

· 基础研究 ·

载脂蛋白 A1、B 基因多态性对非创伤性股骨头坏死发生的影响

汪晓燕^{1,2}, 牛晓红^{1,2}, 陈卫衡³, 林娜⁴, 宋剑南¹, 陈冰¹, 金红¹

(1. 中国中医科学院基础理论研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院医学实验中心; 3. 中国中医科学院骨伤科研究所; 4. 中国中医科学院中药研究所)

【摘要】 目的: 探讨载脂蛋白 A1、B 基因多态性对非创伤性股骨头坏死 (avascular necrosis of the femoral head, ANFH) 发生的影响。**方法:** 应用聚合酶链反应对中国北方汉族 143 例 ANFH 患者和 92 例正常人分别扩增含 Apo A1 基因启动子-75 bp 和第一内含子+83 bp 及 Apo B 基因 Eco RI、Xba I 和 3'-VNTR 的 DNA 片段, 限制性内切酶酶切扩增产物, 琼脂糖凝胶电泳分离基因多态性。**结果:** Apo A1 基因启动子-75 bp 处, ANFH 患者中 A/A 基因型频率明显高于正常组 ($P < 0.01$), 而 G/A 基因型频率明显低于正常组 ($P < 0.01$)。Apo A1 内含子+83 bp 位点, Apo B 基因 Eco RI、Xba I 位点和 3'-VNTR 区域 ANFH 患者组和正常组基因型及等位基因频率分布无统计学差异。**结论:** Apo A1 基因启动子区域-75bp 位点 A/A 型可能是非创伤性股骨头坏死易感基因之一, 但未能发现 Apo A1 第一内含子+83 bp 位点及 Apo B 基因 Eco RI、Xba I 和 3'-VNTR 位点多态性与非创伤性股骨头坏死发生有明显的关系。

【关键词】 股骨头坏死; 载脂蛋白 A1; 载脂蛋白 B 类; 基因多态性; 限制性片段长度

Effects of apolipoprotein A1 and B gene polymorphism on avascular necrosis of the femoral head in Chinese population WANG Xiao-yan*, NIU Xiao-hong, CHEN Wei-heng, LIN Na, SONG Jian-nan, CHEN Bing, JIN Hong. *The Institute of Basic Theory of China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Apo A1 and B gene polymorphism on avascular necrosis of the femoral head (ANFH) in north Chinese Han population. **Methods:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) technique was used in samples of 143 cases with documented ANFH and 92 healthy control matched by age and sex individuals selected from north Chinese Han nationality. The studied loci include promoter region (-75bp) and the intron 1 (+83 bp) of Apo A1 gene, Eco RI, Xba I of Apo B gene; polymerase chain reaction was used to study 3'-VNTR of Apo B gene. **Results:** At -75 bp in promoter, the frequency of A/A genotype in ANFH group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$), while the frequency of G/A genotype in ANFH group was significantly lower than that in control group ($P < 0.01$). No difference was found in the frequency of genotype at +83bp in intron 1 of Apo A1 gene, Eco RI, Xba I and 3'-VNTR loci of Apo B gene. **Conclusion:** Apolipoprotein A1 gene A/A substitution at position -75 in promoter is associated with ANFH, the mutation may be one of the sensitive genes of ANFH, first reported inside and abroad. But no evident relationship was found between gene polymorphism of +75 bp loci of Apo A1 gene, Eco RI loci of Apo B gene, Xba I loci of Apo B gene or 3'-VNTR of Apo B gene and ANFH.

Key words Femur head necrosis; Apolipoprotein A1; Apolipoproteins B; Gene polymorphism; Restriction fragment length polymorphisms

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(2): 99-102 www.zggszz.com

研究发现, 脂代谢紊乱与非创伤性股骨头坏死 (avascular necrosis of the femoral head, ANFH) 的发生发展关系密切^[1-2], 但其确切的机制并不清楚。为了探讨非创伤性股骨头坏死的发生与遗传的关系, 我们选择了与脂类及脂蛋白代谢关系最密切且作用相反的两种脂蛋白的主要载脂蛋白 A1 和 B, 测

定其重要位点的基因多态性, 分析其与非创伤性股骨头坏死发生的关系, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 对象及分组 选取 2003 年 10 月至 2005 年 9 月在中国中医科学院骨伤科研究所和望京医院就诊、住院治疗的 中国北方汉族 ANFH 患者作为 ANFH 组。这些病例均符合 Mont 等^[3]1995 年提出的股骨头坏死诊断标准, 且均经临床诊断和双髋关节 X 线片、CT 或 MRI 检查确诊。诊断标准(符合

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30271565)

通讯作者: 宋剑南 Tel: 010-64076065 E-mail: sjn2003@sina.com

下述标准之一方可诊断为股骨头坏死):①股骨头塌陷而无关节间隙变窄;②软骨下骨折,出现透 X 线带(新月征);③股骨头前外侧出现楔形坏死骨;④同位素扫描显示热区中有冷区;⑤MRI 的 T2 加权像示双线征;⑥骨活检显示骨细胞空隙超过 50%且累及邻近多根骨小梁。对照组来源于同一医院的健康就诊者。ANFH 组 143 例,男 98 例,女 45 例,平均年龄(41.6±10.3)岁;正常组 92 例,男 48 例,女 44 例,平均年龄(40.7±14.7)岁。经方差分析两组年龄、性别等条件具可比性。

1.2 材料

1.2.1 主要试剂 全血 DNA 纯化试剂盒(Wizard Gernomic DNA Purification kit)、dNTPs、DNA 分子量 Marker(DNA 100 bp Marker)、限制性内切酶 Msp I、Eco RI 和 Xba I 以及载脂蛋白 B 的 XbaI 的 Taq DNA 聚合酶均购自美国 Promega 公司;载脂蛋白 A1 的 Taq DNA 聚合酶购自北京鼎国生物工程公司;载脂蛋白 B 的 Eco RI 和 3'-VNTR 的 Taq DNA 聚合酶购自北京华美生物工程公司。

1.2.2 血样采集 患者和正常组均空腹 12 h 后,抽取 2 ml 静脉血样,EDTA 抗凝,低温保存。

1.2.3 引物 Apo A1 引物参照文献[4]设计,序列为:5'端:AGG GAC AGA GCT GAT CCT TGA ACT CTT AAG;3'端:TTA GGG GAC ACC TAG CCC TCA GGA AGA GCA。Apo B 基因 Eco RI、Xba I 和 3'-VNTR 位点的扩增引物分别按照文献[5-7]设计,序列为:Eco RI:5'端:CTG AGA GAA GTG TCT TCGAAG;3'端:CTC GAA AGG AAG TGT AAT CAC;Xba I:5'端:GGA GAC TAT TCA GAA GCT AA;3'端:GAA GAG CCT GAA GAC TGA CT;3'-VNTR:5'端:ATG GAA ACG GAG AAA TTA TG;3'端:CCT TCT CAC TTG GCA AAT AC。所有引物均由北京华美生物工程公司合成。

1.3 方法

1.3.1 Apo A1、B 基因目的片段的 PCR 扩增 采用全血 DNA 纯化试剂盒提取全血 DNA。分别参考文献[8-11],修改完善条件后进行 Apo A1 和 Apo B 基因 Eco RI、Xba I 和 3'-VNTR 的目的片段扩增。反应体系见表 1。

1.3.2 Apo A1、B 基因型测定 扩增产物按下列条件分别进行酶切:分别取 12 μl Apo A1 扩增产物、10 μl Eco RI 扩增产物和 10 μl Xba I 扩增产物,各加特定内切酶 12 U,加去离子水等使总体积达 20 μl,37 °C 温育 4 h 酶切分解。于 Apo B 基因 3'-VNTR 扩增产物中加入 6×载样缓冲液 1.2 μl,混匀。以 DNA 100 bp ladder 作为分子量参照,上述酶切及扩增产物于 2%琼脂糖凝胶上进行电泳分离(70 V,4 h),0.5 mg/L 溴化乙锭(EB)染色 1 h,然后在凝胶成像系统的紫外光灯下检测结果并照像,根据酶切条带结果进行基因分型。以 DNA 100 bp ladder 的泳动距离为标准,测量 Apo B 基因 3'-VNTR 扩增产物 DNA 带泳动距离,在半对数坐标纸上作出标准曲线按以下公式计算串联重复序列拷贝数:串联重复序列拷贝数=(片段长度-151 bp)/15 bp。

1.4 统计学分析 资料分析采用 SAS 软件包。等位基因频率计算公式:等位基因频率=(纯合子×2+杂合子)/2/被检人数。ANFH 组和正常组间基因型及等位基因频率的差别用χ²检验。

表 1 Apo A1 及 Apo B 基因的 PCR 反应体系和循环条件

Tab.1 The Systems and conditions of PCR cycle of ApoA1 and Apo B gene

基因位点	反应体系	PCR
Apo A1	10×buffer(includingMg ⁺⁺) 5 μl, 10 mM 的 dNTPs 各 1 μl, 25 pmol/μl 的引物各 1 μl, 2 U/μl 的 DNA Taq 酶 2 μl, 50~100 ng/μl 的 DNA 模板 4 μl,总体积 50 μl	96 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 3 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环,4 °C 恒 温保存
Apo B- Eco RI	10×buffer 5 μl, 25 mM 的 Mg ⁺⁺ 3 μl, 10 mM 的 dNTPs 各 1 μl, 15 pmol/μl 的引物各 2 μl, 1 U/μl 的 DNA Taq 酶 2 μl, 50~100 ng/μl 的 DNA 模板 4 μl, 总体积 50 μl	94 °C 预变性 7 min, 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 3 min, 30 个循环后,72 °C 延伸 5 min,4 °C 恒 温保存
Apo B-Xba I	10×buffer 5 μl, 25 mM 的 Mg ⁺⁺ 4 μl, 10 mM 的 dNTPs 各 1 μl, 10 pmol/μl 的引物各 2.5 μl, 1 U/μl 的 DNA Taq 酶 2 μl, 50~100 ng/μl 的 DNA 模板 5 μl, 总体积 50 μl	94 °C 变性 7 min, 92 °C 退火 3 min, 58 °C 延伸 5 min, 30 个循环后,58 °C 再 延伸 10 min,4 °C 恒温保存
Apo B- 3'-VNTR	10×buffer 5 μl, 25 mM 的 Mg ⁺⁺ 3 μl, 10 mM 的 dNTPs 各 1 μl, 15 pmol/μl 的引物各 2 μl, 3 U/μl 的 DNA Taq 酶 0.5 μl, 50~100 ng/μl 的 DNA 模板 4 μl, 总体积 50 μl	94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 0.5 min,58 °C 退火 3 min,循环 30 次 后,58 °C 延伸 10 s, 4 °C 恒温保存

2 结果

2.1 酶切电泳图谱 见图 1-4。

图 1 为 Apo A1 基因扩增产物的酶切电泳结果。酶切后可获得 6 种基因型:在-75 bp 处有 A/A 型(179 bp)、G/G 型(113 bp,66 bp)和 G/A 型(113 bp,179 bp,66 bp);+83 bp 处有 C/C 型(209 bp,45 bp)、C/T 型(209 bp,254 bp,45 bp)和 T/T 型(209 bp)。本实验中启动子-75 bp 位点处共检测出 3 种基因型;G/G、G/A、A/A,内含子+83bp 位点处共检测出 2 种基因型;C/C、C/T,未见 T/T 基因型。

图 2 为 Apo B 基因 Eco RI 目的片段的酶切电泳结果。酶切后可产生 3 种基因型:E+E+(253 bp,227 bp)、E+E-(480 bp,253 bp,227 bp)和 E-E-(480 bp)。本实验共检测出 2 种基因型:E+E+、E+E-,未见 E-E-基因型。

图 3 为 Apo B 基因 Xba I 目的片段的酶切电泳结果。酶切后可产生 3 种基因型:X-X-(710 bp)、X+X-(710 bp,433 bp,277 bp)和 X+X+(433 bp,277 bp)。本实验中 Xba I 酶切共检测出 2 种基因型:X-X-、X+X-,未见 X+X+基因型。

图 4 为 Apo B 基因 3'-VNTR 的 PCR 扩增结果电泳图。3'-VNTR 区域主要由不同拷贝数的 14~16 bp 串联的重复序列组成,构成等位基因的高度多态性。习惯上把拷贝数≥38 者

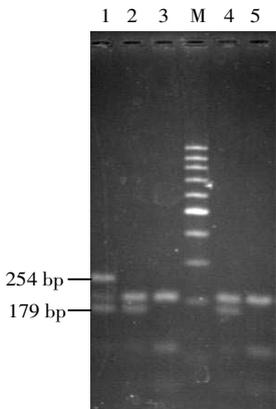


图 1 Apo A1 的 Msp I 酶切电泳结果图

Fig.1 Electrophoresis of Apo A1 after Msp I digestion

M: 100 bp DNA ladder -75 bp; Lane 1, 2, 4: A/A Lane 3, 5: G/G +83 bp; Lane 1: C/T Lane 2, 3, 4, 5: C/C

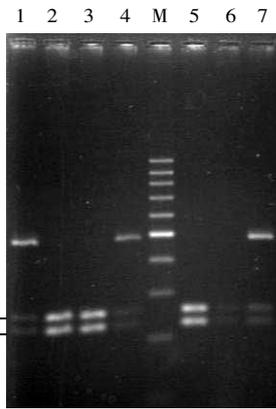


图 2 Apo B 的 Eco RI 酶切分型结果电泳图

Fig.2 Electrophoresis of Apo B after Eco RI digestion

M: 100 bp DNA ladder Lane 2, 3, 5, 6: E+E+ Lane 1, 4, 7: E+E-

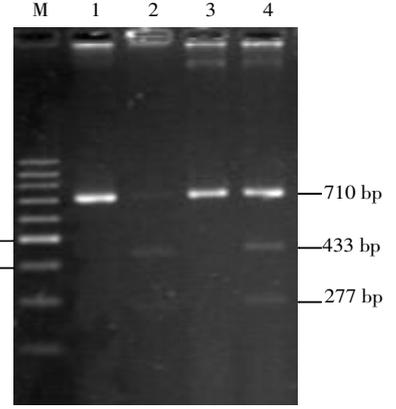


图 3 Apo B 基因 Xba I 位点酶切结果电泳图

Fig.3 Electrophoresis of Apo B after Xba I digestion M: 100 bp DNA ladder Lane 1, 3: X-X- Lane 2, 4: X+X-

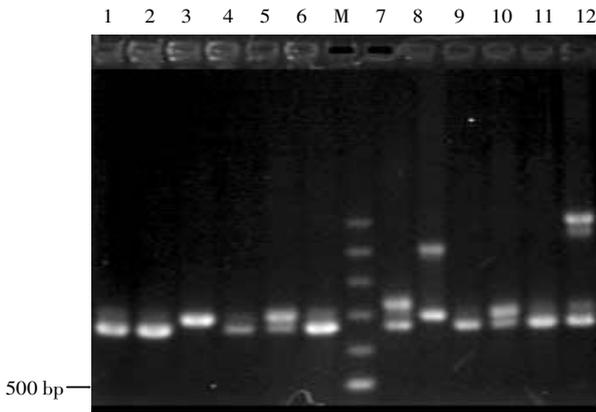


图 4 Apo B 基因 3'-VNTR 目的片段 PCR 扩增结果电泳图

Fig.4 Electrophoresis of PCR of Apo B-3'-VNTR

M: 100 bp DNA ladder Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11: SS Lane 7, 8, 12: SB

称为 3'-VNTR-B, 而拷贝数 < 38 者称为 3'-VNTR-S。

2.2 ANFH 患者基因型及等位基因频率分布

2.2.1 Apo A1 基因-75 bp、+83 bp 处基因型及等位基因频率分布 见表 2。

表 2 显示, Apo A1 启动子-75 bp 位点处, ANFH 患者中 A/A 基因型频率明显高于正常组 (P < 0.01), 而 G/A 基因型频率明显低于正常组 (P < 0.01)。内含子+83 bp 位点处, 两组无明显区别。

2.2.2 Apo B 基因 Eco RI、Xba I 和 3'-VNTR 位点基因型及等位基因频率分布 见表 3。

表 3 可见, 三位点处, ANFH 患者与正常组中 E+E+、X-X- 和 SS 基因型均占绝对优势, 但 3 个位点的基因型和等位基因频率分布无明显区别 (P > 0.05)。

3 讨论

Apo A1 是高密度脂蛋白的主要组成蛋白, 作为 HDL 受

表 2 ANFH 患者 Apo A1 基因启动子-75 bp 位点基因型及等位基因频率分布

Tab.2 The frequencies of genotype and allele gene of Apo A1 gene at position -75 in promoter in two groups

组别	病例数	基因型 [% (样本数)]			等位基因 [% (样本数)]	
		A/A	G/A	G/G	A	G
ANFH 组	143	37.1(53)**	14.1(20)**	49.0(70)	44.1(126)	55.9(160)
正常对照组	92	20.7(19)	30.4(28)	48.9(45)	35.9(66)	64.1(118)

注: 与正常对照组比较, **P < 0.01

Note: As compared with the normal control group, **P < 0.01

表 3 ANFH 患者 Apo B 基因 Eco RI、Xba I 和 3'-VNTR 基因型及等位基因频率分布

Tab.3 The frequencies of genotype and allele gene of Apo B-Eco RI, Xba I, 3'-VNTR in two groups

组别	基因型 [% (样本数)]						等位基因 [% (样本数)]					
	Eco RI		Xba I		3'-VNTR		Eco RI		Xba I		3'-VNTR	
	E+E+	E+E-	X-X-	X-X-	SS	BS	E+	E-	X+	X-	S	B
ANFH 组	0.874 (125)	0.126 (18)	0.881 (126)	0.119 (17)	0.762 (109)	0.231 (33)	0.937 (268)	0.063 (18)	0.059 (17)	0.941 (269)	0.878 (251)	0.122 (33)
正常对照组	0.891 (82)	0.109 (10)	0.946 (87)	0.054 (5)	0.793 (73)	0.196 (18)	0.946 (174)	0.054 (10)	0.027 (5)	0.973 (179)	0.891 (164)	0.109 (18)

体的配基参与胆固醇的逆向转运。Apo A1 位于人类 11 号染色体长臂上约 15 kb 的基因片段内,与 Apo C3、Apo A4 基因呈簇状排列。Apo A1 基因转录起始点上游-75 bp 处有 G/A 多态性位点,第一内含子+83 bp 处有 C/T 多态性位点。Apo A1 基因结构的改变影响着 Apo A1 的分子结构、生成和向血液中释放的速率,进而影响血中 Apo A1 与 HDL 的水平。邹阳春等^[12]发现载脂蛋白 A1 基因-75 bp 位点 G 被 A 取代及+83 bp 位点 C 被 T 取代或 G 被 A 取代后个体血载脂蛋白 A1 及高密度脂蛋白水平升高;程爱娟等^[8]认为 Apo A1 启动子-75 bp 位点可能不直接影响 Apo A1 基因的转录,而和邻近的某个基因存在连锁不平衡,后者才是引起 Apo A1 转录速度变化的直接原因。

本研究发现非创伤性股骨头坏死患者 Apo A1 基因启动子区域-75 bp 位点 A/A 基因型频率明显高于对照组,而 G/A 基因型频率明显低于对照组,且非创伤性股骨头坏死患者 G 等位基因携带频率显著低于对照组。提示 Apo A1 启动子-75 bp 位点的 G/A 突变可能是 ANFH 的易感因素之一。但这种关联性是否与 ANFH 患者体内血脂代谢相关仍有待进一步研究。本研究未发现 Apo A1 基因第一内含子+83 bp 位点基因多态性与非创伤性股骨头坏死的发生有关联。

Apo B 是 LDL 惟一的结构蛋白,其主要是与胆固醇结合组成 LDL 和识别 LDL 受体,在脂类的转运和代谢过程中起着极其重要的作用。Apo B100 基因位于第 2 号染色体短臂(2p23)末端,全长 43 kb,由 29 个外显子和 28 个内含子组成。最大的外显子是 26 号外显子,其次为 29 号外显子^[13-14]。在已知的动脉粥样硬化相关基因中,Apo B 基因具有最明显的多态性,目前研究较多的是 Xba I、Eco RI 及 Msp I 酶切位点多态性和 3' 端可变数目串联重复序列(3'-VNTR)。以往的研究中发现,Eco RI 位点等位基因 E+ 与 TG 水平增高相关^[9,15],Xba I 位点 X+ 等位基因与较低水平的 HDL-C 有关^[16],3'-VNTR-B 等位基因与 TC、LDL-C 水平升高、HDL-C 水平降低相关^[17]。然而本实验未发现 Apo B 基因的这三个突变位点与非创伤性股骨头坏死之间存在明显关系。我们认为由于 ANFH 的发病机制非常复杂,受多种因素的影响,因此在 ANFH 患者中出现的脂代谢紊乱,除了先天因素外,后天因素可能影响更大,有关这方面的问题尚待深入探讨。

参考文献

- 1 Miyanishi K, Yamamoto T, Irida T, et al. Increased level of apolipoprotein B/apolipoprotein A1 ratio as a potential risk for osteonecrosis. *Ann Rheum Dis*, 1999, 58(8): 514-516.
- 2 陈卫衡,林娜,郭效东,等. ANFH 与血浆脂蛋白的相关性研究. 中

- 国骨伤, 2003, 16(2): 69-70.
- 3 Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg(Am)*, 1995, 77(3): 459-474.
- 4 Reguero JR, Cubero GI, Batalla A, et al. Apolipoprotein A1 gene polymorphisms and risk of early coronary disease. *Cardiology*, 1998, 90(3): 231-235.
- 5 谈永飞,杨松,喻荣彬,等. 载脂蛋白 B 基因多态性及血脂成分与胆石病关系的研究. *中华医学杂志*, 2003, 83(1): 844-847.
- 6 王绿娅,顾云,吴桂贤. 载脂蛋白 B 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的关系. *中华医学杂志*, 1999, 79(8): 603-606.
- 7 叶平,陈保生,王士雯. 载脂蛋白 B 基因可变数目串联重复序列多态性及其与冠心病关联的研究. *中国病理生理杂志*, 1996, 12(1): 9.
- 8 程爱娟,毛用敏,崔让,等. 载脂蛋白 A1 基因多态性与冠心病和血脂关系的研究. *天津医药*, 2004, 32(6): 327-329.
- 9 张岸平,姜玉如,武守山,等. 载脂蛋白 B 基因 Xba I 和 Eco RI 酶切位点多态性与冠心病和血脂水平的关联研究. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(5): 435-437.
- 10 臧彬,李海宁,郭津津,等. 载脂蛋白 B 基因多态性与心肌梗死的关系. *中国实用内科杂志*, 2001, 21(12): 723-724.
- 11 陈保生,赵元力,成英. 藏族人群 Apo B 基因 3' 等位基因的多态性及血脂水平的分析. *中华医学杂志*, 1999, 79(7): 505-508.
- 12 邹阳春,胡大一,杨新春,等. 国人载脂蛋白 A1 基因多态性与血脂水平及冠心病的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(4): 345-348.
- 13 Law SW, Lee N, Monge JC, et al. Human Apo B-100 gene resides in the p23-pter region of chromosome 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 131(2): 1003-1012.
- 14 Turner PR, Talmud PJ, Visvikis S, et al. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular diseases: European Atherosclerosis Research Study. *Atherosclerosis*, 1995, 116(2): 221-234.
- 15 Machado MO, Hirata MH, Bertolami MC, et al. Apo B gene haplotype is associated with lipid profile of higher risk for coronary heart disease in Caucasian Brazilian men. *J Clin Lab Anal*, 2001, 15(1): 19-24.
- 16 Renges HH, Wile DB, Mckeigue PM, et al. Apolipoprotein B gene polymorphisms are associated with lipid levels in men of South Asian descent. *Atherosclerosis*, 1991, 91(3): 267-275.
- 17 Friedl W, Ludwig EH, Paulweber B, et al. Hypervariability in a minisatellite 3' of the apolipoprotein B gene in patients with coronary heart disease compared with normal controls. *J Lipid Res*, 1990, 31(4): 659-665.

(收稿日期:2007-10-28 本文编辑:李为农)

·读者·作者·编者·

欢迎作者网上投稿

本刊现已重新开通网上投稿,欢迎作者通过 E-mail:tgzgs@163.com 途径投稿,要求文稿存储为 Word 格式,文章中的图片要以 JPG 格式另行存储发至邮箱,勿插入 Word 文档中。

《中国骨伤》杂志社