

遵义汉族人群载脂蛋白 A5 基因多态性与高胆固醇血症的关系

肖代敏¹, 耿争光², 杨昌伟¹, 李春霞², 张志敏³

(1.遵义医学院附属医院检验科, 2.遵义医学院 2012 级临床医学专业,
3.遵义医学院医学遗传学教研室, 贵州省遵义市 563099)

[关键词] 载脂蛋白 A5 基因; c.553G/T 位点多态; 高胆固醇血症; 遵义汉族人群; 血脂指标比值

[摘要] **目的** 探讨载脂蛋白 A5 (ApoA5) 基因 c.553G/T 位点多态性与遵义汉族人群高胆固醇血症 (HTC) 的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应限制性片长多态性 (PCR-RFLP) 技术检测并分析 101 例 HTC 患者和 118 例正常对照者 ApoA5 基因 c.553G/T 位点多态性。**结果** 两组中 ApoA5 基因 c.553G/T 位点基因型频率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ApoA5 c.553T 基因在 HTC 患者组中的分布频率明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 对 HTC 有独立影响 ($OR = 4.685, 95\% CI: 1.269 \sim 17.296, P = 0.020$); 各血脂指标比较更进一步验证血脂指标比值比单相血脂检测更具临床意义。**结论** ApoA5 c.553G/T 位点多态性与遵义汉族人群 HTC 发病存在相关性; ApoA5 c.553T 等位基因可能是 HTC 的独立危险因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association of apolipoprotein A5 gene polymorphism with hyper total cholesterolemia of the Han Nationality in Zunyi

XIAO Dai-Min¹, GENG Zheng-Guang², YANG Chang-Wei¹, LI Chun-Xia², ZHANG Zhi-Min³

(1. Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College; 2. 2012 Department of Clinical Medicine, 3. Medical Genetics Department, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563099)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A5 gene; c.553G/T polymorphism; Hyper total cholesterolemia; Zunyi Han nationality; Blood lipid index ratio

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relativity of apolipoprotein A5 gene (ApoA5) c.553G/T polymorphism in exon 4 with hyper total cholesterolemia (HTC) in Zunyi Han Nationality. **Methods** c.553G/T polymorphism of 101 HTC patients and 118 healthy individuals were tested by polymerase chain reaction and restriction fragment length (PCR-RFLP) assay. **Results** The genotype frequency of ApoA5 gene c.553G/T showed statistically difference between patients group and normal groups ($P < 0.05$), and the distribution of ApoA5 c.553T gene in HTC group was significantly higher than normal group ($P < 0.05$), therefore it had independent effect on HTC ($OR = 4.685, 95\% CI: 1.269 \sim 17.296, P = 0.020$). It has more optical clinical significance comparing different blood lipid index ratio than one blood lipid index.

Conclusion There was relativity between ApoA5 gene c.553G/T polymorphism and HTC in Zunyi Han Nationality. The c.553T gene was an independent risk factor for HTC.

高脂血症是由遗传和环境因素共同作用而产生的一种全身性疾病。临床上根据血液生化检测结果将高脂血症分为高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia, HTG)、高胆固醇血症 (hyper total cholesterolemia, HTC)、混合型高脂血症 (mixed hyperlipidemia) 和低高

密度脂蛋白血症 (low high density lipoprotein hyperlipidemia)^[1-2], 其中, HTC 是指血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 高于正常水平, 是动脉粥样硬化性心血管疾病最重要的危险因素^[3]。近 30 余年来, 我国居民中血脂异常的流行趋势日趋严重, 对高脂血症的防治形成

[收稿日期] 2016-08-30

[修回日期] 2016-11-02

[基金项目] 贵州省科技厅项目 (黔科合 J 字 LKZ [2012]39 号); 遵义医学院大学生创新创业训练计划项目 (院发 [2014]5828)

[作者简介] 肖代敏, 硕士, 副教授, 研究方向为临床分子生物学检验。通讯作者张志敏, 硕士, 教授, 研究方向为医学遗传学, E-mail 为 zzm_zhangzhimin@126.com。

严峻挑战。载脂蛋白 A5 (apolipoprotein A5, ApoA5) 基因是一个新发现的载脂蛋白基因, 流行病学研究提示人 ApoA5 基因多态与血脂水平存在明显相关^[4-7], 但其多态性与西南地区汉族人群 HTC 的相关性研究尚未见报道。本课题旨在探讨 ApoA5 基因 c.553G/T 位点多态性与遵义汉族人群 HTC 的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象

2014 年 3 月至 8 月从遵义医学院附属医院检验科收集无血缘关系的遵义籍汉族 HTC 患者抗凝血样 101 例, 其中男性 51 例, 女性 50 例, 年龄 24~81 岁, 平均 51.19 ± 13.52 岁 (男性 51.53 ± 14.30 岁, 女性 50.84 ± 12.82 岁); 遵义籍汉族正常对照人群血样 118 例, 为同期本院健康体检者, 其中男性 63 例, 女性 55 例, 年龄 24~83 岁, 平均 49.08 ± 12.02 岁 (男性 50.29 ± 13.14 岁, 女性 47.69 ± 10.54 岁), 无血缘关系, 血糖、血脂水平均正常, 无心脑血管疾病家族史。HTC 诊断标准参照《中国成人血脂异常防治指南》(2007 年)^[1]: 血清 TC ≥ 5.18 mmol/L (200 mg/dL)。正常对照人群血清甘油三酯 (triglyceride, TG) < 1.70 mmol/L (150 mg/dL), 血清 TC < 5.18 mmol/L (200 mg/dL), 血清低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) < 3.37 mmol/L (130 mg/dL), 血清高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) ≥ 1.04 mmol/L (40 mg/dL), 各指标检测在检验科完成。排除糖尿病、肾病综合征、甲状腺功能减退、肾功能衰竭、肝病、系统性红斑狼疮、糖原累积症、骨髓瘤、脂肪萎缩症、急性卟啉病、多囊卵巢综合症等, 排除服用利尿剂、 β 受体阻滞剂、糖皮质激素等可引起继发性高血脂症的疾病或摄入药物 (即其他血检结果正常即可), 并注明是否激发其他心血管疾病如缺血性/充血性脑卒中、冠心病、动脉粥样硬化等。研究通过医院伦理委员会认可, 所有研究对象均签署《高脂血症调查知情同意书》。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒为天根公司产品; 引物由上海生工生物技术有限公司合成, PCR 扩增的 Dream Taq Green PCR Master Mix (2*) 为 Thermo 公司产品, Tru9 限制性内切酶为 Promega 公司产品。

1.3 血样收集与血脂测定

以普通真空采血管采集所有受试者晨起空腹静脉血 5 mL, 一部分用于血脂、血糖水平测定, 其中

TC、TG、HDLc 运用酶法测定, LDLc 运用免疫比浊法测定, 血糖测定运用己糖激酶法, 以上指标均在 Abbott 全自动生化分析仪上进行。参照《中国成人血脂异常防治指南》(2007 年) 标准筛选出符合实验要求的受试者, 并将其剩余血样 (≥ 2 mL) 放于 -20°C 保存。此过程均在遵义医学院附属医院检验科完成。

1.4 DNA 提取

取 HTC 组和正常对照组抗凝全血每人 2 mL, 用血液基因组 DNA 提取试剂盒法提取基因组 DNA, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取结果, 紫外灯下观察并拍照记录; 提取成功的 DNA 放于 -20°C 保存备用。

1.5 PCR 扩增

ApoA5 基因 c.553G/T 多态鉴定: 上游引物为 5'-CAG CAA CTG AAG CCC TAC ACG-3' (21 bp); 下游引物为 5'-ATG CCG CTC ACC AGC TCT CG-3' (20 bp), 产物长度为 227 bp^[8]。30 μL 反应体系: 2×Mix 15 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 模板 DNA 1.5 μL , 无菌去离子水补足总体积至 30 μL 。反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 65°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 循环 35 次, 末次循环后 72°C 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果, 紫外灯下观察并拍照记录。

1.6 Msp I 酶切

Msp I 酶切采用 25 μL 反应体系: 10×NE Buffer 2.5 μL , Msp I 内切酶 1 μL (20U), 纯化 PCR 产物 5 μL , 灭菌去离子水补足总体积 25 μL 。反应条件: 37°C 8 h, 65°C 30 min。对酶切产物回收, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果, 紫外灯下观察并拍照记录。选取部分 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序, 验证酶切结果。

1.7 统计学分析

所有数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本群体代表性用 Hardy-Weinberg 平衡检验, 组间等位基因频率与基因型频率差异分析采用 χ^2 检验; 不同基因型与血脂的关系用 Wilcoxon 秩和检验法, 基因型对发病危险度的影响用 Logistic 回归判断, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

HTC 组和正常对照组在年龄、性别和血糖构成

上差异无统计学意义($P>0.05$),血脂指标(TG、TC、LDLC、TC/HDL、LDLC/HDL)比较,HTC 组明显高于正常对照组($P<0.05$;表 1)。

表 1. HTC 组与正常对照组临床资料比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1. Comparison of clinical data within HTC group and normal group($\bar{x}\pm s$)

分 组	正常对照组 ($n=118$)	HTC 组 ($n=101$)	P 值
年龄(岁)	49.08±12.02	51.19±13.52	0.116
男/女(例)	63/55	51/50	0.669
TG(mmol/L)	1.10±0.28	1.36±0.64	<0.001
TC(mmol/L)	4.30±0.45	5.76±0.56	<0.001
HDL(mmol/L)	1.36±0.36	1.35±0.25	0.054
LDL(mmol/L)	2.48±0.53	3.66±0.64	<0.001
空腹血糖(mmol/L)	4.64±0.43	4.63±0.45	0.798
TC/HDL	3.31±0.65	4.39±0.87	<0.001
LDL/HDL	1.96±0.56	2.82±0.80	<0.001

2.2 ApoA5 基因 c.553G/T 位点 PCR 和 MspI 酶切结果
扩增产物位于人 ApoA5 基因第四外显子内,含 Msp I 酶切位点,产物大小 227 bp。经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 ApoA5 基因 c.553G/T 位点 PCR 扩增结果和 Msp I 酶切结果显示良好(图 1 和图 2)。PCR 产物经 Msp I 酶切后,可见三种基因型,纯合子 TT 基因型为 227 bp 一个片段,纯合子 GG 基因型为 173 bp 和 54 bp 两个片段,杂合子 GT 基因型为上述三个片段。由于 HTC 组和正常对照组该基因位点 PCR 产物缺乏 Msp I 酶切位点(TT 基因型),而且 54 bp 的核苷酸序列太短,分子量小,琼脂糖凝胶电泳后较难区分(但并不影响基因型判定),因此检测到 227 bp 和 173 bp 两条带为 GT 基因型,173 bp 一条带为 GG 基因型。

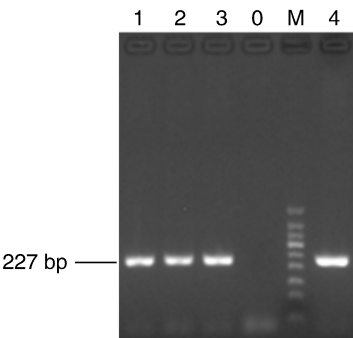


图 1. ApoA5 基因 c.553G/T 位点 PCR 产物电泳图 M 为 DNA Marker(50 bp),1、2、3、4 为 PCR 产物,0 为阴性对照。
Figure 1. Electrophoretic results of PCR product about c.553G/T in ApoA5 gene

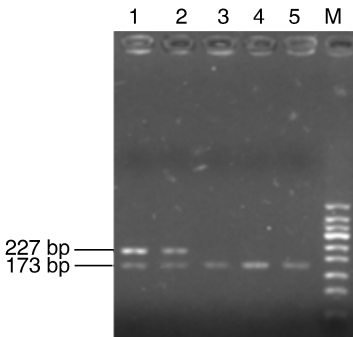


图 2. ApoA5 基因 c.553G/T 位点 MspI 酶切电泳图 M 为 DNA Marker(50 bp),1、2 为 GT 基因型,3、4、5 为 GG 基因型。
Figure 2. Electrophoretic results of MspI restriction fragment length product about c.553G/T in ApoA5 gene

2.3 ApoA5 基因 c.553G/T 位点测序结果
部分 PCR 产物经上海生工生物工程有限公司测序,可见基因分型与测序结果相符(图 3)。ApoA5 基因 c.553G/T 位点为 CGG→CTG 点突变。因此,GG 基因型正向测序结果为 CGG;GT 基因型正向测序结果为 CGG/CTG。

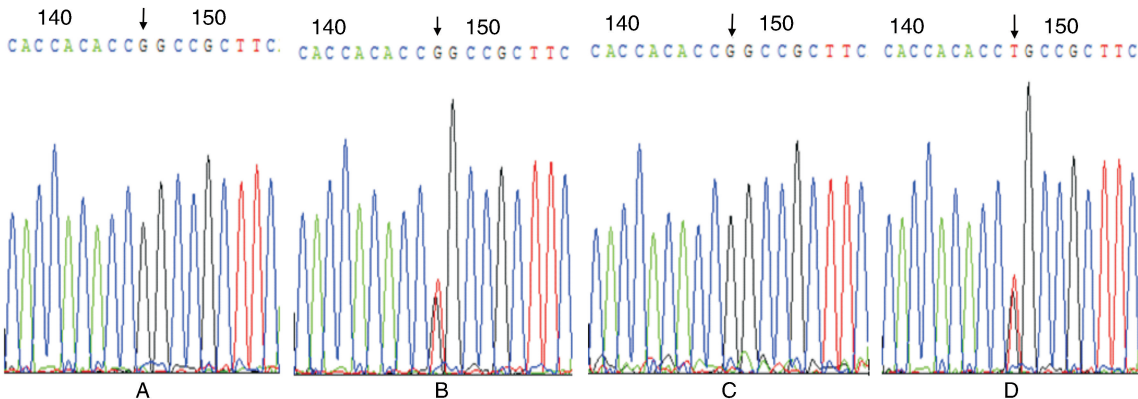


图 3. ApoA5 基因 c.553G/T 位点测序图 A 为 HTC 组 G2-90 正向测序结果示显性纯合子(GG);B 为 HTC 组 G2-22 正向测序结果示杂合子(GT);C 为正常对照组 Z-18 正向测序结果示显性纯合子(GG);D 为正常对照组 Z-41 正向测序结果示杂合子(GT)。

Figure 3. The sequencing results of c.553G/T in ApoA5 gene

2.4 ApoA5 基因 c.553G/T 位点基因型和等位基因频率在 HTC 组和正常对照组中分布

经 Hardy-Weinberg 平衡检验, c.553G/T 位点基因型和等位基因的分布在 HTC 组和正常对照组的 χ^2 值分别为 0.335 ($P=0.846$) 和 0.020 ($P=0.990$),

均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($P>0.05$), 说明样本来自遗传平衡群体, 可以代表所在地区人群分布。在 HTC 组中, ApoA5 基因 c.553G/T 位点 GT 基因型频率 ($\chi^2=5.02$) 和 T 等位基因频率 ($\chi^2=4.855$) 显著高于正常对照组 ($P<0.05$; 表 2)。

表 2. HTC 组和正常对照组 ApoA5 基因 c.553G/T 位点多态情况

Table 2. Comparison of polymorphism about c.553G/T in ApoA5 gene within HTC group and normal group

分 组	n	基因型(例)			等位基因(例)	
		TT	GT	GG	G	T
正常对照组	118	0	3(2.54%)	115(97.46%)	233(98.73%)	3(1.27%)
HTC 组	101	0	11(10.89%) ^a	90(89.11%)	191(94.55%)	11(5.44%) ^a

a 为 $P<0.05$, 与正常对照组比较。

2.5 不同基因型与血脂水平的关系

正常对照组 TC/HDLc 水平在组内 GT 与 GG 基因型个体比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); 而两

组内其他血脂指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$; 表 3)。

表 3. HTC 组和正常对照组不同基因型血脂水平比较 ($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

Table 3. Comparison of blood lipid level within HTC group and normal group ($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

血脂指标	正常对照组 (n=118)			HTC 组 (n=101)		
	GG 基因型	GT 基因型	P 值	GG 基因型	GT 基因型	P 值
TG (mmol/L)	1.09±0.28	1.38±0.05	0.054	1.36±0.67	1.38±0.26	0.567
TC (mmol/L)	4.29±0.45	4.61±0.41	0.245	5.72±0.52	6.22±0.75	0.065
LDLC (mmol/L)	2.48±0.53	2.66±0.24	0.726	3.62±0.61	4.16±0.78	0.088
HDLc (mmol/L)	1.36±0.36	1.13±0.08	0.07	1.35±0.24	1.35±0.31	0.785
TC/HDLc	3.29±0.65	4.08±0.30	0.02	4.36±0.86	4.76±0.98	0.152
LDLC/HDLc	1.95±0.56	2.35±0.15	0.126	2.79±0.79	3.22±0.88	0.064

2.6 ApoA5 基因 c.553G/T 位点多态性与 HTC 相关性分析

对 ApoA5 基因 c.553G/T 多态与 HTC 各组分的相关性进行 Logistic 回归分析显示, 使用单因素分析未排除混杂因素时, T 等位基因携带者个体患 HTC 风险是 GG 基因型个体的 4.920 倍 ($OR=4.920, 95\% CI: 1.311\sim 18.465, P=0.018$)。校正年龄、性别、血糖水平等混杂因素后, 差异仍具有统计学意义, 风险仍然存在 ($OR=4.685, 95\% CI: 1.269\sim 17.96, P=0.020$)。

3 讨 论

目前发现一些脂类代谢相关基因是影响机体血脂水平的重要因素, 如 ApoA5 基因、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 基因、低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 基因等^[9-12]。

ApoA5 是 2001 年发现的载脂蛋白家族新成员, 国内已有了初步临床研究^[13-15], 该基因位于人类染色体 11q23, 全长 1889 bp, 由四个外显子、三个内含子构成, 编码 366 个氨基酸, 其中 c.553G/T 多态位点是 2003 年由 Kao 等^[9]首先发现的新 SNP 位点, 它位于 ApoA5 基因第 4 外显子的 5' 端, 其基因多态性与血清 TG、HDLc 等有关。

在血脂指标中, TC、TG、HDLc 和 LDLc 是基本的临床实用检测项目, 对于任何需要进行心血管危险性评价和给予降脂药物治疗的个体, 都应进行此 4 项血脂检测^[1]。近些年有部分研究指出, 单项血脂指标受饮食影响波动较大, 但 TC/HDLc 比值和 LDLc/HDLc 比值受饮食胆固醇的影响较小, 比单相血脂检测更具临床意义^[16-19]。本文对 101 例 HTC 患者及 118 例正常对照者的 ApoA5 基因 c.553G/T 位点基因多态性进行研究发现, ApoA5 基因 c.553G/T 位点基因型和等位基因频率分布在两

组中具有统计学差异,HTC 组 T 等位基因所占百分比高于正常对照组 ($P<0.05$)。本研究对两组内不同基因型与血脂水平相关性的比较发现,正常对照组内 GT 杂合子个体的 TC/HDL-C 比值明显高于 GG 纯合子个体 ($P<0.05$),而血清 HDL-C 水平低于 GG 纯合子个体,且其余各血清指标水平无论在正常对照组还是 HTC 组内 GT 杂合子个体均高于与之相对的 GG 纯合子个体,但差异却无统计学意义 ($P>0.05$),更进一步证实血脂指标比值的稳定性更优于单项血脂检测,而其差异可能与入种选择、地区差异或该基因位点存在强烈的连锁不平衡等因素有关。

本研究还发现,使用单因素分析未排除混杂因素时,T 等位基因携带者个体患 HTC 风险是 GG 基因型个体的 4.920 倍 (OR = 4.920, 95% CI: 1.311 ~ 18.465, $P=0.018$)。经 Logistic 回归校正年龄、性别、血糖水平等混杂因素后,差异仍具有统计学意义,风险仍然存在 (OR = 4.685, 95% CI: 1.269 ~ 17.96, $P=0.020$)。

本研究初步显示,在遵义汉族人群中 ApoA5 基因 c.553G/T 位点多态性与 HTC 之间存在一定相关性;c.553T 等位基因携带者患 HTC 风险明显高于 GG 基因型个体;c.553T 等位基因可作为 HTC 的独立危险因素。指南^[1]指出降脂是防治心脑血管疾病的最主要目的,因此,检测其基因位点有助于了解高脂血症的病因学特征,为心脑血管疾病的防治给予一定的指导,但该位点多态性与 HTC 相关性是否存在种族或地域差异,需要更大样本甚至跨种族跨地域的调查与研究来证实。

HTC 的病因错综复杂,本次研究仅对 ApoA5 基因 c.553G/T 位点多态性与 HTC 的关系进行探讨,以期能够对遵义地区汉族人群的 ApoA5 基因 c.553G/T 位点基因型与 HTC 的关系有一个初步的了解和认识,并且为日后检测和预防 HTC 的发生提供新的思路 and 理论依据。

[参考文献]

- [1] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(5): 390-419.
- [2] 张沛然, 郭改会. 高脂血症的发病机制及分类[J]. 中国临床医生杂志, 2012, 40(3): 18-20.
- [3] 郭艺芳. 2014 年中国胆固醇教育计划血脂异常防治专家建议[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(3): 3-5.
- [4] Yan D, Zhu M A, Zhi X W, et al. Associations of polymorphisms in

- the apolipoprotein APOA1-C3-A5 gene cluster with acute coronary syndrome [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012(1): 1-5.
- [5] Matsunaga A, Arishima H, Niimura H, et al. Strong linkage disequilibrium and association of -1131T>C and c.553G>T polymorphisms of the apolipoprotein A5 gene with hypertriglyceridemia in a Japanese population [J]. Circ J, 2007, 71(5): 746-752.
- [6] Liu Z K, Hu M, Baum L, et al. Associations of polymorphisms in the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with familial combined hyperlipidaemia in Hong Kong Chinese [J]. Atherosclerosis, 2010, 208(2): 427-432.
- [7] Kim YR, Hong SH. Association of apolipoprotein A5 gene polymorphisms with metabolic syndrome in the Korean population [J]. Gene Test Mol Bioma, 2016, 20(3): 130-136.
- [8] 黄贤圣, 赵水平, 张 骞, 等. 急性冠状动脉综合征患者载脂蛋白 A5 检测及其意义[J]. 中华心血管病杂志, 2009, 37(10): 896-899.
- [9] Kao J T, Wen H C, Chien K L, et al. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia [J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(19): 2533-539.
- [10] 何美霞, 张明明, 刘 琼, 等. 白细胞介素-6 基因多态性与高脂血症的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(1): 23-25.
- [11] Garcia CK, Wilund K, Arca M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein [J]. Science, 2001, 292(5520): 1394-398.
- [12] Do R, Stitzel N O, Won H H, et al. Multiple rare alleles at LDLR and APOA5 confer risk for early-onset myocardial infarction [J]. Nature, 2015, 518(7537): 102-106.
- [13] 魏红霞, 张 葵, 李 雷, 等. 血清载脂蛋白 A5 ELISA 法的建立及评价[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(5): 355-357.
- [14] 洪 雁, 周碧燕, 李 洁, 等. 载脂蛋白 A5 (ApoA5) 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死关系的研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2015(10): 44-46.
- [15] 刘美玲, 陈黎蒙, 王晓春. 醛固酮合成酶及载脂蛋白 A5 基因多态性与高血压相关性的研究进展[J]. 临床心血管病杂志, 2015(10): 1044-046.
- [16] Greene C M, Zern T L, Wood R J, et al. Maintenance of the LDL cholesterol: HDL cholesterol ratio in an elderly population given a dietary cholesterol challenge [J]. J Nut, 2005, 135(12): 2793-798.
- [17] Elshazly MB, Quispe R, Michos ED, et al. Patient-level discordance in population percentiles of the TC/HDL-C ratio compared with LDL-C and Non-HDL-C: the Very Large Database of Lipids Study (VLDL-2B) [J]. Circulation, 2015, 132(8): 667-676.
- [18] 李 莹, 陈志红, 周北凡, 等. 我国中年人群血清 TC/HDL-C 比值与缺血性和出血性脑卒中发病危险性[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(5): 305-308.
- [19] 李明春, 初少莉, 左君丽, 等. LDL-C/HDL-C 与冠状动脉病变程度的相关性研究[J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(3): 270-273.

(此文编辑 许雪梅)