

中国高脂血症急性胰腺炎患者中 APOA5 基因的致病性突变

中文摘要

研究目的

高脂血症性急性胰腺炎 (HLAP) 是急性胰腺炎 (AP) 中最严重的一种, 其发作的直接原因是严重的高甘油三酯血症, 究其根本在于脂质代谢相关的基因发生致病性突变引起的脂蛋白代谢异常。本研究的目的是探究多种脂质相关的基因突变在 HLAP 患者发生严重高甘油三酯血症中的作用, 尤其是不同的载脂蛋白 A5 (APOA5) 突变。

研究方法

将 163 名 HLAP 患者的全外显子组测序 (第二代基因测序技术) 结果与 30 名胆源性急性胰腺炎 (BAP) 患者的结果进行比对, 得出与 HLAP 患者的脂质代谢异常相关的基因突变。结合软件预测、数据库信息、残基在蛋白质的位置、残基保守性以及携带者的临床信息综合评估该突变的致病性。并且通过多种软件的模拟功能实现 APOA5 致病性突变的可视化以便更直观地观察残基侧链的改变。

研究结果

1. 与 BAP 患者相比, HLAP 患者中 APOA5 的致病性突变频繁发生 (52, 32% 对 1, 3%); 其中, p.G185C 的杂合突变最为常见。

2. 本研究发现的六种 APOA5 致病性突变 (p.S35N、p.D167V、p.G185C、p.K188I、p.R223C、p.H182fs) 与严重的高甘油三酯血症呈正相关, 并且它们均出现在载脂蛋白 A-V 的重要结构域中。其中, 残基 223 在多种哺乳动物中严格守序, 并且位于载脂蛋白 A-V 的脂蛋白脂肪酶 (LPL) 结合域。当残基 223 上的精氨酸突变为半胱氨酸时, 该残基的正电荷丢失, 对该结构域具有一定的破坏性。

3. 四个新的 APOA5 突变在本研究中被发现, 即 c.563A>T、c.667C>T、c.788G>A 和 c.544_545insGGTGC。

结论

APOA5 的致病性突变对于中国的 HLAP 患者所罹患的严重的高甘油三酯血症具有

The pathogenic mutations of APOA5 in Chinese patients with hyperlipidemic acute pancreatitis

Abstract

Background and aims:

Hyperlipidemic acute pancreatitis (HLAP) is the most severe form of acute pancreatitis (AP). The immediate cause of its attack is severe hypertriglyceridemia, which is rooted in abnormal lipoprotein metabolism caused by pathogenic mutations in lipid metabolism-related genes. The aim of this study was to investigate the role of multiple lipid-related gene mutations in the development of severe hypertriglyceridemia in patients with HLAP, especially different apolipoprotein A5 (APOA5) mutations.

Methods:

Whole-exome sequencing (second-generation gene sequencing technology) results from 163 HLAP patients were compared with those from 30 biliary acute pancreatitis (BAP) patients to derive genetic mutations associated with abnormal lipid metabolism in patients with HLAP. The pathogenicity of the mutation was assessed by combining software predictions, database information, residue location in the protein, residue conservation, and clinical information about the carrier. And the pathogenic mutations of APOA5 were visualized by the simulation function of various software to observe the alteration of residue side chains more clearly.

Results:

1. Pathogenic mutations in APOA5 were frequent in HLAP patients compared to BAP patients (52, 32% versus 1, 3%); among them, heterozygous mutations in p.G185C were the most common.

2. All six pathogenic mutations of APOA5 identified in this study (p.S35N, p.D167V, p.G185C, p.K188I, p.R223C, p.H182fs) were positively correlated with severe hypertriglyceridemia; they were all in the important domains of apolipoprotein A-V. Of these, residue 223 is strictly conserved in multiple mammals and is located in the lipoprotein lipase (LPL) binding domain of apolipoprotein A-V. When Arg 223 is mutated to Cys223, the positive charge of this residue is reduced, which is potentially destructive for this domain.

目 录

引 言	1
方 法	3
2.1 研究对象	3
2.2. 遗传学 and 数据分析	3
2.2.1. 全外显子组测序.....	3
2.2.2. APOA5 相关信息数据库.....	5
2.2.3. 软件分析突变的载脂蛋白 A-V 的蛋白质功能	5
2.2.4. 统计分析.....	6
结 果	7
3.1. 临床特征	7
3.2 突变特征和生物信息学预测	8
3.2.1. 脂质相关的突变基因的比较.....	8
3.2.2. APOA5 基因突变之间的比较.....	11
讨 论	19
结 论	23
参考文献	24
综 述	30
参考文献.....	40
攻读学位期间本人出版或公开发表的论文	51
致 谢	52

引 言

急性胰腺炎（AP）是一种常见的急腹症^[1]，主要有胆道结石、高甘油三酯血症和酗酒三大病因。虽然胰酶的异常激活导致胰腺和胰周组织的自我消化是 AP 的共同病理生理特征，但不同病因所导致的严重程度、并发症以及预后是具有明显差异的^[2-4]。多项研究已经证实，高脂血症性比其他病因引起的 AP 具有更严重的炎症反应，导致更多的并发症、更高的死亡率和复发率^[5-7]。

当血清甘油三酯（TG）浓度大于 1.7mmol/L 时，该患者被认为患有高甘油三酯血症（HTG）。当患有严重的 HTG（血清 TG 浓度 \geq 11.3mmol/L 时），有 15%到 20%的成人将发生高脂血症性急性胰腺炎（HLAP）^[8]。虽然在英国、美国、欧洲等西方国家，胆源性和酒精性是急性胰腺炎最为常见的病因，合计占发病率的 80%，高甘油三酯血症居于第三位^[9-12]。但在中国的部分地区，例如北京和四川南部，高甘油三酯血症已超过酒精性成为 AP 的第二大病因^[13-16]。根据一项从 2009 年 7 月至 2013 年 6 月在苏州和上海地区开展的大型回顾性研究，在就诊的 1073 位 AP 患者中胆源性的发病率最高（53.31%），其次是高脂血症（19.38%），酒精性仅占 9.69%^[15]。除外实验室检查、影像技术和医务人员诊断水平的进步导致的相对增加^[17]，中国 HLAP 发病率的上升主要原因是我国膳食结构的逐渐西方化。

Yvaine Ye 等人发现^[18]，从 1990 年到 2021 年，随着中国人均可支配收入增加了 130 多倍，中国农村地区的肉类消耗量增长了 2 倍多，城市地区增长了约 1.5 倍，并且碳水消耗量各减少了 35%和 4.5%。而人们从碳水中减少的能量摄入在脂肪上得到了补偿，这样的饮食结构与以美国为首的西方国家十分相似^[18]。这一改变很可能解释了中国人均血清甘油三酯水平的逐年上升^[19]。

随着研究者们对重度高甘油三酯血症病因的深入研究，一个统一的结论浮出水面，严重的高甘油三酯血症是基因突变、不健康的生活方式和基础疾病共同作用的结果，其中基因突变占主要部分^[20-22]。为探寻 HLAP 患者发病的根本原因，本研究旨在寻找哪些基因突变可能导致重度的 HTG 的发生。

在本研究中，与 BAP 患者相比，脂蛋白 A5（APOA5）的致病性突变在 HLAP 患者中最为常见。APOA5 是新发现的 APOA4/APOC3/APOA1 脂蛋白簇的成员，位于

11 号染色体长臂第二区第三带 (11q23)。其产物是由 366 个氨基酸残基组成的载脂蛋白 A-V^[23], 它在肝脏中产生, 主要存在于乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)和高密度脂蛋白(HDL)中, 血浆浓度在 20ng/mL 至 500ng/mL 之间。虽然载脂蛋白 A-V 在血液中的浓度较低, 但已被证明是人体血清甘油三酯的重要调节因子^[23]。并且 APOA5 的多态性具有很强的地域性和人种学特征, 例如, c.553G>T (rs2075291) 被发现在东亚地区流行和集中。2004 年, 当 APOA5 刚刚被发现时, Hubacek 等人在 83 例高脂血症和 420 例健康的高加索人中未发现 p.G185C 的身影^[24]。然而, Kao 和 Khovidhunkit 等人报告说, 这种变异在我国的台湾地区以及和泰国十分常见^[21, 25]。2011 年的一项对 527 例汉族和 406 例新疆维吾尔族健康受检者进行的 APOA5 c.553G>T 多态性检验进一步确立了 T 等位基因是高甘油三酯血症的危险因素^[26]。目前已有许多研究证实, 多种 APOA5 多态性与中国人的高甘油三酯血症呈正相关^[27-29]。本研究发现了几种与严重的高甘油三酯血症相关的新的 APOA5 致病性突变, 将这一观点向前推进了一步。

方 法

2.1 研究对象

本研究获得了苏州大学附属第二医院伦理委员会的批准（JD-LK-2021-001-01）。根据中国最新的 AP 诊断和治疗指南^[30]，本研究纳入了 2014 年 10 月 24 日至 2023 年 5 月 31 日在苏州大学附属第二医院就诊的共 163 例 HLAP 患者和 30 例胆源性胰腺炎（BAP）患者。

患者纳入标准：首先，所有患者必须满足两个条件：（1）符合 AP 三项诊断标准中的两项及以上：常向背部放射的持续性剧烈上腹痛，血清脂肪酶（或淀粉酶）至少是正常值上限的三倍，具有 AP 的特征性表现的 CECT（增强计算机断层扫描）或 MRI（磁共振成像）或经腹超声检查的影像学结果^[31-35]。（2）必须有在发病 48 小时内的实验室数据，包括白细胞计数、C-反应蛋白、血尿素氮、血清钙、血糖、TG 和血清胆固醇（TC）等。其次，HLAP 患者还需要满足 $TG \geq 11.3 \text{ mmol/L}$ ^[36]。BAP 患者需要满足：通过超声、CT 或 MRCP（磁共振胰胆管成像）或内镜检查明确胆道结石^[37]。患者排除标准：（1）资料不全；（2）确诊为慢性胰腺炎；（3）年龄小于 18 岁。

根据亚特兰大急性胰腺炎分类修订版^[38]，AP 的严重程度分为轻度（MAP）、中度严重（MSAP）和严重 AP（SAP）。

2.2. 遗传学和数据分析

2.2.1. 全外显子组测序

经过空腹过夜的患者的血液样本暂时保存在 0°C 的冰箱中（BCD-206WECX，长虹美菱股份有限公司，中国安徽）。在 24 小时内，血样必须经过离心机（TDL-60B；嘉鹏科技有限公司，中国上海）进行初步处理。离心后得到的底层血细胞被保存在 -80°C 的冷冻箱中（DW-86L938；浙江冰之星制冷电器有限公司）。使用 TIANamp 基因组 DNA 试剂盒（DP304-02；天正生物化学技术有限公司，中国北京）提取 DNA，并用紫外分光光度计（NanoDrop 2000；赛默飞世尔科技，中国上海）、Qubit 荧光仪（Q32857；生命科技，中国上海）和琼脂糖凝胶电泳检测提取出的 DNA 质量。合格的基因组 DNA 再经 Covaris 样品制备系统（S220；Covaris, Woburn, Massachusetts）

随机切割成 150bp 至 220bp 的片段。然后使用 Agilent SureSelect 人类全外显子试剂盒 (V6; Agilent Technologies, California, 美国) 构建和捕获基因文库。使用基因 DNA 测序仪 (NovaSeq6000; Illumina 科学仪器有限公司, 中国北京) 对基因文库进行测试, 合格后再进行双端测序。使用 fastp 程序^[39]对测序的原始数据进行质量控制, 去除一些质量差的读长 (reads, 比如测序错误, 长度小于 20 的读长等), 以获得清洁读长 (clean reads)。随后, 使用 BWA^[40]将清洁读长与参考基因组 GRCh37.p13 进行比较, 并将结果转换为 SAMtools^[41]格式, 使用 Picard 分析软件进行去冗余处理, 使用 Qualimap 软件分析检测到的变异信息。最后, 使用 GATK4^[42]对比较结果进行单核苷酸变异 (SNVs)、插入和缺失 (InDels) 检测 (由上海鹿鸣生物科技有限公司处理)。

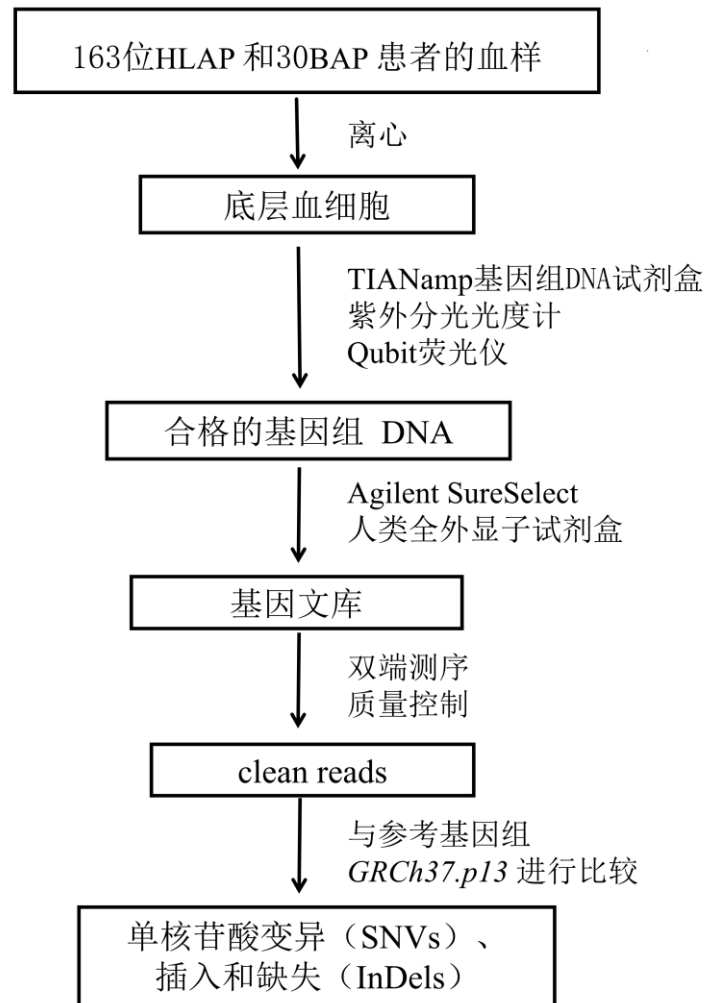


图 1. DNA 处理流程图

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/157045065155010041>