

中国北方汉人 ABCG8 基因 rs4148217 多态性及血脂水平相关性分析

吴歌, 李贵斌, 张冬青

吉林大学第四医院国家药物临床试验机构, 吉林 长春 130011

摘要: **目的** 研究中国北方汉人 ABCG8 基因 rs4148217 多态性与血脂水平的关系。**方法** 收集中国北方汉人 334 例非高血脂者及 305 例高血脂患者的血样,应用高分辨率溶解曲线法在实时定量荧光 PCR 仪上对其进行基因分型分析;在全自动生化分析仪上对高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)进行检测。对各组人群不同基因多态性与血脂水平进行关联性分析。**结果** rs4148217 基因型和等位基因频率在高血脂组和非高血脂组间分布差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。进一步统计分析表明,在 rs4148217 的 A 等位基因携带者中, TG 水平在两组间有统计学差异($P < 0.05$), LDL-C、HDL-C 及 TC 水平在 rs4148217 的等位基因携带者及非携带者中分布无统计学差异(P 均 > 0.05)。**结论** ABCG8 基因的 rs4148217 的纯合子次等位基因可显著提高血清中 TG 水平,是中国北方汉族人群罹患高血脂的独立危险因素。

关键词: 高血脂症; ABCG8; rs4148217; 等位基因; 北方汉人, 中国; 基因频率

中图分类号: R 589.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2017)08-1059-03

ABCG5/8 是三磷酸腺苷结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运体家族成员,因能参与胆固醇代谢调节而成为近年来研究的新热点^[1]。已有多项研究报告,ABCG5/8 基因上 rs4148217 的单核苷酸基因多态性对血脂动态平衡有显著影响,并进一步增加心脑血管发病风险^[2-6]。该位点在欧洲人群中基因型分布与中国汉族人群存在较大的种族差异性。本研究选取该位点作为候选位点,进行其与中国北方汉人血脂水平的关联性研究,旨在更好的揭示影响中国北方汉人血脂代谢调节及疾病发展的相关规律,为心脑血管疾病的个体化防治提供更坚实的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集中国北方吉林长春地区非高血脂人群 334 名和高血脂患者 305 名,所有入组人员均经过专业临床医生对临床资料的收集,包括民族、年龄、性别、吸烟、饮酒等。高血脂症诊断标准参照《中国成人血脂异常防治指南》的标准^[7],总胆固醇(TC) ≥ 5.18 mmol/L,甘油三酯(TG) ≥ 1.7 mmol/L,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) ≥ 3.37 mmol/L,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) ≤ 1.04 mmol/L,一项指标异常即可判定高血脂。入选受试者排除标准:心脑血管疾病、内分泌系统疾病、呼吸系统疾病、泌尿系统疾

病、恶性肿瘤、自身免疫病、肥胖、结核、急性和慢性感染性疾病、严重肝肾功能不全、妊娠、外伤、手术、近两周服用降压或降脂药物者等。患者入组前均签署知情同意书,通过吉林大学第四医院伦理委员会批准。

1.2 生化指标检测 所有患者晨起抽取空腹静脉血 3 ml,分离血清,保存在 -86 °C 至分析。采用日立 7170 全自动生化分析仪检测血清中 TG、TC、HDL-C 及 LDL-C 水平。

1.3 基因多态性检测 采用 Genra puregen 血试剂盒提取基因组 DNA,用 Nanodrop 1000 定量仪定量至 10 ng/ μ l。根据 Primer-Blast 工具在线设计特异性引物,正义链 5'-CCG AGT CCT ACG AAG ATG CC-3' (20 bp),反义链 5'-GGG GGG CGG GTT CAG T-3' (16 bp)。PCR 反应体系包括 10 \times PCR 缓冲液 1 μ l, 25 mM MgCl₂ 1 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 0.25 μ l, Eva-green 饱和染料 0.5 μ l, 10 μ mol/L 引物各 0.25 μ l, DNA 1 μ l, Taq 酶 0.1 μ l, 超纯水 5.65 μ l。扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 25 s, 50 个循环; 高分辨率溶解曲线基因分型: 95 °C 1 min, 40 °C 1 min, 95 °C 每秒检测荧光 40 次,冷却为 40 °C 10 s。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。基因型和基因频率采用基因计数法计算。按 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)定律计算各等位基因频率并做吻合度检测(χ^2 检验)。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组设计的配对 t 检验;计数资料以率表示,

采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 本研究纳入高血脂患者 305 例,其中男性 155 例,女性 150 例,年龄 55 ~ 75 岁;非高血脂人群 334 例,男性 169 例,女性 165 例,年龄 55 ~ 76 岁。两组体质指数(BMI)、TC、TG、LDL-C 比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),其他指标比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.2 ABCG8 Thr400LysC > A (rs4148217) 基因分型 所有入组的受试者均按 HRM-PCR 法进行基因分型,典型分型图见图 1。

2.3 ABCG8 Thr400LysC > A (rs4148217) 基因型和等位基因频率分布 经计算,rs4148217 位点基因型满足 Hardy-Weinberg 平衡定律检验($HWP = 0.985$),具有群体代表性。非高血脂组中 rs4148217 位点 CC、CA、AA 基因型频率分别为 80.54%、17.96%、1.50%;A、C 等位基因频率分别为 0.10、0.90;高血脂组和非高血脂组中 rs4148217 位点 CC、CA、AA 基因型频率分别为 72.79%、23.28%、3.93%;A、C 等位基因频率分别为 0.16、0.84;基因型分布和等位基因频率两组间比较均有统计学差异(P 均 < 0.05)。见表 2。

2.4 ABCG8 Thr400LysC > A (rs4148217) 等位基因携带者及非携带者血脂水平分布 rs4148217 的 A 等位基因携带者中,高血脂组和非高血脂组 TG 水平有统计学差异($P < 0.05$),LDL-C、HDL-C 及 TC 水平在 rs4148217 的 A 等位基因携带者及非携带者中无统计学差异(P 均 > 0.05)。非高血脂组 TC、TG、LDL-C 及 TC 水平均无统计学差异($P > 0.05$)。见表 3。

表 1 两组基线资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	非高血脂组 ($n = 334$)	高血脂组 ($n = 305$)	P 值
年龄(岁)	62.23 ± 11.46	61.36 ± 10.41	> 0.05
男性(%)	49.40	50.82	> 0.05
吸烟(%)	32.93	15.57	> 0.05
饮酒(%)	39.02	19.34	> 0.05
BMI(kg/m ²)	21.81 ± 2.73	23.68 ± 3.14	< 0.05
收缩压(mmHg)	124.52 ± 13.53	140.26 ± 15.89	> 0.05
舒张压(mmHg)	76.99 ± 10.36	81.24 ± 11.37	> 0.05
TC(mmol/L)	4.79 ± 1.26	5.31 ± 1.02	< 0.01
TG(mmol/L)	1.99 ± 0.51	2.37 ± 0.6	< 0.05
HDL-C(mmol/L)	1.20 ± 0.31	1.10 ± 0.30	> 0.05
LDL-C(mmol/L)	2.71 ± 0.68	3.56 ± 0.93	< 0.01
空腹血糖(mmol/L)	5.26 ± 1.52	5.36 ± 1.57	> 0.05

表 2 高血脂组与非高血脂组 rs4148217 基因型和等位基因频率比较 例(%)

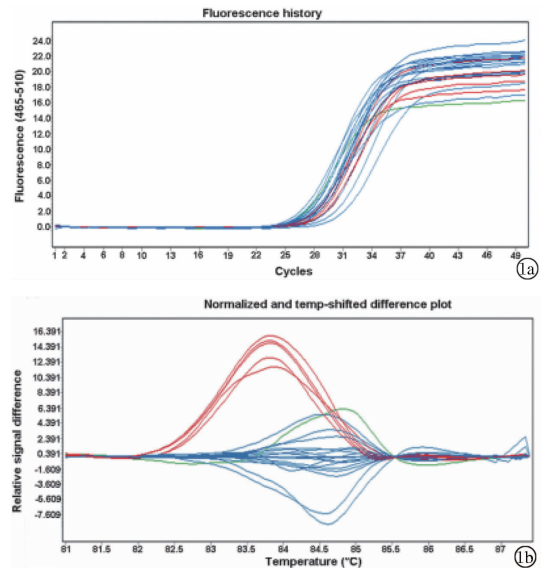
组别	例数	基因型			MAF(%)
		CC(%)	CA(%)	AA(%)	
非高血脂组	334	269(80.54)	60(17.96)	5(1.50)	10.47
高血脂组	305	222(72.79)	71(23.28)	12(3.93)	15.57
P 值		< 0.05			< 0.05

注:MAF 为最小等位基因频率。

表 3 rs4148217 等位基因携带者及非携带者血脂水平分布 ($\bar{x} \pm s$)

血脂指标	组别	CC	CA + AA
TC	非高血脂组	4.77 ± 1.27	4.81 ± 1.24
	高血脂组	5.30 ± 0.99	5.32 ± 1.04
TG	非高血脂组	1.96 ± 0.49	2.02 ± 0.53
	高血脂组	2.08 ± 0.64	2.65 ± 0.56*
HDL-C	非高血脂组	1.21 ± 0.36	1.19 ± 0.25
	高血脂组	1.18 ± 0.31	1.02 ± 0.29
LDL-C	非高血脂组	2.65 ± 0.71	2.76 ± 0.65
	高血脂组	3.52 ± 0.88	3.59 ± 0.98

注:与非高血脂组比较,* $P < 0.05$ 。



注:1a:扩增样本;1b:溶解曲线(蓝色曲线—CC型;绿色曲线—AA型;红色曲线—AC型)。

图 1 HRM-PCR 法基因分型典型分型图

3 讨论

血脂异常包括 HDL-C 降低,TC、TG、LDL-C 和载脂蛋白 B 升高,该病受环境和遗传双重因素影响,也是缺血性心血管病(冠心病、缺血性卒中)发病的独立危险因素之一。ABCG5 和 ABCG8 是三磷酸腺苷结合盒转运体家族成员,两者可形成异源二聚体并定位于肝、肠等细胞膜上发挥作用^[8]。多项研究表明,该异二聚体可限制体内胆固醇的聚集,促进胆固醇和植物固醇从肝脏排回肠内及向胆汁内分泌,与其他肝内转运体如 Npl1 等共同维持血脂的动态平衡。AB-

CG5 和 ABCG8 两者中有任意一个发生突变,都可导致胆固醇在体内堆积,并进一步导致多种心脑血管疾病。

本研究选取中国北方汉族人群作为研究对象,共收集 639 名高胆固醇患者和非高血脂患者的血样,首先应用高分辨率溶解曲线法在实时定量荧光 PCR 仪上对 ABCG5/8 基因的 SNP 位点进行基因分型分析。结果显示,非高血脂组中 rs4148217 位点 CC、CA、AA 基因型频率分别为 80.54%、17.96%、1.50%;高血脂组的对照组中 rs4148217 位点 CC、CA、AA 基因型频率分别为 72.79%、23.28%、3.93%;在另一项对中国胆结石患者的研究中,CC、CA、CA 的频率分别是 83.1%、16.4%、0.5%^[9]。以上基于亚洲人种的观察结果与白种人完全不同,如一项基于德国胆结石患者的研究中,CC、CA/AA 的频率分别是 58.3% 和 41.7%^[2];另一项 Boston Puerto Rican Health cohort 研究结果显示,ABCG8 Thr400LysC > A 多态性的 CC、CA/AA 的频率分别是 60% 和 40%^[3]。以上研究均显示,ABCG8 Thr400LysC > A 的分具有明显的种族差异性。

目前已有多个大型前瞻性和病例对照研究对于 ABCG8 Thr400LysC > A 多态性与血脂及心脑血管疾病的关联性进行研究,涉及的种群包括白种人、智利人、台湾人及非洲人等,多数报道均显示 ABCG5/8 基因上 T400K 的单核苷酸基因多态性对血脂动态平衡有显著影响^[10]。本研究在全自动生化分析仪上对 HDL-C、LDL-C、TG、TC 进行检测,并进一步采用统计软件对基因型与中国北方汉族人群的血脂水平进行关联性验证。结果显示,rs4148217 基因型和等位基因频率在高血脂组和非高血脂组间分布差异有统计学意义。其中,在 rs4148217 的 A 等位基因携带者中,TG 水平在两组间有统计学差异,LDL-C、HDL-C 及 TC 水平在 rs4148217 的等位基因携带者及非携带者中分布无统计学差异。提示 ABCG8 基因 rs4148217 的纯合子次等位基因可显著提高血清中 TG 水平,是中国北方汉族人高血脂的独立危险因素。有研究显示,高卡路里饮食与正常饮食相比也可导致 ABCG5/8 在胆管中表达显著增高^[11-12]。中国北方地区常年气候寒冷,居民日常偏重肉、蛋食,胆固醇摄入量高,且很多人有常年吸烟和饮酒的习惯,可能导致 ABCG5/8 在该人群中表达增高,导致该地区血脂

水平异常增高及心脑血管疾病高发。总之,本研究提示 ABCG5/8 对中国北方汉族人群的血脂动态平衡及心脑血管疾病发生发展中发挥着重要的调节作用。

参考文献

- [1] Chan YM, Varady KA, Lin Y, et al. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease [J]. *Nutr Rev*, 2006, 64(9): 385-402.
- [2] Acalovschi M, Ciocan A, Mostean O, et al. Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones [J]. *Eur J Intern Med*, 2006, 17(7): 490-494.
- [3] Junyent M, Tucker KL, Smith CE, et al. The effects of ABCG5/G8 polymorphisms on plasma HDL cholesterol concentrations depend on smoking habit in the Boston Puerto Rican Health Study [J]. *The Journal of Lipid Research*, 2008, 50(3): 565-573.
- [4] Szilvási A, Andrikovics H, Pongrácz E, et al. Frequencies of four ATP-binding cassette transporter G8 polymorphisms in patients with ischemic vascular diseases [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2010, 14(5): 667-672.
- [5] Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM, et al. Interactions between common genetic polymorphisms in ABCG5/G8 and CYP7A1 on LDL cholesterol-lowering response to atorvastatin [J]. *Atherosclerosis*, 2004, 175(2): 287-293.
- [6] Plat J, Bragt MC, Mensink RP. Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(1): 68-75.
- [7] 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]. *中国实用乡村医生杂志*, 2012, 19(16): 4-14.
- [8] Berge KE, Tian H, Graf GA, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters [J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1771-1775.
- [9] Li Q, Wei XL, Yin RX. Association of ATP binding cassette transporter G8 rs4148217 SNP and serum lipid levels in Mulao and Han nationalities [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2012, 11(1): 46.
- [10] Jakulj L, Vissers MN, Tanck MW, et al. ABCG5/G8 polymorphisms and markers of cholesterol metabolism: systematic review and meta-analysis [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(10): 3016-3023.
- [11] Yamazaki Y, Hashizume T, Morioka H, et al. Diet-induced lipid accumulation in liver enhances ATP-binding cassette transporter g5/g8 expression in bile canaliculi [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26(5): 442-450.
- [12] Wilund KR, Yu L, Xu F, et al. High-level expression of ABCG5 and ABCG8 attenuates diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice [J]. *J Lipid Res*, 2004, 45(8): 1429-1436.

收稿日期: 2017-02-25 修回日期: 2017-03-15 编辑: 王国品