

PON 基因簇序列变异筛查研究

王晓玲^{1,2}, 范中杰³, 黄建凤¹, 宿少勇^{1,2}, 赵建功¹, 顾东风¹

(1. 中国医学科学院中国协和医科大学阜外心血管病医院 群体遗传及防治研究室, 北京 100037;
2. 国家人类基因组北方研究中心, 北京 100176; 3. 中国医学科学院中国协和医科大学协和医院, 北京 100730)

摘要: 系统筛查 *PON 1*、*PON 2* 及 *PON 3* 基因编码、剪接及侧翼序列, 以期发现所有潜在功能多态基因座, 为进一步探讨 *PON* 基因家族与心血管疾病的关系做准备。随机选择 48 例冠心病患者作为筛查对象, 以 PCR 产物直接测序检测 DNA 序列变异。扩增片断涵盖整个外显子, 其两侧部分内含子区域及 5' 和 3' 侧翼序列。(1) 13.9 kb 测序范围内共发现 31 个多态性基因座, 均为单核苷酸多态 (SNP), 其中 17 个 SNP 为首次报道。(2) 国人中 SNP 构成和等位基因频率与高加索人群存在显著差异。(3) 一个基因内部两个或多个多态性基因座间存在完全或近乎完全连锁不平衡相当常见。中国汉族人群中 *PON* 基因簇多个潜在功能多态基因座的识别及这些基因座间的强连锁不平衡状态, 为在国人中探讨 *PON* 基因簇与心血管疾病关系提供了重要的基础数据。

关键词: 单核苷酸多态; 遗传; *PON* 基因簇

中图分类号: Q987

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)04-0539-05

Polymorphisms Screening of *PON* Gene Cluster

WANG Xiao-Ling^{1,2}, FAN Zhong-Jie³, HUANG Jian-Feng¹, SU Shao-Yong^{1,2},
ZHAO Jian-Gong¹, GU Dong-Feng¹

(1. Division of Population Genetics and Prevention, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100037, China; 2. National Human Genome Center, Beijing 100176, China;
3. Peking Union Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

Abstract: To identify all putative functional polymorphisms of *PON* gene cluster in Chinese Han population, common polymorphisms of *PON 1*, *PON 2* and *PON 3* gene were identified by directly sequencing of genomic DNAs derived from 48 randomly selected patients with coronary heart disease. We designed PCR arrays to amplify regions up to about 1 kb upstream from transcription-initiation sites, i. e., putative promoter regions, all exons and adjacent non-coding regions. In a total length of 13.9 kb explored, we identified thirty-one SNPs, of which, 17 were first reported. Allele frequencies of some polymorphisms are significantly different from those reported in Caucasian populations. Complete or nearly complete association between polymorphisms was frequently observed. The identified multiple putative functional polymorphisms in *PON* gene cluster and their linkage disequilibrium patterns in combination with the population specific frequencies are of values for further association studies of *PON* gene cluster with cardiovascular disease.

Key words: single nucleotide polymorphism; genetics; paraoxonase gene cluster

收稿日期: 2004-05-13; 修回日期: 2004-07-06

基金项目: 国家十五攻关项目 (编号: 2002BA711A05) 和北京市科委 (编号: H020220030130) 项目资助 [This Work was Funded by Grant (No. 2002BA711A05) of the National Tenth Five-year Plan Key Program from the Ministry of Science and Technology and Grant (No. H020220030130) Biomedical Projects from the Council of Science and Technology, Beijing].

作者简介: 王晓玲 (1974—), 女, 博士, 研究方向: 遗传流行病学。E-mail: wangxl_74@yahoo.com

通讯作者: 顾东风 (1958—), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 遗传流行病学。Tel: 010-68331752, E-mail: gudongfeng@vip.sina.com

1999年,最具影响力的杂志发表了4篇旨在探讨人类基因序列变异特点的研究^[1~4]。这些研究的共同结论是候选基因内存在相当数量的常见多态及不只一个功能多态基因座,多态性基因座间存在强连锁不平衡。这对生物学和医学领域中关注基因型变异与表型变异间生物和统计学关系的研究具有重要意义,即必须探讨每一个多态性基因座的特定等位基因及各多态性基因座间联合作用对疾病性状的影响,而不仅仅是孤立的分析基因内一个功能突变基因座。

对硝苯磷酸酯酶基因簇(PONs)位于7号染色体长臂21.3~22.1区,至少由PON 1、PON 2和PON 3 3个基因组成,顺序为着丝粒-PON 1-PON 3-PON 2-端粒,跨度约500 kb^[5]。PON 1基因产物——血清对硝苯磷酸酯酶可以抑制LDL氧化。最近有研究发现PON 2和PON 3基因产物也具有抗氧化功能,提示该基因簇可能影响心血管疾病的遗传易感性。PON 1基因编码区Q192R多态和L54M多态是最早定位的人类遗传多态性之一。2000年,Levieu^[6]和Suehiro^[7]等分别在瑞士和日本人群中就对PON 1基因启动子区进行筛查,发现PON 1基因启动子区存在5个强连锁不平衡的SNP基因座,分别为-908G/C、-831G/A、-162G/A、-126G/C和-107C/T。2000年,Ohnishi^[8]和尤蓓^[9]等分别在日本人群和中国南方汉族人群中系统筛查了PON 1基因的编码序列,发现两个人群中均有Q192R多态,日本人群虽然有L54M多态,但L54M等位基因频率显著低于高加索人群(0.06/0.36),而中国南方汉族人群中未发现L54M多态。2001年,Brophy^[10]等在美国高加索人群PON 1基因的3'UTR区发现了4个SNP位点。1996年在克隆PON 2基因的同时,也发现了其两个常见多态A148G和S311C。目前未见PON 3基因多态的报道。

考虑到人群和种族的差异及人类基因组研究关于基因序列变异特点的最新进展,本研究的目的是在中国汉族人群中系统筛查PON 1、PON 2及PON 3基因编码、剪接及侧翼序列,以期发现所有潜在功能多态基因座,为进一步探讨PON基因家族与心血管疾病的关系做准备。

1 对象和方法

1.1 研究对象

随机选择48例无血缘关系的北方汉族冠心病

患者作为筛查对象。病例经冠状动脉造影确诊(39例)和/或有明确急性心肌梗塞病史(35例)。该样本量发现少见等位基因频率大于>0.01 SNP的概率等于95%^[11]。冠状动脉造影阳性标准:主要冠状动脉之一横截面狭窄超过70%或左主干狭窄超过50%。急性心肌梗塞诊断标准:根据WHO 1979年的诊断标准。

1.2 实验方法

以PCR产物直接测序检测DNA序列变异。根据GenBank中公布的PON 1、PON 2和PON 3的基因序列及基因结构,应用Oligo6.53软件设计引物,使扩增片段涵盖整个外显子及其两侧部分内含子区域。5'及3'侧翼序列分别与第1及最末外显子同时扩增。共设计并应用23对引物完成对目的片段的扩增,引物序列、扩增片段长度及退火温度可由作者提供。PCR反应体系(25 μL):基因组DNA 50 ng、dNTPs 200 μmol/L、Taq酶(TaKaRa公司)1 U、Mg²⁺ 2.0 mmol/L、Tris-HCl 10 mmol/L、KCl 50 mmol/L及引物200 pmol/L。PCR循环参数:95℃预变性5 min,经94℃ 45 s,48.5~62℃ 40 s,72℃ 45 s,循环30 w后于72℃延伸10 min。PCR产物经纯化后进行测序反应。以PCR引物作为测序引物,大于1 kb的片段,在400 bp左右增加一条测序引物。测序在ABI 3700测序仪上完成。在SUN工作站上,应用Phred/Phrap/consed程序进行序列拼接、序列比对和SNP基因座识别。对于少见等位基因频率小于0.05的SNP基因座,双向测序进行核实。

1.3 SNP命名原则

根据Utah州SNP网站上公布的PON 1、PON 2和PON 3的基因序列为参考进行SNP的命名,以开放阅读框架的第一个核苷酸作为核苷酸1,其上游(5'侧翼序列)逆向计为-N;3'侧翼序列自开放阅读框架的最后一个核苷酸之后计为+N;内含子区SNP以核苷酸的位置表示;编码区SNP以蛋白质中相应的氨基酸及其位置进行命名。

1.4 统计学分析

(1)计算各多态性基因座的等位基因频率及杂合度。(2)核苷酸变异度,定义为每个核苷酸基因座发生变异的概率。以无限基因座中心等位基因模型估计核苷酸变异度(θ)和其标准差 $S(\theta)$,计算公式如下:

$$\theta = K/aL, S(\theta) = \sqrt{a\theta L + b(\theta L)^2}/aL,$$

$$a = \sum_{t=2}^n \frac{1}{(t-1)}, b = \sum_{t=2}^n \frac{1}{(t-1)^2}$$

K 代表一定基因组长度 (L , bp) 范围内识别的 SNP 数目, n 为样本等位基因的数目, 本研究为 96。

2 结果

2.1 DNA 序列多态分布

测序总长度为 13.9 kb, 包括 2 237 bp 的 5' 侧翼序列、2 683 bp 的编码序列、7 058 bp 的内含子序列及 1 922 bp 的 3' 侧翼序列。48 例冠心病患者, 96 条染色体, 13.9 kb 的测序范围内共发现 31 个多态基因座, 均为单核苷酸多态 (SNP), 其中 7 个在 5' 侧翼序列, 5 个在编码区、14 个在内含子区、5 个在 3' 侧翼序列; 17 个 SNP 为首次报道; 少见等位基因频率在 0.02~0.50 之间 (表 1)。31 个 SNP 中 19 个为转换, 12 个为颠换, 转换与颠换的比率为 1.58 (表 2)。

表 1 3 个基因的测序长度及 SNP 数目

Table 1 The sequencing length of three genes and the number of SNPs

基因 Gene name	测序长度 Sequencing length (bp)				SNPs
	5' 侧翼序列 5' flanking	外显子 Exon	内含子 Intron	3' 侧翼序列 3' flanking	
	<i>PON</i> 1	1278	1068	2646	
<i>PON</i> 2	415	1003	2752	589	10
<i>PON</i> 3	544	612	1660	632	5

表 2 SNPs 置换类型

Table 2 Substitution type of SNPs

置换类型 Substitution type	编码区 SNPs coding	非编码区 SNPs non-coding	总计 Total
转换 Transition	3	16	19
颠换 Transversion	2	10	12
转换/颠换 Transition/transversion	1.5	1.6	1.58

2.2 核苷酸变异度

根据无限基因座中心等位基因模型估计核苷酸变异度 (θ) 和其标准差 $S(\theta)$ 。如表 3 所示, 非编码区的变异度是编码区的 1.24 倍 (0.000451 ± 0.000143 vs 0.000363 ± 0.000186), 而编码区错义突变的变异度远远高于同义突变, 前者约是后者的 4 倍, (0.00029 ± 0.000162 vs 0.000073 ± 0.000075)。

表 3 不同类型 SNP 发生率及核苷酸变异度分析

Table 3 Analyses of sequence diversity and nucleotide diversity

SNP 类型 Sequence type	筛查的序 列长度 Sequence length (bp)	SNPs	发生率 (SNP/bp) Sequence diversity	核苷酸变异度 ($\times 10^{-4}$) Nucleotide diversity
编码区 Coding region	2683	5	1/537	3.63 ± 1.86
错义突变 Nonsynonymous		4	1/671	2.90 ± 1.62
同义突变 Synonymous		1	1/2683	0.73 ± 0.75
非编码区 Non-coding region	11217	26	1/431	4.51 ± 1.43
5' UTR	2237	7	1/320	6.09 ± 2.76
3' UTR	1922	5	1/384	5.06 ± 2.59
内含子区 Intronic region	7058	14	1/504	3.86 ± 1.41
总计 Total	13900	31	1/448	4.34 ± 1.33

2.3 筛查区域中国汉族人群 *PON* 基因簇 SNP 基因座及频率

由表 4 可见, 与中国南方人群相同, 在中国北方汉族冠心病患者中同样没有发现 *PON* 1 基因的 L54M 多态, 但在 *PON* 1 基因的第 5 外显子 108 位发现一个 A/G 突变。该突变使 *PON* 1 第 160 位氨基酸由精氨酸 (R) 变为甘氨酸 (G)。*PON* 1 基因 3' UTR 发现的 3 个 SNP 基因座中, 两个与 Brophy 等报道的相同, 即 +548A/G 和 +579C/T。除发现 *PON* 2 基因编码区 2 个改变氨基酸编码的常见多态外, 在外显子 4 和 3' UTR 各发现了一个低频 SNP, 但前者不改变氨基酸编码。在 *PON* 3 基因的编码区未发现任何多态性基因座, 但在 5' 和 3' 侧翼序列各发现一个 C/A 多态和 G/A 多态。

2.4 多态性基因座间的完全连锁不平衡

一个基因内部两个或多个多态性基因座间存在完全或近乎完全连锁不平衡 (不同基因座的基因型几乎完全一致, 有相同的等位基因频率, 人群中主要存在两种单体型) 很常见, 如 *PON* 1 基因的 -1076A/G、-162G/A 和 -126G/C 多态, 少见等位基因频率均为 0.16, 人群中只存在 AGG 和 GAC 两种单体型。完全连锁不平衡还见于 *PON* 1 基因的内含子 1 的 -107C/T 多态之间、R160G 与 26171C/T 多态之间及 *PON* 2 基因的 A148G、23963A/C、26060G/A、29372T/A 与 S311C 多态之间。

表 4 筛查区域发现的 SNP 基因座

Table 4 SNPs identified in three genes

基因 Gene name	SNP	区域 Region	类型 Type	少见等位 基因频率 Minor allele frequency
PON1	-1076A/G	5' Flank	5' Flank	0.16
	-908G/C	5'UTR	5'UTR	0.50
	-831G/A	5'UTR	5'UTR	0.20
	-162G/A	5'UTR	5'UTR	0.16
	-126 G/C	5'UTR	5'UTR	0.16
	-107A/G	5'UTR	5'UTR	0.50
	15996G/A	Intron 1	Intronic	0.48
	22757A/C	Intron4	Intronic	0.26
	R160G	Exon5	Nonsyn	0.08
	26171C/T	Intron5	Intronic	0.08
	Q192R	Exon6	Nonsyn	0.38
	31935G/C	Intron7	Intronic	0.20
	31960T/G	Intron7	Intronic	0.20
	+332A/G	3'UTR	3'UTR	0.36
	+548A/G	3'UTR	3'UTR	0.46
	+579C/T	3'UTR	3'UTR	0.09
	PON2	K(A)90K(G)	Exon4	Syn
23963A/C		Intron4	Intronic	0.16
A148G		Exon5	Nonsyn	0.16
26060G/A		Intron5	Intronic	0.16
29316A/G		Intron7	Intronic	0.02
29372T/A		Intron7	Intronic	0.16
29923A/T		Intron7	Intronic	0.14
30684T/A		Intron8	Intronic	0.38
S311C		Exon9	Nonsyn	0.16
+23G/A		3'UTR	3'UTR	0.02
PON3	-133C/A	5'UTR	5'UTR	0.25
	4487T/C	Intron1	Intronic	0.02
	8854G/A	Intron2	Intronic	0.26
	9466G/A	Intron3	Intronic	0.38
	+121G/A	3'UTR	3'UTR	0.09

注:黑体字为新识别的 SNP 基因座。

Note: The novel polymorphisms identified in this study were shown in bold.

3 讨论

对 *PON* 基因簇序列变异的系统筛查研究共发现了 31 个 SNP 基因座,其中 17 个 SNP 为首次报道。13.9 kb 测序范围内,核苷酸变异度为 0.00043,即人群中随机选择两个序列,每 2326 个碱基就有一个不同。这与 Cambien^[4] 等对 36 个心血管疾病候选基因序列变异研究的结果相似(0.00037),均明显低于 Nickerson^[3] 等报道的 0.002。差别的主要原因可能是 Nickerson 筛查的 10 kb 脂蛋白酯酶基因序列 90% 在内含子区。由于选择压力的作用,编码区核苷酸变异度低于非编码区,在 Nickerson 等人的研究中,后者是前者的 4 倍。另一个原因是 Nickerson 等筛查了 71 个个体,高于本研究的 48 个个体及 Cambien 等研究的 20 个

个体,有更大的概率发现罕见 SNP。

一般情况下,同义 SNP 的概率高于错义 SNP,因为错义 SNP 影响基因产物的功能,进化过程中,由于选择的压力而逐渐消失。但是,对 *PON* 基因簇序列的筛查发现的 5 个编码区 SNP 中,4 个改变氨基酸编码。这种错义 SNP 的高发生率可能的原因有两个:第一,氨基酸替代可能并不影响基因产物的结构或极性;第二,在一定环境因素下,氨基酸改变可能具有某些有益作用,如杂合子优势,所以在选择压力下仍能保持高发生率^[12]。

与 Cambien 等研究相似,*PON* 基因簇各基因内部的多态性基因座间存在强连锁不平衡,两个多态性基因座间存在完全连锁不平衡是常见现象,一个基因内部多个多态性基因座间存在近乎完全连锁不平衡也是一种常见现象,除了完全一致多态性产生过多信息外,这种现象增加了存在功能单体型的可能性。这表明如果以关联研究识别复杂疾病的候选基因,了解潜在的生物学机制则需要针对特定基因的方法和研究该基因所有序列变异,即必须探讨每一个多态性基因座的特定等位基因及各多态性基因座间联合作用对疾病性状的影响,而不仅仅是孤立的分析基因内一个功能突变基因座。以下几个实例可以证明上述观点:1. *ACE* 基因第 16 内含子的插入/缺失多态与血浆 ACE 水平强相关,但进一步的分子筛查发现 *ACE* 基因的编码区和调节区序列发现还存在两个存在强连锁不平衡的多态性基因座,以相加的方式影响血浆 ACE 水平^[13];2. *CETP* 基因的 *Taq I* 多态性与 *CETP* 浓度和 HDL-C 水平间均存在关联,并于饮酒间存在相互作用,但系统筛查 *CETP* 基因序列发现至少存在 3 个功能突变基因座以不同机制影响 *CETP* 浓度和 HDL-C 水平^[14];3. *APOE* 基因 112 位和 158 位多态产生的 3 个等位基因已是众所周知,但最近发现基因启动子区存在影响 *APOE* 表达的第三个多态,且与其他两个存在连锁不平衡^[15]。上述的例子表明应调查一个基因的所有多态性基因座,而不只是几个标记基因座。同时也强调了测定相关表型的重要性,这有助于识别功能突变基因座。

人群和种族序列变异的差别是另外一个需要关注的问题。以 *PON 1* 基因为例,在 *PON 1* 筛查区域共报道的 21 个 SNP 中,与高加索人群相比,10 个 SNP 为两个人群所共有的,6 个 SNP 为中国汉族人

群所特有的,另有 5 个 SNP 为高加索人群所特有的;某些共有的 SNP 其等位基因频率在两个人群之间也存在显著差别,如 Q192R 多态,中国汉族人群中 Q 等位基因频率为 0.38,而高加索人群为 0.73^[16]。这充分强调了鉴定种族特异性 SNP 的重要性。在中国南方人群和日本人群中未发现 R160G 多态的主要原因可能是序列筛查方法的不同所致,前者采取的是敏感度较低的变相梯度凝胶电泳(DGGE),后者使用了 DNA pooling 技术,敏感度也低于单个样本的直接测序。

既往文献及我们的研究均证明,尽管个体之间的差异大于族群与群体之间的差异,但一个群体的基因组特点,甚至于与疾病易感性相关的差异是客观存在的。尽管在国际 SNP 协作组的“DNA Polymorphism Discovery Resource”中,Asian-American(亚裔)的个体占 25%。由于他们的亚裔来源与代表性尚不清楚,独立的个体数目未达统计学要求,直接使用国际 SNP 的数据将不可避免的造成多个实验室的重复劳动与资源浪费。我国搬用 CEPH 的 STR 数据(现有的连锁分析手段都需要输入来自同一群体的 STR 基因座各等位基因的频率)曾造成计算误差。我国法医 DNA 领域在使用 STR(美国 FBI 的 13 个推荐基因座)等也曾经出现频率问题而影响了可靠性与使用价值。因此,使用中国人群的材料,筛选适用于我国人群的 SNP,是了解中华民族主要群体的基因组特点,使我国受惠于人类基因组计划、应用 SNP 不可逾越的基础研究。

参 考 文 献(References):

- [1] Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane C R, Lim E P, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley G Q, Lander E S. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 1999, 22(3): 231~238.
- [2] Halushka M K, Fan J B, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet*, 1999, 22(3): 239~247.
- [3] Nickerson D A, Taylor S L, Weiss K M, Clark A G, Hutchinson R G, Stengard J, Salomaa V, Vartiainen E, Boerwinkle E, Sing C F. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 233~240.
- [4] Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann S M, Mallet C, Ricard S, Behague I, Hallet V, Blanc H, Loukaci V, Thillet J, Evans A, Ruidavets J B, Arveiler D, Luc G, Tiret L. Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorders. *Am J Hum Genet*, 1999, 65(1): 183~191.
- [5] Primo-Parmo S L, Sorenson R C, Teiber J, La Du B N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene is one member of a multigene family. *Genomics*, 1996, 33: 498~507.
- [6] Leviev I, James R W. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 516~521.
- [7] Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y, Shindo M, Tanaka H, Hashimoto K. A polymorphism upstream from the human paraoxonase gene and its association with PON 1 expression. *Atherosclerosis*, 2000, 150: 295~298.
- [8] Yamada R, Tanaka T, Ohnishi Y, Suematsu K, Minami M, Seki T, Yukioka M, Maeda A, Murata N, Saiki O, Teshima R, Kudo O, Ishikawa K, Ueyosi A, Tateishi H, Inaba M, Goto H, Nishizawa Y, Tohma S, Ochi T, Yamamoto K, Nakamura Y. Identification of 142 single nucleotide polymorphisms in 41 candidate genes for rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Hum Genet*, 2000, 106(3): 293~297.
- [9] YOU Bei, YU Jin-De, LU Lin, LE Wei, TAO Rong, HE Ru-Min, CAI Xu, ZHU Ding-Liang, GONG Lan-Sheng. The relationship between paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2000, 16(1): 3~5.
尤 蓓, 于金德, 陆 林, 乐 玮, 陶 蓉, 何汝敏, 蔡 煦, 朱鼎良, 龚兰生. 中国人群 II 型糖尿病患者付氧酶基因多态性与冠心病关系的研究. *中华内分泌代谢杂志*, 2000, 16(1): 3~5.
- [10] Brophy V H, Jampsa R L, Clendenning J B, McKinsty L A, Jarvik G P, Furlong C E. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 1428~1436.
- [11] Kruglyak L, Nickerson D A. Variation is the spice of life. *Nat Genet*, 2001, 27(3): 234~236.
- [12] Unoki M, Furuta S, Onouchi Y, Watanabe O, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Tamari M, Nakamura Y. Association studies of 33 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 29 candidate genes for bronchial asthma: positive association a T924C polymorphism in the thromboxane A2 receptor gene. *Hum Genet*, 2000, 106(4): 440~446.
- [13] Villard E, Soubrier F. Molecular biology and genetics of the angiotensin-I-converting enzyme: potential implications in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 1996, 32(6): 999~1007.
- [14] Corbex M, Poirier O, Fumeron F, Betoulle D, Evans A, Ruidavets J B, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Cambien F. Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction. *Genetic Epidemiology*, 2000, 19: 64~80.
- [15] Lambert J C, Pasquier F, Cattel D, Frigard B, Amouyel P, Chartier-Harlin M C. A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 533~540.
- [16] Hegele R A. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med*, 1999, 31: 217~224.