

· 临床研究 ·

新发现的蒙古族 ABCA1M233V 基因和 R219K 基因多态性

袁托亚, 刘晓宇*, 王悦喜

(内蒙古医学院第一附属医院心内科, 呼和浩特 010050)

【摘要】目的 探讨 ATP 结合盒转运子 A1 基因 (ABCA1) M233V 和 R219K 多态性在内蒙古地区蒙古族人群中的分布及其与血脂和冠心病的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法检测 115 例蒙古族冠心病患者和对照组 ABCA1 基因相应片段的多态性。结果 内蒙古地区蒙古族人群中 ABCA1 基因 M233V 多态性位点存在 MM, MV 和 VV 三种基因型, 其在冠心病患者和对照组人群的基因多态性分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MM 组和 MV+VV 组总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG), 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对照组 KK 基因型的频率显著高于 CHD 组 ($P < 0.05$)。KK 基因型的 HDL-C 水平显著高于 RR 型 ($P < 0.05$), KK 型 TG 水平明显低于 RR 型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 内蒙古地区蒙古族人群中存在新发现的 ABCA1 基因 M233V 多态性, ABCA1 基因 R219K 多态性与内蒙古地区蒙古族人群冠心病的遗传易感性相关, KK 基因型产生有益的临床血脂谱, 可能是冠心病患者的低危遗传标记。

【关键词】冠心病; 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1; 多态性; 蒙古族

【中图分类号】 R541.4

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00026

A novel polymorphism in ABCA1 gene (M233V and R219K) in Mongolian nationality population

YUAN Tuoya, LIU Xiaoyu*, WANG Yuexi

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical College, Huhehot 010050, China)

【Abstract】 Objective To investigate ATP-binding cassette transporter 1(ABCA1) M233V and R219K gene polymorphism in Mongolian nationality population in Inner Mongolia region and its relationship with blood lipids and coronary heart disease(CHD). **Methods** The target fragments of ABCA1 gene were amplified and analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphism(PCR-RFLP) technique in 115 Mongolian control subjects without CHD and patients with CHD. **Results** The subjects presented ABCA1 gene M233V polymorphism, which had three genotypes: MM genotype, MV genotype and VV genotype. There was no significant difference in frequency of allele and genotype in M233V polymorphism between controls and CHD patients ($P > 0.05$). No significant difference was found in levels of total cholesterol(TC), triglyceride(TG), high density lipoprotein-cholesterol(HDL-C) and low density lipoprotein-cholesterol(LDL-C) between MM genotype and MV+VV genotype ($P > 0.05$). The frequency of KK genotype was significantly higher in controls than in CHD patients ($P < 0.05$). KK genotype had higher HDL-C level ($P < 0.05$) and lower TG level than RR genotype ($P < 0.05$). **Conclusion** In Mongolian population in Inner Mongolia region, M233V is a novel polymorphism in ABCA1 gene. ABCA1 gene R219K polymorphism is associated with CHD risk. The KK genotype results in a beneficial profile of blood lipids, which may be a novel genetic marker for low risk of CHD.

【Key words】 coronary heart disease; ATP binding cassette transporter 1; polymorphism; Mongolian nationality

This work was supported by Inner Mongolia Natural Science Foundation (20080404MS1135)

国内外均有研究表明, 三磷酸腺苷结合盒子转运体1 (ATP binding cassette transporter 1, ABCA1) 功能障碍可促进冠心病的发生发展。我们在中国蒙古族人群中发现一个国内外仅见一次报道的新单核苷酸多态性位点即M233V基因多态性位点的改变, 我

们首次发现了VV型 (GG型) 基因型变异。本研究探讨了内蒙古蒙古族人群ABCA1基因R219K和M233V变异位点及与血脂、冠心病的关系, 旨在为内蒙古地区蒙古族冠心病的预防及治疗提供进一步的理论依据。

收稿日期: 2011-06-19; 修回日期: 2011-08-29

基金项目: 内蒙古自然科学基金(20080404MS1135)

通讯作者: 刘晓宇, Tel: 0471-6636692, E-mail: xxggood1@126.com

1 对象与方法

1.1 对象

共观察内蒙古地区蒙古族115例,均来自2008年12月~2010年10月内蒙古医学院第一附属医院心内科住院患者。冠心病组60例,平均年龄(58.77±9.98)岁,行冠状动脉造影确诊(至少1支冠状动脉直径狭窄50%)30例,经临床症状结合心电图、超声心动图、平板运动实验、心肌灌注ECT显像及64排冠状动脉CT确诊30例;对照组55例,平均年龄(55.10±11.8)岁,经询问病史、体检、实验室检查(血、尿、粪便常规,血脂,血糖,肝、肾功能),心电图、胸片、心脏彩超、心肌灌注ECT显像、64排冠状动脉CT、冠状动脉造影等检查排除冠心病、严重肝肾功能不全。排除标准:风湿性疾病、大动脉炎、血液病、结核、肿瘤、严重肝肾功能不全、脑血管疾病等。

1.2 方法

1.2.1 血脂水平的检测 所有化验检查均采用次日清晨空腹采取肘静脉血3ml,分离血清测定血脂水平,甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)以氧化酶法测定,高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)用PEG变构酶法测定,试剂均为Leadman公司生产。仪器为日本OLYMPUS AU 600全自动生化分析仪。

1.2.2 DNA提取 用EDTA抗凝真空采血管采集外周静脉血3ml,置于-80保存备用。按照血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒的说明提取血液DNA(由TIANGEN公司提供)。

1.2.3 设计引物 设计PCR引物, R219K上游引物:5'-GTATTTTGTGCTACCAGTTACATTTGACAA-3', 下游引物:5'-GATTGGCTTCAGGATTGTTGGAA-3'。M233V上游引物:5'-GCAAGGCTACCAGTTACATT-3', 下游引物:5'-GTCCAAGGAAAAGCCTCA-3', 由上海生工生物工程技术服务公司合成。

1.2.4 ABCA1基因多态性片段的PCR扩增 PCR反应在PTC-200型循环仪中进行。PCR反应体系50μl,包括:2×Taq PCR MasterMix(由Tiangen公司提供)25μl, DNA 2.0μl, 上游和下游引物分别1.0μl(10μmol/L), 灭菌超纯水21μl。PCR反应条件:94预变性5min; 94变性30s, 53退火30s, 72延伸40s, 共25个循环; 72终末延伸5min。

1.2.5 PCR产物的酶切消化 Xag 酶切反应体系30μl, PCR产物10μl, Xag 内切酶(由Fermantas公

司提供)1.0μl, 10×NEB Buffer 2.0μl, 灭菌超纯水18.0μl, 置于37酶切12h。取酶切产物在2%琼脂糖凝胶中电泳检测并确定样品基因型。DNA Marker为BioMarker(100bp, 由BioFluk公司提供), CviA II酶切反应体系20μl, PCR产物10μl, 限制性内切酶CviA II(由BioLab公司提供)0.6μl, 10×NEB Buffer 2.0μl, 灭菌超纯水7.4μl。置于25恒温水浴箱中18h, 2%琼脂糖凝胶验证。

1.3 统计学处理

采用SPSS13.0统计学软件进行数据处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用t检验, 两组以上比较采用One Way ANOVA检验, 计数资料的组间比较用 χ^2 检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冠心病组与对照组的一般资料和基因分布平衡检验

两组研究对象一般资料见表1。对冠心病组和对照组的基因型分布进行了平衡检验, 结果表明, R219K基因型(冠心病组: $\chi^2=0.023$, $df=1$, $P>0.05$; 对照组: $\chi^2=3.04$, $df=1$, $P>0.05$)和M233V基因型(冠心病组: $\chi^2=0.83$, $df=1$, $P>0.05$; 对照组: $\chi^2=1.17$, $df=1$, $P>0.05$)的分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律, 具有群体代表性。

表1 冠心病组和对照组一般资料
Table 1 General data of the subjects

项目	冠心病组(n=60)	对照组(n=55)
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	58.77±9.98	55.10±11.8
男/女(n/n)	42/18*	23/32
吸烟史(%)	38.33*	18.18
高血压(%)	51.67	49.09
糖尿病(%)	20.00*	3.64
HDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.11±0.28*	1.31±0.44
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	3.24±0.92*	2.66±0.85
TG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.99±1.02*	1.52±0.67
TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	4.84±1.02	4.50±1.07

HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇。与对照组比较, *P<0.05

2.2 R219K位点多态性分析

R219K扩增产物片段长度为177bp, 经Xag酶切后, K等位基因被切为3个可能的基因型(图1)。RR型: 纯合子GG(177bp); RK型: 杂合子GA(177bp, 107bp, 70bp); KK型: 纯合子AA(107bp, 70bp)。表2结果表明, 冠心病组与对照组间基因型和等位基因频率分布比较, 冠心病组KK型分布明显低于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05), 基因型KK个体显著减少患冠心病的危险[OR=0.411, 95%CI 0.17~0.99]。

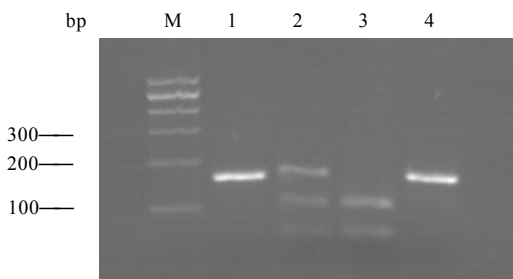


图1 R219K酶切(Xag I)产物

Figure 1 Xag I digested products of R219K
M: 100bp DNA Marker; 1,4: RR 基因型; 2: RK 基因型; 3: KK 基因型

表2 两组 ABCA1 基因型和等位基因频率分布
Table 2 Distribution of ABCA1 allele and genotype in two groups [n(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		RR	RK	KK	R	K
对照组	55	16(29.1)	21(38.2)	18(32.7)	53(0.482)	57(0.518)
冠心病组	60	22(36.7)	28(46.7)	10(16.7)*	72(0.600)	48(0.400)

注: 与对照组比较, *P < 0.05

2.3 M233V 位点多态性分析

ABCA1 基因第 7 号外显子 DNA 序列中 1092 位上一个核苷酸由 G → A 的改变 (A1092G), 导致 233 位氨基酸由甲硫氨酸转变为缬氨酸 (M233V)。ABCA1 产物片段总长度为 240bp。经特异性限制内切酶消化之后, 这个 240 bp 片段可被切割成三个可

能的基因型: VV(240 bp), MV(240bp, 146bp, 94bp), MM(146bp, 94bp)(图 2)。冠心病组发现 18 例 A1092G 位点的改变, 发生率为 30%, 其中 17 例为 MV 型, 1 例为 VV 型。对照组 14 例改变, 全部为 MV 型, 发生率为 25.6%。两组人群的基因多态性分布差异无统计学意义。

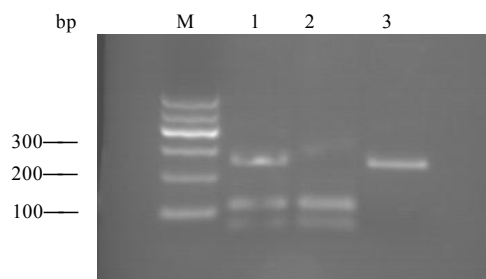


图2 M233V酶切(CviA)产物

Figure 2 CviA digested products of M233V
M: 100bp DNA Marker; 1: MV 基因型; 2: MM 基因型; 3: VV 基因型

2.4 R219K 和 M233V 各基因型血脂水平比较

M233V V 等位基因携带者和非携带者间 TC, TG, HDL-C, LDL-C 比较, 差异无统计学意义 (表 3)。R219K ABCA1 不同基因型之间血脂水平比较, KK 型和 RK 型 TG 与 RR 型比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), KK 型 HDL-C 与 RR 型比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05; 表 4)。

表3 ABCA1 M233V V 等位基因携带者和非携带者血脂比较
Table 3 Comparison of plasma lipid levels between ABCA1M233V V allele and the non-V allele (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

基因型	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
MV+VV	32	4.64 ± 1.12	1.66 ± 0.47	1.20 ± 0.33	3.03 ± 0.94
MM	83	4.69 ± 1.02	1.81 ± 1.02	1.21 ± 0.40	2.94 ± 0.93

注: HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇

表4 ABCA1 R219K 三种基因型血脂比较
Table 4 Comparison of plasma lipid levels among three ABCA1R219K genotypes (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

基因型	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
RR	38	4.73 ± 1.03	2.10 ± 1.19	1.14 ± 0.33	3.06 ± 0.95
RK	49	4.66 ± 0.90	1.66 ± 0.49*	1.18 ± 0.30	2.88 ± 0.95
KK	28	4.64 ± 1.32	1.49 ± 0.88*	1.37 ± 0.51*	2.96 ± 0.89

注: TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL-C: 高密度脂蛋白-胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白-胆固醇。与 RR 基因型比较, *P < 0.05

3 讨论

1999年人们阐明ABCA1基因变异与丹吉尔病、家族性HDL-C缺乏的发生密切相关。ABCA1基因属于ATP结合盒转运子基因超家族中的一个亚型, ABCA1介导的细胞内胆固醇流出, 是胆固醇逆向转运的起始环节, 机体清除组织细胞内过多的胆固醇主要是通过胆固醇逆向转运来实现的。如果ABCA1基因突变, 有可能使其编码的氨基酸改变, 从而导致其功能发生改变, 使胆固醇外流障碍, 胆固醇和

胆固醇脂在巨噬细胞内积聚而成为泡沫细胞, 继而浸润血管壁, 促进动脉粥样硬化和冠心病的发生发展。已有研究显示, 用骨髓移植的方法使巨噬细胞过表达, ABCA1可以明显抑制动脉粥样硬化病变的进程^[1]。在动脉壁, 增加ABCA1的表达可使巨噬细胞清除自身过多的胆固醇, 从而发挥抗动脉粥样硬化的作用^[2]。因此, ABCA1基因是调节胆固醇和磷脂代谢平衡的关键途径, ABCA1与动脉粥样硬化的发生、发展密切相关。

单核苷酸多态性在人群中的发生率差异很大,

不同类型和位置的ABCA1变异,其表现各异,即使是相同或距离较近的变异,其意义也截然不同。有些变异(如同义突变)可能没有或很少影响到ABCA1的功能,与血浆HDL-C水平变化无明显相关性,如-565 C/T,但其T等位基因可能增加亚临床型心血管疾病的危险性^[3]。有一些变异使HDL-C增高^[3-5],具有抗动脉粥样硬化作用和减少冠心病的危险性,如R219K,C-105T,V771M和V825I;有些变异使HDL-C水平下降,增加冠心病的危险性,如E1172D和R1587K^[5]。在启动区的核苷酸多态性与动脉粥样硬化的严重程度相关,如-191C/-320C/-477T,G191C和A-1096G加重动脉粥样硬化,而C17G减轻动脉粥样硬化,这些变异不伴有血脂水平的改变。此外,V825I,I883M,E1172D单核苷酸多态性能使临床事件增加及动脉粥样硬化加重^[6]。

目前,国内外研究较多且较深入的单核苷酸多态性突变是R219K型ABCA1,通过PCR-RFLP方法检测内蒙古地区蒙古族ABCA1 R219K多态性,证实了在内蒙古地区蒙古族人群中存在ABCA1 R219K变异。冠心病组RR型频率高于对照组^[7],但未达到统计学差异,而KK型频率低于对照组,差异有统计学意义。计算KK基因型的OR值发现[OR=0.411,95%CI 0.17~0.99],基因型KK个体显著减少患冠心病的危险,提示KK基因型是蒙古族冠心病发病的一个保护因子。本实验研究表明,内蒙古地区蒙古族人群不仅KK基因型HDL-C水平明显高于RR型,而且其TG水平也明显低于RR型。这说明KK型基因不仅可升高HDL-C水平^[10],且亦可通过降低TG水平而发挥抗冠心病作用,提示蒙古族ABCA1 R219K变异与血脂异常^[11,12]及冠心病之间存在一定的关系。其发生机制为,HDL-C促进胆固醇外流,抑制血脂氧化,抑制单核细胞克隆刺激因子和单核细胞趋化蛋白-1,促进纤维蛋白溶解,加强前列腺素的作用,抑制血管平滑肌增生,从而发挥抗动脉粥样硬化和冠心病的作用。

M233V是一个新发现的ABCA1基因单核苷酸多态性,这种基因型改变目前国内外仅见一篇报道^[13]。此位点为ABCA1基因第7号外显子DNA序列中1092位上一个核苷酸G→A(A1092G)的改变,它导致ABCA1蛋白233位氨基酸由甲硫氨酸突变为缬氨酸(M233V)。60例蒙古族冠心病患者经CviA限制性内切酶酶切分析发现,18例存在A1092G改变,17例为MV型(AG型),1例为VV型(GG型),42例MM型(AA型),MV型发生率为28.3%,VV型发生率为1.7%,MM型发生率为70.0%。55例对照

组发现14例A1092G改变,14例为MV型改变,41例为MM型,MV型发生率为25.5%,MM型发生率为74.5%,但各基因型在两组间发生率差异无统计学意义。两组均为MM型分布最广,MV型次之,VV型最少。而本研究发现的1例VV型(GG型)在国内外为首次报道。此外,MM型与MV型和VV型之间的血脂改变无统计学差异,说明这种新发现的基因型变异对冠心病和血脂的影响尚不确定。可能与不同基因因素(同时存在其他基因位点的改变或调控基因的影响)、不同种族、不同民族以及生活习惯和地域差异有关,更具体机制还需要进一步的大样本研究工作来明确。

总之,本研究结果提示,ABCA1基因R219K多态性与内蒙古地区蒙古族人群冠心病的遗传易感性相关,其中KK基因型是冠心病的保护因子。ABCA1基因中A219K可通过影响血液中HDL-C及TG的水平而影响冠心病的易感性,发挥对心血管的保护作用。新发现的ABCA1基因M233V MM型分布最广,MV型次之,VV型最少。我们在内蒙古地区蒙古族冠心病患者中首次发现了VV型(GG型)基因型变异,但其对冠心病和血脂的影响尚不确定,有待于在细胞生物表达和大样本的研究中探讨它的可能机制。

【参考文献】

- [1] Vaneck M, Singaraja RR, Ye D, *et al.* Macrophage ATP binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low density lipoprotein receptor knockout mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (4): 929-934.
- [2] Attie AD. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(4): 172-179.
- [3] Benton JL, Ding J, Tsai MY, *et al.* Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 193(2): 352-360.
- [4] Genvigir FD, Soares SA, Hirata MH, *et al.* Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals[J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 389(1-2): 79-86.
- [5] Slatter TL, Jones GT, Williams MJ, *et al.* Novel rare mutations and promoter haplotypes in ABCA1 contribute to low-HDL-C levels[J]. *Clin Genet*, 2008, 73(2): 179-184.
- [6] Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, *et al.* Genetic variation in ABCA1 predicts ischemic heart disease in the general population[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,

- 2008, 28(1): 180-186.
- [7] Doosti M, Najafi M, Reza JZ, *et al.* The role of ATP-binding-cassette-transporter-A1 (ABCA1) gene polymorphism on coronary artery disease risk[J]. *Transl Res*, 2010, 155(4): 185-190.
- [8] Andrikovics H, Pongrácz E, Kalina E, *et al.* Decreased frequencies of ABCA1 polymorphisms R219K and V771M in Hungarian patients with cerebrovascular and cardiovascular diseases[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2006, 21(4): 254-259.
- [9] 刘竞丽, 李劲频, 汪晓玲. ABCA1 基因 R219K 多态性与青年缺血性脑卒中的相关性研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2009, 8(12): 1221-1225.
- [10] 赵水平, 肖志杰, 聂 赛, 等. 冠心病患者 ATP 结合盒转运子 1 基因 R219K 变异的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32(8): 712-716.
- [11] Li J, Wang LF, Li ZQ, *et al.* Effect of R219K polymorphism of the ABCA1 gene on the lipid-lowering effect of pravastatin in Chinese patients with coronary heart disease[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(5-6): 567-570.
- [12] Kitjaroenatham A, Hananantachai H, Tungtrongchitr A, *et al.* R219K polymorphism of ATP binding cassette transporter A1 related with low HDL in overweight/obese Thai males [J]. *Arch Med Res*, 2007, 38(8): 834-838.
- [13] 郭志刚, 王琦光, 赖文岩, 等. 新发现的中国人 ATP 结合盒转运子 A1 基因 M233V 单核苷酸多态性及其家系调查[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(12): 1101-1104.
- (编辑: 王雪萍)

· 消 息 ·

《心血管病防治知识》征稿启事

《心血管病防治知识》(半月刊)是由国家新闻出版总署批准, 中华人民共和国卫生部、中国科学技术协会、中华医学会心血管病学分会、卫生部心血管病防治研究中心指导, 广东科学技术协会主管、主办的国家一级专业性学术刊物。

《心血管病防治知识》创刊于 2002 年, 2010 年 7 月 5 日经广东省新闻出版局批准为半月刊, 每月出版两期, 上半月为科普, 下半月为专业学术。本刊以广大心脑血管疾病的预防与临床工作者为主要读者对象, 报道最新专业领域资讯及临床领先的科研成果和经验, 以及对临床有指导作用且与临床紧密结合的基础理论研究。本刊国际刊号: ISSN1672-3015, 国内刊号: CN44-1581/R, 邮发代号: 46—192, 定价: 8 元, 半月刊。全国各大邮局均可订阅。

办刊宗旨: 贯彻党和国家的卫生工作方针政策, 贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针, 反映我国疾病预防及临床与科研工作的重大进展, 促进国内外的学术交流。

本刊栏目有论著、临床观察/研究、综述与进展、专题报告、理论探讨、经验交流、病例讨论、临床护理等, 欢迎投稿。

投稿邮箱: 100871 北京市北京大学 100871-009 信箱

投稿邮箱: xxgbfz@163.com

咨询电话: 010-52580688

网址: <http://www.hao910.com/xxgfz>