

高脂血症患者脂蛋白脂酶基因 外显子 4 区域变异的研究

赵迎社¹, 杨中汉², 冯建生¹, 蒋建伟¹, 吴美玉¹, 周天鸿³

(1. 暨南大学医学院生化教研室, 广州 510632; 2. 中山大学中山医学院生化教研室, 广州 510089; 3. 暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要:为了探讨广东地区高脂血症患者脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)基因的分子变异, 从 258 例高脂血症患者外周血白细胞中提取基因组 DNA, 用 PCR-SSCP 方法分析外显子 4 及其附近区域, 对 SSCP 带型异常样品进行克隆和序列测定。在 2 名高脂血症患者 LPL 基因内含子 3 的 3' 端-6bp 处发现 C→T 转换突变, 252 例正常对照中未发现该突变。IVS-3 的 C→T 突变可能与高脂血症有关。

关键词:脂蛋白脂酶; 高脂血症; 多聚酶链反应; 单链构象多态性

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)05-0519-04

Variants of Exon 4 and Its Flanking Region of LPL Gene in Patients with Hyperlipidemia

ZHAO Ying-she¹, YANG Zhong-han², FENG Jian-sheng¹,
JIANG Jian-wei¹, WU Mei-yu¹, ZHOU Tian-hong³

(1. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China;

3. College of Life Sciences and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To elucidate abnormalities of LPL gene in hyperlipidemia in the Chinese population in Guangdong, genomic DNA was extracted from leukocyte of 258 patients with primary hyperlipidemia. A segment of LPL gene including exon 4 and its flanking sequences was analyzed by PCR-SSCP. The PCR products with abnormal SSCP pattern were cloned and sequenced. As a C→T transition mutation at -6 bp of intron 3 was found in two Chinese with hyperlipidemia and the mutation was not found in 252 normolipidemic controls, the C→T transition in intron 3 may be related to hyperlipidemia.

Key words: lipoprotein lipase; hyperlipidemia; polymerase chain reaction; single strand conformation polymorphism

脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)是脂蛋白代谢的关键酶, 催化乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)中甘油三酯水解为甘油和脂肪酸, 在乳糜微粒和极低密度脂蛋白的分解代谢中具有核心作用。LPL 基因的异常可导致血浆甘油三酯水平的升高和高密度脂蛋白(HDL)胆固醇水平的降低, 促进冠状动脉粥样硬化的形成和发展。

LPL 基因位于染色体 8p22, 长约 35kb, 由 10 个外显子和 9 个内含子组成。外显子 1~9 编码由 475 个氨基酸组成的前体蛋白, 外显子 10 编码 LPL mRNA 3'非翻译区^[1]。LPL 基因外显子 4 编码与脂质即底物结合的区域, 外显子 4 的 Ser¹³²是催化中心三联体 Asp¹⁵⁶-His²⁴¹-Ser¹³²组分之一^[2]。因此, 这一区域发生突变可导致酶活性下降或完全丧

收稿日期: 2001-11-12; 修回日期: 2002-05-10

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(990467)

作者简介: 赵迎社(1964-), 女, 河南人。理学博士, 副教授, 医学遗传学专业。E-mail: zhaoy2000@21cn.com

失,使乳糜微粒和极低密度脂蛋白降解障碍。本文研究广东地区高脂血症患者 *LPL* 基因外显子 4 及其附近区域的变异情况,以探讨 *LPL* 基因突变对高脂血症的影响。

1 对象和方法

1.1 研究对象

住院病人或定期体检者,高甘油三酯血症 100 例,男性 46 例,女性 54 例。混合型高脂血症患者 158 例,男性 81 例,女性 77 例。以上高脂血症患者总共 258 例,均为汉族人,年龄 44.5 ± 15.8 岁,排除糖尿病、肝脏疾病、肾病综合征、甲状腺功能异常等疾病。正常对照为血脂正常的定期体检者,男性 123 人,女性 129 人,共 252 人,均为汉族,年龄 45.5 ± 16.1 岁。

1.2 方法

1.2.1 人基因组 DNA 的提取 低渗法分离人白细胞,SDS-蛋白酶 K 消化后,用酚-氯仿法提取白细胞 DNA,DNA 溶于 TE 缓冲液中, -20°C 保存。

1.2.2 *LPL* 基因目的片段 PCR 扩增 引物采用 Primer 软件辅助设计,由上海 Sangon 生物公司合成,经 PAGE 纯化。上游引物:5'-TTTG-GCAGAACTGTAAGCACCT-3',下游引物:5'-CCAACGAAATTGCTTTCTTACC-3'。扩增目的片段位于 *LPL* 基因外显子 4 及其附近区域,长度为 277bp,PCR 反应条件为:50 μl 反应液含 MgCl_2 2.5mmol/L,dNTP 0.25 mmol/L,引物 0.5 pmol/ μl ,Taq DNA 聚合酶 2.5U。PCR 反应循环参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 30s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30s 循环 35 次,最后一个循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3min。

1.2.3 PCR 产物的 SSCP 分析 配制 10% 的聚丙烯酰胺凝胶,丙烯酰胺与 N,N'-甲叉丙烯酰胺的比例为 49:1,凝胶中的弱变性剂为 3% 蔗糖,电泳温度为 4 $^{\circ}\text{C}$,以低离子强度(low ionic strength, LIS)溶液变性上样,上样量为 8 μl ,电泳参数为 300V 7h。

1.2.4 分子克隆分离杂合子基因 PCR 产物与 T/A 载体 PMD18-T Vector 连接成重组质粒,转化进大肠杆菌 JM109 受体菌中,蓝白斑筛选转化菌,挑取单克隆菌株分离培养。

1.2.5 样品 DNA 测序 重组质粒 PCR 扩增所得产物进行 SSCP 分析,辩明正常带型和异常带型,选一个含正常带的单克隆菌株和 3 个含异常带的单克隆菌株进行序列测定。DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。

1.2.6 PCR-RFLP 252 例正常对照人群外显子 4 区域的突变以限制酶 *Mbo* II (Sangon) 消化 PCR 产物来确定。取 PCR 产物 10 μl ,加 *Mbo* II 5U 及相应的缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 4h 后,以 2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯透射灯下观察拍照。

2 结果

2.1 PCR-SSCP 筛查结果

PCR-SSCP 筛查 258 例高脂血症患者 DNA,在 100 例高甘油三酯血症和 158 例混合型高脂血症患者中分别发现 1 例标本的 SSCP 图谱有异常(图 1)。

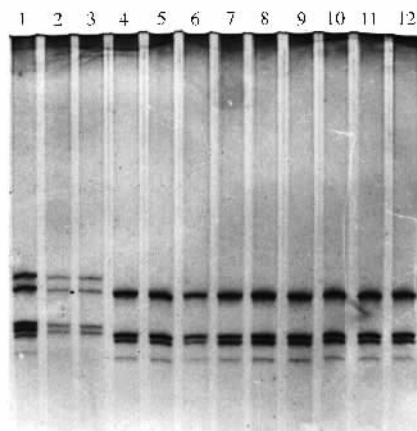


图 1 外显子 4 区域的 SSCP 分析

1~3 泳道为同一标本 3 次 PCR 产物的 SSCP 图;
4 为正常对照;5~12 为部分标本的 SSCP 结果。

Fig. 1 SSCP analysis of exon 4 regions

Lane 1~3 was three times different PCR products of a same patient;
Lane 4: normal control; Lane 5~12: SSCP results of part samples.

2.2 DNA 序列测定

对 SSCP 异常的标本进行 DNA 序列分析,发现 2 例标本均在内含子 3 的 3' 端上游-6 处发生碱基改变(图 2),突变性质为 C \rightarrow T 转换(简称为 IVS-3 3' 端-6 C \rightarrow T 突变),2 例均为杂合子。

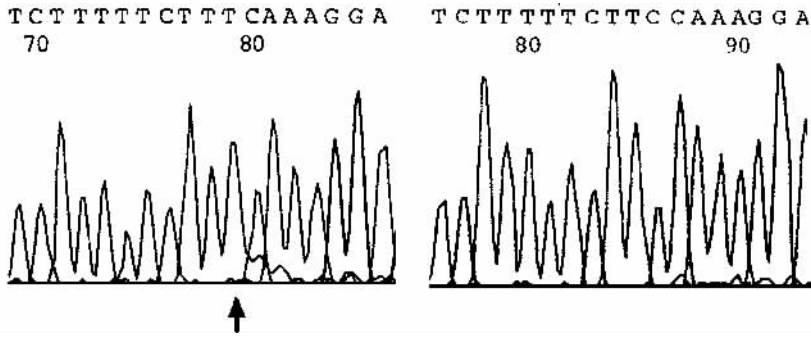


图 2 外显子 4 及 IVS-3 的部分基因序列

箭头示 IVS-3 的 3'端-6 C→T 突变

Fig. 2 A part of exon 4 and IVS-3 sequence

Arrows indicate the site of -6 C→T mutation

2.3 正常对照筛查结果

在扩增片段内有 *Mbo* II 酶切位点 (5' GAAGANNNNNN ↓ 3'), 正常 PCR 产物可被 *Mbo* II 切割成 150bp 和 27bp 两个片段, 而 IVS-3 3'端-6 C→T 突变消除了 *Mbo* II 酶切位点。252 例正常对照的 PCR 产物经 *Mbo* II 消化后未发现 IVS-3 3'端-6 C→T 突变(图 3)。

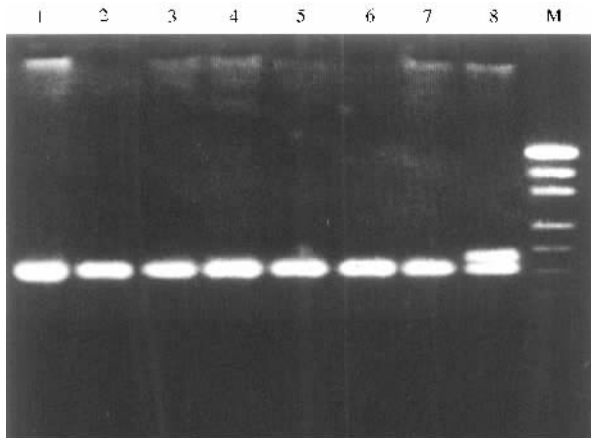


图 3 外显子 exon 4 PCR 产物经 *Mbo* II 消化的琼脂糖电泳图

1~7 为正常个体;8 为一个杂合子;

M 为 DNA 分子量标准 pUC19/*Msp* I。

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of exon 4 PCR products after digestion with *Mbo* II

Lane 1~7: PCR products from normal subjects;

Lane 8: from a heterozygote; M: DNA size marker pUC19/*Msp* I.

胞、乳腺细胞、巨嗜细胞等实质细胞合成和分泌的一种糖蛋白, 分子量 60kDa, 含 3%~8% 的糖, 存在于血清中。脂蛋白脂酶的基因缺陷与高脂血症关联的研究已取得了长足进展, 这些研究肯定了 *LPL* 基因缺陷与高甘油三酯血症及冠心病等多种疾病有密切关系。但这些研究绝大部分是在白种人群中进行的, 因此, 有必要对中国人高脂血症的发病与 *LPL* 基因变异情况作一调查研究。

目前, 已在白种人群中发现约 70 余种 *LPL* 基因突变, 这些突变对 *LPL* 基因功能的影响不一。中国人高脂血症中 *LPL* 的变异情况尚在研究中, 张秋萍等对成都地区 11 例重度内源性高甘油三酯血症患者 *LPL* 基因外显子 1~9 的序列进行分析, 结果发现有 4 例其 *LPL* 基因在外显子 6, 8 及 9 具有 3 种杂合子变异^[3]。有作者发现 *LPL* 基因一些单核苷酸多态性 (SNP) 和限制性片段长度多态性 (RFLP) 可能是易患冠心病的遗传标志^[4,5]。

LPL 基因前 9 个外显子编码一个含 475 个氨基酸残基的前肽, 该前肽脱掉一个 27 个氨基酸残基的信号肽后形成 448 个氨基酸残基的成熟肽。其外显子 4 编码与脂质底物结合的结构域, 外显子 5 是高度保守区, 酶的催化中心三联体 (Asp¹⁵⁶ - His²⁴¹ - Ser¹³²) 由外显子 4 和外显子 5 编码, 该区域的突变常导致 *LPL* 功能的丧失及降低, 致使 CM 和 VLDL 不能降解, 因此, 外显子 4 是 *LPL* 基因重要区域之一。

本研究以 258 例广东省原发性高脂血症患者为研究对象, 分析 *LPL* 基因外显子 4 及其附近区域的变异情况, 发现 2 例有内含子 3 的 3'端剪切点上游

3 讨 论

脂蛋白脂酶是脂肪细胞、心肌细胞、骨骼肌细

—6 处 C→T 突变(即 IVS-3 3'端—6 C→T 突变),为国内首次发现的一种新突变。这是继在日本人中首次发现后的 2 例亚洲黄种人中存在的突变,该突变在白种人中未见报道。日本报道,50 例高甘油三酯血症患者中发现 13 例 *LPL* 基因变异,其中 4 例为 IVS-3 3'端—6 C→T 变异^[6]。另一份日本研究报告,在 106 例高甘油三酯血症病人中发现有 6 例这种 C→T 变异,均为杂合子,变异频率接近 6%,而在 105 例正常对照组中未发现一例^[7]。这一突变在高甘油三酯血症患者中携带频率较高,提示极有可能与黄种人群高脂血症有关联,因该位点紧邻编码底物结合区和催化部位的外显子 4,因此,内含子 3 的 3'端剪切受体附近区域发生变异令人关注。但是,通过 RT-PCR 研究突变患者的 *LPL* 基因表达,没有发现 *LPL* 基因异常剪接情况^[7]。

本研究不仅在高甘油三酯血症患者中发现 IVS-3 3'端—6 C→T 突变,而且在混合型高脂血症患者中亦发现该突变,结果提示 IVS-3 3'端—6 C→T 突变可能与亚洲黄种人高脂血症有关联,该突变可能与 *LPL* 基因上其它突变位点或其它致高脂血症的基因存在连锁关系。这些研究结果也为不同人

群在 *LPL* 基因上的变异存在民族差异,从而可能导致高脂血症遗传机制上的差异,提供了又一个佐证。

参 考 文 献 (References):

- [1] Deeb S S, Peng R. Structure of the human lipoprotein lipase gene [J]. *Biochemistry*, 1989, 28(10): 8966~8971.
- [2] Wion K L, Kirchgessner T G, Lusis A J, *et al.* Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence [J]. *Science*, 1987, 235: 1638~1641.
- [3] 张秋萍, 刘秉文, 等. 11 例重度内源性高甘油三酯患者脂蛋白脂酶基因的序列分析[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1997, 29(4): 395~400.
- [4] 苏志广, 张思仲, 侯一平, 等. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者脂蛋白脂酶基因的单核苷酸多态性的初步研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2000, 17(3): 157~160.
- [5] 钱卫冲, 王 强, 朱铁兵, 等. 脂蛋白脂酶基因多态性与冠心病关系的初探[J]. *中华心血管病杂志*, 1998, 26(4): 309~312.
- [6] Nakamura T, Suehiro T, Yasuoka N, *et al.* A novel nonsense mutation and a transition in intron3 of the lipoprotein lipase gene [J]. *J Atheroscler Thromb*, 1996, 3(1): 17~24.
- [7] Li J, Kobori K, Kondo A, *et al.* The application of end user computing (EUC) for detection of lipoprotein lipase gene abnormality [J]. *Rinsho Byori*, 1999, 47(8): 737~743.

第四届国际转基因动物学术讨论会

4th International Conference on Transgenic Animals

大会主席: Dr. Wenhao Xu (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical Center, University of Kansas)

胡以平 教授(中国人民解放军第二军医大学转基因动物研究所)

大会副主席: 成国祥 教授(上海转基因研究中心主任)

大会主题: 后基因组时代的转基因技术

大会议程:

- 开幕词: 转基因技术的过程与现在
- 主题报告: TG 和 GT 在基础研究、医学及生物技术领域中的应用
- 转基因技术前沿
 - 1) 转基因与基础研究: a. 肿瘤 b. 心血管疾病 c. 神经科学 d. 感染性疾病(如 AIDS, HBV 等)
 - 2) 转基因与生物技术: a. 治疗学 b. 遗传性状修饰(动物和植物, 如转基因小鼠) c. 异种移植
 - 3) 转基因新技术: a. 诱导型 b. 病毒介导 c. Tosk
- 基因剔除技术体系
 - 1) 胚胎干细胞技术; 2) 程序性遗传修饰; 3) 基因打靶新技术: a. Cre-loxp, Flp-FRT b. 染色体工程 c. 基因捕获; 4) 人类基因剔除
- 转基因建库
 - 1) 冷藏法(精液干冻法); 2) IVF(ICSD); 3) 转基因信息学

有意参会者提交论文及报名方式如下(未提交论文者亦可参会):

E-mail: swli@genetics.ac.cn 电话/传真: 010-64889348 联系人: 李绍武 陈惠萍

收到报名后寄报到通知

1. 会议时间: 2002 年 11 月 26~29 日 会议地点: 上海国际饭店(中国上海南京西路 170 号)

2. 工作语言: 英语

3. 会务费: i. 1500 元/每人(含午餐费, 不住宿)需要提供住宿的参会代表, 住宿费 80 元/天。

ii. 参加过以往一届会议的优惠 5%, 二届的 10%, 三届的 15%。iii. 学生凭学生证会务费减半。