مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی دوازدهم، شماره‌ی ۲، صفحه‌های ۱۸۰ ـ ۱۷۷ (تیر ۱۳۸۹)

مقاله‌ی پژوهشی

فراوانی پلی‌مورفیسم C-482T در ژن آپولیپوپروتئین 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 ـ درمانی شهید بهشتی، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده مسئول**: تهران، ولنجک، جنب بیمارستان آیتا... طالقانی، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، کدپستی:۴۷۶۳-۱۹۳۹۵، دکتر مهدی هدایتی؛ e-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: آپولیپوپروتئین C3 به عنوان مهارکننده‌ی عمل لیپولیز شناخته شده است. این آپولیپوپروتئین 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 سال‌ها است که مورد مطالعه قرار گرفته است. پلی‌مورفیسم C-482T در ناحیه‌ی پروموتر 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 MspI 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: آپولیپوپروتئین C_3، پلی‌مورفیسم واینبرگ، فراوانی
دریافت مقاله: ۸۸/۶/۱۸ ـ دریافت اصلاحیه: ۸۸/۱۰/۱۶ ـ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۲۱

مقدمه

آپولیپوپروتئین C_3 (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 آپولیپوپروتئین وظیفه‌ی مهار لیپولیز VLDL را به وسیله‌ی مهار هر دو آنزیم لیپوپروتئین لیپاز 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-

Archive of SID
www.SID.ir

تری‌گلیسریدمی سال‌ها است که مورد مطالعه قرار گرفته - است و به عنوان یک مارکر لیپوپروتئین‌های غنی از تری‌لیسرید 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 پروموتر 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 آللی در مطالعه‌های انجام شده در جمعیت چینی، فراوانی آلل 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 خطرساز 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 آلل‌ها 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[i] 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≤ A260/A280<2.0) بود، به مطالعه وارد شدند. تکثیر قطعه‌ی مورد نظر با استفاده از روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) 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) با پرایمرهای رفت 5'GGA TTG AAA CCC AGA GAT GGA GGT G3' و برگشت CTG GAA TTT CAG GCC3' 5' TC ACA (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 ۲۳۱ 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 درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴) مرحله‌ی extention ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (مراحل ۲ تا ۴ ، ۳۰ سیکل تکرار شد و ۵) مرحله‌ی extention نهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی 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 درجه‌ی سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت. قطعه‌های حاصل از هضم با الکتروفورز روی ژل آگارز ۳٪ از یکدیگر جدا شدند که در صورت حضور آلل T دو قطعه‌ی ۱۶۳ و ۶۸ جفت بازی و در صورت حضور آلل C، سه قطعه‌ی ۱۴۷ و ۶۸ و ۱۶ جفت بازی از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۱).

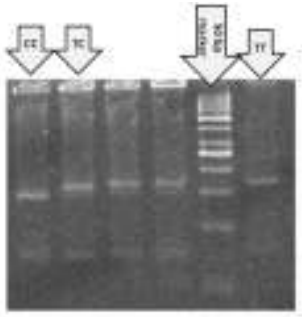
داده‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد و متغیرهای کیفی به صورت درصد بیان شدند. در این مطالعه، فراوانی هر آلل با توجه به یافته‌های آزمون‌های مولکولی محاسبه شد و درستی تعادل با استفاده از فرمول هاردی–

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

Archive of SID

www.SID.ir

واینبرگ محاسبه شد. مطابق این قانون، در صورتی که p2+q2+2pq=(p+q) 2=1 باشد، جامعه متعادل است.



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

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 پلی‌مورفیسم در جمعیت مورد بررسی از قانون هاردی‌واینبرگ تبعیت کرد. فراوانی آلل‌ها در کل افراد مورد بررسی عبارت بود از : فراوانی آلل C، ۰/۶۵۳ و فراوانی آللT، ۰/۳۴۷ .

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	۳۷/۹	۴۵/۵	۱۴/۳	۳۲/۱	۵۳/۶
۴۰-۲۱	۱۰/۸	۴۰/۰	۴۹/۲	۱۲/۳	۴۱/۰	۴۶/۷
۶۰-۴۱	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	تعداد نمونه‌ها	فراوانی نسبی آلل‌های آپولیپوپروتئین C3	
		C	T
(18) چینی‌ها	۶۲۹	۰/۵۶۰	۰/۴۴۰
(9) چینی‌ها	۳۹۰	۰/۴۵۰	۰/۵۵۰
(14) فرانسوی‌ها	۸۹۸	۰/۷۴۰	۰/۲۶۰
(8) کاستاریایی‌ها	۳۴۰۶	۰/۵۹۸	۰/۴۰۲
ایرانی‌ها (مطالعه‌ی حاضر)	۵۳۴	۰/۶۵۳	۰/۳۴۷

بحث

مطالعه‌ی حاضر، فراوانی پلی‌مورفیسم 482C>T- 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 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،

Archive of SID

www.SID.ir

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 (جدول۲).

با توجه به شیوع بالای این پلی‌مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه و با در نظر گرفتن همراهی‌های گزارش شده 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.

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. Curr Opin Lipidol 2001; 12: 297-304.
7. Gangabadage CS, Zdunek J, Tessari M, Nilsson S, Olivecrona G, Wijmenga SS. Structure and dynamics of human apolipoprotein CIII. J Biol Chem 2008; 20: 283: 17416-27.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Surguchov AP, Page GP, Smith L, Patsch W, Boerwinkle E. Polymorphic markers in apolip-oprotein C-III gene flanking regions and hypertriglyceridemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 941-7.
13. Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TW. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. Atherosclerosis 2001; 157:1-11.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

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

Shojaee S[1], Daneshpour M[1], Halalkhor S[2], Azizi F[3], Hedayati M[1]

[1]Obesity Research Center, Research Institute For Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, [2]Department of Internal Medicine, Babol University of Medical Sciences, [3]Endocrine 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 C_3, Polymorphism, Frequency

Archive of SID

www.SID.ir