

فراوانی پلی‌مورفیسم C-482T در ژن آپولیپروتئین C3 در جمعیت تهرانی: مطالعه‌ی قند و لیپید تهران

شهلا شجاعی^۱، دکتر مریم‌السادات دانشپور^۱، دکتر سهراب حلال‌خور^۲، دکتر فریدون عزیزی^۳
دکتر مهدی هدایتی^۱

۱) مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، ۲) گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۳) مرکز تحقیقات غدد، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده مسئول: تهران، ولنجک، جنب بیمارستان آیت‌الله طالقانی، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، کدپستی: ۴۷۶۳-۱۹۳۹۵، دکتر مهدی هدایتی؛ e-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: آپولیپروتئین C3 به عنوان مهارکننده‌ی عمل لیپولیز شناخته شده است. این آپولیپروتئین مهار لیپولیز را به وسیله‌ی مهار هر دو آنزیم لیپوپروتئین‌لیپاز و لیپاز کبدی به عهده دارد و به این علت به عنوان یک عامل در هیپرتری‌گلیسریدمی سال‌هاست که مورد مطالعه قرار گرفته است. پلی‌مورفیسم C-482T در ناحیه‌ی پروموتور این ژن با هیپرتری‌گلیسریدمی و مقاومت به انسولین، از عوامل همراه با سندرم متابولیک، در ارتباط است. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی این پلی‌مورفیسم در جامعه‌ی ایرانی بود. **مواد و روش‌ها:** ۵۳۴ نفر از شرکت‌کنندگان در مطالعه‌ی قند و لیپید تهران به طور اتفاقی انتخاب شدند. یک قطعه‌ی ۲۳۱ جفت بازی از ژن مورد نظر با استفاده از روش PCR تکثیر شد سپس پلی‌مورفیسم مورد نظر با استفاده از روش RFLP با کمک آنزیم دارای اثر محدود Mspl مشخص شد. یافته‌ها: فراوانی آلل C در جمعیت مورد مطالعه ۰/۶۵۳ و فراوانی آلل T ۰/۳۴۷ بوده است. این فراوانی‌ها از قانون هاردی واینبرگ تبعیت می‌کند. نتیجه‌گیری: ژنوتیپ‌های مشاهده شده و فراوانی آلل‌ها مشابه گزارش‌های سایر افراد نژاد سفید بود. یافته‌های بدست آمده در این پژوهش مقدمه‌ای برای مطالعه‌ی عوامل ژنتیک تأثیرگذار در متابولیسم لیپیدها در جمعیت ایرانی است.

واژگان کلیدی: آپولیپروتئین C₃، پلی‌مورفیسم واینبرگ، فراوانی

دریافت مقاله: ۸۸/۶/۱۸ - دریافت اصلاحیه: ۸۸/۱۰/۱۶ - پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۲۱

مقدمه

آپولیپروتئین C₃ (APOC3) پروتئین سرمی است شامل ۷۹ اسیدامینه با وزن مولکولی ۸/۸ کیلودالتون که در کبد و در مقادیر کمتر در روده ساخته می‌شود. APOC3 که از مدت‌ها پیش به عنوان مهارکننده‌ی عمل لیپولیز شناخته شده است، در لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL)، لیپوپروتئین با

دانسیته بسیار کم (VLDL) و شیلومیکرون یافت شده است، اما به طور اولیه توسط HDL حمل می‌شود. این آپولیپروتئین وظیفه‌ی مهار لیپولیز VLDL را به وسیله‌ی مهار هر دو آنزیم لیپوپروتئین‌لیپاز و لیپاز کبدی به عهده دارد. همچنین، APOC3 در اتصال لیپوپروتئین به گلیکوزآمین روی غشای سلول نقش دارد.^۱ به علت نقشی که APOC3 در مهار لیپولیز دارد به عنوان یک عامل در هیپر-

تری‌گلیسریدی سال‌ها است که مورد مطالعه قرار گرفته - است و به عنوان یک مارکر لیپوپروتئین‌های غنی از تری‌لیپرید شناخته شده‌است.^{۲-۱۰} پژوهش‌هایی درباره‌ی ژن این آپولیپوپروتئین و پلی‌مورفیسم‌های آن انجام شده که، ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها از جمله پلی‌مورفیسم‌های نادر این ژن مانند $482C>T$ ، $455T>C$ و $3238G>T$ با افزایش غلظت تری‌گلیسرید سرم در جمعیت‌های مختلف انسانی گزارش کرده‌اند.^{۱۱-۱۳} پلی‌مورفیسم $482C>T$ واقع در پروموتور ژن APOC3 به تکرار گزارش شده است که با غلظت تری‌گلیسرید سرم همراه بوده است.^{۸،۱۴} فراوانی پلی‌مورفیسم $482C>T$ در جمعیت‌های مختلفی بررسی شده‌است،^{۸،۹،۱۵،۱۶،۱۸} عنوان نمونه، میانگین فراوانی آلی در مطالعه‌های انجام شده در جمعیت چینی، فراوانی آل T را ۰/۴۹۵ گزارش شده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر تعیین فراوانی این پلی‌مورفیسم در جمعیت مورد بررسی در مطالعه‌ی بزرگ قند و لیپید تهران بود.

مواد و روش‌ها

جامعه‌ی مورد بررسی از مطالعه‌ی قند و لیپید تهران انتخاب شد. مطالعه‌ی قند و لیپید تهران، بررسی آینده‌نگری است که طی چهار مرحله به منظور بررسی عوامل خطر ساز بیماری‌های غیرواگیر در ۱۵۰۰۵ نفر از جمعیت تهران انجام شده است.^{۱۷} نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه از میان همه‌ی افراد مراجعه‌کننده به واحد بررسی قند و لیپید مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز واقع در شرق تهران تا پایان فاز دوم مطالعه که شامل مردان و زنان غیرحامله‌ی ایرانی با سن ۳ سال به بالا بودند، انتخاب شدند. دو نمونه‌ی خون محیطی، لخته و دارای ضد انعقاد EDTA از مراجعه‌کنندگان گرفته شد. برای مطالعه‌ی پلی‌مورفیسم ApoC3، با توجه به فراوانی آل‌ها در جمعیت‌های دیگر، تعداد ۵۳۴ نمونه به طور تصادفی با نرم افزار SPSS انتخاب شدند. ۵ میلی‌لیتر از خون محیطی این افراد گرفته و در لوله دارای ضد انعقاد EDTA به آزمایشگاه بیولوژی ملکولی مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز برای آماده‌سازی ارجاع شد.

برای استخراج DNA ژنوم ابتدا نمونه‌ها توسط Lysis Buffer^۱ و بافر PBS شسته و گلبول‌های قرمز از

محیط حذف شدند و سپس DNA افراد شرکت‌کننده با روش Salting out پروتئیناز کا استخراج شد و نمونه‌هایی که میزان خلوص DNA استخراج شده‌ی آن‌ها ($1.6 \leq A260/A280 < 2.0$) بود، به مطالعه وارد شدند. تکثیر قطعه‌ی مورد نظر با استفاده از روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمران) و به دنبال آن تعیین پلی‌مورفیسم به روش RFLP با استفاده از آنزیم دارای اثر محدود MspI (تهیه شده از شرکت Fermentas) انجام شد. برای تکثیر قطعه‌ی APOC3 C-482T هر مخلوط PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: dNTPs mix (0.2mM) و 10X PCR Taq DNA Polymerase (1U) buffer MgCl₂ (1.5mM) 5'GGA TTG AAA CCC AGA GAT پرایمرهای رفت 5'GGA TTG AAA CCC AGA GAT و برگشت 3'GGA GGT G3' CTG GAA TTT CAG GCC3' (تهیه شده از شرکت زیست فناوری کوثر) استفاده شد که با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ساخت کارخانه‌های بید انگلستان) به تکثیر یک قطعه به طول ۲۲۱ جفت باز منجر شد. شرایط دمایی سایکلر پس از بهینه سازی شامل موارد زیر بود: (۱) مرحله‌ی Denaturation ابتدایی، ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (یک سیکل)، (۲) مرحله‌ی Denaturation ۱۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، (۳) مرحله‌ی annealing ۲۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، (۴) مرحله‌ی extension ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (مراحل ۲ تا ۴، ۳۰ سیکل تکرار شد و (۵) مرحله‌ی extension نهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (یک سیکل). کنترل درستی تکثیر PCR با استفاده از کنترل‌های مثبت و منفی و با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های تکثیر شده با استفاده ۳ واحد از آنزیم دارای اثر محدود MspI به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت. قطعه‌های حاصل از هضم با الکتروفورز روی ژل آگارز ۳٪ از یکدیگر جدا شدند که در صورت حضور آل T دو قطعه‌ی ۱۶۳ و ۶۸ جفت بازی و در صورت حضور آل C، سه قطعه‌ی ۱۴۷ و ۶۸ و ۱۶ جفت بازی از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۱).

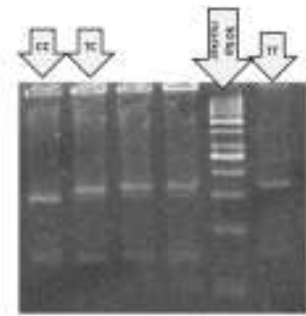
داده‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد و متغیرهای کیفی به صورت درصد بیان شدند. در این مطالعه، فراوانی هر آل با توجه به یافته‌های آزمون‌های مولکولی محاسبه شد و درستی تعادل با استفاده از فرمول هاردی-

i - Tris-HCl 10mmol/L, MgCl₂ 5mmol/L, Triton X 1% pH 7.6

یافته‌ها

پس از تقسیم‌بندی افراد به چهار گروه سنی کمتر از ۲۰ سال، ۲۱ تا ۴۰ سال، ۴۱ تا ۶۰ سال و بیش از ۶۰ سال، تعداد و درصد فراوانی هر یک از آلل‌ها در افراد شرکت‌کننده در این مطالعه، در چهار گروه سنی به تفکیک جنس در جدول ۱ آورده شد. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود فراوانی آلل T در جمعیت مردان ۰/۳۴۱ بود در حالی که در جمعیت زنان این عدد ۰/۳۵۲. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. فراوانی آلل‌های این پلی مورفیسیم در جمعیت مورد بررسی از قانون هاردی واینبرگ تبعیت کرد. فراوانی آلل‌ها در کل افراد مورد بررسی عبارت بود از: فراوانی آلل C، ۰/۶۵۳ و فراوانی آلل T، ۰/۳۴۷.

واینبرگ محاسبه شد. مطابق این قانون، در صورتی که $p^2+q^2+2pq=(p+q)^2=1$ باشد، جامعه متعادل است.



شکل ۱- تصویر ژل حاصل از RFLP در پلی مورفیسیم -
The allele frequency of 482C > T

جدول ۱- درصد فنوتیپ‌های آپولیپوپروتئین C3 به تفکیک جنس و گروه‌های سنی در جمعیت مورد بررسی

گروه‌های سنی	مرد			زن		
	TT	CC	TC	TT	CC	TC
۲۰ سال و کمتر	۱۶/۷	۲۷/۹	۴۵/۵	۱۴/۳	۳۲/۱	۵۳/۶
۲۱-۴۰	۱۰/۸	۴۰/۰	۴۹/۲	۱۲/۳	۴۱/۰	۴۶/۷
۴۱-۶۰	۱۳/۱	۵۰/۸	۳۶/۱	۱۳/۶	۴۸/۱	۳۸/۳
۶۱ سال و بیشتر	۵/۳	۵۰/۰	۴۴/۷	۱۱/۱	۴۸/۹	۴۰/۰

جدول ۲- فراوانی نسبی آلل‌های آپولیپوپروتئین C3 در جمعیت‌های مختلف

جمعیت مورد بررسی	فراوانی نسبی آلل‌های آپولیپوپروتئین C3		تعداد نمونه‌ها
	T	C	
(۱۸) چینی‌ها	۰/۴۴۰	۰/۵۶۰	۶۲۹
(۹) چینی‌ها	۰/۵۵۰	۰/۴۵۰	۳۹۰
(۱۴) فرانسوی‌ها	۰/۲۶۰	۰/۷۴۰	۸۹۸
(۸) کاستاریایی‌ها	۰/۴۰۲	۰/۵۹۸	۳۴۰۶
ایرانی‌ها (مطالعه‌ی حاضر)	۰/۳۴۷	۰/۶۵۳	۵۳۴

آن می‌تواند یکی از ژن‌های انتخابی برای بررسی متابولیسم چربی‌ها و اثر آن بر بیماری‌های مرتبط با متابولیسم چربی‌ها مانند چاقی و بیماری‌های قلبی-عروقی باشد. مطالعه‌های مختلف نشان داده است که حاملان آلل T با کاهش در غلظت آپولیپوپروتئین C3 کمتر قادر به مهار لیپوپروتئین‌لیپاز و لیپاز کبدی است و از این طریق،

بحث

مطالعه‌ی حاضر، فراوانی پلی مورفیسیم C-482T را در ژن آپولیپوپروتئین C3 در چهار گروه سنی در جمعیت قند و لیپید تهران بررسی نمود. از آنجا که آپولیپوپروتئین C3 یکی از پروتئین‌های کلیدی در متابولیسم چربی‌ها است، ژن

آن با افزایش میزان تری‌گلیسرید و کاهش HDL-C که خود از عوامل زمینه‌ساز بیماری‌های قلبی-عروقی است، ممکن است یکی از عوامل شیوع بالای بیماری‌های قلبی-عروقی در ایران فراوانی بالای این پلی‌مورفیسم باشد. برای آزمون این نظریه مطالعه‌های بیشتری همراه با اندازه‌گیری پروفایل لیپیدها و بررسی سابقه‌ی بیماری‌های قلبی-عروقی افراد، لازم است.

تری‌گلیسرید سرم در آن‌ها افزایش می‌یابد در حالی که با کاهش HDL-C مواجه می‌شوند.^{۲-۹} فراوانی آلل T در این مطالعه از فراوانی گزارش شده در جمعیت سفیدپوستان فرانسوی بیشتر اما از فراوانی گزارش شده در جمعیت‌های چینی و آمریکای مرکزی در کاستاریکا کمتر بود (جدول ۲). با توجه به شیوع بالای این پلی‌مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه و با در نظر گرفتن همراهی‌های گزارش شده

References

- Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 472-84.
- Olivieri O, Bassi A, Stranieri C, Trabetti E, Martinelli N, Pizzolo F, et al. Apolipoprotein C-III, metabolic syndrome, and risk of coronary artery disease. *J Lipid Res* 2003; 44: 2374-81.
- Miller M, Rhyne J, Chen H, Beach V, Ericson R, Luthra K, et al. APOC3 promoter polymorphisms C-482T and T-455C are associated with the metabolic syndrome. *Arch Med Res* 2007; 38: 444-51.
- Van der Ham RL, Alizadeh Dehnavi R, Berbée JF, Putter H, de Roos A, Romijn JA, et al. Plasma apolipoprotein CI and CIII levels are associated with increased plasma triglyceride levels and decreased fat mass in men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2009; 32: 184-6.
- Russo GT, Meigs JB, Cupples LA, Demissie S, Otvos JD, Wilson PW, et al. Association of the Sst-I polymorphism at the APOC3 gene locus with variations in lipid levels, lipoprotein subclass profiles and coronary heart disease risk: the Framingham offspring study. *Atherosclerosis* 2001; 158:173-81.
- Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 297-304.
- Gangabadage CS, Zdunek J, Tessari M, Nilsson S, Olivecrona G, Wijmenga SS. Structure and dynamics of human apolipoprotein CIII. *J Biol Chem* 2008; 283: 17416-27.
- Ruiz- Narváez EA, Yang Y, Nakanishi Y, Kirchdorfer J, Campos H. APOC3/A5 haplotypes, lipid levels, and risk of myocardial infarction in the Central Valley of Costa Rica. *J Lipid Res* 2005; 46: 2605-13.
- Li GP, Wang JY, Yan SK, Chen BS, Xue H, Wu G. Genetic effect of two polymorphisms in the apolipoprotein A5 gene and apolipoprotein C3 gene on serum lipids and lipoproteins levels in a Chinese population. *Clin Genet* 2004; 65:470-6.
- Baum L, Ng MC, So WY, Lam VK, Wang Y, Poon E, et al. Effect of hepatic lipase -514C->T polymorphism and its interactions with apolipoprotein C3 -482C->T and apolipoprotein E exon 4 polymorphisms on the risk of nephropathy in chinese type 2 diabetic Patients. *Diabetes Care* 2005; 28: 1704-9.
- Smith RC, Segman RH, Golcer-Dubner T, Pavlov V, Lerer B. Allelic variation in ApoC3, ApoA5 and LPL genes and first and second generation antipsychotic effects on serum lipids in patients with schizophrenia. *Pharmacogenomics J* 2008; 8: 228-36.
- Surguchov AP, Page GP, Smith L, Patsch W, Boerwinkle E. Polymorphic markers in apolipoprotein C-III gene flanking regions and hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 941-7.
- Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TW. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 2001; 157:1-11.
- Olivier M, Wang X, Cole R, Gau B, Kim J, Rubin EM, et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. *Genomics* 2004; 83: 912-23.
- Muendlein A, Saely CH, Marte T, Schmid F, Koch L, Rein P, et al. Synergistic effects of the apolipoprotein E epsilon3/epsilon2/epsilon4, the cholesteryl ester transfer protein TaqIB, and the apolipoprotein C3 -482 C>T polymorphisms on their association with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008; 199: 179-86.
- Bonnet E, Bernard J, Fauvel J, Massip P, Ruidavets JB, Perret B. Association of APOC3 polymorphisms with both dyslipidemia and lipoatrophy in HAART-receiving patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; 24: 169-71.
- Azizi F, Emami H, Salehi P, Ghanbarian A, Mirmiran P, Mirbolooki M, et al. Cardiovascular risk factors in the elderly: the Tehran Lipid and Glucose Study. *J Cardiovasc Risk* 2003; 10:65-73.
- Bi N, Yan SK, Li GP, Yin ZN, Chen BS. A single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and alters triglyceride metabolism in Chinese. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 280-6.

Original Article

Allele Frequency of C-482T Polymorphism in Apolipoprotein CIII Gene in a Tehranian Population: Tehran Lipid and Glucose Study

Shojaei S¹, Daneshpour M¹, Halalkhor S², Azizi F³, Hedayati M¹

¹Obesity Research Center, Research Institute For Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, ²Department of Internal Medicine, Babol University of Medical Sciences, ³Endocrine Research Center, Research Institute For Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

e-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

Received: 9/9/2009 Accepted: 11/1/2010

Abstract

Introduction: Apoc3, an apolipoprotein, is well known as a lipolysis inhibitor. It inhibits lipolysis by both HP and LPL activity inhibition and has been studied as a factor for hypertriglyceridemia for years. C-482T polymorphism in apoc3 gene promoter has associated with hypertriglyceridemia and insulin resistance, factors associated with the metabolic syndrome association factors. **Materials & Methods:** Subjects were randomly selected from the Tehran Lipid and Glucose Study. A 231 bp segment of the mentioned gene was amplified by PCR and the polymorphism revealed by RFLP using the MspI restriction enzyme. **Results:** Allele frequencies obtained for APOC3 -482C and -482T polymorphisms were 0.653 and 0.347 respectively. Genotype frequencies were in conformity with the Hardy-Weinberg expectation. **Conclusion:** The observed genotype and allele frequencies were similar to those reported for other Caucasians samples. The data generated from this study will be of importance in the context of ongoing studies concerning the factors that influence lipid levels in Iranian populations.

Keywords: Apolipoprotein C₃, Polymorphism, Frequency