

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

國人第三型高脂血症之分子研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2314 - B - 002 - 270 -

執行期間： 89年 8月 1日至90年 7月 31日

計畫主持人：高照村

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台大醫學院醫事技術學系

中 華 民 國 90年 10月 23日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國人第三型高脂血症之分子研究

Molecular Study of Type III Hyperlipoproteinemia in Taiwan

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-270

執行期間：89年8月1日至90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

第三型高脂蛋白血症又稱家族性劣質脂蛋白血症 (Familial dysbetalipoproteinemia)。臨床上的特徵是血漿中三酸甘油酯 (Triglyceride ; TG)、總膽固醇 (Total Cholesterol ; TC) 的濃度增加，極低密度脂蛋白 (Very Low Density Lipoprotein ; VLDL) 在血清電泳形成一寬β帶 (β-migrating band)，結締組織有脂肪瘤的產生，病患易罹患早發性冠狀動脈硬化及周邊血管的動脈硬化。

第三型高脂蛋白血症主要是由於脂蛋白元 E (Apolipoprotein E ; apoE) 異常所致，使得肝臟失去代謝脂蛋白剩餘體 (Lipoprotein remnant) 的能力。ApoE 是一由 299 個胺基酸所組成的蛋白質，存在乳糜微粒 (Chylomicron)、VLDL 及高密度脂蛋白 (High Density Lipoprotein ; HDL)。主要的功能是作為脂蛋白與細胞接受器結合的配位基 (ligand)。由於基因的多形性，apoE 有三種異構型，分別是 apoE2、apoE3 及 apoE4。歐美國家的研究報告指出患有第三型高脂蛋白血症的病人 90% 以上是屬於 apoE2 型，apoE2 與接受器結合的能力約只有正常的 1%。本研究是以血清電泳具有β-migrating、測量 VLDL-C/TG 比值大於 0.3，在台大醫院高三酸甘油酯及高膽固醇的病患中篩檢出第三型高脂蛋白血症。探討台灣地區第三

型高脂蛋白血症病患與脂蛋白元 E 基因型 (genotype) 之關聯性，並比較台灣地區第三型高脂蛋白血症病患其 apoE 基因型與其他國家所報告的結果的差異。同時利用聚合酵素鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction ; PCR) 加上直接定序來偵測 apoE 基因的變異，探討是否有除了 apoE2/2 以外的變異型，並且測試溫度梯度電泳法 (Temperature Gradient Gel Electrophoresis ; TGGE)，應用於偵測脂蛋白元 E 基因分型之可行性。

在總數 10 位第三型高脂蛋白血症的病患中，只有 2 位病患是 apoE2/2 (20%) 的基因型，但帶有ε2 對偶基因的頻率佔 50%，顯示國人第三型高脂蛋白血症的病患主要是以異合子的形式存在。而對於高 GC 含量，表現子 (exon) DNA 長度又長的脂蛋白元 E，利用 TGGE 做脂蛋白元 E 基因分型，因其靈敏度及再現性均不佳，因此尚不可行。

關鍵詞：第三型高脂蛋白血症、脂蛋白元 E、基因定序、溫度梯度電泳法

Abstract

Type III hyperlipoproteinemia (type III HLP; familial dysbetalipoproteinemia) is a condition characterized by elevated serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG)

levels, and by a cholesterol-enriched very low density lipoprotein (VLDL) designated floating- β lipoprotein or β -VLDL. Affected individuals may rarely have yellowish lipid deposits in the creases of the palms of the hands called xanthoma striata palmaris. In addition, eruptive and tuberous xanthomas are occasionally seen. Coronary heart disease and peripheral vascular disease both occur prematurely in type III HLP. More than 90% of the patients are homozygous for apolipoprotein E2 in most populations analyzed thus far.

Apolipoprotein E (apoE) is a polypeptide comprised of 299 amino acids found in chylomicrons (CM), VLDL, and high density lipoproteins (HDL). The structure gene for apoE is polymorphic. Three common isoforms of the protein (apoE2, apoE3, apoE4), due to three different alleles (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) inherited in a codominant fashion, account for six common phenotypes (apoE2/2, apoE2/3, apoE2/4, apoE3/3, apoE3/4, apoE4/4). These isoforms interact differently with specific lipoprotein receptors, and thereby alter circulating lipid levels. When compared with the most common apoE3 isoform, the apoE2 isoform has a significantly reduced affinity for the LDL receptor, this may result in the homozygous state in accumulation of cholesterol-enriched lipoprotein remnants and in some individuals this phenotype is associated with type III hyperlipoproteinemia.

The aim of this study was to determine the relationship between apoE genotype and type III HLP patients and to evaluate the apoE genotyping with temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). Type III HLP was defined by elevated serum triglyceride and cholesterol concentrations and by the presence of both β -VLDL and a ratio of VLDL cholesterol to plasma triglyceride

of > 0.30 . The genotype and the allele frequencies of type III HLP were also compared between Taiwanese and other populations.

In 10 patients with type III HLP, only two were apoE2/2 homozygous. The ϵ 2 allele frequency was 0.5, which indicated that the heterozygotes were the major genotypes. This result was different from that of Caucasian but similar to Japanese. In addition to the common apoE genotype, no other apoE variant was found by direct sequencing. Due to the poor reproducibility, apoE genotyping with temperature gradient gel electrophoresis technique was not feasible and modification of the technique is necessary.

Keywords: Type III

Hyperlipoproteinemia, Apo E,
Gene sequencing, Temperature
Gradient Gel Electrophoresis
Technique

二、緣由與目的

第三型高脂蛋白血症是於 1950 年為 Gofman 首先發表[1]，他起初稱這種病為黃色瘤結節並指出這是一種家族性的脂質代謝異常的疾病。病患血漿中三酸甘油酯、膽固醇的濃度增加，皮膚有脂肪瘤的產生，尤其是結節性黃色瘤和掌紋黃色瘤。目前，掌紋黃色瘤為第三型高脂蛋白血症所特有。病患血漿內累積許多極低密度脂蛋白剩餘體。第三型高脂蛋白血症的臨床徵狀呈多樣性，多數第三型高脂蛋白血症病患易罹患早發性冠狀動脈硬化及周邊血管的動脈硬化。然而，大多數的病患在年輕時血漿脂質並不會特別的升高，通常是因為其他的疾病，如甲狀腺低能、糖尿病、肥胖等因素，才進一步引發高血脂的惡化[2]。

第三型高脂蛋白血症形成的主要原因是由於脂蛋白元 E 異常，改

變了脂蛋白元 E 與細胞表面接受器結合的能力，降低血漿內脂蛋白剩餘體代謝的速率，使得病患增加罹患心血管疾病的機率[3]。一般診斷第三型高脂蛋白血症的依據有三：第一、病患血漿中三酸甘油酯、膽固醇的濃度高於 95% 正常人之值，第二、病患血清電泳呈一寬β帶，這是由於脂蛋白內充滿膽固醇所致，第三、病患 VLDL 內膽固醇含量與病患血漿中三酸甘油酯的比值大於 0.3 (正常人則在 0.2 以下) [4]。Utermann 等人發現絕大多數第三型高脂蛋白血症病患其 apoE 是屬於 apoE2/2 的型式[5]。

脂蛋白元 E 是於 1973 年首先被 Shore 和 Shore 所發表[6]。它是一種富含精胺酸的蛋白質，主要存在富含三酸甘油酯的 VLDL 上。脂蛋白元 E 的胺基酸序列於 1982 年首先被定出 [7]，它含有 299 個胺基酸，分子量為 34,200。其由 mRNA 反轉錄出來的 cDNA 也在 1984 年被定序出來[8]。藉由二方向電泳分析，Zannis 和 Breslow 提出脂蛋白元 E 的基因存有三個對偶基因 (alleles)，並在轉譯後有醃化的過程，使得各個脂蛋白元 E 的分子量和 pH 有些許差異，確立了脂蛋白元 E 是一基因上存有三個對偶基，並可轉譯出三種同合子表現型，三種異合子表現型[9]。從分子生物學方面研究脂蛋白元 E 的多形性顯示，脂蛋白元 E 的三種異構體是起源於蛋白質上第 112 與 158 二個位置的胺基酸的不同 [10]，脂蛋白元 E 是一媒介脂蛋白與 apoB,E (LDL) receptors 或 apoE receptors 結合的蛋白質[11]；藉由離子的交互作用力[12]，由其 N 端第 136-150 位置的胺基酸與接受器結合 [13]。當脂蛋白元 E 的 N 端第 158 個胺基酸由 Arg 轉變成 Cys 時，其與接受器結合的能力便只剩 1% [14]，導致脂蛋白剩餘體的清除受到障礙。因此建立一套簡單、可以大量篩檢脂蛋白元 E 異構體的方法便有其重要性。本

研究是探討台灣地區第三型高脂蛋白血症病患與脂蛋白元 E 基因型之關聯性，並比較台灣地區第三型高脂蛋白血症病患其 apoE 基因型與其他國家所報告的結果的差異。同時利用聚合酵素鏈鎖反應直接定序來偵測 apoE 基因的變異，探討是否有除了 apoE2/2 以外的變異型，並且測試溫度梯度電泳法，應用於脂蛋白元 E 基因分型之可行性。

三、結果與討論

本研究對象為來自台大醫院高三酸甘油酯、高膽固醇的病患，共 407 位。其篩選條件為：三酸甘油酯高於 280 mg/dl 且小於 1500 mg/dl；總膽固醇高於 280 mg/dl 且小於 500 mg/dl，LDL-C 小於 130 mg/dl。利用血清電泳篩檢出帶有 β -VLDL 的病患 37 位，其中 VLDL-C/TG>0.3 的病患 10 位，包括 4 位女性，6 位男性，平均年齡 63 歲 (表一及表二)。以 PCR-RFLP 分析高脂血檢體 (β -VLDL (+) 或 VLDL-C/TG>0.3) 的基因型 (圖一)。在總數 10 位第三型高脂蛋白血症的病患中，只有兩位是 apoE2/2 (20%)，與歐美地區大於 90% [5] 相差甚多。若是比較對偶基的分佈情形， β 2 則佔有 50% (表二)，顯示國人主要是以異合子 (heterozygote) 的形式存在，與日本出現的頻率類似。

為了更進一步探討脂蛋白元 E 在高脂血症病人上的分布情形，接著將帶有 β -VLDL 或 VLDL-C/TG>0.3 檢體的基因型加總之後，分析其對偶基出現之頻率，結果發現 β 2=0.195， β 3=0.627， β 4=0.178，對照正常者 β 2=0.082， β 3=0.871， β 4=0.047 [15]，其中 β 2、 β 4 的頻率皆高於正常者，顯示脂蛋白剩餘體清除障礙可能與 β 2 較相關，而帶有 β 4 對偶基也比 β 3 較具脂質代謝異常的危險性。經由聚合酵素鏈鎖反應直接定序法分析，再次確認

脂蛋白元 E 基因型分析的結果，然而在本論文收集的樣本裡，並沒有除了脂蛋白元 E 異構體以外的變異型。利用溫度梯度電泳可將正常的 DNA 和受測的變異的 DNA 加以區分。理論上 apoE3 帶的是 GC 的鹼基配對， T_m 值比 apoE2 高，應有較快的電泳速度；同樣的 apoE4 的電泳速度應比 apoE3 快。然而，經過多次的實驗發現此電泳跑出來的樣式沒有一致性，系統的再現性不佳(圖二及三)，對於用來篩檢高 GC 含量，表現子 DNA 長度又長的脂蛋白元 E，可能需要進一步的評估。

四、計畫成果自評

本研究已達到原來預期的目標，同時參與之工作人員也學到了脂蛋白電泳，基因型分析，聚合酵素鏈鎖反應直接定序法分析及溫度梯度電泳法等技術。且所得的結果具有學術參考之價值。

五、參考文獻

1. Mahley, R. W., and Rall, S. C., Jr. (1995) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds), 7th Ed., pp. 1953-1980, McGraw-Hill, New York
2. Contois JH. Anamani DE. Tsongalis GJ. The underlying molecular mechanism of apolipoprotein E polymorphism: relationships to lipid disorders, cardiovascular disease, and Alzheimer's disease. *Clin Lab Med* 16:105-23, 1996
3. Rall SC Jr. Mahley RW. The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Intern Med* 231:653-9, 1992
4. Nauck M. Glatt L. Marz W. Feussner G. Wieland H. Simple precipitation-based method for the screening of type III hyperlipoproteinemia. *Clin Chem* 45:909-11, 1999
5. Utermann G. Hees M. Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature*. 269:604-7, 1977
6. Shore VG. Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*. 12:502-7, 1973
7. Rall SC Jr. Weisgraber KH. Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 257:4171-8, 1982
8. McLean JW. Elshourbagy NA. Chang DJ. Mahley RW. Taylor JM. Human apolipoprotein E mRNA. cDNA cloning and nucleotide sequencing of a new variant. *J Biol Chem* 259:6498-504, 1984
9. Zannis VI. Breslow JL. Utermann G. Mahley RW. Weisgraber KH. Havel RJ. Goldstein JL. Brown MS. Schonfeld G. Hazzard WR. Blum C. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res* 23:911-4, 1982
10. Weisgraber KH. Rall SC Jr. Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 256:9077-83, 1981.
11. Mahley RW. Innerarity TL. Rall SC Jr. Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 25:1277-94, 1984.
12. Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships.

- Adv Protein Chem 45:249-302,
1994
13. Weisgraber KH. Innerarity TL.
Harder KJ. Mahley RW. Milne
RW. Marcel YL. Sparrow JT. The
receptor-binding domain of
human apolipoprotein E.
Monoclonal antibody inhibition of
binding. J Biol Chem
258:12348-54, 1983
14. Weisgraber KH. Innerarity TL.
Mahley RW. Abnormal
lipoprotein receptor-binding
activity of the human E
apoprotein due to
cysteine-arginine interchange at a
single site. J Biol Chem
257:2518-21, 1982
15. Kao JT. Tsai KS. Chang CJ.
Huang PC. The effects of
apolipoprotein E polymorphism
on the distribution of lipids and
lipoproteins in the Chinese
population. Atherosclerosis.
114:55-9, 1995

表一：高脂血症病患脂質測定值

No.	SEX (F/M)	AGE (years)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C/TG	β-VLDL
N=10	4/6	63.1±4.3	400±64.2	616±46.2	30±2.5	93.1±15.1	>0.3	+
N=6	1/5	64.2±5.8	328±17.6	426±30.4	50.17±4.6	120±34.3	>0.3	-
N=27	15/12	51.6±2.5	284.6±7.9	684.2±71.2	40.2±1.9	121±9.2	<0.3	+

數值是以mean±SEM表示

表二：第三型高脂蛋白血症病患之生化檢查資料

HLP編號	性別	年齡	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C/TG	β-VLDL	ApoE genotype
26	F	74	272	564	21	66	0.328	+	2/2
77	M	51	416	647	25.5	96	0.455	+	2/2
110	F	82	323	562	42	103	0.317	+	3/3
119	F	64	269	412	39	103	0.308	+	2/3
195	M	64	361	518	18	118	0.434	+	2/3
268	M	76	315	653	30	51	0.358	+	2/4
283	M	45	485	841	28.5	198	0.307	+	2/3
304	M	51	300	504	34.5	109	0.311	+	3/3
329	M	48	945	876	25.5	21	1.026	+	2/3
366	F	76	312	578	37.5	66	0.361	+	2/3

圖一：病人血清脂蛋白電泳圖(lipoprotein electrophoresis)