

血脂异常

家族性血脂异常 LPL 基因新突变位点分析*

张智文¹ 王山岭² 刘静静² 吴金涛² 王婷² 赵丹清¹ 范宪伟² 杨海涛²

[摘要] **目的:**对收集的 1 例血脂异常家系的致病基因进行全外显子测序,确定其突变基因位点。**方法:**收集在我院就诊的 1 例血脂异常患者及其家系成员的临床资料,采集患者及相关家系成员外周血样本并提取基因组 DNA,利用目标外显子捕获技术和二代测序技术对先证者的与血脂异常有关的基因进行基因突变筛查,并使用 Sanger 测序法验证可疑突变位点并筛查患者家系成员和 100 例健康人,确定该家系患者的致病突变基因,使用 Polyphen2、MutationTaster、SIFT 和 Provean 这 4 种软件进行突变基因功能检测,并利用 Swiss-Model 软件分析突变前后的蛋白质三维结构模型。**结果:**在受检人样品中检测到 LPL 基因的纯合变异 c. 1322+1G>A(编码区第 1322+1 位核苷酸由 G 变为 A),在其子女样品中检测到 LPL 基因同位点的杂合变异。4 种预测软件均预测该突变为有害突变,Swiss-Model 软件结果显示该突变位点导致 442 位的缬氨酸突变为终止密码子,可能影响蛋白质的剪切和活化功能。**结论:**本研究应用全外显子测序技术在一血脂异常家系中发现 LPL 基因新的突变位点:LPL c. 1322+1G>A。该突变可能是患者家系发生高三酰甘油血症的致病因素,且可能导致更严重的冠心病。此位点目前在我国人群中少见文献报道。

[关键词] 家族性;血脂异常;全外显子测序;基因突变;纯合突变

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2020.08.015

[中图分类号] R54 **[文献标志码]** A

Analysis of a new mutation site of LPL gene in familial hyperlipidemia

ZHANG Zhiwen¹ WANG Shanling² LIU Jingjing² WU Jintao²
WANG Ting² ZHAO Danqing¹ FAN Xianwei² YANG Haitao²

(¹Henan University People's Hospital, Henan Province People's Hospital, Zhengzhou, 450003, China; ²Central China Fuwai Hospital, Heart Center of Henan Province People's Hospital)

Corresponding author: YANG Haitao, E-mail: yanghaitaotougao@163.com

Abstract Objective: To sequence the pathogenic genes of a family with hyperlipidemia by full exon sequencing, and determine the mutation loci. **Method:** We collected the clinical data of a hyperlipidemia patient and her family members in our hospital, peripheral blood samples from patients and related family members were collected and genomic DNA were extracted. The gene mutations associated with hyperlipidemia in the proband were screened by target exon capture and second-generation sequencing techniques. Suspicious mutation sites were identified by Sanger sequencing, and the patients' family members and 100 healthy persons were screened to identify the pathogenic mutations in the proband. Polyphen2, MutationTaster, SIFT and Provean were used to detect the function of mutant genes, and Swiss-Model software was used to analyze the three-dimensional protein structure model before and after mutation. **Result:** The homozygous variation C. 1322+1G>A of LPL gene was detected in the tested samples (the nucleotide of coding site 1322+1 was changed from G to A), and heterozygous variation of LPL gene was detected in the offspring samples. The four prediction softwares predicted that the mutation was a harmful mutation. The Swiss-Model software results showed that the mutation site lead to the mutation of valine at position 442 as a stop codon, which may affect the protein's cleavage and activation function. **Conclusion:** In this study, a new mutation of LPL gene, LPL C. 1322+1G>A, is found in a hyperlipidemia family by using exon sequencing technique. The mutation may be a pathogenic factor of hypertriglyceridemia in the family, and may lead to more severe coronary atherosclerotic heart disease. This locus is rarely reported in Chinese population.

Key words familial; hyperlipidemia; total exon sequencing; gene mutation; homozygous mutation

血脂异常主要是指人体脂质代谢障碍导致的血浆总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)水平的升高,

临床上分为两类:①原发性,比较罕见,属于一种遗传性脂质代谢紊乱导致的疾病;②继发性,常见于糖尿病控制不良、酗酒、甲状腺功能减退症、胆道梗阻、使用避孕药、肾病综合征、血液透析、肾移植等人群^[1]。血脂异常与动脉粥样硬化、糖尿病、脂肪肝、肾病等疾病的发病关系十分密切,尤其是冠心

* 基金项目:河南省科技攻关计划(No: 182102310175);河南省医学科技攻关计划(No:LHGJ20190784)

¹ 河南大学人民医院 河南省人民医院(郑州,450003)

² 华中阜外医院 河南省人民医院心脏中心

通信作者:杨海涛,E-mail: yanghaitaotougao@163.com

病和脑血管疾病,是发病的重要因素。根据流行病学统计资料,血脂异常人群发生上述疾病的可能性要比同年龄组的正常人群高,其发病率要高出4倍^[2]。因此血脂异常这一危险因素应予以足够的重视,并宜尽早发现和尽早采取有效措施,以减少其他疾病的发生^[3]。由于LPL基因的错义突变可引起脂蛋白脂肪酶缺乏^[4]。脂蛋白脂肪酶缺乏被多项研究认为是I型血脂异常的主要原因,称为脂肪诱导的高三酰甘油血症^[5-6]。

1 对象与方法

1.1 对象

本研究对象为一河南籍高三酰甘油血症家系(图1)。先证者(II-1)是一例69岁女性患者,其10余年来反复出现活动后胸闷、气促等症状,本次入院初步诊断为冠心病、不稳定型心绞痛、陈旧性下壁心肌梗死、冠状动脉(冠脉)支架植入术后、血脂异常。入院检查心电图示陈旧性下壁心肌梗死, TG 18.94 mmol/L,远高于正常水平,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)0.37 mmol/L,明显降低。行冠脉造影术发现患者右冠中段90%狭窄,并于右冠植入两枚支架。先证者于40年前体检时发现患有血脂异常,既往无高血压、糖尿病等病史,10年前曾发生急性下壁心肌梗死,接受相关药物治疗并于左前降支近段植入1枚支架。先证者的母亲(I-2)在年轻时也被诊断出高三酰甘油血症,并在50岁时死于急性心肌梗死。先证者的儿子(III-1)TG和TC分别为1.52 mmol/L和5.25 mmol/L,目前尚未表现出血脂异常及冠心病等疾病;其女儿(III-2)TG和TC分别为1.44 mmol/L和4.87 mmol/L,同样尚未表现出血脂异常及冠心病等疾病。

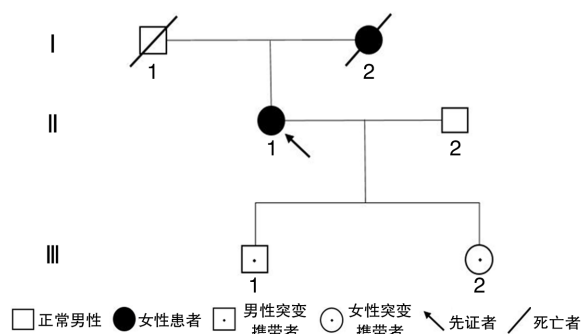


图1 血脂异常患者家系图谱

Figure 1 The family tree of the patient with hyperlipidemia

1.2 方法

采集家系中4位成员的外周血,采用吸附法DNA提取试剂盒提取血液样本中的DNA,以3 μg DNA为起始,参照Agilent's SureSelect XT target enrichment system制备文库。使用

设计好的探针对目标区域完成捕获,并使用MiSeq System测序仪器,以2×150 Pair-End模式进行二代基因测序。利用生物信息学分析排除基因多态性。使用Sanger测序法验证可疑突变位点并筛查患者家系成员和健康人100例,确定该家系患者的致病突变。筛查1000Genome网站、dbSNP和UC-SC等数据库,使用Polyphen2、MutationTaster、SIFT和Provean在线软件对蛋白质进行突变基因的功能检测,并使用Swiss-Model软件分析LPL基因位点突变前后的蛋白质三维结构模型。

2 结果

2.1 LPL 基因突变位点分析

结合全外显子组测序的结果和文献报道的已知与血脂异常相关的基因,在先证者DNA样品中检测到一个位于LPL基因第8号外显子上的非同义突变:LPL基因的纯合变异c.1322+1G>A(编码区第1322+1位核苷酸由G变为A)。该变异位于8号内含子经典剪接位点+1位,该基因上的无功能变异是导致血脂异常I型的已知致病机理。在先证者子女(III-1、III-2)的DNA样品中检测到LPL基因同位点的杂合变异c.1322+1G>A(图2)。在先证者的丈夫(II-2)及100例健康对照者中并未发现该突变位点。

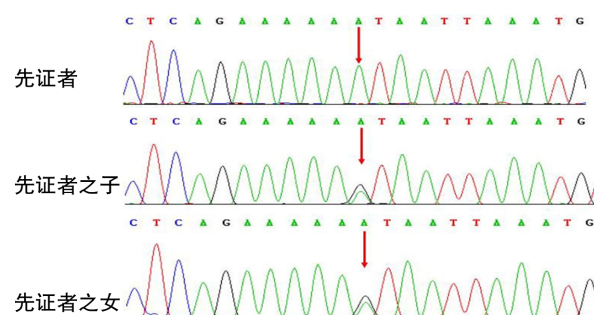


图2 先证者及其子女LPL基因突变位点

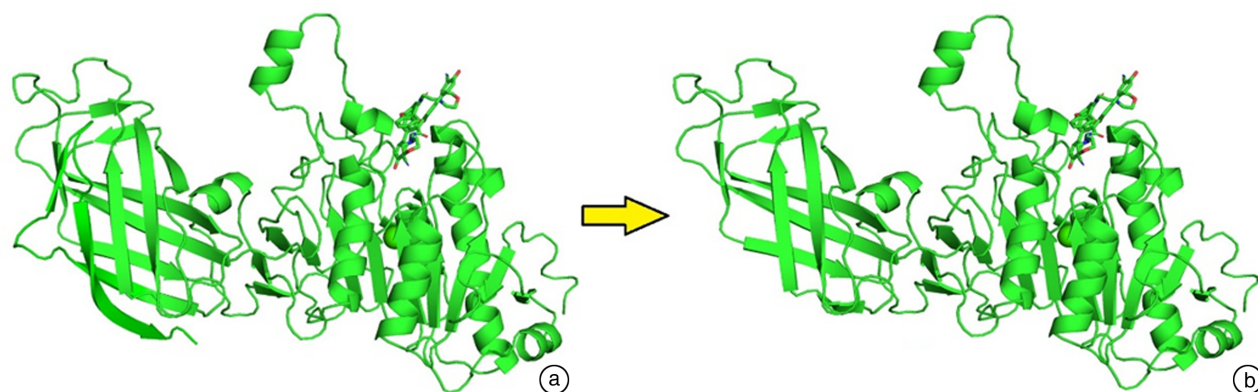
Figure 2 The new mutation site of LPL gene in the proband and her offspring

2.2 生物信息学分析

使用Polyphen2、MutationTaster、SIFT和Provean这4种在线软件对蛋白质进行突变基因功能检测,结果均显示该突变为有害突变;使用Swiss-Model软件分析LPL基因位点突变前后的蛋白质三维结构模型,结果显示,该突变位点导致442位的缬氨酸突变为终止密码子,使编码蛋白提前终止而缺乏C末端关键结构域,这可能会影响蛋白质的剪切和活化功能(图3)。

3 讨论

家族性血脂异常主要包括家族性高三酰甘油血症和家族性混合型血脂异常,其诊断主要依靠血



a:野生型蛋白结构图;b:突变型蛋白结构图。

图3 LPL 基因 c. 1322+1G>A 突变蛋白的结构模拟图

Figure 3 The structural mimic diagrams of c. 1322 + 1G>A mutant protein of LPL gene

清 TG 和 TC 水平。家族性高三酰甘油血症的主要特征是血清 TG 明显升高,其发生发展与 LPL 基因密切相关^[7-8]。LPL 基因位于 8p21.3 染色体上,编码蛋白为脂蛋白脂肪酶,该蛋白作为同型二聚体发挥甘油三酸酯水解酶与脂蛋白摄入受体的配体/桥联因子功能。该基因中的致病性突变与脂蛋白脂肪酶缺乏有关,从而导致家族性血脂异常^[9]。本研究应用全外显子测序技术在一血脂异常家系中发现 LPL 基因新的突变位点:LPL 基因 c. 1322+1G>A。此位点目前在国人人群中少见文献报道,但已有文献报道在该变异相邻碱基位点处发生变异与脂蛋白脂肪酶缺乏症有关:1 例患 I 型血脂异常的日本男婴携带 LPL 基因的复合杂合变异,其中一个变异是 8 号内含子经典剪接位点+2 位变异(c. 1322+2T>C),该变异导致 mRNA 异常剪接,产生的 mRNA 比正常的短 134 bp,造成终止密码子的移码,使编码蛋白提前终止而缺乏 C 末端关键结构域。

LPL 突变导致的高三酰甘油是冠心病的重要危险因素^[10]。在该血脂异常家系中,先证者携带有 LPL 基因 c. 1322+1G>A 的纯合变异,这可能是其严重血脂异常且冠脉病变较重的原因。先证者的母亲也曾被检测出严重血脂异常,且死于严重冠心病,推测其也为该突变位点的携带者。先证者的子女均被检测出该突变的杂合变异,但目前尚未表现出血脂异常。对血脂异常患者及其家系成员尽早进行基因检测可以明确疾病的遗传原因,有助于筛查家系突变基因,对患者的治疗方案、其家系成员的早期诊断有明确的价值,并且对突变携带者的早期干预和遗传咨询具有非常重要的临床意义^[11]。

参考文献

[1] Brouwers MCGJ, de Graaf J, Simons N, et al. Incidence of type 2 diabetes in familial combined hyperlipidemia[J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2020, 8(1): e001107.

- [2] Baumer Y, Mccurdy S, Weatherby TM, et al. Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1129-1129.
- [3] 姚纯, 赵水平. 家族性高胆固醇血症诊治新进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2019, 35(12): 1075-1079.
- [4] Xiao B, Mao J, Sun B, et al. Integrin $\beta 3$ deficiency results in hypertriglyceridemia via disrupting LPL (LIPOPROTEIN LIPASE) SECRETION [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(5): 1296-1310.
- [5] Koopal C, Bemelmans RH, Marais AD, et al. Severe hypertriglyceridaemia and pancreatitis in a patient with lipoprotein lipase deficiency based on mutations in lipoprotein lipase (LPL) and apolipoprotein A5 (APOA5) genes[J]. *Case Reports*, 2019, 12(4): 228-231.
- [6] Rodriguezgarcia E, Gilserrret M, Garciajimenez MC, et al. Characterisation of plasma lipoprotein particles in spanish patients with lysosomal acid lipase deficiency (LAL-D)[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 26(3): 222-226.
- [7] De Castrooros I, Civeira F, Pueyo M, et al. Rare genetic variants with large effect on triglycerides in subjects with a clinical diagnosis of familial vs nonfamilial hypertriglyceridemia[J]. *J Clin Lipidol*, 2016, 10(4): 790-797.
- [8] Albustan SA, Alserri A, Annice BG, et al. A novel LPL intronic variant; g. 18704C>A identified by re-sequencing Kuwaiti Arab samples is associated with high-density lipoprotein, very low-density lipoprotein and triglyceride lipid levels[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): 121-129.
- [9] Taghizadeh E, Ghayourmobarhan M, Ferns GA, et al. A novel variant in LPL gene is associated with familial combined hyperlipidemia[J]. *Biofactors*, 2019, 46(1): 94-99.
- [10] Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, et al. Association of triglyceride-lowering, LPL, variants and LDL-C-lowering, LDLR, variants with risk of coronary heart disease[J]. *JAMA*, 2019, 321(4): 219-226.
- [11] 张智文, 王婷, 杨海涛. 肥厚型心肌病家系携带 ACTN2, MYBPC3 和 TNNI3 基因突变分析[J]. *临床心血管病杂志*, 2020, 36(2): 166-169.

(收稿日期:2020-03-28; 修回日期:2020-04-24)