

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

研究原脂蛋白基因型態對高脂血症病人藥物治療的關連

(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-002-016-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學醫學院內科

計畫主持人：陳明豐

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 11 月 3 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

研究原脂蛋白基因型態對高脂血症病人藥物治療的關連 (3/3)

Studies of Apolipoprotein Genotyping on the Drug Treatment of Hyperlipidemic Patients (3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 93－2314－B－002－016

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳明豐

共同主持人：李源德、許秀卿

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☐精簡報告 ☒完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐涉及專利或其他智慧財產權，☐一年☒二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學醫學院內科

中 華 民 國 九 十 四 年 十 月 三 十 一 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

研究原脂蛋白基因型態對高脂血症病人藥物治療的關連 (3/3)

Studies of Apolipoprotein Genotyping on the Drug Treatment of Hyperlipidemic Patients

計劃編號：NSC 93-2314-B-002-016

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

主持人：陳明豐 教授 執行機構及單位名稱：國立台灣大學醫學院內科

電子信箱：mfchen@ha.mc.ntu.edu.tw

一、中文摘要

流行病學研究發現血脂異常和心臟血管疾病的發生密不可分，心臟血管疾病為一多重因子造成的疾病，有一部份為可修飾的危險因子，然而有一部份卻是無法改變的危險因素，脂蛋白是一個大分子由脂質和蛋白所組成，在脂蛋白上的蛋白稱為原脂蛋白，人類的這些原脂蛋白具有基因變異性，而且已被證實有些突變會引發血脂異常為粥狀硬化形成之病因之一。本研究利用聚合酵素鏈反應、限制片段長度多形性以及單股核酸結構多形性的方法，並分析高脂血症病人之 apo A-I 基因上之上游 75 及下游 83 核苷突變；apo A-II 基因之 1170-2943 核苷區段及 2527~2943 核苷區段突變；apo A-IV 之 2163~2462 鎗除基因，1527~2345 區段突變，2285~2390 區段突變以及 apo C-III 基因第 3175 核苷序列和 3206 核苷序列突變。同時針對 Apo B exon 26 基因之 C10698T 和 exon 29 之 A 13132G 和 Apo E 之 exon2 及 exon 4 上的 T448C 和 C586T，而 Apo B exon 29 之 A/G 突變也與三酸甘油酯的高低有關，得到在 apo C-III 基因，在 3175 核苷之 C→G 的基因變異和血漿高三酸甘油酯的表現呈有意義正相連，而 Apo B exon 29 之 A/G 突變也與三酸甘油酯的高低有關。本研究亦發現許多在西方報告中提及的變異在國人的分析中，並沒有發現如在 Apo A-IV 之 1527-2345 區段變異，和 Apo E exon 2 之變異，以及 Apo B exon 26 中的熱門變異區塊。研究同時顯示各類原脂蛋白之對偶基因的變異頻

率也與西方報告有不同。亦即顯示造成高脂血的基因具有種族差異性，利用已發展的快速分析技術如 SNP 方法來建立國人的疾病相關基因資料庫實有其必要性。

二、英文摘要

Atherosclerotic cardiovascular diseases are multi-factorial. Some non-modifiable risk factors (e.g. genetic trait) may attenuate the benefit of risk modification of the modifiable factors. Genetic epidemiology has been widely used to analyze the underline risk of cardiovascular disease and to point the direction of treatment or prevention. The genetic variation or mutation of apolipoprotein, the protein of lipoprotein, has been linked to some lipid abnormality resulting severe atherosclerotic cardiovascular disease. In the present study, the genetic variation or mutation of Apo AI-CIII-AIV cluster, Apo A-II, Apo B and Apo E were analyzed and the correction of these mutation and lipid abnormality were explored. Our results showed ApoC-III (3175NT C→G) mutation was significantly related to hypertriglyceridemia, the same relation was also found in the Apo B exon 29 (13132 NT C→G; 4311 AA Asn →Ser) mutation. It is interesting to find some hot spot mutation among Caucasian population, such as Apo B exon 26 (10699 NT C→A; 3500 AA Arg →Gln), Apo A-IV (1527-2345 NT) and Apo E exon 2 mutations, were not found in tested samples. Most of presented allele frequencies in apolipoteins genes were different between our population and Caucasian population. The present results strongly suggest that it is necessary to establish our own genetic data which are linked to diseases.

三、前言

流行病學研究發現血脂異常和心臟血管疾病的發生密不可分，研究結果證實降低血脂肪濃度可以有效地延緩或減少粥狀硬化的生

成，藉此能有效地控制和預防心臟血管疾病。心臟血管疾病為一多重因子造成的疾病，有一部份為可修飾的危險因子，例如經由飲食、運動或藥物治療等方式促使血脂肪的改善和降低濃度，然而有一部份卻是無法改變的危險因素，例如：年齡、性別以及遺傳基因背景等。脂蛋白是一個大分子由脂質和蛋白所組成，在脂蛋白上的蛋白稱為原脂蛋白，目前已知有 apo A-I、apo A-II、apo A-IV、apo B₁₀₀、apo B₄₈、apo C-I、apo C-II、apo C-III、apo D 和 apo E。人類的這些原脂蛋白具有基因變異性，而且已被證實有些突變會引發血脂異常為粥狀硬化形成之病因之一。探討原脂蛋白基因變形性之基因位址和血漿脂質濃度之關連，是解開動脈粥狀硬化病因的重要契機。本研究就國人原脂蛋白基因型建立登錄資料，並進行相關研究，期盼能了解原脂蛋白基因型態與心血管疾病危險，因子的相關性以及其對降血脂藥物治療之影響。

四、研究材料與方法

本研究對象將包括民國 88 年 8 月 1 日以後至台大醫院門診求診病人，於病人同意後登錄其辨識資料、教育程度、職業、家族病史、個人嗜好、過往病史包括心雜音、心臟病診斷、高血壓、肺疾病、甲狀腺病、糖尿病等，既往手術住院紀錄及其它心臟病症狀，並進行理學檢查及血脂肪分析。將就病人中選擇血液三酸甘油脂濃度或血液總膽固醇濃度於觀察三個月期間，經至少兩次抽血，分別皆大於 250 mg/dL 之高脂血症病人，或於觀察期三個月經至少兩次抽血膽固醇及三酸甘油脂濃度皆大於 250 mg/dL 病人，年齡大於 18 歲、性別不拘。本研究將同時選擇年齡、性別相仿之非高脂血症為對照組，進行基因型態分析並和高脂血症族群進行比較分析。

在抽血離心取得中層介面(Buffy coat)的白血球，抽取 DNA 以已知的原脂蛋白基因序列，選取合成寡核甘用來作為聚合酵素鏈反應之引子，而偵測之突變包括(一)Apo A-I 基因上之-75 及+83 核甘；(二)Apo A-II 1170-2943 和 2527-2943 核甘區段；(三)Apo A-IV 之 2163-2462

剷除基因，1527-2345 區段突變，2285-2390 區段突變；(四)Apo C-III 基因的 3175 核甘及 3206 核甘突變；(五)Apo B 的 exon 26 之 C 10698T 和 exon29 之 A13132G；(六)Apo E exon 2 及 exon 4。在聚合酵素鏈反應完成後再利用限制酵素作用，單股型態多形性(SSCP)或是單核甘變異性等方法來確立突變型態。所得資料以 Chi square test 來檢查不同資料分布情形，而原脂蛋白基因型將與臨床資料如高血脂、高血壓、冠狀動脈病、中風、糖尿病等險項因子做單元及二元分析。除了計算不同因子之原脂蛋白型的分布差異外，將以計算原脂蛋白基因型對各種心血管疾病的關係。

五、結果與討論

結果得到在 apo C-III 基因之第 3175 和 3206 核甘突變位置之 Haplotype 在理論有十種，但在國人只有六種，同時在 3175 核甘之 C→G 的基因變異和血漿高三酸甘油酯的表現呈有意義正相連，而在 apo A-IV 之 1527-2345 區段的變異，在國人並沒有出現，在分析的案例中皆是 AA 基因型，沒有如西方報告有 A→T 的突變，至於 apo A-I 基因上之上游 75 及下游 83 核甘的 G→A 或 Msp+→- 的突變頻率則與西方報告相近，不具統計差異，其他已分析的突變出現頻率在國人也無持異差別性。

而在 Apo B exon 26 上第 10698 核甘的 C→T 突變亦即是 3500 胺基酸 Arg→Trp，可得突變率為 CC: 99.5%。CT: 5%，而 TT: 0%，而 10699 C→A 即 3500 胺基酸 Agr→G1N 突變則在國人未見，此為高加索人種中為熱門圖變點，其突變率為 1/500。而國人之 Arg 3500 Trp 的突變也未發現和血脂類的高低變化有何關連。在 Apo B exon 29 上偵測到一突變即 13132 核甘 A→G 突變(胺基酸 Asn 4311 Ser)其頻率為 AA: 12.5%、AG: 48.4%、GG 為 39.1%，且發現與 G 對偶基因的出現會與血中三酸甘油酯的含量有關，當 G 對偶基因存在則三酸甘油酯有意義下降。Apo E exon 2 在國人則無發現任何突變，但在 exon 4 則有 2 個突變被偵測到，分別為 448 核甘 T→C 及 586 核甘 C→T 的

變異，然而此變異與血脂高低不具關連性。本研究突顯了國人高脂血症相關的基因突變特徵的確和國外的報告具有極大差異性，種族的差異切實造成臨床應用上在援用外國資料、經驗的困擾。隨著研究的日新月異，使用更新快速的方法，如 SNP(Single Nucleotide polymorphism)，廣泛地分析國人疾病相關基因，建立基因資料庫是因應後基因體時代潮流的必要方式。

參考文獻

1. Beheshti I, Hanson NQ, Copeland KR, Garg U, Tsai M. Single-strand conformational polymorphisms(SSCP): Studies of the genetic polymorphisms of exon 4 of apolipoprotein CIII. Clin. Biochem. 1995; 28:303-307.
2. Dunning AM et al., Am J Hum Genet. 1992; 50: 208-21.
3. Dupuy-Gorce AM, Desmarais E, vigneron S, Buresi C, Nicaud V, Evans A, Luc G, Arveiler D, Marquies-Vidal P, Cambien F, and others. DNA polymorphism in linkage disequilibrium at the 3' end of the human apo A-II gene: relationships with lipids, apolipoprotein and coronary heart disease. Clin. Genetics 1996; 50:191-8.
4. E21K de Knijff et al., Hum Mutat. 1994; 4(3): 178-94.
5. Jansen S, Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Zambrana JL, Marin C, Ostos MA, et al. Effect of 360His mutation in apolipoprotein A-IV on plasma HDL-cholesterol response to dietary fat. J. Lipid Res. 1997; 38:1995-2002.
6. Jansen S, Lopez-Miranda J, Salas J, Ordovas JM, Castro P, Marin C, et al. Effect of 347-serine mutation in apoprotein A-IV on plasma LDL cholesterol response to dietary fat. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997; 17:1532-1538.
7. Kamboth MI, Aston CE, Nestlerode CM, McAllister AE, Hamman RF. Haplotype analysis of two ApoAI/MspI polymorphisms in relation to plasma levels of Apo A-I and HDL-cholesterol.

- Atheroscler. 1996; 127:255-62.
8. Mamotte CD et al., Eur J Intern Med. 2002; 13: 250-255.
 9. Minihane AM. Khan S. Leigh-Firbank EC. Talmud P. Wright JW. Murphy MC. Griffin BA. Williams CM. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. Arterioscler, Throm & Vas Biol. 2000;20(8):1990-7.
 10. Minnich A, DeLangavant G, Lavigne J, Roederer G, Lussier-Cacan S, Davignon J. G to A substitution at position -75 of the apolipoprotein A-I gene promoter. Evidence against a direct effect on HDL cholesterol levels. Arterioscler. Thromb. Vas. Bio. 1995; 15:1740-5.
 11. Moreel JF et al., Hum Genet. 1992; 89: 169-75.
 12. Rabes JP et al., Hum Mutat. 1997; 10: 160-3.
 13. Salazar LA. Hirata MH. Giannini SD. Forti N. Diamant J. Lima TM. Hirata RD. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. Clin Chim Acta. 2000;300(1-2):139-49.
 14. Sigurdsson JG, Gudnason V, Sigurdsson G, Humphries SE. Interaction between a polymorphism of the apo A-I promoter region and smoking determines plasma levels of HDL and apo A-I. Arterioscler. Thromb. 1992; 12:1017-22.
 15. Soria LF et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 8:587-91.
 16. Waterworth DM. Hubacek JA. Pitha J. Kovar J. Poledne R. Humphries SE. Talmud PJ. Plasma levels of remnant particles are determined in part by variation in the APOC3 gene insulin response element and the APOCI-APOE cluster. J Lipid Res. 2000;41(7):1103-9.