

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.010

# 广西汉族人群 NPC1L1 基因 1 735 C>G 多态性分布特征及与血脂、肥胖的关系\*

苗林<sup>1</sup>,尹瑞兴<sup>2△</sup>,吴东峰<sup>3</sup>

(1. 广西医科大学第四附属医院心内科,广西柳州 545005;2. 广西医科大学第一附属医院心内科,南宁 530021;3. 广西壮族自治区人民医院综合干部病区,南宁 530021)

**[摘要]** **目的** 分析 NPC1L1 基因 1 735 C>G 多态性分布特征及其与血脂、肥胖的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,对 409 例汉族人群进行 NPC1L1 基因多态性分型,比较不同基因型间血脂水平、BMI 的差异。**结果** CC,CG,GG 基因型的分布频率分别为 39.40%、46.00%、14.60%;等位基因 C 和 G 频率分别为 62.35% 和 37.65%。3 种基因型组间的 LDL-C、ApoB 水平和 BMI 的差异有统计学意义( $P<0.05$ ),G 等位基因携带者(GC/GG 基因型)较 CC 型有更高的 LDL-C、ApoB 水平( $P<0.05$ )。血脂谱和 BMI 与多种环境因素相关。**结论** NPC1L1 基因 1 735 C>G 多态性与血脂水平和 BMI 相关,G 等位基因可能是高 LDL-C 水平和肥胖的一个危险因素。

**[关键词]** 多态性;单核苷酸;血脂异常;NPC1L1;人体质量指数**[中图分类号]** R446**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)24-3341-04

## Distribution characteristics of NPC1L1 gene 1 735 C>G polymorphism and relationship between serum lipid levels and obesity in Guangxi Han population\*

Miao Lin<sup>1</sup>, Yin Ruixing<sup>2△</sup>, Wu Dongfeng<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, the Fourth Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi 545005, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Department of Comprehensive Cadre's Ward, the People's Hospital of Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530021, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the distributional characteristics of NPC1L1 1 735 C>G polymorphism and the relationship between serum lipid levels and obesity in Guangxi Han population. **Methods** Genotyping of the NPC1L1 1 735 C>G polymorphism of 409 cases of Han was performed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism combined with gel electrophoresis in all subjects. The relationship of different genotypes in blood lipid levels and obesity were evaluated. **Results** The frequency of CC,CG and GG genotypes was 39.40%, 46.00% and 14.60% in Han. The frequency of C and G alleles was 62.35% and 37.65% in Han. The levels of BMI, LDL-C, ApoB was different among the three genotypes ( $P<0.05$ ). The G allele carriers had higher serum LDL-C and ApoB levels than the G allele noncarriers ( $P<0.05$ ). Serum lipid parameters and BMI were also correlated with some environmental factors. **Conclusion** The 1 735 C>G polymorphism in NPC1L1 gene may be correlated with serum lipid profiles and obesity, the G allele might increase the risk of hyperlipemia and obesity.

**[Key words]** polymorphism, single nucleotide; dyslipidemias; niemann-pick c1-like 1; body mass index

血脂代谢紊乱和肥胖是动脉粥样硬化和冠心病发生、发展的重要危险因素<sup>[1-2]</sup>。尼曼-匹克 C1 样 1(NPC1L1)蛋白是胆固醇跨膜转运的关键物质,在小肠中高度表达,影响肠道胆固醇的吸收,以及调节其他血脂代谢基因的活性,对全身胆固醇稳态起着关键的调控作用<sup>[3-4]</sup>。研究显示,NPC1L1 基因多态性对其蛋白功能具有重要生物学效应,从而影响胆固醇的水平<sup>[5-11]</sup>。本文研究 NPC1L1 基因 1 735 C>G (rs2072183)多态性位点对血脂水平和肥胖的影响,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 在广西罗城县采用分层随机整群抽样的方法组建了汉族人群标本库,从中随机抽取 409 名汉族人群作为研究对象。其中男 155 例,女 254 例。排除有心脏病史、中风史,糖尿病或空腹血糖水平大于或等于 7.0 mmol/L 者,及正在使用他汀类、贝特类、胆固醇吸收抑制剂(如依泽麦布片)、激素等

影响血脂代谢相关药物者。纳入研究前患者均签署知情同意书。本研究经广西医科大学医学伦理委员会许可。

**1.2 方法** **体检项目:**由专门人员测量身高、体质量、腰围和血压等,并计算出 BMI。专科医师询问既往病史及生活习惯。血标本采集及生化指标检测:禁食 12 h,清晨空腹,坐位采取静脉血 8 mL,离心获取血清。血清总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)的检测采用标准酶法;血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)采用酶联免疫一步法测定,载脂蛋白 A-I(ApoA-I)和载脂蛋白 B(ApoB)采用免疫透射比浊法。均在广西医科大学第一附属医院检验中心统一测定。DNA 提取及 PCR 扩增:取静脉血 3 mL,采用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA<sup>[12]</sup>。上游引物:5'-GGG ATG ACA GAT AGC ACC AA-3',下游引物:5'-GAC ATC ACC TTC CAC CTC TTG-3'。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L:2.0  $\mu$ L 模板 DNA,12.5  $\mu$ L

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960130)。 作者简介:苗林(1985-),主治医师,硕士,主要从事冠心病的基础和临床研究。

△ 通讯作者,E-mail:yinruixing@126.com。

表 1 研究对象男女组间一般情况比较

项目	男(n=155)	女(n=254)	$t(\chi^2)$	P
年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁)	51.21±17.10	51.37±14.56	-0.110	0.91
BMI( $\bar{x}\pm s$ ,kg/m <sup>2</sup> )	23.02±3.78	21.89±2.94	3.390	<0.05
腰围( $\bar{x}\pm s$ ,cm)	77.87±8.08	73.40±7.19	5.872	<0.05
收缩压( $\bar{x}\pm s$ ,mm Hg)	134.77±18.77	125.93±18.58	4.690	<0.05
舒张压( $\bar{x}\pm s$ ,mm Hg)	83.92±11.13	80.77±10.82	4.678	<0.05
血糖( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	6.14±1.81	6.23±1.99	-0.451	0.65
TC( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	5.22±1.08	4.87±1.00	3.281	<0.05
HDL-C( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	1.65±0.43	1.78±0.56	-2.390	<0.05
LDL-C( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)	3.01±0.87	2.84±0.84	1.989	<0.05
ApoA-I( $\bar{x}\pm s$ ,g/L)	1.35±0.28	1.32±0.24	0.727	0.47
ApoB( $\bar{x}\pm s$ ,g/L)	0.92±0.20	0.81±0.18	5.354	<0.05
吸烟[n(%)]			176.28	<0.05
不吸烟	63(39.1)	252(96.9)		
吸烟	98(60.9)	8(3.1)		
饮酒[n(%)]			129.99	<0.05
不饮酒	87(54.0)	256(98.5)		
饮酒	74(46.0)	4(1.5)		
TG[M(QR <sub>2</sub> ),mmol/L]	1.18(1.13)	0.97(0.78)	-3.869	<0.05

2×Taq PCR MasterMix (北京天根生物公司),上下游引物各 1.0 μL (10 μmol/L),不足部分去离子水补足。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 30 次;最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 产物使用 Taq I 内切酶酶切。总反应体系 10 μL;PCR 产物 5 μL,Taq I 5 U (Fermentas 公司),10×Buffer 1 μL,不足体积去离子水补足,65 °C 水浴 12 h,2.0%琼脂糖凝胶-核酸染料 GELVIEW 染色,100 V 电泳 40 min,紫外线下观察、摄影。将 PCR 产物及酶切产物与 DNA 片段长度标准物比较以鉴定基因型。PCR 产物为 437 bp;野生基因型 CC 酶切产物为 2 条带,分别为 169 bp 和 268 bp;突变型 GG 为 437 bp;杂合型 CG 则为 3 条带,分别是 437、169、268 bp。随机抽取 3 种基因型 PCR 产物经上海生工测序证实。

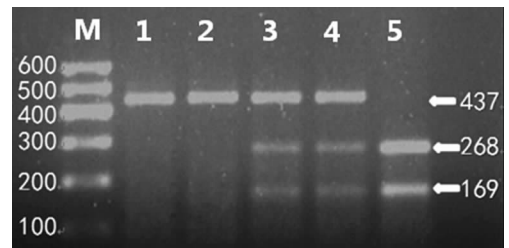
**1.3 统计学处理** 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,正态分布的计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,两样本均数间的比较用  $t$  检验,TG 水平不符合正态分布,采用中位数及四分位间距表示,采用非参数检验;计数资料比较用  $\chi^2$  检验。所有基因型的 Hardy-Weinberg 平衡采用频数分布拟优合度的  $\chi^2$  检验;不同基因型间血脂水平比较用协方差分析(ANCOVA);用多重线性回归分析基因型及性别、年龄、血压、血糖、饮酒、吸烟等环境因素与血脂水平和 BMI 的关系,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般情况比较** 男性具有较高的 BMI、腰围、收缩压、舒张压、TC、TG、LDL-C、ApoB 水平和较低的 HDL-C 水平( $P<0.05$ )。两组间年龄、血糖和 ApoA-I 水平差异无统计学意义,男性中吸烟和饮酒比例明显高于女性( $P<0.05$ )。见表 1。

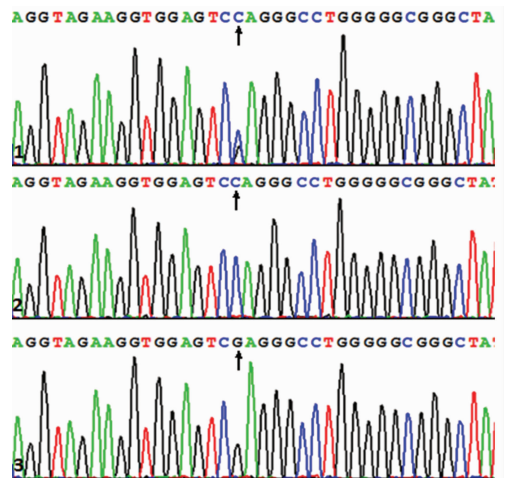
**2.2 电泳结果** NPC1L1 基因 rs2072183 多态性的突变电泳图谱,1 条带(437 bp)为突变纯合子,2 条带(169、268 bp)为野生纯合子,3 条带(437、169、268 bp)为杂合子。测序证实,见

图 1、2。



M:100 bp Marker Ladder;1,2:GG 基因型(437 bp);3,4:GC 基因型(437、169、268 bp);5:CC 基因型(169、268 bp)。

图 1 PCR 产物酶切后电泳结果



1:GC 基因型;2:CC 基因型;3:CG 基因型。

图 2 3 种基因型测序图

表 2 不同基因型各项指标的比较( $\bar{x} \pm s$ )

基因型	<i>n</i>	TC (mmol/L)	TG [M(QR <sub>2</sub> ), mmol/L]	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	ApoA-I (g/L)	ApoB (g/L)	BMI(kg/m <sup>2</sup> )
CC	161	4.88±0.94	1.07(0.90)	1.70±0.40	2.73±0.75	1.34±0.25	0.82±0.19	22.21±3.71
CG	188	5.07±1.12	1.07(0.79)	1.77±0.62	2.99±0.87	1.34±0.26	0.87±0.19	22.10±2.87
GG	60	5.13±1.05	0.99(1.35)	1.69±0.46	3.11±1.03	1.30±0.23	0.89±0.21	23.39±3.49
<i>F</i>		1.501	0.280	1.167	4.678	0.358	3.917	3.312
<i>P</i>		0.224	0.869	0.312	0.010	0.699	0.021	0.037

**2.3 基因分布** NPC1L1 基因 rs2072183 多态性在广西汉族人群中的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。409 例研究对象中 CC、CG、GG 基因型的分布频率为 39.40%、46.00%、14.60%，C 和 G 等位基因频率分别为 62.35% 和 37.65%。男女之间基因型分布差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.4 NPC1L1 基因型与血脂水平和 BMI 的关系** 3 种基因型间 LDL-C、ApoB 和 BMI 水平存在显著差异。G 等位基因携带者具有较高的 LDL-C 和 ApoB 水平，CC 和 CG/GG 组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。GG 基因型具有较高的 BMI，但 G 等位基因携带组与 CC 组比较，BMI 差异无统计学意义( $P>0.05$ )，见表 2。

**2.5 血脂和 BMI 相关因素分析** 多元线性回归分析显示血脂和 BMI 与多种环境因素有着密切关系( $P<0.05$ )，仅 LDL-C 及 ApoB 水平与基因型有相关性( $P<0.05$ )。BMI 未发现与基因型有相关性，见表 3。

表 3 血脂和 BMI 相关因素分析

血脂谱	<i>B</i>	<i>SE</i>	$\beta$	<i>t</i>	<i>P</i>
<b>TC</b>					
舒张压	0.014	0.005	0.144	2.865	<0.05
腰围	0.023	0.006	0.171	3.527	<0.05
年龄	0.011	0.003	0.164	3.367	<0.05
饮酒	0.163	0.054	0.143	2.016	<0.05
<b>TG</b>					
腰围	0.069	0.013	0.258	5.342	<0.05
吸烟	0.354	0.105	0.158	3.388	<0.05
舒张压	0.019	0.009	0.100	2.076	<0.05
血糖	0.104	0.050	0.096	2.072	<0.05
<b>HDL-C</b>					
腰围	-0.013	0.003	-0.200	-4.118	<0.05
<b>LDL-C</b>					
腰围	0.021	0.005	0.193	4.071	<0.05
年龄	0.011	0.003	0.197	4.190	<0.05
基因型	-0.165	0.059	-0.132	-0.789	<0.05
<b>ApoA-I</b>					
饮酒	0.080	0.013	0.284	5.894	<0.05
腰围	-0.004	0.002	-0.133	2.753	<0.05
<b>ApoB</b>					

续表 3 血脂和 BMI 相关因素分析

血脂谱	<i>B</i>	<i>SE</i>	Standard coefficient	<i>t</i>	<i>P</i>
腰围	0.008	0.001	0.306	6.636	<0.05
收缩压	0.002	0.000	0.157	3.426	<0.05
血糖	0.014	0.005	0.133	3.013	<0.05
性别	-0.055	0.019	-0.134	-2.887	<0.05
基因型	-0.026	0.013	-0.091	-2.056	<0.05
<b>BMI</b>					
腰围	0.288	0.015	0.678	18.299	<0.05
血糖	-0.130	0.063	-0.076	-2.076	<0.05

3 讨论

NPC1L1 蛋白作为依泽麦布的作用靶点，调节肠腔内胆固醇的吸收而为人熟知。NPC1L1 蛋白主要分布于小肠上皮细胞的刷状缘和肝细胞内，在结构上具有 13 个跨细胞膜区和固醇感知区域<sup>[13]</sup>。NPC1L1 基因定位于染色体 7p133，包括 20 个外显子，19 个内含子<sup>[13]</sup>。研究发现，该基因单核苷酸基因多态性(SNP)影响胆固醇的吸收及血脂水平。1 735 C>G 多态性位于第 2 外显子的编码区，关于其多态性分布特征，以及是否与血脂水平和肥胖相关的研究较少。

本研究发现，中国广西汉族人群 G 等位基因频率为 37.65%，GG、GC 和 CC 基因型频率分别为 14.60%、46.00% 和 39.40%，男女之间等位基因分布无差异。广西汉族 G 等位基因和 GG 基因型频率与台湾人群的 35.7%、10.71% 和上海地区汉族人群的 37.3%、12.6% 非常相似<sup>[7,14]</sup>，但均低于日本人群的 41.90% 和 19.01%<sup>[9]</sup>。与欧美人群比较<sup>[11]</sup>，在高加索白人、美籍黑人和西班牙人群中，突变基因 G 频率分别为 21.9%、28.3% 和 17.9%，明显低于亚洲人群。这提示 G 等位基因的突变具有显著的种族差异性。

Teslovich 等<sup>[15]</sup> 进行的多中心的 GWAS 研究发现 NPC1L1 基因变异与血脂代谢显著相关，rs2072183 多态性对血清 TC 和 LDL-C 水平有着重要影响。本研究显示 rs2072183 多态性不仅对血脂水平，而且对 BMI 也有着重要影响。G 等位基因携带者的血清 LDL-C 和 ApoB 水平显著高于 CC 基因型组( $P<0.05$ )，多元线性回归分析亦表明 LDL-C 和 ApoB 和基因型有相关性。这和 Polisecki 等<sup>[8]</sup> 在欧洲老年人中的研究结果一致，但却和在其他亚裔人群的研究结果有所不同。Maeda 等<sup>[9]</sup> 在日本人群的研究显示突变基因 G 对血清 TC、HDL-C、LDL-C 和 ApoB 水平无显著性影响，但 GG 可升高菜油甾醇(胆固醇吸收的标志)的水平，提示 G 等位基因可

增加肠腔内胆固醇的吸收,从而增加动脉粥样硬化的风险。Zhao 等<sup>[5]</sup>研究发现基因 1 735 C>G 多态性位点尚通过形成单倍体影响血脂水平,比如单体型-18A-1735C-U328650A>G 较其他单型型的血清 LDL-C 基础水平低 1.8 mg/dL。综上可见,NPC1L1 基因 1 735 C>G 多态性对血脂代谢有着重要影响,携带突变等位基因 G 的人群可能有着较高的血脂水平,但在不同种族中其对血脂谱的影响不同。多因素分析显示多种环境因素与血脂谱相关,这种差异性也可能与环境因素或环境-基因相互作用对血脂谱的影响有关。

研究显示 NPC1L1 基因敲除小鼠可避免肥胖<sup>[16]</sup>,但研究未得到一致结果<sup>[17]</sup>。BMI 作为肥胖的重要衡量指标,本研究表明,3 种基因型间 BMI 水平差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且 GG 基因有着较高的 BMI 水平。但合并 GG/GC 后这种差异性消失,多元回归分析亦未发现相关性。该结果提示 NPC1L1 基因 1 735 C>G 多态性可能影响肥胖的发生,但其是否为肥胖易感基因或是通过增加胆固醇的吸收而影响有待进一步研究。

不可否认,本研究存在一定局限性。(1)本研究共入选了 409 例某一地区汉族人群,样本量小、单一,尚需在大样本、不同种族人群中进行验证。(2)本研究仅探讨了 NPC1L1 基因单个多态位点与血脂谱和 BMI 的关系。由于单个位点的微小性,以及基因-基因和基因-环境因素的相互影响,可能导致与其他结果的不一致,尚需进一步研究多个位点进行关联分析。(3)进一步开展机制和功能方面的研究。

本研究发现,NPC1L1 基因 1 735 C>G 多态性在中国汉族人群中广泛存在,具有显著的种族差异性。该基因突变位点 G 可能是高 LDL-C 水平和肥胖的一个危险因素。

## 参考文献

- [1] European Association for Cardiovascular Prevention, Rehabilitation, Reiner Z, et al. ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias; the task force for the management of dyslipidaemias of the European society of cardiology and the European atherosclerosis society (EAS) [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(14): 1769-1818.
- [2] Li J, Wang L, Huang Z, et al. Study on the relationship between BMI and the risk of cardiovascular among Chinese adults [J]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2014, 35(9): 977-980.
- [3] Davis HR, Altmann SW. Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(7): 679-683.
- [4] Sané AT, Sinnott D, Delvin E, et al. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(10): 2112-2120.
- [5] Zhao HL, Houweling AH, Vanstone CA, et al. Genetic variation in ABC G5/G8 and NPC1L1 impact cholesterol response to plant sterols in hypercholesterolemic men [J]. *Lipids*, 2008, 43(12): 1155-1164.
- [6] Cohen JC, Pertsemlidis A, Fahmi S, et al. Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(6): 1810-1815.
- [7] Chen CW, Hwang JJ, Tsai CT, et al. The g. -762T>C polymorphism of the NPC1L1 gene is common in Chinese and contributes to a higher promoter activity and higher serum cholesterol levels [J]. *J Hum Gen*, 2009, 54(4): 242-247.
- [8] Polisecki E, Peter I, Simon JS, et al. Genetic variation at the NPC1L1 gene locus, plasma lipoproteins, and heart disease risk in the elderly [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(5): 1201-1207.
- [9] Maeda T, Honda A, Ishikawa T, et al. A SNP of NPC1L1 affects cholesterol absorption in Japanese [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17(4): 356-360.
- [10] Yamanashi Y, Takada T, Suzuki H. In-vitro characterization of the six clustered variants of NPC1L1 observed in cholesterol low absorbers [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2009, 19(11): 884-892.
- [11] Simon JS, Karnoub MC, Devlin DJ, et al. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment [J]. *Genomics*, 2005, 86(6): 648-656.
- [12] 范海荣, 夏永静, 孙福成, 等. 四种全血基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10(6): 535-536.
- [13] Jia L, Betters JL, Yu L. Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 239-259.
- [14] 苏秀秀, 汤静, 李珊珊, 等. NPC1L1 基因多态性与冠心病的关系 [J]. *内科理论与实践*, 2012, 7(5): 356-360.
- [15] Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids [J]. *Nature*, 2010, 466(737): 707-713.
- [16] Labonté ED, Camarota LM, Rojas JC, et al. Reduced absorption of saturated fatty acids and resistance to diet-induced obesity and diabetes by ezetimibe-treated and Npc1l1<sup>-/-</sup> mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(4): G776-783.
- [17] Davis J, Hoos LM, Tetzloff GA, et al. Deficiency of Niemann-Pick C1 like 1 prevents atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4): 841-849.

(收稿日期: 2015-02-20 修回日期: 2015-08-10)