

# 脂蛋白脂酶基因多态性与儿童单纯性肥胖的关系

郭锡熔 陈荣华 莫宝庆 刘倩琦

**目的** 探讨脂蛋白脂酶(LPL)基因中常见多态位点HindIII基因多态性与儿童单纯肥胖之间的关系。

**方法** 用聚合酶链反应(PCR)和限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)技术,检测92例单纯肥胖儿童和80例正常儿童的HindIII-LPL基因多态性,测定血脂、脂蛋白含量及体块指数(BMI)、血压、皮褶厚度等。

**结果** 肥胖组 $H^+H^+$ -LPL基因型频率及 $H^+$ 等位基因频率分别为59.78%和79.35%,明显高于正常对照组。肥胖组 $H^+H^+$ -LPL基因型亚组的TG、TC、LDL-C、ApoB含量以及BMI、舒张压、肱二头肌皮褶厚度、肩胛下皮褶厚度等,均明显高于 $H^+H^-$ -LPL基因型亚组。

**结论**  $H^+H^+$ 与儿童单纯肥胖相关,等位基因 $H^+$ 可能是儿童单纯肥胖的一种遗传易感标志。

**关键词** 脂蛋白脂酶 基因多态性 肥胖 儿童

**The relationship between lipoprotein lipase gene polymorphism and children simple obesity**

GUO Xi-Rong, CHEN Rong-Hua, MO Bao-Qing, et al

Department of Pediatrics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029

**Objective** To study the relationship between Hind III DNA polymorphism in the lipoprotein lipase(LPL) gene and children simple obesity.

**Methods** The polymerase chain reaction(PCR) and restriction fragment length polymorphism(RFLP) technique was used to detect the LPL Hind III polymorphism in 92 children with simple obesity and 80 healthy controls. The levels of the plasma lipid, plasma lipoproteins, body mass index(BMI), blood pressure, skinfolds thickness were also measured.

**Results** The prevalence of genotype  $H^+H^+$  and the frequency of allele  $H^+$  were 59.78% and 79.35%, respectively, in the obesity group, which were significantly higher than those (42.50% and 69.38%, respectively) in the control group ( $P < 0.05$ ). The levels of TG, TC, LDL-C, Apo B, BMI, diastolic pressure, biceps and subscapular skinfolds thickness were also significantly higher in the obesity group with  $H^+H^+$  genotype than those in the obesity group with  $H^+H^-$  genotype.

**Conclusion** Genotype of  $H^+H^+$  may contribute to the development of children simple obesity and allele  $H^+$  seems to be a genetic susceptible marker in children simple obesity.

**Key words** lipoprotein lipase; polymorphism; obesity; children

既往认为,儿童单纯肥胖主要由饮食、运动等环境因素影响所致,然而目前研究表明遗传易感性在儿童单纯肥胖的

发生中具有重要作用<sup>[1]</sup>。脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)基因是肥胖发生的一个重要候选基因<sup>[2]</sup>,因含多个多态位点,且基因结构的异常与肥胖的形成及严重程度密切相关<sup>[3]</sup>,因此近年来国外在该方面的研究引人注目。由于国内外有关儿童的报道尚未见到,为此我们采用聚合酶链反应(PCR)和限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)技术,检测LPL基因中常见多态位点Hind III的RFLP,观察它在单纯肥胖儿童和正常健康儿童中的不同分布,并探讨Hind III-LPL基因型与儿童单纯肥胖间的关系。

## 材料和方法

**一、对象** 凡与同年龄、同性别健康儿童相比,体重超过WHO身高标准体重20%以上,临床排除内分泌系统及中枢神经系统等疾病因素为单纯肥胖。92例中男68例,女24例,平均年龄 $9.05 \pm 1.47(6 \sim 12)$ a。体重超过标准20%~30%为轻度肥胖,~50%为中度肥胖,50%以上为重度肥胖。轻度肥胖23例,中度47例,重度22例。同时随机选取健康儿童80例作正常对照组,平均年龄 $9.55 \pm 1.61(6 \sim 12)$ a,男54例,女26例。研究对象均为汉族,且无亲缘关系。

## 二、方法

**1. Hind III位点LPL基因型检测** (1)外周血基因组DNA抽提:均禁食12h后次晨采取前臂静脉抗凝血5ml,用细胞裂解液、蛋白酶K消化及常规苯酚/氯仿法抽提基因组DNA,置4℃保存备用; (2)扩增引物:按Gotoda等<sup>[4]</sup>报道设计,由中科院上海细胞生物研究所合成,引物1序列:5'-GAA GCTCAAA TGGAA GA GT-3';引物2序列:5'-TACAA GCAAA TGACTAA-3'; (3)DNA扩增:50μl反应体系中,模板DNA 5μl(约1~2μg),双蒸水17μl,10×buffer 5μl, Taq DNA 酶5μl(1U),引物1与引物2各5μl(0.625μmol/L),dNTP 4μl(200μmol/L),MgCl<sub>2</sub> 4μl(2mmol/L)。96℃预变性10min后,用PE公司的DNA扩增仪扩增,按94℃变性60s,50℃退火60s,72℃延伸90s的条件循环30次; (4)Hind III酶切PCR产物:取PCR产物17μl,加入Hind III内切酶1μl(10U/μl)、10×缓冲液2μl,混匀后置37℃酶解3h以上; (5)电泳:以PCR Markers(华美公司)作为DNA片断的标准对照物,于40mA恒电流下在3%琼脂糖凝胶(含0.5mg/L溴化乙锭)中上样PCR酶解产物,水平电泳装置中电泳3h后紫外透射灯下观察结果; (6)结果判定:纯合子 $H^+H^+$ -LPL基因型出现600bp、115bp二条带,杂合子 $H^+H^-$ -LPL基因型出现715bp、600bp、115bp三条带,纯合子 $H^-H^-$ 基因型仅出现715bp一条带(图1)。

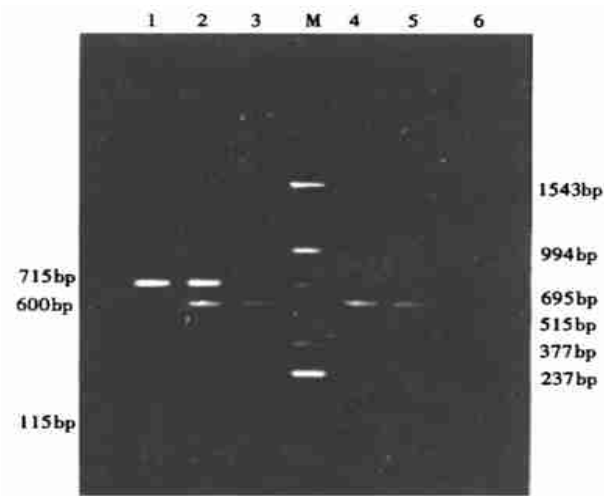


图 1 Hind III位点 LPL 基因型

1 与 6: H<sup>+</sup> H<sup>+</sup>; 2 与 5: H<sup>+</sup> H<sup>-</sup>; 3 与 4: H<sup>-</sup> H<sup>+</sup> M:Markers  
2 血脂测定 血总胆固醇(TC)及甘油三酯(TG)采用酶法; 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)采用一步法, 以上均为日本第一化学株式会社公司试剂; ApoA I ApoB 及脂蛋白 a

[Lp(a)]采用免疫透射比浊法(英国 RONDOLX 公司试剂), 均用日立 7170 全自动生化分析仪测定。LDL-C 用 Friedwald 公式计算: LDL-C = TC - (HDL-C + TG/2)。

3 体格检查 均测定身高、体重及腹壁、肩胛下、肱二头肌等处的皮褶厚度, 并根据公式计算体块指数(BMI) = 体重(kg)/身高(m<sup>2</sup>)。

三、统计方法 基因型和等位基因频率分布在两组间的差异用  $\chi^2$  检验; 血脂与体格指标在两基因型亚组间的差异经方差齐性检验用  $t$  或  $t'$  检验, H<sup>+</sup> H<sup>-</sup> 基因型亚组因例数较少不在本文统计之列; 血 Lp(a) 呈偏态分布, 经对数转换后统计。全部统计分析均采用 Access 数据库与 Excel 软件。

结 果

一、肥胖组与对照组 Hind III-LPL 基因型频率及等位基因频率的比较 见表 1。

二、肥胖组内 H<sup>+</sup> H<sup>+</sup> 与 H<sup>+</sup> H<sup>-</sup> -LPL 基因型亚组的血脂含量比较 见表 2。

三、肥胖组内 H<sup>+</sup> H<sup>+</sup> 与 H<sup>+</sup> H<sup>-</sup> -LPL 基因型亚组的体格指标比较 见表 3。

表 1 两组 LPL-Hind III 基因型频率与等位基因频率比较

| 组 别      | n  | Hind III 基因型频率                |                               |                               | Hind III 等位基因频率 |                |
|----------|----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|----------------|
|          |    | H <sup>+</sup> H <sup>+</sup> | H <sup>+</sup> H <sup>-</sup> | H <sup>-</sup> H <sup>-</sup> | H <sup>+</sup>  | H <sup>-</sup> |
| 肥胖组      | 92 | 55(59.78%)                    | 36(39.13%)                    | 1(1.09%)                      | 146(79.35%)     | 38(20.65%)     |
| 正常组      | 80 | 34(42.50%)                    | 43(53.75%)                    | 3(3.75%)                      | 111(69.38%)     | 49(30.62%)     |
| $\chi^2$ |    | 5.1187*                       |                               |                               | 4.5049          |                |
| P        |    | < 0.05                        |                               |                               | < 0.05          |                |

\* 因理论值 < 5 的格子数超过总格子数的 1/5, 故将 H<sup>+</sup> H<sup>-</sup> 与 H<sup>-</sup> H<sup>-</sup> 基因型频率合并

表 2 肥胖组 LPL-Hind III 基因型亚组血脂比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 基因型                           | n  | TG (mmol/L)   | TC (mmol/L)   | HDL-C (mmol/L) | LDL-C (mmol/L) | Apo A1 (g/L) | ApoB (g/L)    | Lp(a) (mg/L)    |
|-------------------------------|----|---------------|---------------|----------------|----------------|--------------|---------------|-----------------|
| H <sup>+</sup> H <sup>+</sup> | 55 | 0.80 ± 0.44   | 3.66 ± 0.80   | 1.30 ± 0.29    | 1.98 ± 0.74    | 0.87 ± 0.10  | 0.75 ± 0.28   | 113.18 ± 117.21 |
| H <sup>+</sup> H <sup>-</sup> | 36 | 0.42 ± 0.18** | 3.14 ± 0.45** | 1.39 ± 0.21    | 1.57 ± 0.38*   | 0.89 ± 0.06  | 0.57 ± 0.22*▲ | 94.12 ± 104.16▲ |
| H <sup>-</sup> H <sup>-</sup> | 1  | 0.39          | 2.58          | 1.33           | 1.10           | 0.84         | 0.30          | 55.2            |

H<sup>+</sup> H<sup>+</sup> 组与 H<sup>+</sup> H<sup>-</sup> 组比较: \*P < 0.002 \*\*P < 0.001 ▲t 检验, 余为 t 检验

表 3 肥胖组 LPL-Hind III 基因型亚组体格指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 基因型                           | n  | BMI            | 收缩压 (kPa)    | 舒张压 (kPa)       | 肱二头肌皮褶厚度 (mm) | 腹壁皮褶厚度 (mm) | 肩胛下皮褶厚度 (mm)   |
|-------------------------------|----|----------------|--------------|-----------------|---------------|-------------|----------------|
| H <sup>+</sup> H <sup>+</sup> | 55 | 22.76 ± 2.53   | 13.63 ± 1.43 | 8.89 ± 1.04     | 1.31 ± 0.38   | 1.89 ± 0.65 | 1.88 ± 0.47    |
| H <sup>+</sup> H <sup>-</sup> | 36 | 21.31 ± 2.54** | 13.11 ± 1.21 | 8.29 ± 0.76***▲ | 1.14 ± 0.38*  | 1.64 ± 0.56 | 1.54 ± 0.58*** |
| H <sup>-</sup> H <sup>-</sup> | 1  | 21.74          | 13.50        | 10              | 1.00          | 1.72        | 1.64           |

H<sup>+</sup> H<sup>+</sup> 组与 H<sup>+</sup> H<sup>-</sup> 组比较: \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 \*\*\*P < 0.005 ▲t 检验, 余为 t 检验

讨 论

LPL 是体内极低密度脂蛋白(VLDL)与乳糜微粒(CM)中甘油三酯代谢的一种重要限速酶, 其基因定位于人染色体 8p22, 包含 10 个外显子和 9 个内含子, 所编码产物是一种由 447 个氨基酸残基组成的 60kD 糖蛋白<sup>[5]</sup>。LPL 基因存在多个片段长度多态性位点, 其中以位于内含子 8 处的 Hind III 位点基因多态性最为常见, 近年来认为与成人内脏型肥胖、血脂异常以及冠心病之间存在一定关系, 与正常人群相比等

位基因 H<sup>+</sup> 在这些疾病人群中的频率分布呈明显增高的趋势<sup>[3,6]</sup>。目前国内有关 Hind III-LPL 基因多态性与肥胖关系的研究较少, 国外也缺乏有关儿童单纯肥胖的报道, 因此认为有必要开展这方面的研究。

本组通过 PCR-RFLP 技术, 对 80 例正常儿和 92 例肥胖儿进行了 Hind III-LPL 基因型检测, 结果发现 H<sup>+</sup> 等位基因在正常儿中的频率为 69.38%, 稍低于正常日本人 73% 的频率<sup>[4]</sup>, 但高于正常白人 57.9%<sup>[7]</sup> 的等位基因频率, 提示该等位基因频率在不同种族间也存在一定差异。肥胖组 H<sup>+</sup> 等

位基因频率为 79.35%, 较正常儿童明显增高, 其差异具统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 同时肥胖儿童的  $H^+H^+$ -LPL 基因型频率也明显高于正常对照 ( $P < 0.05$ ), 与国外成人肥胖的报道<sup>[3]</sup>较为一致, 提示  $H^+H^+$  与儿童单纯肥胖的发生相关, LPL 的等位基因  $H^+$  可能是肥胖的一种遗传易感标志。

由于 LPL 在催化水解 CM 及 VLDL 中 TG 时, 还伴随着胆固醇、磷脂和载脂蛋白在脂蛋白间的转运和交换, 因此我们对肥胖组  $Hind III$ -LPL 基因型与血脂之间的关系也进行了研究。结果  $H^+H^+$ -LPL 基因型肥胖儿童较  $H^+H^-$ -LPL 基因型血浆 TG、TC、ApoB 及 LDL-C 水平更高, 与 Vohl 等<sup>[3]</sup>报道结果一致。已知该多态位点由一个碱基替换 (T → G) 所致, 似不足以改变 LPL 的氨基酸顺序与酶的活性<sup>[8]</sup>, 其原因可能是  $H^-$  等位基因与外显子 4 处编码 LPL 脂质结合界面的基因片段存在连锁不平衡, 使  $H^-$  等位基因所编码的 LPL 与脂蛋白亲和力和明显高于  $H^+$  等位基因所编码的 LPL, 从而 CM 及 VLDL 中 TG 能够更彻底地解离有关<sup>[8]</sup>。另有研究认为<sup>[9]</sup>,  $Hind III$ -LPL 各基因型间禁食后的血浆胰岛素存在明显差异, 血脂在不同基因型之间的差别可能源自个体受胰岛素调节的差异。

然而, 与一些研究报道<sup>[3]</sup>有异, 本组并未观察到  $Hind III$ -LPL 基因型与 HDL-C 血浆的相关联系, 支持 Wang 等人<sup>[6]</sup>的观察结果。造成这种分歧的部分原因可能是: 1. 本文对象为儿童, 基因多态性等遗传易感性因素的作用在现有环境因素影响下尚未充分发挥; 2. 各研究之间样本大小存在差异; 3. 研究所针对的疾病不同所致。

研究中我们发现肥胖组内  $H^+H^+$  亚组的 BMI 舒张压及肱二头肌与肩胛下皮褶厚度也明显高于  $H^+H^-$  亚组。其中不同  $Hind III$ -LPL 基因型与 BMI 之间的关系符合 Jemaa 等<sup>[10]</sup>的报道, 而不同基因型对舒张压、肱二头肌与肩胛下皮褶厚度的影响目前则尚无资料引证。由于这些因素均利于肥胖症状的加重和并发症的出现, 因此本文认为重视 LPL- $H^+H^+$  基因型与肥胖关系的深入研究将有重要意义。

#### 参考文献

1 Sørensen T A. The genetics of obesity. *Metabolism*, 1995; 44(9

suppl 3): 4

- 2 Kern PA. Potential role of TNF  $\alpha$  and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr*, 1997; 127(9): 1917S
- 3 Vohl MC, Lamarche B, Moorjani S, et al. The lipoprotein lipase  $Hind III$  polymorphism modulates plasma triglyceride levels in visceral obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995; 15(5): 714
- 4 Gotoda T, Yamada N, Murase T, et al. Detection of three separate DNA polymorphisms in the human lipoprotein lipase gene by gene amplification and restriction endonuclease digestion. *J Lipid Res*, 1992; 33(7): 1067
- 5 Santamarina-Fojo S, Dugi KA. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 1994; 5(2): 117
- 6 Wang XL, McCredie RM, Wilcken DEL. Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene. Association with severity of coronary artery disease and diabetes. *Circulation*, 1996; 93(7): 1339
- 7 Thorn JA, Chamberlain JC, Alcolado JC, et al. Lipoprotein and hepatic lipase gene variants in coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1990; 85(1): 55
- 8 Peacock RE, Hamsten A, Nilsson-Ehle P, et al. Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlations of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Sweden. *Atherosclerosis*, 1992; 97(2-3): 171
- 9 Ahn YI, Ferrell RE, Hamman RF, et al. Association of lipoprotein lipase gene variation with the physiological components of the insulin-resistance syndrome in the population of the San Luis Valley, Colorado. *Diabetes Care*, 1993; 16(11): 1502
- 10 Jemaa R, Tuzet S, Portos C, et al. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with hypertriglyceridemia and body mass index in obese people. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1995; 19(4): 270

(收稿: 1999-06-05, 修回: 1999-10-13)