

· 论 著 ·

某地区哈萨克族肥胖儿童 ApoE 基因多态性研究*

张季红¹, 王晓英², 徐佩茹^{1△}, 常忠生¹

(1. 新疆医科大学第一附属医院儿科, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆维吾尔自治区人民医院儿科, 乌鲁木齐 830002)

摘要:目的 探讨乌鲁木齐周边地区哈萨克族儿童肥胖与载脂蛋白 E(ApoE)基因多态性的关系。方法 选择 98 例超质量/肥胖哈萨克族儿童(病例组)及 88 例健康者(对照组),采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法测定 ApoE 基因型及等位基因频率。结果 (1)病例组与对照组的基因型频率 $\epsilon 3/3$ 、 $\epsilon 2/3$ 、 $\epsilon 4/4$ 、 $\epsilon 2/2$ 和 $\epsilon 3/4$ 基因型分布差异无统计学意义($P>0.05$)。病例组和对照组 ApoE $\epsilon 4$ 等位基因频率分别为 6.12% 和 2.87%, 差异有统计学意义($P<0.05$)。(2) 病例组和对照组女性 ApoE $\epsilon 4$ 等位基因频率分别为 7.44% 和 1.09%, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 ApoE $\epsilon 4$ 等位基因是哈萨克族肥胖的危险因素,尤其在女性儿童肥胖的发病中起重要作用。

关键词:肥胖;载脂蛋白 E 类;多态现象;遗传;哈萨克族儿童

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.34.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)34-3586-02

The study of Apolipoprotein E gene polymorphism with obesity in Karzak children in an area*

Zhang Jihong¹, Wang Xiaoying², Xu Peiru^{1△}, Chang Zhongsheng¹

(1. Department of Paediatrics, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xingjiang 830011, China; 2. Department of Paediatrics, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi, Xingjiang 830002, China)

Abstract: Objective To study the relevance of Apolipoprotein E gene polymorphism and obesity in Xinjiang Karzak children.

Methods Using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism(PCR RFLP), to determine the apolipoprotein E genotypes and allele frequency in 98 cases of patients with obesity, and 88 cases of normal control. **Results** (1) there were not difference among $\epsilon 3/3$ 、 $\epsilon 2/3$ 、 $\epsilon 4/4$ 、 $\epsilon 2/2$ and $\epsilon 3/4$ genotype from children with simple obesity and normal control. The allele frequency of ApoE $\epsilon 4$ was higher in obese group than that in normal control, 6.12% and 2.87% ($P<0.05$). (2) ApoE $\epsilon 4$ allele frequency in female in obese group and normal control such as 7.44% and 1.09%, this difference also had statistically significance ($P<0.05$).

Conclusion ApoE $\epsilon 4$ allele frequency is a risk factor of Karzak children obesity, especially in femal obese Karzak children.

Key words: obesity; apolipoproteins E; polymorphism; genetic; Karzak child

近年来,儿童肥胖发病率正逐年升高,已成为全球关注的主要健康问题。在新疆地区进行的肥胖儿童调查显示,6~16岁维吾尔族、哈萨克族、汉族和回族 4 个民族儿童肥胖总患病率为 5.66%。而哈萨克族位居新疆不同民族学龄儿童肥胖患病率之首,为 8.94%^[1]。载脂蛋白(apolipoprotein, Apo) E 包含 3 个等位基因($\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$)和 6 种常见的基因表型($\epsilon 2/2$ 、 $\epsilon 3/3$ 、 $\epsilon 4/4$ 、 $\epsilon 2/3$ 、 $\epsilon 2/4$ 、 $\epsilon 3/4$),是一种由遗传决定的具有多态性的蛋白质,其中 Apo E4 等位基因是动脉粥样硬化的危险因素之一,据研究可能是冠状动脉粥样硬化性心脏病的重要遗传标记^[3]。哈萨克族儿童肥胖发病率较高,但目前对哈萨克族儿童 ApoE 基因多态性的研究极少。为探讨哈萨克族单纯性肥胖儿童中 ApoE 基因变异与肥胖的关系,本研究采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RELP)方法对新疆地区 186 名哈萨克族超质量/肥胖儿童和非肥胖儿童 ApoE 基因型变异及等位基因频率的差异进行了初步研究,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集新疆乌鲁木齐市周边城市数所哈萨克族小学校进行健康普查,进行随机整群抽样,并且排除其他疾病导致的肥胖。体质量参照人群采用中国城区 0~18 岁男、女儿童身高、体质量值为参照^[4],体质量超过平均标准的 15% 为超

质量,超过 20% 为肥胖,超过 20%~29% 者为轻度肥胖,超过 30%~49% 为中度肥胖,重度肥胖为超过 50% 者。病例组(超质量/肥胖儿童)98 例,其中男 51 例,女 47 例,年龄为 6~12 岁;对照组为同区小学校哈萨克族非肥胖儿童,年龄性别与肥胖组基本配对,体质量不超过标准体质量的 10%,共 88 例,年龄 6~12 岁,其中男 44 例,女 44 例。所有研究对象均征得家长同意并签字,同时经过本医院伦理委员会的批准。研究对象禁食 12 h 后,抽取外周静脉血 5 mL,加到含 2% 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管中,混匀,经 8 000 r/min 离心后,小心吸取上清液留取作生化检测,其余 -20 ℃ 冻存。

1.2 方法

1.2.1 体格测量 由专业培训过的人员用校正的身高、体质量计测量,受试儿童免冠、脱鞋测量立式身高。身高精确至 0.1 cm。测量体质量清晨空腹仅穿短内裤测量,体质量精确至 0.1 kg。计算体质量指数(BMI)=体质量(kg)/身高²(m²)。

1.2.2 血清的采集和制备 晨起抽取空腹静脉血 2 mL,静置后以 3 000 r/min 离心 15 min,上清液制备血清。并贮于 -20 ℃ 备用。

1.2.3 基因组 DNA 的制备 静脉血 2 mL,经 EDTA 抗凝,淋巴细胞分离液分离白细胞后,传统酚氯仿法抽提 DNA。

1.2.4 ApoE 基因的 PCR 扩增及酶切消化 引物由上海生工

表 1 健康儿童与超质量/肥胖儿童 ApoE 基因型和等位基因频率分布比较

组别	表型(n)					等位基因频率[n(%)]		
	ε3/3	ε3/2	ε3/4	ε4/4	ε2/2	ε2	ε3	ε4
超质量/肥胖组(n=98)	85	3	8	2	0	3(1.53)	96(92.34)	12(6.12)*
对照组(n=88)	80	2	5	0	1	4(1.13)	87(95.97)	5(2.87)

* : P<0.05, 与对照组比较。

表 2 不同性别超质量/肥胖组和对照组 ApoE 基因型和等位基因频率分布比较

组别	n	ApoE 基因型频率(n)					等位基因频率[n(%)]			
		ε3/3	ε3/2	ε3/4	ε4/4	ε2/2	ε2	ε3	ε4	
女性	超质量/肥胖组	47	40	2	3	2	0	2(2.13)	85(90.42)	7(7.44)*
	对照组	44	42	1	1	0	0	1(1.09)	90(97.83)	1(1.09)
男性	超质量/肥胖组	45	45	1	5	0	0	1(0.98)	96(94.12)	5(4.90)
	对照组	38	38	1	4	0	1	3(3.49)	81(94.19)	4(4.65)

* : P<0.05, 与对照组比较。

生物工程技术有限公司合成。引物按文献[5]设计, 上游引物序列为 5'-AGA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3', 下游引物序列为 5'-TAA GCT TGG CAG GCT GTC CAA GGA-3'。PCR 反应体系为 30 μL, 内容如下:(1)3 μL DNA 模板;(2)10×PCR 反应缓冲液 3 μL(不含 Mg²⁺);(3)2 mmol/L dNTP 0.45 μL;(4)3 μL 二甲基亚砜(DMSO), 25 mmol/L MgCl₂ 2.2 μL;(5)10 μmmol/L 上游引物 1.5 μL;(6)下游引物 1.5 μL;(7)去离子水 15.2 μL,(8)Tag DNA 聚合酶 0.75 U。PCR 的反应条件为: 先行 95 °C 预变性 5 min, 继而 95 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环后, 72 °C 继续延伸 10 min, 终末降至 4 °C。所得 PCR 产物, 加限制性内切酶 Hha I 于 37 °C 水浴中过夜, 充分酶切消化, 采用 5% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 后紫外灯下摄像。

1.3 主要仪器与试剂 采用 Mettler Toledo LD202 电子天平、Beckman L8-55 型超速离心机、DYY-6C 型电泳仪、日本 SanYo MDF-U52V 超低温冰箱、DK-8A 快速恒温数显水箱、DYCP-31DN 型水平电泳槽、BIO-RAD Gel DOC 2000 凝胶成像仪、PCR 热循环仪为 BIO-RAD 公司产品; 所用试剂蛋白酶 K、dNTP、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 Hha I 均为上海生工生物工程公司产品。

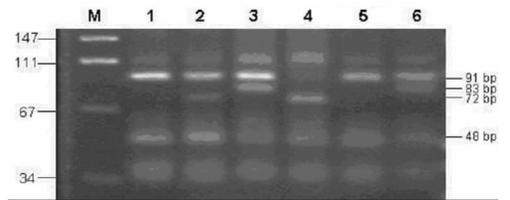
1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析, 吻合度检验确定符合 Hardy-Weinber 平衡定律, 组间比较用 χ² 检验, 检验水准 α=0.05(双侧), 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肥胖组与对照组 ApoE 基因型和等位基因频率分布比较 除 ε2/4 基因型未鉴别到外, ε3/3 基因型频率在超质量/肥胖组和对照组中最高, ε3/4 和 ε2/3 基因型频率次之, ε4/4 和 ε2/2 基因型最少。而在超质量/肥胖组中, ε3/3 基因型频率为 85.65%, 略低于对照组的 89.88%, 差异无统计学意义(P>0.05); 超质量/肥胖组 ε3/4 基因型频率为 8.16%, 对照组为 5.62%, 差异无统计学意义(P>0.05); 超质量/肥胖组 ε3/2 基因型频率为 3.06%, 对照组为 2.24%, 差异无统计学意义(P>0.05)。超质量/肥胖组 ApoE ε4 等位基因频率为 6.12%, 高于对照组的 2.87%, 差异有统计学意义(χ² = 41.27, P<0.05), 两组 ApoE ε3 和 ApoE ε2 等位基因频率差异均无统计学意义(P>0.05), 见表 1。

2.2 肥胖组与对照组不同性别 ApoE 基因型和等位基因频率

分布比较 超质量/肥胖组和对照组 ε3/3、ε2/3 和 ε3/4 基因型在男、女不同性别中的频率分布差异无统计学意义。超质量/肥胖组女性和对照组女性 ApoE ε4 等位基因频率分布分别为 7.44% 和 1.09%, 差异有统计学意义(χ² = 4.569, P<0.05), 而在男性两组无明显差异。超质量/肥胖组和对照组 ApoE ε2 和 ApoE ε3 等位基因频率在不同性别间的比较, 差异亦无统计学意义, 见表 2。



M: DNA 参照物; 1, 5: ε3/3 基因型; 2: ε3/4 基因型; 3: ε2/3 基因型; 4: ε4/4 基因型; 6: ε2/2 基因型。

图 1 ApoE 基因突变电泳结果

3 讨 论

ApoE 基因是位于第 19 号染色体长臂 13 区 2 带(19q13, 2)上的有多态性改变的基因。其 3 个等位基因, ε2、ε3 和 ε4, 可产生 ε2/2、ε2/3、ε3/3、ε4/4、ε2/4、ε3/4 共 6 种基因型, 即有对应的 ApoE 2/2、ApoE 2/3、ApoE 3/3、ApoE 4/4、ApoE 2/4、ApoE 3/4 6 种遗传表现型[5]。

本研究显示, 乌鲁木齐周边地区哈萨克族儿童中存在 ApoE 基因型及等位基因频率的差异, 其中 ε3/3 基因型发生频率最高, ε2/2 基因型发生频率最低, 而 ε2/4 基因型未检出。本实验发现, ApoE 等位基因最常见为 ε3、ε2 等位基因发生频率最低, 与国内外报道相一致。ApoE ε4 等位基因在肥胖组要明显高于对照组, 在哈萨克族女性儿童中尤为显著, 说明 ApoE ε4 等位基因是哈萨克族儿童肥胖的危险因素之一, 尤其对哈萨克族女性肥胖儿童的发病起重要作用。

ApoE 基因在调节血脂与脂蛋白代谢方面具有重要作用, 故被认为是肥胖的重要候选基因之一[6]。近年研究表明, ApoE 基因结构功能异常与高脂血症、动脉粥样硬化等疾病的有着密切的相关性。ε4 等位基因是冠心病(chronic heart failure, CHD)的重要遗传标记, 而 ε2 等位基因则对人体起保护作用[7]。本研究发现, 哈萨克族超质量/肥胖儿(下转第 3590 页)

- [3] Manning A, Russell V, Eastick K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses[J]. *J Infect Dis*, 2006, 194(9): 1283-1290.
- [4] 胡亚美, 江载芳. 诸福堂实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1163-1199.
- [5] 袁艺, 宋国维, 杜军保, 等. 北京地区住院急性呼吸道感染患儿的病毒病原检测分析[J]. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21(6): 348-350.
- [6] 欧少阳, 林广裕, 吴扬, 等. 粤东地区住院小儿急性下呼吸道感染病毒病原学研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(3): 203-206.
- [7] Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2004, 23(1 Suppl): S6210.
- [8] Sly PD, Boner AL, Bjorksten B, et al. Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children[J]. *Lancet*, 2008, 372(9643): 1100-1106.
- [9] Stern DA, Morgan WJ, Halonen M, et al. Wheezing and bronchial hyper-responsiveness in early childhood: as predictors of newly diagnosed asthma in early adulthood: a longitudinal birth-cohort study [J]. *Lancet*, 2008, 372(9643): 1058-1064.
- [10] Kusel MM, de Klerk NH, Keadze T, et al. Early-liferespiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(5): 1105-1110.
- [11] Gern JE. Rhinovirus and the initiation of asthma[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2009, 9(1): 73-78.
- [12] Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(1): 16-24.
- [13] Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(7): 667-672.
- [14] Menezes AM, Hallal PC, Muino A, et al. Risk factors for wheezing in early adolescence: a prospective birth cohort study in Brazil [J]. *J Ann Allergy Asthma Immunol*, 2007, 98(5): 427-431.
- [15] Mandhane PJ, Greene JM, Cowan JO, et al. Sex differences in factors associated with childhood-adolescent-onset wheeze[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(1): 45-54.

(收稿日期: 2012-06-08 修回日期: 2012-09-10)

(上接第 3587 页)

童与非肥胖儿童比较, 其 $\epsilon 4$ 等位基因频率增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示哈萨克族肥胖儿童已存在促进 CHD 发生的危险因素, 携带 $\epsilon 4$ 等位基因的哈萨克族肥胖儿童成年后有患 CHD 的危险性。受检的哈萨克族儿童体质指数与成年后患 CHD 是否有相关性, 以及与 ApoE 基因多态性的关系还有待进一步研究。

有研究表明, ApoE 基因多态性与血脂的代谢水平相关^[8]。 $\epsilon 4$ 等位基因作为 CHD 的遗传易患因子, 可能引起高胆固醇血症, 在单纯性肥胖儿童中 $\epsilon 4$ 明显增高。本研究发现, 哈萨克族超质量/肥胖儿童 ApoE 基因 $\epsilon 4$ 等位基因频率高于非肥胖儿童, 哈萨克族肥胖儿童发生机制可能与脂代谢紊乱有关, ApoE 基因多态性可能通过影响血脂水平, 从而增加哈萨克族成年人患 CHD 的风险。已有研究表明, 单纯性肥胖儿童较非肥胖儿童发生 CHD 的年龄更早, 因此, 从基因角度分析, 哈萨克族儿童肥胖发病率高于其他民族的因素, 尽管是多因素的, 与饮食和环境有关, 但还具有遗传易感性, 哈萨克族肥胖儿童成年后患心血管疾病的风险高于其他民族。因此, 为了预防哈萨克族 CHD 的发生, 应从儿童开始注重对危险因素的评估。通过及早进行基因型检测, 早期发现高危人群, 以便及时进行干预治疗, 这对哈萨克族整体人群健康具有重要的临床意义。

参考文献:

- [1] 徐佩茹, 张卫平, 阿依古丽, 等. 新疆地区不同民族学龄儿

童肥胖患病率及相关因素分析[J]. *中华现代医学杂志*, 2003, 3(1/2): 107-109.

- [2] Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis[J]. *Arteriosclerosis*, 1988, 8(1): 1-21.
- [3] Peter WF, Richard H, Martin G, et al. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia and coronary heart disease[J]. *JAMA*, 1994, 272: 1666-1671.
- [4] 吴瑞萍, 胡亚美, 江载芳. 诸福堂实用儿科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 567-569.
- [5] 王莲, 刘长云, 赵园园, 等. 单纯性肥胖儿童脂代谢与 LEPR 及 ApoE 基因多态性的相关性研究[J]. *中华妇幼临床医学杂志*, 2007, 3(4): 189-193.
- [6] 蔡建光, 印大中. 阿尔茨海默病主要相关基因及其功能蛋白研究进展[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2006, 13(2): 120-124.
- [7] Bonithon-Kopp C, Touboul PJ, Berr C, et al. Relation of intima-media thickness to atherosclerotic plaques in carotid arteries. The Vascular Aging (EVA) study[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(2): 310-316.
- [8] 肖志杰, 赵水平, 聂赛, 等. 载脂蛋白 E 基因多态性对血脂的影响[J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(7): 533-536.

(收稿日期: 2012-07-02 修回日期: 2012-09-18)