接检测载脂蛋白 E 的

基因型(genotype),并探讨其与高脂血症(hyperlipidemia)的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

样本来自北京首钢工人及广东造船厂工人。

1.1.1 病例组 高脂血症患者,排除肝、肾、内分泌和其它疾病引起的继发性高脂血症,共133例,均为男性,年龄41~60岁。高脂血症诊断标准为总胆固醇 >2 g/L或/和甘油三酯 >0.2 g/L。

1.1.2 对照组 与病例组年龄、性别相匹配的正常人群,共122例。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取^[5] 清晨空腹静脉取血约10 ml,离心,上层血浆用于血脂分析。血细胞加等量裂解缓冲液(0.32 mol/L蔗糖,10 mmol/L TrisCl, pH 7.6, 5 mmol/L MgCl₂, 1% Triton-X100)贮存于-20℃,将冻存的血细胞室温下化冻,4℃离心,6 000 r/min,去上清液,加五倍体积去离子水,低速破坏红细胞,重复离心,沉淀用等量生理盐水洗两次,将白细胞悬浮于5 ml 15 mmol/L TES (15 mmol/L TrisCl, pH 8.0, 15 mmol/L EDTA, pH 8.0, 15 mmol/L NaCl)溶液中,加10%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)溶液和10 g/L蛋白酶K分别至终浓度0.5%和50 mg/L,37℃轻摇过夜,消化后的白细胞液依次用等体积饱和酚和氯仿:异戊醇(24:1)各抽提两次,上层DNA水相,以二倍体积无水乙醇沉淀,沉淀出的DNA用70%乙醇洗两遍,干燥,加适量TE缓冲液(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5)溶解,用260、280和230 nm的波长测定样品DNA的光密度值,计算DNA浓度和纯度。

1.2.2 多聚酶链反应扩增^[6] 采用如下特异5'引物:5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3'和3'引物:5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'来扩增载脂蛋白E基因第四外显子中含多态性位点的片段,扩增产物长度为244 bp。反应总体积为30 μ l,含有基因组DNA 1 μ g,引物各1 μ mol/L,10%二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO),TaqDNA聚合酶1单位,其它成分按常规。反应体系混匀后放在PCR扩增仪中95℃预变性5 min,按95℃变性1 min $\rightarrow$ 55℃退火2 min $\rightarrow$ 70℃延伸2 min进行循环,共30个循环,最后在70℃再延伸7 min。

1.2.3 载脂蛋白E基因型的鉴定^[6] 取扩增产物5

μ l,在2%琼脂糖凝胶电泳上检测是否有所要的DNA片段,剩余的扩增产物再加入Hha I酶6单位及其缓冲液,在37℃消化4~5 h。消化后的产物在15%PAGE上鉴定,在160 V电泳4 h后用0.5 mg/L溴化乙啶染色30 min,紫外观察照相。

1.2.4 血浆脂质测定 用酶法测血浆脂质水平。

1.3 统计学方法

病例组与对照组之间血浆脂质含量平均数的比较用*t*检验;等位基因频率用基因计数法;病例组与对照组之间的基因型频率及等位基因频率的比较用 χ^2 检验;不同基因型间血浆脂质的比较用单因素方差分析方法检验。

2 结果

2.1 HhaI酶切扩增产物后,电泳结果显示载脂蛋白E的不同基因型如Figure所示。病例组与对照组载脂蛋白E基因型的分布见Table 1。

2.2 病例组与对照组血脂水平的比较

Table 2显示病例组人群的胆固醇水平明显高于对照组人群($P<0.001$),而总HDL水平则低于后者($P<0.01$)。

2.3 载脂蛋白E基因多态性与血脂的关系

Table 3和Table 4分别比较了对照组人群及病例组人群载脂蛋白E的不同基因型之间的血脂水平。结果表明,对照组人群载脂蛋白E不同基因型之间,其总胆固醇及HDL水平无明显差异($P>0.05$);而病例组人群在不同基因型之间,其总胆固醇水平有明显差异($P<0.05$),HDL水平无明显差异($P>0.05$)。

Table 1. Different apo E genotypes in the patient and control groups.

Genotypes	control group n (frequencies %)		patient group n (frequencies %)	
E2/2	1	0.82	5	3.76
E3/3	97	79.5	88	66.2*
E4/4	0	0	1	0.75
E2/3	14	11.5	17	12.8
E2/4	2	1.64	4	3.01
E3/4	8	6.57	18	13.5
total	122	100	133	100

* Compared with control group, $P<0.05$.

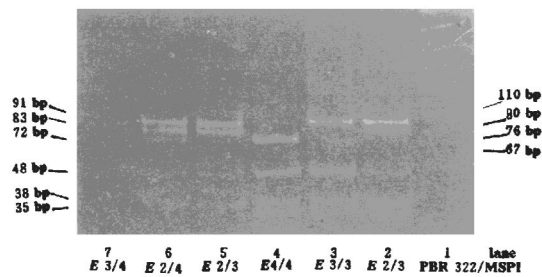


Figure 1. Different apo E genotypes showed on 15% PAGE. Lane 1; standard DNA molecular marker of PBR 322/MspI; lane 2 and lane 5; E2/3; lane 3; E3/3; lane 4; E4/4; lane 6; E2/4; lane 7; E3/4.

2.4 载脂蛋白 E 基因多态性与高脂血症有关
Table 1 和 Table 5 比较了病例组人群与对照人群的载脂蛋白 E 基因型分布及等位基因频率分布。结果表明病例组人群的载脂蛋白 E E 3/3 基因型和 E₄ 等位基因明显低于对照组 ($P<0.01$), E₄ 等位基因明显高于对照组 ($P<0.05$)。其它基因型分布及等位基因频率分布在两组中无明显差异 ($P>0.05$)。

Table 2. Comparison of plasma level of total cholesterol(TC) and total HDL between the patient and control groups ($\bar{x}\pm s$, g/L).

Groups	n	TC	total HDL
control	122	1.92 $\pm$ 0.33	0.51 $\pm$ 0.15
patient	133	2.25 $\pm$ 0.52 ^b	0.46 $\pm$ 0.17 ^a

Compared with control group, ^b $P<0.001$, ^a $P<0.01$.

Table 3. Comparison of different apo E genotypes with plasma lipid level in control group ($\bar{x}\pm s$, g/L).

Genotypes	n	TC	total HDL
E3/3	97	1.91 $\pm$ 0.32	0.51 $\pm$ 0.14
E2/3	14	1.94 $\pm$ 0.39	0.60 $\pm$ 0.16
E3/4	8	2.02 $\pm$ 0.48	0.53 $\pm$ 0.11

Table 4. Comparison of different apo E genotypes with plasma lipid level in patient group ($\bar{x}\pm s$, g/L).

Genotypes	n	TC	total HDL ^{a, b}
E2/2	5	1.97 $\pm$ 0.32	0.43 $\pm$ 0.14
E3/3	88	2.31 $\pm$ 0.56	0.48 $\pm$ 0.19
E4/4	1	1.64	0.39
E2/3	17	2.18 $\pm$ 0.34	0.43 $\pm$ 0.09
E2/4	4	1.83 $\pm$ 0.50	0.43 $\pm$ 0.17
E3/4	18	2.27 $\pm$ 0.39	0.43 $\pm$ 0.10

^a $P<0.05$; ^b $P>0.05$.

Table 5. Comparison of apo E allele's frequencies between the patient and control group.

Allele	control group		patient group	
	n	frequencies(%)	n	frequencies(%)
E ₂	18	7.38	31	11.6
E ₃	216	88.5	211	79.3 ^a
E ₄	10	4.10	24	9.02 ^a
total	244	100	266	100

Compared with control group, ^b $P<0.01$; ^a $P<0.05$.

3 讨论

3.1 关于用 PCR 方法及 HhaI 酶切快速鉴定载脂蛋白 E 基因型

与等电聚焦方法及利用等位基因特异的寡聚核苷酸探针做 Southern 印迹方法相比,PCR 方法快速、简便、灵敏,无疑在检测基因多态性

的研究中有广阔的应用前景。在 $E_4/4$ 表型中, 第 112 位和 158 位的氨基酸均为精氨酸, 其密码子为 CGC, 构成 HhaI 酶切位点(GCGC), 因此其扩增产物经 HhaI 酶切后产生 72 bp、48 bp、35 bp 和 19 bp 四个片段, 用 15%PAGE 可检测到前三条带, 19 bp 片段意义不大可忽略; 而 $E_2/2$ 中, 这两个位置均为半胱氨酸, 其密码子为 TGC, 不构成 HhaI 酶切位点, 酶切后只有 91 bp 和 83 bp 两条带; $E_3/3$ 同在 112 位为半胱氨酸, 158 位为精氨酸, 为仅含一个 HhaI 酶切位点的杂合子^[3], 酶切产生 91 bp、48 bp 和 35 bp, 其它三个杂合子 $E_2/3$ 、 $E_2/4$ 、 $E_3/4$ 以此类推得到相应的电泳带, 因此可根据 HhaI 酶切扩增产物后的电泳图谱鉴定载脂蛋白 E 的基因型。

3.2 载脂蛋白 E 基因多态性及与血脂的关系

许多实验表明, 三种常见载脂蛋白 E 等位基因分布频率在不同种族间、地区间略有差异, 正常中国人 E_3 的相对频率较高(为 0.852), 与白种人 E_3 的相对频率均数(为 0.769)相比, 有显著性差异; 中国人 E_4 的相对频率(为 0.064)明显低于白种人(0.143)^[7,8]。本实验所调查的总人群(包括病例组和对照组)中, E_3 等位基因最常见, 为 83.72%, E_4 最少见, 为 6.67%, 与上述结果基本接近。

载脂蛋白 E 在脂蛋白代谢中起重要的调节作用, 三种载脂蛋白 E 异构体的调节作用是有差别的^[9], 载脂蛋白 E_2 对 LDL 受体和载脂蛋白 E 受体的亲和力非常低, 载脂蛋白 E_3 和载脂蛋白 E_4 的亲和力无明显差异^[10]。因此, 含载脂蛋白 E_2 的高脂血症个体的血脂特征为甘油三酯升高而总胆固醇下降; 含载脂蛋白 E_4 的高脂血症个体的血脂变化为总胆固醇升高而甘油三酯变化不明显。本实验中, 病例组与对照组之间不同载脂蛋白 E 基因型的总胆固醇水平有显著差异。

3.3 载脂蛋白 E 基因多态性与高脂血症

有关载脂蛋白 E 与高脂血症关系的研究进行了很多, 最明显的关系是 II 型高脂血症中, $E_2/2$ 的比例为 90%。尽管如此, $E_2/2$ 表型中

却只有约 5% 的人患有 II 型高脂血症, 大多数 $E_2/2$ 型的人不一定是 II 型高脂血症患者^[11]。这说明 $E_2/2$ 表型是 II 型高脂血症发生的必要因素, 但不是唯一因素。其它如环境及代谢异常等诸多因素复杂作用导致 II 型高脂血症。在本组实验中, $E_3/3$ 在病例组中的出现频率明显低于对照组, 值得注意的是, $E_3/4$ 在病例组中的出现频率高于对照组, E_4 等位基因在病例组的分布频率亦明显高于对照组, 这提示在中国人群中 E_4 等位基因与高脂血症的关系十分密切。有人认为 E_4 等位基因与低密度脂蛋白胆固醇升高相关^[12], 在本实验中也发现这一趋势, 表明 E_4 等位基因可能作为高脂血症发生的一种内在易感因素。

参考文献

- 1 Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, et al. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver and is present in other peripheral tissues of rats and marmosers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 203~207.
- 2 Havel RJ, Yamada N, Shames DM. Role of apolipoprotein E in lipoprotein metabolism. *Am Heart J*, 1987, **2**: 470~474.
- 3 Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, et al. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 3445~449.
- 4 Zannis VL, Breslow JL. Human VLDL apoE isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and post-translational modification. *Biochemistry*, 1981, **20**: 1033~041.
- 5 张俊武, 王黎明. 人染色体 DNA 的制备. 见: 吴冠芸, 方福德(主编). 基因诊断技术及应用. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992: 175~180.
- 6 Hixon JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 545~548.
- 7 Marie-Luise Blue, Wishmas DL, Stanley Eucker, et al. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 283~287.
- 8 Newman TC, Dawson PA, Rude LL, et al. Quantitation of Apolipoprotein E mRNA in the liver and peripheral tissues of nonhuman primates. *J Biol Chem*, 1985,

- 260: 2 452~457.
- 9 Ehnholm C, Mahley RW, Chappell DA, et al. Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of beta-very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type II hyper-lipoproteinemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 5 566~570.
 - 10 Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem*, 1982, **257**: 2 518~512.
 - 11 Utermann G, Vögeberg KH, Steinmet A, et al. Polymorphism of apolipoprotein E. I. Genetics of hyperlipoproteinemia type II. *Chin Genet*, 1979, **15**: 27~62.
 - 12 Chung BH, Segrest JP. Resistance of a very low density lipoprotein subpopulation from family dysbetalipoprotein to in vitro lipolytic conversion to the low density lipoprotein fraction. *J Lipid Res*, 1983, **24**: 1 148~159.

(1996-06-15 收到, 1996-08-24 修回)

· 会 讯 ·

第十一届国际动脉粥样硬化学术报告会

日前, 本刊主编杨永宗教授收到国际动脉粥样硬化学会 1997 年会议主席 B. Jacotot 教授的信, 告知由国际动脉粥样硬化学会主持召开的第十一届国际动脉粥样硬化学术报告会将于 1997 年 10 月 5 日~9 日在法国巴黎举行。国际动脉粥样硬化学会主持的学术报告会议每三年举行一次, 这是第一次在法国举行。1997 年的学术报告会主要涉及下列主题:

- 动脉壁生物学;
- 动脉血栓形成;
- 遗传和地域流行病学;
- 动脉粥样硬化和它的危险因素的预防;
- 脂蛋白紊乱的分子生物学;
- 动脉粥样硬化和血脂异常的遗传;
- 胰岛素抵抗、糖尿病和动脉粥样硬化;
- 动脉粥样硬化损伤、发展和消退的评价;
- 年龄和动脉粥样硬化;
- 营养和局部缺血性疾病;
- 影响脂代谢的药物和动脉粥样硬化。

在正式会议前后, 还将举行 6 个卫星会议, 这 6 个卫星会议的主题、时间和地点是:

①胆固醇逆转运。1997 年 10 月 2~4 日, Lille;

②致动脉粥样硬化的低密度脂蛋白: 生理病理学 and 治疗方法。1997 年 10 月 2~4 日, Abbaye of Royaumont;

③动脉血栓形成中的止血变异: 预报与预防。1997 年 10 月 2~4 日, Marseille;

④平滑肌细胞增殖与分化。1997 年 10 月 2~4 日, Bordeaux;

⑤脂蛋白代谢、肥胖和动脉粥样硬化。1997 年 10 月 3~4 日, Saint-Malo;

⑥糖尿病和动脉粥样硬化。1997 年 10 月 10~11 日, Lyon。

联系地址:

①组委会(Local Organizing Committee)

Pr B. Jacotot

Service Médecine V

Hôpital Henri Mondor 94010

Créteil-Cedex, France

Tel: 33. (0)1. 49. 81. 35. 86

Fax: 33. (0)1. 48. 99. 11. 67

E-mail: 100306. 3000 @ compuserve.com

②会议秘书处(Conference Secretariat)

Agency ORMES:

17 Place de la Résistance 92445

Issy-les-Moulineaux, France

Tel: 33. (0)1. 46. 48. 46. 48

Fax: 33. (0)1. 46. 45. 59. 38

E-mail: ormlisa @ easynet.fr

(胡必利 提供)