

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 脂蛋白元 B 五端重複基因多型性與血脂肪之關係

The Association of Polymorphism at 5'VNTR of the Apolipoprotein B  
and Blood Lipids

計畫編號：NSC 87-2314-B-002-313

執行期間：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人：高 照 村 台大醫學院醫事技術學系

### 一. 中文摘要

脂蛋白元 B 是乳糜微粒及低密度脂蛋白的一種主要之蛋白質。血清中的低密度脂蛋白及脂蛋白元 B 的濃度被認為是心血管疾病的一種重要的危險因子。除了變異外，人類脂蛋白元 B 基因在其五端也含有任意重複的可變數目。在五端其重複的可變數目以 2 個鹼基形成不同的對偶基因。本研究擬尋求五端重複的可變數目與血脂肪濃度之關係。八十二位正常及曾患有心肌梗塞者其脂蛋白元 B 五端上重複的核苷酸數目共有六種對偶基因，其大小由 12 至 19 對重複的核苷酸，不過 16 及 17 對重複的核苷酸並未被發現。對偶基因 14 佔有 73.5% 為最多其次是 15 佔 20.3%。基因型之分佈以 VNTR14/14 佔最多 46.9%，VNTR14/15 次之佔 40.6%。帶有對偶基因 13 或 15 者其總膽固醇較高 ( $p = 0.005$ ;  $p = 0.039$ )，但帶有對偶基因 14 者則相反 ( $p = 0.042$ )。而對偶基因 15 則分別與三酸甘油酯及高密度脂蛋白膽固醇之濃度呈負及正相關 ( $p = 0.008$ ;  $p = 0.02$ )。曾患有心肌梗塞之病人帶有對偶基因 15 者較少 ( $p = 0.005$ )。其原因可能是因為高密度脂蛋白膽固醇濃度較低之故而導致疾病之發生。

關鍵詞：脂蛋白元 B、多型性、隨意重複可變數目

### Abstract

Apolipoprotein B (apo B) is a major component of chylomicron and low density lipoprotein (LDL). Serum levels of LDL and apo B are considered as important risk factors for coronary heart disease. In addition to mutations, the human apo B gene also contains variable number of tandem repeat (VNTR) at 5' end of this gene. Alleles differ in length by virtue of variable numbers of 2-bp randomly repeated sequence elements. The purpose of this study was to relate VNTR with serum lipid levels. Six alleles were found in eighty-two normal subjects and patients suffered from myocardial infarction. The numbers of repeats observed were from 12 to 19 except 16 and 17 repeats. The allele 14 was the most frequent (73.5%), followed by allele 15 (20.3%) in normal subjects. The genotype of VNTR14/14 was most common (46.9%). While subject with allele 13 or 15 had higher serum total cholesterol level ( $p = 0.005$ ;  $p = 0.039$ ), person carried allele 14 had lower total cholesterol level ( $p = 0.042$ ). Allele 15 was negatively and positively correlated with serum triglyceride and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentration ( $p = 0.008$ ;  $p = 0.02$ ), respectively. The reason for lower frequency of allele 15 in myocardial infarction patients ( $p = 0.005$ ) probably

due to higher HDL-C with allele 15.

Keywords: Apolipoprotein B,  
Polymorphism, Variable Number  
of Tandem Repeat

## 二、計畫緣由與目的

脂蛋白元B是血清中乳糜微粒，極低密度脂蛋白，中密度脂蛋白和低密度脂蛋白的一種重要的組成分之一。它在膽固醇的輸送中佔有相當重要的角色。脂蛋白元B可當作低密度脂蛋白接受器之配位子，因此能調控細胞對膽固醇之攝入(1)。血中膽固醇的濃度大體上是由低密度脂蛋白之產生及其清除之間之平衡而決定之。血中低密度脂蛋白及脂蛋白元B的量被認為是早發性心臟病之重要危險因子(2)。脂蛋白元B基因限制酶長度片斷的多型性與低密度脂蛋白的代謝速率有關係(3)。而不同的脂蛋白元B對偶基因與肥胖、高膽固醇血症及高罹患冠心症機率也有關連(4)。Monsalve等人(5)發現患有週邊動脈疾病者其脂蛋白元B之多型性中帶有R2及X1對偶基因之頻率較未患病者為高。但是在瑞典人則並無相同的結果(6)。在丹麥人中則認為脂蛋白元B之XbaI多型性是冠心病之一獨立之預測因子(7)。Friedlander等人(8)也指出脂蛋白元B的XbaI多型性與含脂蛋白元B之脂蛋白顆粒之代謝有關。國內的報告則並未發現有相類似的現象(9)。在脂蛋白元B靠近三端約100個鹼基位置有一任意重複的可變數目，利用聚合酶鏈反應放大此區域，再以聚丙烯醯胺膠電泳，Ludwig 等人(10)發現共有14種不同的對偶基因。這些對偶基因是以15個鹼基為單位形成25至52個重複的數目。Boerwinkle 等人(11)也發現相同的結果。國內則報告有16種不同的對偶基因(12)，而這些對偶基因之分佈在心肌梗塞病人與正常者之間並無不同(13)。Coresh 等人(14)也找不出此種三端脂蛋白元B對偶基因對血中脂蛋白元B

的濃度有任何大的影響。脂蛋白元B基因另一任意重複的可變數目則位在五端轉載起始點前3000個鹼基處(15)。共有七種不同的對偶基因，這些對偶基因是以2個鹼基為單位形成12至18個重複的數目。我們先前的研究顯示國人也有六種對偶基因，而心肌梗塞病人與正常者其脂蛋白元B五端任意重複的可變數目之對偶基因不同。病人中其VNTR15對偶基因比正常者少，而VNTR14/15基因型在病人組中也較少。此種基因記號是否介入脂肪之代謝而引起疾病之發生則不得而知。目前國內外皆無此方面之報告。可能存在有不同的對偶基因以不同的程度影響血中脂肪的濃度進而引起冠心症的變化。為了瞭解此種基因型是否經由調控脂肪之代謝而致病，本研究擬進行脂蛋白元B五端VNTR對血中脂肪濃度之影響，如能經由此發現則可早期檢查此段基因而藉以提供此種疾病早期預防之參考依據。本研究挑選心肌梗塞及正常人分別抽取其空腹的EDTA血液。分離出血漿後，利用非酵素法抽取其DNA(16)。加入TKM 1 buffer及2% Triton X-100破壞紅血球，再用TKM 2溶液及SDS溶解白血球後以飽和NaCl沈澱蛋白質，加入酒精後便可得DNA。將之溶在TE buffer後利用引子(Primer 1 - 5' ATTTCTTTCCTGATAGTTCTC 3'; Primer 2 - 5' AACTTCCAAACATTGTAGATG 3')作聚合酶鏈反應將之放大。其產物再以8%的聚丙烯醯胺膠電泳之後用銀染色而作判讀。同時其重複的區域則由聚丙烯醯胺膠中切出，溶在TE buffer後再利用Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit以ABI 373A DNA sequencer來定序。脂肪濃度則利用一般常規方法測量。所得的結果再利用統計學的方法來比較之。

## 三、結果與討論

國人脂蛋白元 B 五端任意重複的可變數目分佈之情形顯示在表一。共有六種對偶基因，分別是 12、13、14、15、18 及 19。對偶基因 14 佔有 73.5% 為最多其次是 15 佔 20.3%。病人中之分佈類似只是對偶基因 15 較少 ( $p = 0.005$ )。在白人中有對偶基因 16，但並不存在於國人中。而對偶基因 19 卻相反，白人中並未發現。基因型之分佈以 VNTR14/14 佔最多 46.9%，VNTR14/15 次之佔 40.6%。病人中後者出現之頻率遠低於正常者 ( $p = 0.0006$ ) (表二)。帶有 13 或 15 對偶基因者其血清總膽固醇濃度較高 ( $p = 0.005$ ;  $p = 0.039$ )，但帶有 14 對偶基因者則相反 ( $p = 0.042$ )。而 15 對偶基因則分別與三酸甘油酯及高密度脂蛋白膽固醇之濃度呈負及正相關 ( $p = 0.008$ ;  $p = 0.02$ )。而在不同之對偶基因其與低密度脂蛋白膽固醇濃度之相關性並不高 (表三)。病人組中其對偶基因 15 或 VNTR14/15 基因型出現之頻率遠低於正常者，其原因可能是因為帶有對偶基因 15 者其 HDL-C 較高，而此為冠心症之保護因子，病人中缺少此基因故可能導致其 HDL-C 濃度偏低而增加患病之機會。

總之脂蛋白元 B 五端任意重複的可變數目與血脂肪之代謝有關，其分析可提供心肌梗塞疾病早期預防之參考。

#### 四、計畫成果自評

本研究已達到原來之預期目標，同時參與之工作人員也學到了 DNA 的抽取，聚合酶鏈反應，電泳，銀染色及 DNA 定序等之技術。所得的結果具有應用之價值也適合在學術期刊發表。

#### 四、參考文獻

- [1] Brown, M. S.; Goldstein, J. L.: A receptor-mediated pathway of cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47.
- [2] Vega G. L.; Grundy, S. M.: In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 1986; 78:1410-4.
- [3] Demant, T.; Houlston, R. S.; Caslake, M. J.; Series, J. J.; Shepherd, J.; Packard, C. J.; Humphries, S. E.: Catabolic rate of low density lipoprotein is influenced by variation in the apolipoprotein B gene. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 797-802.
- [4] Rajput-Williams, J.; Knott, T. J.; Wallis, S. C.; Sweetnam, P.; Yarnell, J.; Cox, N.; Bell, G. I.; Miller, N. E.; Scott, J.: Variation of apolipoprotein-B gene is associated with obesity, high blood cholesterol levels, and increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1988; II: 1442-1446.
- [5] Monsalve, M.V.; Young, R.; Jobsis, J.; Wiseman, S.A.; Dhamu, S.; Powell, J.T.; Greenhalgh, R.M.; and Humphries, S.E.: DNA polymorphisms of the gene for apolipoprotein B in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 1988; 70:123-129.
- [6] Wiklund, O.; Darnfors, C.; Bjursell, G.; Nilsson, J.; Lindén, T.; Olofsson, S.O.; Wilhelmsen, L.; and Bondjers, G.: XbaI restriction fragment length polymorphism of apolipoprotein B in Swedish myocardial infarction patients. *Euro J Clin Invest* 1989; 19:255-258.
- [7] Tybjaerg-Hansen, A.; Nordestgaard, B.G.; Gerdes, L.U.; and Humphries, S.E.: Variation of apolipoprotein B gene is associated with myocardial infarction and lipoprotein levels in

- Danes. *Atherosclerosis* 1991; 89:69-81.
- [8] Friedlander, Y.; Dann, E. J.; Leitersdorf, E. : Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Israeli patients with dominantly inherited hypercholesterolemia and in offspring with parental history of myocardial infarction.(Letter) *Hum. Genet.*1993; 91: 299-300.
- [9] Pan, J.P.; Chiang, A.N.; Tai, J.J.; Wang, S.P.; Chang, M. S.: Restriction fragment length polymorphisms of apolipoprotein B gene in Chinese population with coronary heart disease. *Clin. Chem.* 1995; 41:424-429.
- [10] Ludwig, E. H.; Friedl, W.; McCarthy, B. J. : High-resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 45: 458-464.
- [11] Boerwinkle, E.; Xiong, W.; Fourest, E.; Chan, L. : Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3-prime hypervariable region. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989; 86: 212-216.
- [12] Wu, J. H.: Sequences of 表一、脂蛋白元 B 五端任意重複的可變數目分佈。
- apolipoprotein B 3' hypervariable repeat alleles. *Gene* 1995; 159:235-237.
- [13] Wu, J. H.; Chern, M. S.; Lo, S. K.; Wen, M. S.; Kao, J. T.: Apolipoprotein B 3'hypervariable repeat genotype:association with plasma lipid concentrations, coronary artery disease,and other restriction fragment polymorphisms. *Clin. Chem.* 1996; 42:927-932.
- [14] Coresh, J.; Beaty, T. H.; Kwiterovich, P. O., Jr.; Antonarakis, S. E. : Pedigree and sib-pair linkage analysis suggest the apolipoprotein B gene is not the major gene influencing plasma apolipoprotein B levels. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 50: 1038-1045
- [15] Ludwig, E. H.; Haubold, K.; McCarthy, B. J.: Analysis of two different tandem repetitive elements within the human apolipoprotein B gene. *J. Lipid Res.* 1991; 32:374-379.
- [16] Lahiri, D. K.; Nurnberger. Jr. J.I.: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19:4293.

(TG) <sub>n</sub>	Percent		p
	Control	Patient	
12	0	1	0.005
13	3.1	4	
14	73.5	83	
15	20.3	5	
18	3.1	5	
19	0	2	

表二、脂蛋白元 B 五端任意重複的可變數目基因型之分佈。

VNTR	Percent		p
	Control	Patient	
12/15	0	2	
13/14	6.2	8	
14/14	46.9	68	0.0475
14/15	40.6	8	0.0006
14/18	6.3	10	
14/19	0	4	

表三、對偶基因與血脂肪濃度之相關性<sup>a</sup>

	VNTR					
	12	13	14	15	18	19
T chol	0.047 (0.679)	0.308 (0.005)	- 0.226 (0.042)	0.230 (0.039)	- 0.176 (0.117)	-0.094 (0.405)
Triglyceride	0.120 (0.285)	0.012 (0.915)	0.184 (0.100)	- 0.292 (0.008)	0.016 (0.890)	0.035 (0.755)
HDL-C	0.055 (0.627)	- 0.024 (0.832)	- 0.213 (0.056)	0.258 (0.020)	0.013 (0.910)	- 0.001 (0.991)
LDL-C	0.077 (0.497)	- 0.066 (0.559)	0.087 (0.440)	- 0.083 (0.462)	0.034 (0.765)	-0.073 (0.519)

a: the number indicates correlation coefficient and the parenthesis indicates significance level.