

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00445

2代3人同患家族性高胆固醇血症及其低密度脂蛋白受体基因突变分析

吴弘^{1△*}, 谢芳^{2,3△}, 郎希龙^{1△}, 郭志福¹, 朱霓¹, 白元¹, 陈峰¹, 潘静薇¹, 郑兴¹, 赵仙先¹, 秦永文¹, 黄薇^{2,3}

1. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433
2. 上海交通大学附属瑞金医院血液学研究所, 上海 200025
3. 国家人类基因组南方研究中心遗传学部, 上海 201203

[摘要] **目的** 调查2代3人同患家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)的家系,并检测和分析低密度脂蛋白受体(LDL-R)基因突变,以探讨FH发病的分子机制。**方法** 对17岁先证者进行体格、心电图、血脂水平、心脏超声、冠状动脉造影检查。根据患者及其家系的血缘关系绘制家系图谱。以PCR法分别扩增家系成员LDL-R基因启动子、18个外显子及侧翼序列,应用直接测序法进行突变检测;并以90名来自患者原籍的正常人群和190个随机人群样本为对照。**结果** 共检查先证者4代28人。先证者、其胞姐及姨外祖母均为FH黄色瘤患者,3人血浆总胆固醇分别为18.89、15.23、12.89 mmol/L;临床诊断基因型分别为纯合型、杂合型及杂合型。系谱分析该家系遗传方式符合常染色体显性遗传规律。核苷酸序列分析显示3名患者LDL-R基因的10号外显子存在G1448A改变,为W462X终止突变。先证者、其胞姐及姨外祖母的基因型分别是GA、GA、AA;先证者的父亲家系均为GG纯合子。90名来自患者原籍的正常人群和190个随机人群样本该位点测序结果均为GG纯合子。**结论** 3名患者LDL-R基因均存在G1448A突变,为终止突变,来自母系亲属,此位点的突变很可能是该家系发病的分子基础。

[关键词] 高胆固醇血症Ⅱ型;基因型;低密度脂蛋白受体;突变

[中图分类号] R 589.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0445-04

Mutation analysis of low-density lipoprotein receptor gene in 3 patients with familial hypercholesterolemia in two generations

WU Hong^{1△*}, XIE Fang^{2,3△}, LANG Xi-long^{1△}, GUO Zhi-fu¹, ZHU Ni¹, BAI Yuan¹, CHEN Feng¹, PAN Jing-wei¹, ZHENG Xing¹, ZHAO Xian-xian¹, QIN Yong-wen¹, HUANG Wei^{2,3}

1. Department of Cardiovasology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
3. Genetics Division, Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 201203, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mutation of low-density lipoprotein receptor (LDL-R) gene in 3 patients with familial hypercholesterolemia (FH) in two generations, so as to discuss the pathogenesis of FH. **Methods** A 17-year-old patients was selected to undergo physical examination, lipid level test, electrocardiography, cardiac ultrasound and coronary artery angiography. Pedigree analysis was carried out based on family investigation. The promoter and the 18 exons of the LDL-R gene and the flank sequence were amplified by PCR; DNA sequencing was used to detect point mutation. Ninety normal subjects from the native place of the proband and 190 subjects from random population were taken as controls. **Results** Totally 28 members of 4 generations were examined. The proband, her elder sister and grandaunt had FH with xanthoma, and their total cholesterol (TC) levels were 18.89 mmol/L, 15.23 mmol/L, and 12.89 mmol/L, respectively. Pedigree analysis showed that the genetic pattern of this family was consistent to autosomal dominant inheritance trait. DNA sequencing demonstrated that a G1448A substitution caused a nonsense mutation TGG to TAG in exon 10 of LDL-R gene, a Trp→462 stop mutation. The mutation of the proband, her older sister and grandaunt were homozygous, heterozygous and heterozygous, respectively. The same mutation was not detected in the family members from the proband's father and people from control group.

[收稿日期] 2011-08-21 **[接受日期]** 2012-03-22

[作者简介] 吴弘,博士,副教授、副主任医师;谢芳,助教。E-mail: xief@chgc.sh.cn; 郎希龙,副教授、副主任医师。E-mail: langxl666@yahoo.com.cn

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873193, E-mail: doctorwh666@126.com

Conclusion The proband, her elder sister and grandaunt have the same mutation, the Trp→462 stop mutation in exon 10 of LDL-R gene, which might be the key mutation that causes FH in this pedigree.

[Key words] hypercholesterolemia type II; genotype; low-density lipoprotein receptor; mutation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4): 445-448]

家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 是一种以血浆胆固醇尤其是低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平明显增高为主要特点的常染色体显性遗传性疾病, 是脂质代谢疾病中最严重的一种。在欧美国家, FH 杂合子在人群中出现的频率约为 1/500, FH 纯合子的出现频率约为 1/1 000 000^[1]。黄色瘤和早发性角膜环 (corneal arcus) 为本病的常见体征^[2]。由于 FH 与早发冠心病关系密切 (纯合子患者较杂合子严重, 多于 20 岁前死于心肌梗死), 且病死率高, 被认为是世界性健康问题^[3]。FH 的发生与血浆低密度脂蛋白受体 (LDL-R) 基因、载脂蛋白 B100 (apolipoprotein B100, Apo-B100) 及枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 等基因突变有关, 但以 LDL-R 基因突变占主导^[4-5], 且有研究认为 PCSK9 可能在其中起辅助作用^[6]。本研究对临床确诊为 FH 的先证者及其家系成员进行了家系调查, 对 LDL-R 基因的启动子、18 个外显子及侧翼序列进行了测序, 为探讨其分子病理机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 先证者女性, 17 岁, 安徽籍。因“皮肤黄色瘤”来第二军医大学长海医院心血管内科就诊。患者 3 岁时臀部即有一绿豆粒大小疹状黄色瘤。此后, 黄色瘤渐扩展为条纹状及片状, 并发展为结节状黄色瘤, 以臀部最为明显。其胞姐和姨外祖母也出现相似体征。通过走访方式对先证者家系进行了调查。

1.2 我国 FH 临床诊断标准^[7] 成年人总胆固醇 (TC) > 7.8 mmol/L; 16 岁以下儿童 TC > 6.7 mmol/L 或成人低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) > 4.9 mmol/L, 以及患者或亲属有黄色瘤。其中, TC > 16 mmol/L 并有黄色瘤者诊断为纯合子 FH, 未达纯合子标准者诊断为杂合子 FH。

1.3 临床资料和样本收集 所有家系成员均接受血脂测定, 对血脂水平高者、有心血管疾病史以及可疑有心血管疾病临床症状者行心电图检查。记录家系成员的其他临床资料 (年龄、性别、发病年龄、病程、家族史及治疗情况)。收集家系成员空腹 12 h 外周血 10 ml, EDTA 抗凝, 血浆用于血脂测定。同时, 以 90 名来自患者原籍的正常人群和 190 个随机人群样本为对照。所有被调查者均签署知情同意书。

1.4 血脂测定 采用氧化酶法测定血浆 TC、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、LDL-C 水平, 应用免疫沉淀法测定载脂蛋白 A1 (Apo-A1) 和载脂蛋白 B (Apo-B)。

1.5 LDL-R 基因突变分析 应用 FlexiGene DNA 试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 提取经 EDTA 处理的全血样本中的 DNA, 采用国家人类基因组南方研究中心遗传学部实验中心常规方法设计跨越启动子、18 个外显子及侧翼序列的寡核苷

酸引物, 扩增 LDL-R 基因的全部编码区域。PCR 反应按 Touchdown 程序操作, 10 μl 反应液: 0.2 mmol/L dNTP, 2.5 U Hotstar, 0.4 μmol/L 引物, 1×buffer 和 20 ng DNA。PCR 扩增反应条件: 95℃ 预变性 15 min, 进入 40 个反应循环, 94℃ 变性 20 s, 前 12 个循环 63~57℃ 退火, 72℃ 延伸 60 s; 72℃ 延伸 7 min。PCR 扩增的目的片段经回收、纯化、ABI PRISM™ Big-Dye 末端标记进行测序反应, 以 PCR 引物为测序引物, 进行正反向测序。测序反应条件: 96℃ 变性 10 s, 50℃ 退火 5 s, 65℃ 延伸 4 min, 25 个循环。产物经醋酸铵-乙醇沉淀, 应用 ABI 3730 自动测序仪 (Applied Biosystems 公司) 行核苷酸序列测定。用 Sequence-Navigator 软件分析序列中突变的位置和类型, 检索 FH 突变数据库确定突变是否被收录报道。

2 结果

2.1 家系调查 先证者一代、父母、祖父母及曾祖父母 4 代共 29 人, 因先证者父母一代中有 1 人外出, 只进行了电话调查, 未采集血样本, 最终检查 28 人。家系中各代配偶未查。父亲的兄弟姐妹及祖辈中无罹患本病者, 血脂水平正常或轻度升高。先证者外祖母年幼时皮肤即出现黄色瘤, 39 岁死于心脏病; 曾外祖母年轻时皮肤亦有黄色瘤, 中年时死于心脏病 (具体不详); 姨外祖母皮肤多处黄色瘤; 父亲 41 岁时患有冠心病、陈旧性下壁心肌梗死, 植入支架 1 枚。

2.2 体格检查及实验室检查 先证者眼内眦部、颈后、腋部、肘部、腕部、手指、腓骨、踝部、脚趾等皮肤松弛处及肌腱附着处见结节状黄色瘤, 以臀部最为严重, 心电图提示陈旧性前壁心肌梗死, 冠状动脉 (冠脉) 造影提示左主干开口处严重狭窄, 前降支、回旋支及右冠脉弥漫性狭窄, 回旋支和右冠脉提供侧支循环给前降支, 分别于左主干开口处及右冠脉远段最狭窄处植入支架。先证者姐姐皮肤黄色瘤分布范围与其相似, 姨外祖母眼内眦部、手指等皮肤松弛处及肌腱附着处见黄色瘤, 但皮肤黄色瘤分布部位不如姐妹二人广泛; 3 人血浆 TC、LDL-C、Apo-B 水平均明显增高, HDL-C 及 Apo-A1 水平降低 (表 1)。

2.3 LDL-R 基因测序 家系中 28 人进行了 LDL-R 基因测序。结果显示, 在 LDL-R 基因的 10 号外显子存在 G1448A 突变, 由色氨酸 (Trp 462) 变成了终止密码子 (stop), 导致终止密码子在第 462 位提前出现 (W462X), 见图 1。3 名患者的基因型分别是: 先证者 GA, 其姐 GA, 其姨外祖母 AA, 先证者父亲家系均为 GG 纯合子, 先证者母亲家系图谱和基因测序结果见图 2。进一步对 90 名来自患者原籍的正常人群和 190 个随机人群样本该位点进行测序, 结果均为 GG 纯合子。

表 1 先证者及家族成员临床特征及血脂水平

家系	年龄(岁)	黄色瘤	早发冠心病	TC		TG		LDL-C		HDL-C		Apo-A1		Apo-B	
				c _B /(mmol·L ⁻¹)	c _B /(mmol·L ⁻¹)	c _B /(mmol·L ⁻¹)	c _B /(mmol·L ⁻¹)	c _B /(mmol·L ⁻¹)	c _B /(mmol·L ⁻¹)	c _B /(mmol·L ⁻¹)	c _B /(mmol·L ⁻¹)				
IV3	17	有	有	18.89	2.12	10.9	0.66	0.81	2.27						
IV2	18	有	无	15.23	1.77	12.7	0.93	0.87	1.96						
IV1	17	无	无	4.13	6.43	1.7	0.63	0.93	0.67						
IV5	14	无	无	4.86	0.66	3.2	1.3	1.26	0.33						
IV7	7	无	无	4.02	1.2	3.6	1.2	0.87	0.66						
III1	42	无	无	5.3	7.04	2.2	0.56	0.87	1.19						
III8	42	无	无	7.1	2.41	4.9	0.65	0.88	1.51						
III2	38	无	无	6.61	1.67	4.6	1.24	1.29	1						
III3	34	无	无	6.32	8.5	3.1	0.63	0.88	1.06						
III4	31	无	无	5.47	1.94	3.8	0.9	1.02	0.93						
III7	31	无	无	5.12	1.5	3.8	1.05	0.96	0.85						
II4	61	有	无	12.89	3.5	7.8	0.6	0.81	1.84						

IV3: 先证者; IV2: 姐姐; IV1: 弟弟; IV5: 表弟; IV7: 表外甥; III1: 母亲; III8: 父亲; III2: 大舅; III3: 小姨; III4: 小舅; III7: 表姐; II4: 姨外祖母. TC: 总胆固醇; TG: 三酰甘油; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; Apo-A1: 载脂蛋白 A1; Apo-B: 载脂蛋白 B

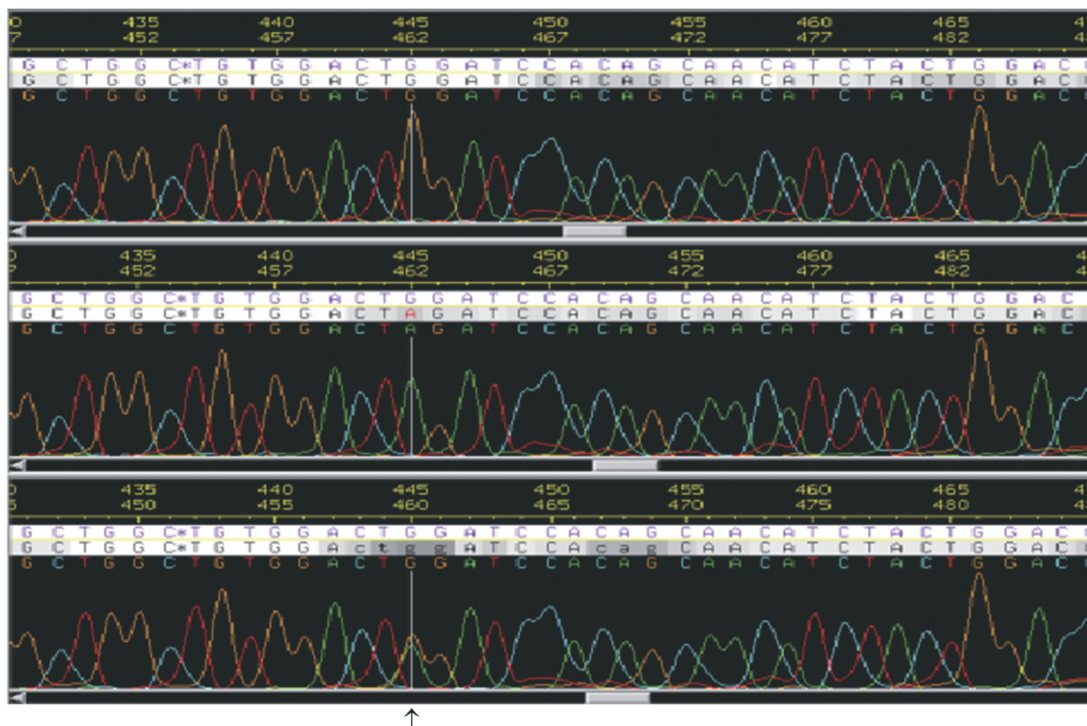


图 1 先证者 LDL-R 基因第 10 外显子 1448 位核苷酸 G→A 杂合突变(箭头所示)

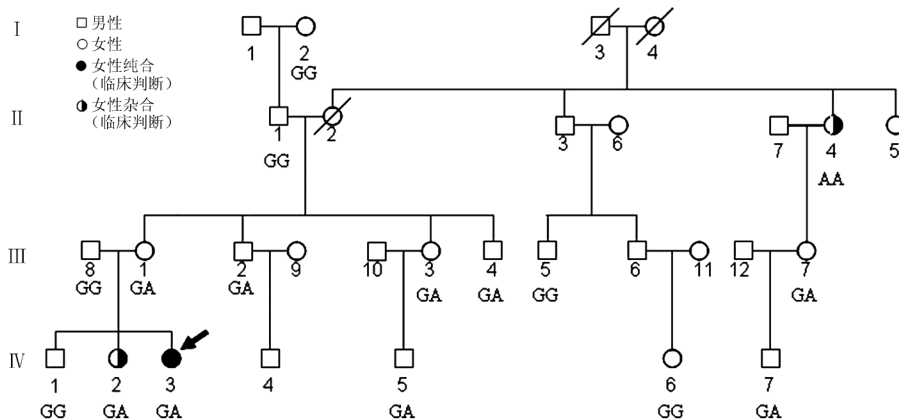


图 2 母亲家系成员家系图及突变位点基因型(箭头所示突变位点)

3 讨论

FH是最常见且最为严重的常染色体单基因显性遗传性疾病之一,也是最早被明确其临床和基因特征的脂代谢紊乱性疾病^[8],FH也有常染色体隐性遗传性疾病的报道^[9],由衔接子蛋白(adaptor protein)基因突变所致病。FH的主要病理基础是LDL-R基因突变^[10],引起细胞膜表面的LDL-R缺如或结构功能异常,导致肝脏对血循环LDL清除障碍而在组织内过度淤积。在正常情况下,LDL与细胞膜表面的LDL-R在体内结合后,被摄入细胞内,由溶酶体降解,随同进入细胞内的胆固醇则抑制微粒体的3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A还原酶。此酶与胆固醇合成有关,LDL-R缺陷则上述生理过程异常而发生本症。

根据血脂水平初步推断,本研究所采集的FH家系具备遗传特征,该家系3代成员均出现高TC血症患者,符合常染色体显性遗传病的遗传特征。先证者血脂水平高达18.89 mmol/L,临床表现符合纯合子诊断标准,皮肤黄色瘤、动脉粥样硬化症的严重程度与国外纯合子症状报道^[11]相同;根据临床表现和血胆固醇水平,先证者胞姐和姨外祖母被判断为杂合子。测序分析提示3名患者在LDL-R基因的10号外显子均存在突变,即Trp 462(stop),该突变导致终止密码子在第462位提前出现。体外实验证实,W462突变导致其编码蛋白缺少胞内结合域,无法使其正确表达于细胞膜上,显著降低了LDL-R对LDL的结合和内吞能力^[12]。3名患者的基因型分别是:先证者GA,胞姐GA,姨外祖母AA,与临床评判并不一致。先证者的父亲家系均为GG纯合子,进一步对来自90名患者原籍的安徽籍正常人群和190个随机人群样本该位点进行测序,结果也都是GG纯合子。目前终止突变常被认为是致病性突变,因而Trp462(stop)很可能是该家系患病的分子基础。我国江苏省南京市和浙江、广东等省均有该突变位点的相关报道^[13],提示该突变可能是汉族FH发病的主要分子基础。值得一提的是,该家系中姨外祖母的基因型为AA,皮肤黄色瘤和血脂水平却比长期居住在城市的基因型为杂合子的先证者姐妹轻得多,可能是由于其姨外祖母长期居住在农村,饮食相对清淡,而两姐妹生活在城市,高脂饮食摄入较多,运动较少,这些不良的生活方式在很大程度上影响了血脂水平,提示这种LDL-R基因测序基因型与临床诊断的不一致,可能与患者生活的环境因素有着密切关系。

总之,本研究通过对FH家系调查和基因检测筛查可积累和丰富FH的遗传特征,阐明FH的发病机制,有助于对FH患者的疾病管理和追踪。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Hobbs H H, Brown M S, Goldstein J L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia [J]. *Hum Mutat*, 1992, 1: 445-466.
- [2] Sibley C, Stone N J. Familial hypercholesterolemia: a challenge of diagnosis and therapy [J]. *Cleve Clin J Med*, 2006, 73: 57-64.
- [3] Civeira F, Jarauta E, Cenarro A, Garcia-Otin A L, Tejedor D, Zambón D, et al. Frequency of low-density lipoprotein receptor gene mutations in patients with a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia in a clinical setting [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52: 1546-1553.
- [4] Rader D J, Cohen J, Hobbs H H. Monogenic hypercholesterolemia; new insights in pathogenesis and treatment [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111: 1795-1803.
- [5] Marduel M, Carrié A, Sassolas A, Devillers M, Carreau V, Di Filippo M, et al. Molecular spectrum of autosomal dominant hypercholesterolemia in France [J]. *Hum Mutat*, 2010, 31: E1811-E1824.
- [6] Abifadel M, Rabès J P, Jambart S, Halaby G, Gannagé-Yared M H, Sarkis A, et al. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in Lebanon: spectrum of LDLR mutations and role of PCSK9 as a modifier gene [J]. *Hum Mutat*, 2009, 30: E682-E691.
- [7] 陆宗良. 脂代谢异常与冠心病 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1998: 18-26.
- [8] Campagna F, Martino F, Bifulco M, Montali A, Martino E, Morrone F, et al. Detection of familial hypercholesterolemia in a cohort of children with hypercholesterolemia: results of a family and DNA-based screening [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196: 356-364.
- [9] Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, et al. Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 2541-2547.
- [10] Goldstein J L, Brown M S. The LDL receptor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 431-438.
- [11] Baumer J H, Shield J P. Hypercholesterolemia in children guidelines review [J]. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 2009, 94: 84-86.
- [12] 刘舒, 王绿娅, 蔺洁, 勇强, 杨娅, 吴邦骏, 等. 家族性高胆固醇血症患儿低密度脂蛋白受体基因W462X突变检测的临床意义 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24: 18-23.
- [13] 代艳芳, 孙立元, 张新波, 王绿娅. 中国人群家族性高胆固醇血症LDLR基因突变研究进展 [J]. *遗传*, 2011, 33: 1-8.

[本文编辑] 周燕娟, 邓晓群