

论著·临床研究

脂蛋白酯酶基因突变与肥胖儿童心血管疾病危险的研究

关玉明<sup>1</sup> 桂永浩<sup>2</sup> 罗飞宏<sup>3</sup> 沈水仙<sup>3</sup> 杨毅<sup>4</sup>

(1. 大连市儿童医院, 辽宁 大连 116012; 2. 复旦大学附属儿科医院心血管中心, 上海 201102;  
3. 复旦大学附属儿科医院内分泌科, 上海 201102; 4. 复旦大学附属儿科医院儿科研究所, 上海 201102)

[摘要] 目的 了解脂蛋白酯酶基因外显子常见突变与肥胖儿童心血管疾病发生发展的关系。方法 用聚合酶链反应结合限制性片段长度多态性分析检测脂蛋白酯酶外显子常见的3个突变位点D9N、N291S和S447X, 同时检测血脂。比较157例肥胖儿童与175例非肥胖儿童基因突变率的差异, 以及不同基因型血脂的分布差异。结果 332名肥胖及非肥胖儿童中未检测出D9N和N291S突变, S447X突变在肥胖与非肥胖儿童中分布差异无统计学意义, S447与X447两种基因型间血脂含量差异亦无统计学意义。结论 D9N与N291S基因突变可能不是引起肥胖儿童心血管疾病的危险因素, S447X突变对肥胖儿童心血管疾病的发展影响不大。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12(3):161-164]

[关键词] 肥胖; 脂蛋白酯酶; 基因多态性; 血脂; 危险因素; 儿童  
[中图分类号] R723 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)03-0161-04

Lipoprotein lipase gene mutations and the risk of cardiovascular diseases in children with obesity

GUAN Yu-Ming, GUI Yong-Hao, LUO Fei-Hong, SHEN Shui-Xian, YANG Yi. Dalian Children's Hospital, Dalian, Liaoning, China (Gui Y-H, Email: yhgui@shmu.edu.cn)

**Abstract: Objective** To inquire into the relationship between lipoprotein lipase (LPL) gene D9N, N291S and S447X polymorphisms and the development of cardiovascular diseases in children with obesity. **Methods** The polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques were used to detect three common mutations of LPL gene exon D9N, N291S and S447X in 157 obese children and 175 normal controls. Plasma lipid and lipoprotein levels between children with different genotypes were compared. **Results** The D9N and N291S gene mutations were not detected in either the obese or the control groups. There were no significant differences in the frequency of S447X gene mutation between the two groups. There were no significant differences in the levels of plasma lipid and lipoprotein between children with S447 and X447 genotypes. **Conclusions** D9N and N291S gene mutations may not be risk factors associated with cardiovascular diseases in children with obesity. S447X gene mutation might not play an important role in the development of cardiovascular diseases in childhood. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(3):161-164]

**Key words:** Obesity; Lipoprotein lipase; Polymorphism; Plasma lipid; Risk factor; Child

成人和儿童中肥胖症的患病率在进行性增加<sup>[1]</sup>, 肥胖的流行是导致心血管疾病增多的主要原因。动脉粥样硬化性心血管疾病的病理过程和与其相关的危险因素在儿童期已经存在<sup>[2]</sup>。肥胖儿童中已经出现明显的高脂血症和动脉粥样硬化的早期表现。脂蛋白酯酶(lipoprotein lipase, LPL)在脂蛋白代谢中起重要作用, 催化极低密度脂蛋白和乳糜微粒中的甘油三酯水解, 从而向机体组织提供游离脂肪酸<sup>[3]</sup>。脂蛋白酯酶的活性降低导致高密度脂蛋白降低和高甘油三脂血症, 对冠心病的形成有重要影响。人LPL基因定位于8p22上, 由10个外显子和9个内含子组成, 是一个长度约为30 kb的单拷贝基因<sup>[4]</sup>。LPL基因内存在广泛多态性, 在基因外显子序列中3个常见的引起氨基酸改变的突变是D9N(Asp9→Asn)、N291S(Asn291→Ser)和S447X(Ser447→X), 并与血脂水平增高和冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)的发生存在相关性<sup>[5]</sup>。目前外显子突变对肥胖儿童心血管危险因素的影响尚不清楚。本研究应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测单纯性肥胖儿童外显子3个常见多态位点, 同时分析基因多态性与脂代谢异常的关系。

[收稿日期]2009-09-18; [修回日期]2009-12-02  
[作者简介]关玉明,男,博士,副主任医师。  
[通信作者]桂永浩,男,教授。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

按整群随机抽样原则,抽取上海市徐汇区6所中小学6~14岁的全体学生,共5483人,其中男生2780人,女生2703人。58人因故缺席,实际测身高体重人数5425人。由经过培训的专业人员按照统一的方法对学生的身高和体重各测量1次,身高精确至0.1 cm,体重精确至0.1 kg,计算体重指数(body mass index, BMI) = 体重(kg)/身高(m)<sup>2</sup>。根据国际生命科学学会中国肥胖组颁布的“中国学龄儿童青少年超重、肥胖体重指数分类标准”<sup>[6]</sup>检测出肥胖儿童298人,其中自愿参加检查并除外其他疾病的单纯性肥胖儿童157人(男70人,女87人)作为肥胖组;并选取年龄性别相匹配的正常对照组175人(男79人,女96人)。

### 1.2 研究方法

1.2.1 DNA提取及引物设计 采集外周血500 μL,加入68 mmol/L EDTA 500 μL抗凝。使用DNA纯化试剂盒(BS474, Bio Basic Inc., Canada)提取基因组DNA。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列为:D9N-1 CAG AAA GAA GAG ATT TTG TC, D9N-2 TTG CTG CTG TGA TTG AAA TGA; N291S-1 GCC GAG ATA CAA TCT TGG TG, N291S-2 CTG CTT CTT TTG GCT CTG ACT GTA; S447X-1 TAC ACT AGC AAT GTC TAG CTGA, S447X-2 TCA GCT TTA GCC CAG AAT GC。引物D9N-1引入一个错配(下划线碱基),创造一个SalI限制性内切酶位点,当位于引物下游的核苷酸出现G→A突变,SalI内切酶不能识别,扩增后的PCR产物经内切酶消化后无变化。引物N291S-2的3'端错配(下划线碱基),当发生核苷酸A→G突变时,出现一个限制性内切酶RsaI识别点,扩增后的PCR产物能被限制性内切酶RsaI消化。

1.2.2 PCR扩增 反应体系:50 μL反应总体积中含20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4), 20 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 上下游引物各0.5 μmol/L, dNTPs各200 μmol/L, 基因组DNA 0.1 μg, TaqDNA聚合酶2.5 U, TaqDNA聚合酶购自北京天为时代科技有限公司。反应在Applied Biosystems公司GeneAmp PCR System2400自动热循环仪上进行。含D9N片段扩增循环参数:94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 45℃退火45 s, 72℃延伸30 s, 循环35次; 72℃终延伸7 min。含N291S片段扩增循环参数:94℃预

变性3 min; 94℃变性45 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 循环35次; 72℃终延伸7 min。含S447X片段扩增循环参数:94℃预变性3 min; 94℃变性45 s, 54℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 循环35次; 72℃终延伸7 min。

1.2.3 脂蛋白酯酶基因多态性检测 按生产商推荐的反应条件D9N片段、N291S片段和S447X片段分别经内切酶SalI(华美生物工程公司)、内切酶RsaI(Promega公司)和内切酶MnII(MBI Fermentas公司)消化后,2%琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L溴化乙锭)电泳,紫外透射灯下观察结果。

1.2.4 DNA测序分析 PCR产物的纯化:采用DNA胶回收试剂盒(上海博彩生物科技有限公司)从第一次PCR产物中纯化回收目的DNA片段。核苷酸序列测定:采用末端标记法对PCR产物进行直接测序。脂蛋白酯酶含D9N位点3'→5'端测序以D9N-2作为测序引物,脂蛋白酯酶含N291S位点5'→3'端测序以N291S-1作为测序引物。使用PE Applied Biosystems公司BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit测序试剂盒,在ABI PRISM 3700型全自动DNA序列分析仪上进行测序。

1.2.5 血脂测定 胆固醇和甘油三酯浓度测定采用酶法,高密度脂蛋白和低密度脂蛋白采用消除法,ApoA-I、ApoB采用免疫比浊法,血液生化分析均采用商业试剂盒,分析在复旦大学儿科医院实验室应用标准实验设备进行(7060 Automatic Analyzer, HITACHI)。

### 1.3 统计学分析

所有结果均采用SPSS 11.5软件分析。肥胖组与非肥胖组脂蛋白酯酶突变采用卡方检验;不同基因型血脂差异采用 $t$ 检验;呈非正态分布的数据,经对数转换后呈正态化,再行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 限制性片段长度多态性分析结果

2.1.1 D9N DNA片段 D9N序列PCR扩增片段长度为136 bp,经限制性内切酶消化后,正常纯合子产生117 bp和19 bp片段,杂合子出现136 bp、117 bp和19 bp片段,先证者仅出现136 bp片段。本研究实验对象经SalI酶切后均未见136 bp片段,说明均为正常纯合子。

2.1.2 N291S DNA片段 N291S序列PCR扩增片段长度为238 bp,经限制性内切酶消化后,正常纯合子238 bp PCR产物保持完整,杂合子出现

238 bp、215 bp 和 23 bp 片段,先证者出现 215 bp 和 23 bp 片段。本研究实验对象经 *RsaI* 酶切后均保持完整的 238 bp 片段,说明均为正常纯合子。

**2.1.3 S447X DNA 片段** S447X DNA 片段 PCR 扩增长度为 488 bp,该 DNA 片段包含两个 *MnII* 限制性内切酶位点,其中一个提示 S447X 位点发生 C→G 突变。经限制性内切酶消化后,正常纯合子产生 204 bp 和 285 bp 片段,杂合子出现 204 bp、248 bp 和 285 bp 片段,突变纯合子仅出现 204 bp 和 248 bp 片段(图 1)。根据 S447X 位点有无突变,表示基因型命名为:突变纯合子为 GG,杂合子为 CG,正常纯合子为 CC。本研究实验对象经 *MnII* 酶切共检出突变者 60 名,检出率 18.1%。其中:157 名肥胖儿童中,正常纯合子 127 名,占 80.9%;携带者 29 名,占 18.5%;突变纯合子 1 名,占 0.6%。175 名正常体重儿童中,正常纯合子 145 名,占 82.9%;携带者 27 名,占 15.4%;突变纯合子 3 名,占 1.7%。经卡方检验,正常组与肥胖组间 S447X 基因型分布差异无统计学意义。见表 1。

2.2 突变携带者(包括突变纯合子)与正常纯合子血脂比较

突变携带者(X447)高密度脂蛋白较正常纯合子(S447)增高,而甘油三酯和低密度脂蛋白较正常

纯合子稍降低,但差异均无统计学意义。见表 2。

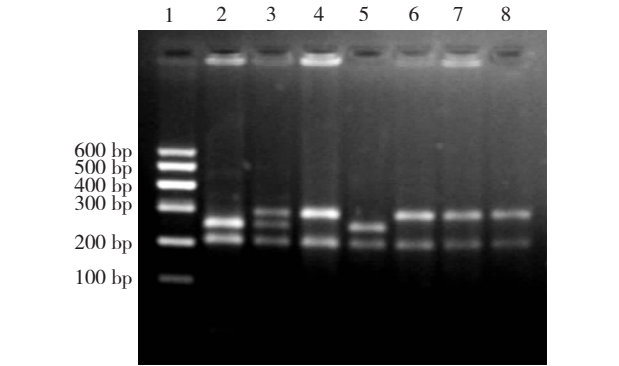


图1 S447X 扩增产物经 *MnII* 酶切后电泳图 注:泳道 1 为 DNA Marker,泳道 2、5 为突变纯合子,泳道 3 为突变杂合子;泳道 4、6、7、8 为正常纯合子。

| 表 1 各组 S447X 基因型分布 [例(%)] |     |           |          |        |
|---------------------------|-----|-----------|----------|--------|
| 组别                        | 例数  | 基因型       |          |        |
|                           |     | CC        | CG       | GG     |
| 正常组                       | 175 | 145(82.9) | 27(15.4) | 3(1.7) |
| 肥胖组                       | 157 | 127(80.9) | 29(18.5) | 1(0.6) |
| 合计                        | 332 | 272(81.9) | 56(16.9) | 4(1.2) |

| 表 2 S447X 突变携带者与非携带者血脂比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) |     |                 |                  |               |               |                    |                    |
|----------------------------------------------|-----|-----------------|------------------|---------------|---------------|--------------------|--------------------|
|                                              | 例数  | 胆固醇<br>(mmol/L) | 甘油三酯<br>(mmol/L) | ApoA<br>(g/L) | ApoB<br>(g/L) | 高密度脂蛋白<br>(mmol/L) | 低密度脂蛋白<br>(mmol/L) |
| 携带者(X447)                                    | 60  | 3.93 ± 0.84     | 0.88 ± 0.34      | 1.20 ± 0.22   | 0.67 ± 0.19   | 1.45 ± 0.30        | 2.26 ± 0.74        |
| 非携带者(S447)                                   | 272 | 3.96 ± 0.86     | 0.98 ± 0.53      | 1.16 ± 0.24   | 0.68 ± 0.19   | 1.36 ± 0.33        | 2.32 ± 0.73        |
| F 值                                          |     | 0.075           | 1.222 *          | 1.220         | 0.486         | 3.620              | 0.482              |
| P 值                                          |     | 0.784           | 0.270            | 0.270         | 0.486         | 0.058              | 0.488              |

\* 呈非正态分布,经对数转换后呈正态化,再行方差分析

2.3 基因序列测定结果

对 D9N 基因 PCR 产物反义链测序显示 PCR 扩增产物与目的基因片段一致,D9N 位点编码链未发生 G→A 突变。对 N291S 基因 PCR 产物编码序列测序显示 PCR 扩增产物与目的基因片段一致,N291S 位点无 A→G 突变。

3 讨论

在脂蛋白酯酶基因编码区常见 3 个氨基酸改变:D9N(位点 280G→A),N291S(位点 1127A→G),S447X(位点 1595C→G)已经经过单链构象多态性和直接测序确定<sup>[7]</sup>。本研究对 332 人进行基因多态

性分析,未发现 D9N 和 N291S 突变携带者,国内也未见相关资料,可能与我国人群突变率很低有关。D9N 突变在西方普通人群检出率为 4.2%,是一个常见突变,但在人群的分布不均,D9N 携带率在芬兰为 0.2%,英国为 7.7%<sup>[8]</sup>。N291S 的突变率在欧洲为 3.1%<sup>[8]</sup>。在健康人群的前瞻性观察发现,D9N 和 N291S 携带者血浆甘油三酯分别高于非携带者 14.3% 和 10.9%,并在几年的随访中维持不变<sup>[9-10]</sup>。Jukema 等<sup>[11]</sup>报道 D9N 携带者血浆甘油三酯增高,高密度脂蛋白降低,冠心病发病率比非携带者高。Wittrup 等<sup>[12]</sup>研究发现 N291S 突变与血浆甘油三酯增高和高密度脂蛋白降低有关,携带者冠心病发病率高。D9N 和 N291S 突变共同的表现型是低高密

度脂蛋白和高甘油三酯血症,在各种高脂血症人群中的发生率不尽相同,提示它们是血脂异常的易患因素,但完全解释血脂异常的表现型除 D9N 或 N291S 突变以外,还需要其他的遗传和环境因素<sup>[7]</sup>。Gerdes 等<sup>[8]</sup>发现,D9N 或 N291S 突变引起甘油三酯增高的作用随体重指数增加更为突出,任意一种突变携带者轻微肥胖就显著增加心血管疾病的危险性。

S447X 突变携带率为 18.1%,正常组与肥胖组间差异无统计学意义。Chen 等<sup>[13]</sup>的一项社区人群纵向队列研究显示,S447X 多态性与成人高密度脂蛋白增高及甘油三酯降低有关,对于高密度脂蛋白从儿童期到成人期的变化有良性影响,冠心病的家族性易患因素降低。但本研究显示 S447X 突变对儿童期的高密度脂蛋白和甘油三酯没有明显影响,原因不清。年龄依赖性基因表达,基因潜在表现率的变化,暴露某种环境因素的积累作用等方面可能影响脂蛋白随年龄变化,这可能是最常见的多态性作用不明显的原因<sup>[14-15]</sup>。Sawano 等<sup>[16]</sup>对日本冠心病患者与正常人群对照研究发现,S447X 基因突变导致高密度脂蛋白增高,甘油三酯和极低密度脂蛋白降低,冠心病患者中 S447X 突变检出率显著低于正常人群,S447X 携带者患冠心病的相对危险度为 0.38,证明 S447X 突变可以降低甘油三酯和极低密度脂蛋白两种导致动脉粥样化的因素,增加高密度脂蛋白的抗动脉粥样化的因素,对冠心病的形成有保护作用。

我国肥胖儿童脂蛋白酯酶基因 D9N 和 N291S 突变发生率极低,可能不是引起心血管疾病的危险因素。肥胖儿童与非肥胖儿童 S447X 突变率差异无统计学意义,其对心血管疾病的保护作用有待长期的前瞻性研究。

## 参 考 文 献

- [1] Stettler N, Zemel BS, Kumanyika S, Stallings VA. Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study [J]. *Pediatrics*, 2002, 109(2):194-199.
- [2] Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study [J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(23):1650-1656.
- [3] Santamarina-Fojo S, Dugi KA. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1994, 5(2):117-125.
- [4] Oka K, Tkalcic GT, Nakano T, Tucker H, Ishimura-Oka K, Brown WV. Structure and polymorphic map of human lipoprotein lipase gene [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1049(1):21-26.
- [5] Humphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides; the European Atherosclerosis Research Study (EARS) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(4):526-534.
- [6] 中国肥胖问题工作组. 中国学龄儿童青少年超重、肥胖筛查体重指数值分类标准 [J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(2):97-102.
- [7] Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1997, 135(2):145-159.
- [8] Gerdes C, Fisher RM, Nicaud V, Boer J, Humphries SE, Talmud PJ, et al. Lipoprotein lipase variants D9N and N291S are associated with increased plasma triglyceride and lower high-density lipoprotein cholesterol concentrations; studies in the fasting and postprandial states; the European Atherosclerosis Research Studies [J]. *Circulation*, 1997, 96(3):733-740.
- [9] Mailly F, Tugrul Y, Reymer PW, Bruin T, Seed M, Groenemeyer BF, et al. A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9→Asn). Functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15(4):468-478.
- [10] Fisher RM, Mailly F, Peacock RE, Hamsten A, Seed M, Yudkin JS, et al. Interaction of the lipoprotein lipase asparagine 291→serine mutation with body mass index determines elevated plasma triacylglycerol concentrations: a study in hyperlipidemic subjects, myocardial infarction survivors, and healthy adults [J]. *J Lipid Res*, 1995, 36(10):2104-2112.
- [11] Jukema JW, van Boven AJ, Groenemeijer B, Zwinderman AH, Reiber JH, Bruschke AV, et al. The Asp9 Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. REGRESS Study Group, Interuniversity Cardiology Institute, Utrecht, The Netherlands. Regression Growth Evaluation Statin Study [J]. *Circulation*, 1996, 94(8):1913-1918.
- [12] Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(7):1606-1613.
- [13] Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Ellsworth DL, Boerwinkle E, Berenson GS. Influence of lipoprotein lipase serine 447 stop polymorphism on tracking of triglycerides and HDL cholesterol from childhood to adulthood and familial risk of coronary artery disease: the Bogalusa Heart Study [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 159(2):367-373.
- [14] Snieder H, van Doornen LJP, Boomsma DI. Dissecting the genetic architecture of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: lessons from twin studies [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(12):2826-2834.
- [15] Jarvik GP, Goode EL, Austin MA, Auwerx J, Deeb S, Schellenberg GD, et al. Evidence that the apolipoprotein E-genotype effects on lipid levels can change with age in males: a longitudinal analysis [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61(1):171-181.
- [16] Sawano M, Watanabe Y, Ohmura H, Shimada K, Daida H, Mokuno H, et al. Potentially protective effects of the Ser447-Ter mutation of the lipoprotein lipase gene against the development of coronary artery disease in Japanese subjects via a beneficial lipid profile [J]. *Jpn Circ J*, 2001, 65(4):310-314.

(本文编辑:黄 榕)