

# 载脂蛋白 E 基因多态性在中国 4 个民族中的分布

陈 峰 薛雅丽 黄承滨 董 澜  
傅松滨 张贵寅 李 璞

(哈尔滨医科大学医学遗传研究室, 哈尔滨 150086)

## 摘 要

本研究提取中国东北汉族和达斡尔、鄂伦春、鄂温克等 4 个人群的基因组 DNA 后, 利用 PCR-RFLP 方法扩增 apo E 基因第 4 外显子片段并进行遗传分析, 计算各个人群中的 apo E 等位基因频率。结果发现 4 个人群中的 apo E 等位基因频率分布趋势与国内外报告基本一致, 但等位基因  $\epsilon_3$  的频率显著高于欧美国家。

**关键词** 载脂蛋白 E, 基因多态性, 等位基因

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apo E) 首先在正常人的极低密度脂蛋白 (VLDL) 中发现的, 其结构基因位点存在多态性, apo E 等位基因频率在不同人群分布有所差异。目前我国仅对部分地区的汉族群体进行了 apo E 等位基因频率的分析 (顾牛范, 1996)。本文利用 PCR-RFLP 技术首次对生活在中国东北地区的汉族和内蒙古地区的达斡尔、鄂伦春和鄂温克等 3 个少数民族的 apo E 等位基因频率的分布进行了分析, 结果发现中国 4 个人群中 apo E 表型和等位基因频率分布差异不显著, 而  $\epsilon_3$  基因频率显著高于欧美国家。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本来源

DNA 样本来自生活在中国东北和内蒙古地区的 4 个民族群体。其中哈尔滨医科大学 94 级学生 85 人; 内蒙古自治区莫力达瓦达斡尔自治旗达斡尔族学生 80 人; 内蒙古自治区阿里河镇鄂伦春族学生 69 人; 内蒙古自治区呼伦贝尔盟鄂温克族学生 56 人。以上献血者均为健康、无亲缘关系, 3 代均是同一民族的个体。血液样本均用 ACD 抗凝,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存至提取基因组 DNA。

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用常规的蛋白酶 K-SDS 处理, 酚/氯仿抽提, 无水乙醇沉淀法提取基因组 DNA。

### 1.3 apo E 基因的 PCR 扩增

以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 apo E 基因第 4 外显子片段。反应引物按 Wenham 等报道设计 (Wenham *et al.*, 1991), 由上海细胞所合成。上游引物序列为: 5' -TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA -3'; 下游引物序列为: 5' -ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A -3'。

PCR 扩增在 20  $\mu$ l 反应体系中进行, 其中包括基因组 DNA 200ng, 引物各 10 pmol, dNTPs 各 100  $\mu$ mol, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mmol, 二甲亚砜 10%, Taq DNA 聚合酶 0.5—1U。先进行 94 10 秒、68 10 秒、72 30 秒共 4 个循环; 再进行 94 10 秒、62 10 秒、72 30 秒共 30 个循环, 最后置于 72 延伸 7 分钟。

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色检测扩增结果。

### 1.4 限制性内切酶消化

限制性酶切反应在 20 $\mu$ l 体系中进行, 其中包括 PCR 反应产物 12 $\mu$ l, *cf*o 内切酶 10U (10U/ $\mu$ l, Boehringer Mannheim)。轻轻混匀后置 37 消化过夜, 加 1 $\mu$ l 0.5mol/L EDTA 终止反应。

### 1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

应用常规方法制备中性聚丙烯酰胺凝胶 (浓度为 8%、交联度为 29 1、离子强度为 1 $\times$ TBE)。在室温下, 250V 恒压电泳 3—4 小时, 分离 *cf*o 酶切产物。

### 1.6 银染分析电泳结果

将凝胶置于一塑料盘中, 蒸馏水冲洗 2—3 次后进行银染。利用 Bio-Rad 公司的 Gel Doc 1000 型 DNA 凝胶分析及成像系统对染色后的凝胶进行照相及保存。电泳图谱按文献 (Wenham, 1991) 中的方法进行 apo E 基因分型。

## 2 结 果

本文对生活在中国东北和内蒙古地区的 4 个民族群体共计 290 名无血缘关系个体的 apo E 基因进行了分型, 并计算出不同民族的表型频率。结果见表 1。根据 apo E 表型频率分布结果及 apo E 基因为共显性基因的特点, 按 Hardy-Weinberg 平衡定律计算出不同民族 apo E 的复等位基因频率。结果见表 2。经  $\chi^2$  检验, 各个民族群体 apo E 的等位基因频率和表型频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。

表 1 中国 4 个人群中 apo E 表型分布

The distribution of apo E phenotype in four populations in China

人群 Population	人数 Cases	apo E 表型频数						apo E 基因型频率					
		2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4
汉 族	85	0	11	0	68	6	0	0	0.129	0	0.800	0.071	0
达斡尔族	80	0	8	1	61	10	0	0	0.100	0.013	0.763	0.125	0
鄂伦春族	69	0	7	1	48	13	0	0	0.101	0.014	0.696	0.188	0
鄂温克族	56	0	2	1	41	12	0	0	0.036	0.018	0.732	0.214	0

表 2 中国 4 个人群的 apo E 等位基因频率  
The gene frequencies of apo E in four populations in China

人 群 Population	人 数 Cases	$\epsilon_2$	$\epsilon_3$	$\epsilon_4$	$\chi^2$
汉 族	85	0.065 ± 0.0189	0.900 ± 0.0353	0.035 ± 0.0142	1.05
达斡尔族	80	0.056 ± 0.0182	0.875 ± 0.0372	0.069 ± 0.0200	0.88
鄂伦春族	69	0.058 ± 0.0199	0.841 ± 0.0411	0.101 ± 0.0257	1.14
鄂温克族	56	0.027 ± 0.0153	0.857 ± 0.0451	0.116 ± 0.0303	2.21

### 3 讨 论

apo E 基因位于 19 号染色体长臂上 (19q13), 其结构基因位点存在多态性, 有 3 种常见的等位基因为  $\epsilon_2$ 、 $\epsilon_3$  和  $\epsilon_4$ , 编码产生 3 种主要的 apo E 异构体 E2、E3 和 E4 (Zannis, 1981)。这种多态性的分子基础源于多肽链第 112 位和 158 位单个氨基酸的替换 (Rall, 1982): E2 的这两个位置均为半胱氨酸 (Cys), E4 的这两个位置均为精氨酸 (Arg), 而 E3 的 112 位是 Cys、158 位是 Arg。这 3 种等位基因为共显性表达。

国内外科研工作者都曾对 apo E 等位基因频率的分布作过研究 (见表 3), 并得到近乎一致的结果, 即 apo E 等位基因频率在不同人群中分布有相同的趋势, 等位基因  $\epsilon_3$  的频率最高, 是群体中最常见的等位基因,  $\epsilon_2$  和  $\epsilon_4$  相对较少, 所以  $\epsilon_3$  被认为是“野生型”; 而  $\epsilon_2$  和  $\epsilon_4$  是由它变异得来 (见表 4)。

表 3 各种人群的 apo E 等位基因频率  
The gene frequencies of apo E in some populations

人 群 Population	人 数 Cases	基因频率 (Gene frequency)			文 献 Reference	u 检验 ( $\epsilon_3$ ) u test ( $\epsilon_3$ )
		$\epsilon_2$	$\epsilon_3$	$\epsilon_4$		
Finland	615	0.041	0.733	0.227	Ehnholm <i>et al.</i> , 1986	3.81**
Germany	1000	0.078	0.783	0.139	Menzel <i>et al.</i> , 1983	2.89**
Scotland	400	0.080	0.770	0.150	Cumming <i>et al.</i> , 1984	2.99**
French	434	0.123	0.751	0.126	Davignon <i>et al.</i> , 1988	3.38**
U. S. A.	182	0.100	0.730	0.160	Strittmatter <i>et al.</i> , 1993	3.42**
Singapore	188	0.122	0.782	0.096	Uterman <i>et al.</i> , 1987	2.51*
Japan	319	0.081	0.849	0.067	Uterman <i>et al.</i> , 1987	1.27
China (Han)	438	0.040	0.031	0.129	顾牛范等, 1996	1.72
China (Han)	85	0.065	0.900	0.035	本 文	Standard
China (Daur)	80	0.056	0.875	0.069	本 文	0.51
China (Oroqen)	69	0.058	0.841	0.101	本 文	1.09
China (Ewenki)	56	0.027	0.857	0.116	本 文	0.77

表 4 apo E 等位基因比较  
The comparison of apo E gene

载脂蛋白	等位基因	假定基因型	氨基酸位点 (aa site)		cfo	切割位点 (cfo site)		产 物 (bp)	
Apo	Allele	Genetype	112	158		112	158	Product (bp)	
E2	$\epsilon_2$	变异型	Cys	Cys	-	-	-	91	81
E3	$\epsilon_3$	野生型	Cys	Arg	-	+	+	91	48
E4	$\epsilon_4$	变异型	Arg	Arg	+	+	+	72	48

本文采用 PCR-RFLP 方法对 apo E 基因进行分型, 如果 apo E 多态位点编码 Arg, 其上游碱基与该密码子序列就形成一个 cfo 识别位点 (GCGC), 结果 PCR 产物在这一区域被切割; 若该位点编码 Cys, 则上游碱基与该密码子形成 GTGC 序列, 不为 cfo 识别和切割。这样, 用特异的限制性内切酶 cfo 消化 apo E 基因 PCR 产物将产生不同的特异性片段 (见图 1, 表 4)。根据 3 种等位基因特异性片段的不同可以在电泳图谱上将 apo E 所有的 6 种表型区分开。

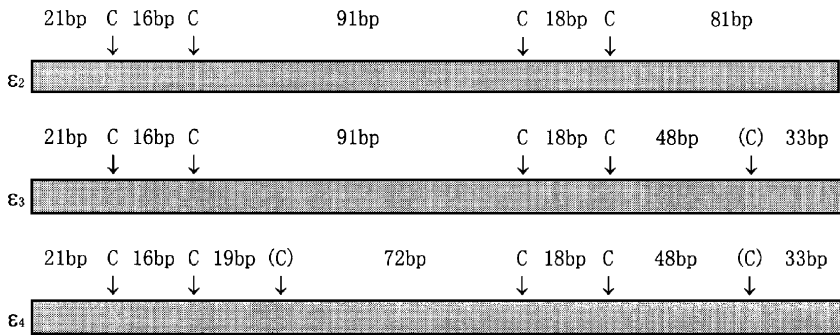


图 1 apo E 基因第 4 外显子片段酶切示意图 (仿 Wenham PR.)

C: cfo 酶切位点 (C): 位于多态位点的 cfo 酶切位点

对中国东北及内蒙古地区的汉族和达斡尔、鄂伦春、鄂温克族进行研究的结果表明, 4 个人群中, apo E 等位基因  $\epsilon_3$  的频率最高, 而在不同民族中,  $\epsilon_2$  和  $\epsilon_4$  的频率有所差别。汉族人群中  $\epsilon_2$  频率高于  $\epsilon_4$ , 而达斡尔、鄂伦春、鄂温克人群中  $\epsilon_4$  高于  $\epsilon_2$ 。这与国内外关于 apo E 等位基因频率分布趋势的报告基本一致, 但中国 4 个人群的  $\epsilon_3$  基因频率分别为 0.900、0.875、0.841 和 0.857, 均较欧美国家高。从文献资料上看, apo E 等位基因  $\epsilon_3$  的频率在亚洲其他国家如新加坡、日本人群中的分布也高于欧美国家的平均水平。以本文的汉族人群 (85 例) 为标准进行统计学 u 检验, 发现其 apo E 等位基因  $\epsilon_3$  的频率与欧美国家相比, 均有极显著的差异, 与亚洲的新加坡人群有显著性差异, 而与亚洲其他人群和本文研究的 3 个少数民族人群相比没有显著性差异。这说明 apo E 基因频率的分布存在着人种、地域上的差异, 但影响 apo E 基因在人群中分布差异的原因尚不明确。

现在的研究已基本确认 apo E 基因与迟发性老年性痴呆 (AD 2) 和 型高脂血症 (HLP) 密切相关。在各种人群中进行 apo E 基因分型, 可以使我们在基因水平上探讨疾病根源, 对疾病易感者及早进行诊断和防治, 避免疾病发生具有重要的临床意义。

## 参 考 文 献

- 顾牛范, 冯国鄞, 江三多. 1996. 中国汉族人群 apo E 等位基因频率的初步研究. 中华医学遗传学杂志, 13: 8-10.
- Cumming AM, Robertson FW. 1984. Polymorphism at the apoprotein E locus in relation to risk of coronary disease. Clin Genet, 25: 310-313.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. 1988. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. Atherosclerosis, 8: 1-21.
- Ehnholm CM, Lukka T, Kuusi E. 1986. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. J Lipid Res, 27: 227-235.
- Menzel HJ, Kladetzky RG, Assmann G. 1983. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. Arteriosclerosis, 3: 310-315.
- Rall SC, Weisgraber KH *et al.* 1982. Human apolipoprotein E: The complete amino acid sequence. J Biol Chem, 257: 4171-4178.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D. 1993. Apolipoprotein E: high avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 1977-1981.
- Utermann G. 1987. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. Am Heart J, 113: 433-440.
- Wenham PR, Price WH, Blundell G. 1991. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. The Lancet, 337: 1158-1159.
- Zannis Vi, Breslow JL. 1981. Human very low density lipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variant and posttranslational modification. Biochemistry, 20: 1033-1041.

## DISTRIBUTION OF APO E POLYMORPHISM IN FOUR CHINESE NATIONAL POPULATIONS

Chen Feng Xue Yali Huang Chengbin Dong Lan  
Fu Songbin Zhang Guiyin Li Pu

(Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086)

### Abstract

In present study after extracting genomic DNA from four population DNA fragment of the fourth exon of apo E, which contains site 112 and 158 in amino acid sequence, were amplified by PCR-RFLP and conducted polymorphism analysis. The results showed that the distribution tendency of apo E allele frequency in four populations (the Han, the Daur, the Oroqen and the Ewenki) is similar to that reported home and abroad, but the frequency of allele  $\epsilon$  is significantly higher than that of Europe and American populations.

**Key words** Apolipoprotein E, Genetic Polymorphism, PCR-RFLP