ارتباط پلی‌مورفیسم D442G ژن کلسترول استر ترانسفر پروتیین با الگوی لیپیدی و فعالیت CETP در بیماران هیپرکلسترولمی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۹/۲۲

عسگر برخورداری،[۲] تقی حسن‌زاده[۲و۱*] مسعود سعیدی جم،[۱] رسول اسماعیلی،[۳] مکس پائولی[۴]

۱- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی
۲- گروه بیوشیمی و تغذیه
۳- کمیته تحقیقات دانشجویی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، دانشکده پزشکی

۴- مرکز علوم بیوملکولی، دانشکده داروسازی، دانشگاه ناتینگهام، بریتانیا

* نویسنده مسئول: همدان، خیابان شهید فهمیده، روبه‌روی پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی تلفن: ۰۸۱۱-۸۳۸۰۴۶۲
E-mail: hzadeht@yahoo.ca

چکیده

زمینه و هدف: هیپرکلسترولمی یک فاکتور خطر اصلی برای بیماری‌های قلبی عروقی، آترواسکلروز و پانکراتیت می‌باشد. پلی‌مورفیسم‌های ژن کلسترول استر ترانسفر پروتیین می‌تواند با تغییراتی در میزان لیپیدها همراه باشد. در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم D442G ژن کلسترول استر ترانسفر پروتیین (CETP) را با الگوی لیپیدی و فعالیت CETP در بیماران هیپرکلسترولمی و گروه شاهد بررسی نمودیم. ***روش بررسی:*** در یک مطالعه مورد- شاهدی تعداد ۱۰۲ بیمار مبتلا به هیپرکلسترولمی و ۲۰۰ فرد سالم انتخاب شدند. قطعات ژنی واجد تغییرات ژنتیکی با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر و ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم D442G با تکنیک Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) و در حضور آنزیم MSP1 شناسایی گردید. فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها تعیین گردید. فعالیت CETP به‌وسیله کیت و طبق روش استاندارد فلوریمتر و پارامترهای لیپیدی نیز توسط کیت‌های بیوشیمیایی و به روش آنزیمی اندازه‌گیری گردید. ***یافته‌ها:*** نتایج ما نشان می‌دهد که فعالیت CETP در گروه بیمار به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۵). فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین دو گروه شاهد و بیمار اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (در گروه کنترل: ۹۶٪ DD، ۴٪ DG و GG صفر درصد و در گروه بیمار: ۸۶٪ DD، ۱۰٪ DG و ۴٪ GG) (P>۰/۰۵). در هر دو گروه کنترل و بیمار، افراد واجد آلل G (GG و DG) در مقایسه با سایر افراد، کلسترول تام، HDL-C و LDL-C بالاتر و CETP کم‌تری داشتند (P<۰/۰۵). ***نتیجه‌گیری:*** نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم D442G می‌تواند تغییراتی را در الگوی لیپیدی و فعالیت CETP جمعیت مورد مطالعه، ایجاد نماید.

کلمات کلیدی: پلی‌مورفیسم، کلسترول استر ترانسفر پروتیین، هیپرکلسترولمی.

مقدمه

مرگ ناشی از بیماری کرونری قلب Coronary Heart Disease (CHD) در سرتاسر جهان تقریباً دو برابر سرطان و ۱۰ برابر تصادفات است. علت اولیه CHD، آترواسکلروز کرونر بوده که ناشی از ضایعات چربی در پوشش داخلی سرخرگ‌های کرونری است. هیپرلیپیدمی علت اصلی آترواسکلروز و به دنبال آن بیماری‌های کرونری قلب، ایسکمی عروق مغزی و عروق محیطی می‌باشد.[۲و۱] در میان عوامل خطرساز متعددی که برای CHD وجود دارد، هیپرکلسترولمی یکی از عوامل خطرساز اصلی بوده و ارتباط مستقیمی بین کلسترول و افزایش خطر ابتلا به CHD وجود دارد.[۳] کلسترول در بسته‌های لیپو- پروتیینی مختلف مانند LDL و HDL حمل می‌شود. افزایش غلظت LDL سرم ارتباط مستقیمی با خطر ابتلا به CHD دارد[۴] و کاهش کلسترول تام (TC) و LDL باعث کاهش خطر ابتلا به CHD می‌شود.[۵] بین غلظت کلسترول HDL و خطر ابتلا به CHD ارتباط معکوسی وجود دارد.[۶] از جمله مکانیسم‌هایی که باعث تاثیر مطلوب HDL در برابر CHD می‌شود انتقال معکوس کلسترول می‌باشد که این فعالیت با همکاری کلسترول استر ترانسفر پروتیین Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) افزایش یافته و نتیجه آن خروج بیش‌تر کلسترول از سلول‌ها می‌باشد. کلسترول خارج شده پس از انتقال به کبد به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-10]

اسیدهای صفراوی تبدیل شده و یا از بدن دفع می‌شود.[۷] ژن CETP انسان در یک کپی منفرد روی کروموزوم ۱۶ (16q12-16q21) نزدیک به ژن لسیتین کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT) و هاپتوگلوبولین قرار دارد.[۸و۹] اندازه این ژن بیش از ۲۵ کیلو جفت باز و حاوی ۱۶ اگزون و ۱۵ اینترون است.[۱۰] پروتیین CETP انسان یک گلیکوپروتیین پلاسمایی هیدروفوب با وزن مولکولی ۷۴ کیلو دالتون و ۴۷۶ جز اسید آمینه بوده که به‌وسیله کبد، بافت چربی، طحال و روده کوچک سنتز می‌شود.[۱۱] مقدار این پروتیین در پلاسما معمولاً ۱-۳µg/ml و عمدتاً همراه با ذرات HDL می‌باشد.[۱۲و۱۳] CETP با انتقال کلسترول استر از HDL به لیپوپروتیین‌های غنی از تری‌گلیسرید (TRLs) و LDL، و در مقابل انتقال تری‌گلیسرید از TRLs به HDL و LDL نقش خود را ایفا می‌کند. انتقال کلسترول استر با میانجی‌گری CETP از HDL به VLDL و LDL، مسیر غیرمستقیمی ایجاد و کلسترول استر می‌تواند از HDL به کبد تحویل داده شود.[۱۴] پلی‌مورفیسم D442G (c.1325A>G) در اگزون ۱۵ ژن CETP نخستین بار در سال ۱۹۹۳ مشاهده شد که باعث تغییر آدنین به گوانین در کدون ۴۴۲ می‌شود و این کدون از Asp به Gly تغییر می‌کند.[۱۵] این جهش در انتهای کربوکسیل ژن قرار دارد.[۱۰] در ارتباط با اثر D442G بر الگوی لیپیدی سرم نتایج متناقضی گزارش شده است. آلل D442G با LDL-C و کلسترول تام (TC) بالا ارتباط دارد[۱۶و۱۷] و جهش D442G با HDL-C بالا همراه است و به نظر می‌رسد 442G به‌صورت آنتی‌آتروژنیک عمل می‌کند.[۱۵و۱۸و۱۹] با توجه به تاثیر هیپرکلسترولمی در ایجاد بیماری قلبی- عروقی به‌عنوان اولین عامل مرگ و میر انسان، انجام مطالعات مختلف و بررسی این مسئله از زوایای مختلف ضروری به نظر می‌رسد. برخی از مطالعات انجام شده در ایران ارتباط پلی‌مورفیسم‌های این ژن را با الگوی لیپیدی نشان داده است.[۲۰] شیوع هیپرکلسترولمی در ایران بالا بوده و مطالعات کمی بر روی پلی‌مورفیسم‌های ژن CETP انجام شده است. در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم D442G ژن CETP با بیماری هیپرکلسترولمی بررسی می‌شود.

روش بررسی

کلیه ملاحظات اخلاقی در این مطالعه رعایت شده و به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان رسیده است. هزینه انجام این طرح تحقیقاتی توسط معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان فراهم گردید. کیت استخراج DNA، MgCl2، PCR Buffer10X، dNTP Mix، پرایمرها، Taq پلیمراز، لودینگ بافر 6X، اتیدیوم بروماید و آنزیم محدودساز از شرکت (Cinnagen, Iran) خریداری شدند. آگاروز و DNA Ladder از شرکت (Fermentas, (Germany و کیت اندازه‌گیری CETP از شرکت (Roar Biomedical, (USA تهیه گردید. در این مطالعه مورد/ شاهدی، ۱۰۲ بیمار هیپرکلسترولمی و ۲۰۰ فرد سالم مراجعه‌کننده به آزمایشگاه بیمارستان قلب شهید رجایی تهران، طی سال ۱۳۸۷، بررسی گردیدند. نمونه‌هایی که کلسترول تام آن‌ها بیش از ۲۵۰mg/dl بود، به عنوان گروه بیمار انتخاب شدند.[۴] ۲۰۰ فرد سالم و بدون هیچ نوع سابقه و علایم بالینی این بیماری که در آزمایشات پاراکلینیک، تری‌گلیسرید و کلسترول طبیعی داشتند و از نظر سن و جنس با گروه بیمار مشابه بودند به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. در ضمن این افراد خویشاوندی نسبی با هم نداشتند. افراد مبتلا به دیابت، فشارخون بالا، بیماری‌های کبدی، کلیوی، تیرویید و هم‌چنین خانم‌های باردار از کل جمعیت مورد مطالعه حذف گردیدند. علاوه بر این، افراد مصرف‌کننده داروهای موثر بر سطح پلاسمای لیپیدها از این مطالعه خارج شدند. از هر فرد پس از ۱۴-۱۲ ساعت ناشتا بودن در طول شب ۱۰ میلی‌لیتر خون سیاهرگی جمع‌آوری گردید. ۲ml از هر نمونه در لوله‌های حاوی EDTA جهت استخراج DNA ریخته شد و مابقی برای تهیه سرم جهت اندازه‌گیری لیپیدها، فعالیت CETP و پارامترهای دیگر به کار رفت.

اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی: برای جدا کردن سرم جهت اندازه‌گیری پارامترهای بیوشمیایی شامل تری‌گلیسرید، کلسترول تام، LDL-C و HDL-C، نمونه‌های خون به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. میزان تری‌گلیسرید، کلسترول تام، LDL-C و HDL-C به روش‌های آنزیمی وبا استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون ایران اندازه‌گیری شد. فعالیت CETP پلاسما به‌وسیله کیت Roar Biomedical (USA) و با استفاده از دستگاه فلوریمتر Perkin Elmer LS55 Fluorescence Spectrometer اندازه‌گیری گردید. نمونه‌ها به‌وسیله این دستگاه در طول موج‌های ۴۶۵ نانومتر (Excitation) و ۵۳۵ نانومتر (Emission) خوانده شد. در نهایت با منحنی استاندارد رسم و فعالیت CETP (pmoL/µL.h) محاسبه گردید.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-10]

آزمایشات مولکولی: استخراج DNA ژنومی از خون تام با استفاده از کیت ساخت شرکت Cinnagen و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. قطعات ژنی واجد تغییرات ژنتیکی با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شدند و با تکنیک Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) تعیین ژنوتیپ شدند. پلی‌مورفیسم D442G در ناحیه اگزون ۱۵ ژن CETP قرار گرفته است. یک قطعه ۱۸۰ زوج بازی با استفاده از پرایمرهای مربوطه با روش PCR تکثیر گردید. واکنش PCR جهت تکثیر قطعه موجود در اگزون ۱۵ در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد و شرایط PCR به‌صورت زیر بود: پرایمرهای R (Reverse) و F (Forward) هر کدام ۰/۲ میکرومول، $MgCl_2$ با غلظت ۲ میلی‌مول، dNTP Mix با غلظت ۰/۲ میلی‌مول، ۲/۵ میکرولیتر از PCR Buffer 10X، Taq Polymerase با غلظت ۰/۲۵ واحد در میکرولیتر، ۳۰۰–۲۰۰ نانوگرم DNA. برنامه دمایی به‌کار گرفته شده برای تکثیر قطعه واجد پلی‌مورفیسم D442G به صورت زیر بود: ابتدا مخلوط واکنش به مدت سه دقیقه در دمای $94\ ^{\circ}C$ گرم شد تا دو رشته DNA از هم جدا شوند. سپس ۳۵ چرخه برنامه تغییرات دمایی زیر تکرار گردید: ۳۰ ثانیه در دمای $94\ ^{\circ}C$ جهت واسرشته سازی دو رشته DNA (Denaturation)، ۳۰ ثانیه در دمای $61\ ^{\circ}C$ جهت اتصال پرایمرها به DNA (Annealing) و ۴۵ ثانیه در دمای $72\ ^{\circ}C$ برای طویل شدن (Extension). پس از اتمام ۳۵ چرخه، مخلوط واکنش به مدت پنج دقیقه در دمای $72\ ^{\circ}C$ گرم شده تا عمل طویل شدن نهایی انجام گردد. توالی پرایمرهای R و F لازم جهت تکثیر قطعه DNA دارای پلی‌مورفیسم D442G عبارت بود از:[19]

D442G F: 5'-tca tga aca gca aag gcg tga gcc tct ccg -3'
D442G R: 5'-agc caa gct ggt aga ggc ccc tct gtc tgt -3'

برای آزمایشات RFLP به ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR ۱۰ واحد آنزیم MSP1، پنج میکرولیتر از بافر مربوطه و ۱۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز اضافه شد و به مدت دو ساعت در دمای $37\ ^{\circ}C$ قرار داده شدند. برای الکتروفورز محصولات PCR و قطعات RFLP از ژل آگاروز و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. قطعات مربوط به پلی‌مورفیسم D442G در آگاروز ۲/۵٪ الکتروفورز و با UV Transilluminator مشاهده و بررسی شدند. تحلیل آماری یافته‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ انجام گرفت. اطلاعات کمّی به صورت میانگین ± انحراف‌معیار ارایه گردیده است. تفاوت‌های آماری بین پارامترهای پلاسمای خون با استفاده از آزمون Independent sample t-test محاسبه شد. مقایسه فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها بین بیماران با گروه شاهد با آزمون χ^2 انجام شد. در مقایسه بین گروه‌ها، $P<0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقایسه خصوصیات بالینی و بیوشیمیایی دو گروه کنترل و بیماران هیپرکلسترولمی نشان داد دو گروه از نظر شاخص توده بدنی، سن و جنس اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. در مقادیر کلسترول، HDL-C، LDL-C، VLDL-C، LDL-C/HDL-C و CETP بین دو گروه هیپرکلسترولمی و کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۱). با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه واجد پلی‌مورفیسم D442G به طول ۱۸۰ جفت باز تکثیر گردید. الکتروفورز محصول هضم شده با آنزیم محدودساز MSP1 روی آگارز ۲/۵٪ انجام شد. در موارد بدون جهش (DD) یک باند ۱۸۰bp، برای موارد هموزیگوت GG دو باند ۱۵۰bp و ۳۰bp و برای موارد هتروزیگوت (DG) سه باند ۱۸۰bp، ۱۵۰bp و ۳۰bp مشاهده گردید. فراوانی آللی و توزیع ژنوتیپ‌ها در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. فراوانی ژنوتیپ‌های DD، DG و GG در گروه کنترل به ترتیب ۹۶٪، ۴٪ و

جدول- ۱: مقایسه ویژگی‌های بالینی بین گروه کنترل و گروه بیمار

ویژگی	گروه کنترل (N=۲۰۰)	هیپرکلسترولمی (N=۱۰۲)	P*
سن (سال)	۴۹/۴±۱۲/۹	۵۱/۹±۱۲/۸	NS
جنس (مرد/زن)	۱۰۳/۱۱۱	۴۹/۵۳	NS
BMI (kg/m^2)	۲۵/۵±۵/۹	۲۵±۵/۸	NS
کلسترول (mg/dl)	۱۸۴/۸±۳۱/۵	۲۶۹/۷±۱۹/۴	P<۰/۰۵
تری‌گلیسیرید (mg/dl)	۱۳۱/۱±۵۱/۱	۱۶۰/۶±۵۴/۷	NS
HDL-C (mg/dl)	۵۳/۶±۱۰/۹	۵۴/۹±۱۲/۹	P<۰/۰۵
LDL-C (mg/dl)	۱۰۴/۶±۲۵/۹	۱۸۱/۸±۲۱/۴	P<۰/۰۵
VLDL-C (mg/dl)	۲۶/۴±۱۱/۷	۳۸/۵±۱۳/۳	P<۰/۰۵
LDL-C/HDL-C	۲±۰/۵۲	۳/۶۷±۰/۵۳	P<۰/۰۵
CETP (pmoL/μL.h)	۱۰۷/۳±۱۸	۱۴۵±۲۹/۷	P<۰/۰۵

* آزمون آماری: χ^2، مقادیر $P<0/05$ معنی‌دار می‌باشد.

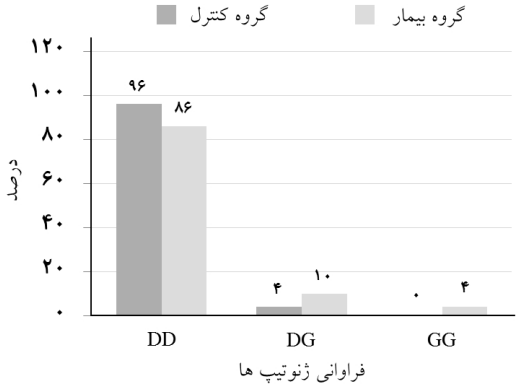
BMI=Body Mass Index, NS = Not Significant

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-10]

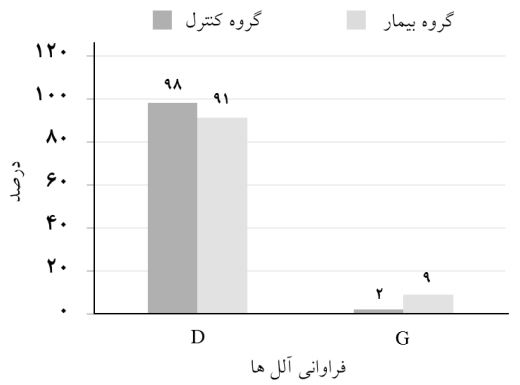
جدول- ۲: مقایسه ویژگی‌های بالینی ژنوتیپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم D442G در گروه بیماران هیپرکلسترولمی

ژنوتیپ‌ها / ویژگی‌ها	DD (N=۸۸)	DG (N=۱۰)	GG (N=۴)	P*
سن (سال)	۵۴/۴±۱۲/۸	۵۳/۲±۱۳/۷	۵۳/۹±۱۳/۴	NS
کلسترول (mg/dl)	۱۲/۱±۲۶۳/۱	۲۲/۱±۳۱۵	۱۸/۱±۲۹۲/۹	P<۰/۰۵
تری‌گلیسیرید (mg/dl)	۶۴±۱۶۳/۴	۶۰/۱±۱۵۱/۴	۴۴/۶±۱۶۴	NS
HDL-C (mg/dl)	۶/۱±۵۰/۵	۱۱/۸±۶۶/۴	۱۴/۶±۶۴/۲	P<۰/۰۵
LDL-C (mg/dl)	۲۳±۱۷۷/۵	۱۶/۳±۲۱۲/۳	۱۸/۸±۱۹۳/۶	P<۰/۰۵
CETP (pmoL/µL.h)	۱۵۰/۵±۳۱/۷	۱۳۶/۷±۳۴/۵	۱۲۷/۴±۳۶/۷	P<۰/۰۵

* آزمون آماری: χ^2، مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد. NS = Not Significant



نمودار- ۱: فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم D442G ژن CETP (P<۰/۰۵).



نمودار- ۲: فراوانی آلل‌های پلی‌مورفیسم D442G ژن CETP (P<۰/۰۵).

صفر و در گروه بیمار به ترتیب ۸۶٪، ۱۰٪ و ۴٪ بود. فراوانی آلل G در گروه کنترل ۲٪ و در گروه بیمار ۹٪ به دست آمد. توزیع فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها در دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت. ویژگی‌های بالینی در سه ژنوتیپ DD، DG و GG پلی‌مورفیسم D442G ژن CETP مطالعه گردید. در بررسی‌های مقایسه‌ای به وسیله Tukey HSD مشخص گردید که میزان کلسترول تام، HDL-C، LDL-C و CETP در ژنوتیپ‌های DG و GG در مقایسه با ژنوتیپ DD، اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

بحث

جهش D442G فقط در کشورهای آسیایی دیده می‌شود.[۱۸و۲۱و۲۲] فراوانی آن در جمعیت آسیایی کاملاً تفاوت داشته و فراوانی آن در ژاپن، چین، کره و ویتنام بیش از ۱٪ است[۱۸و۲۱و۲۲] و تاکنون در جمعیت‌های اروپایی، آفریقایی، یا هندی تبار دیده نشده است.[۲۳و۲۴] در مطالعه حاضر فراوانی آلل G در گروه کنترل ۲٪ و در گروه بیماران هیپرکلسترولمی ۸/۳٪ بود. فراوانی سه ژنوتیپ DD، DG و GG بین گروه کنترل و گروه هیپرکلسترولمی تفاوت داشت. از ۲۰۰ فرد گروه کنترل تنها هشت نفر حامل جهش D442G بودند (همه افراد هتروزیگوت بودند) و در گروه بیماران ۱۰ مورد حامل جهش D442G بودند (هشت نفر هتروزیگوت و دو نفر هموزیگوت). نتایج مطالعه ما مشابه با نتایج به‌دست آمده در سایر مطالعات است.[۱۶و۱۷و۲۲و۲۵] مقایسه مطالعات صورت گرفته روی D442G به علت تغییرات فراوانی جغرافیایی تا حدودی گمراه کننده است. در واقع فراوانی D442G بسیار متغیر است، که منجر به مشکلات بالقوه‌ای برای ارتباط و تطابق دادن بیماران و کنترل‌ها می‌شود. در میان جمعیت‌های ژاپنی، فراوانی D442G از ۱/۵٪ تا ۷٪ متغیر است.[۲۶و۲۷] در میان جمعیت‌های چینی تغییرات مشابه است و از ۱/۵٪ تا ۵/۴٪ گزارش شده است.[۲۸و۲۹] در چندین مطالعه تغییر D442G در هیچ‌کدام از افراد شرکت کننده در مطالعه وجود نداشت.[۲۳و۳۰و۳۱] این تغییرات ممکن است به علت تفاوت در گروه‌های قومی مورد مطالعه باشد. اولین بار در سال ۱۹۹۳ مشخص شد که پلی‌مورفیسم D442G در اگزون ۱۵ ژن CETP با افزایش غلظت HDL ارتباط دارد. در این مطالعه افزایش HDL-C به میزان سه برابر و کاهش قابل ملاحظه فعالیت CETP گزارش شد.[۱۵] در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-10]

مطالعات بعدی موارد هتروزیگوت D442G با فعالیت بالای CETP و افزایش سطح HDL-C همراه بود.[۲۵] علاوه بر این فعالیت اختصاصی CETP در موارد هموزیگوت پلی‌مورفیسم D442G مشابه با نوع طبیعی بود.[۳۲] در دو مطالعه اپیدمیولوژیک، جمعیت‌ها از نظر دارا بودن جهش D442G بررسی شدند. در ۳۴۹۶ مرد ژاپنی- آمریکایی ساکن Hawaii، جهش D442G با کاهش CETP و افزایش سطح HDL-C ارتباط داشت و شیوع کلی CHD در مردان واجد جهش با وجود افزایش سطح HDL-C نسبت به مردان بدون جهش بالاتر بود.[۲۱] مطالعه دیگر بر روی جمعیت ژاپنی ساکن در Kochi prefecture نتایج مشابهی را نشان داد،[۳۳] داده‌های فوق نشان داد که نقص CETP آتروژنیک است، اما آتروژنیسیته نقص CETP همیشه با سطح HDL-C پلاسما ارتباط ندارد. در این تحقیق مقایسه ویژگی بالینی افراد در سه ژنوتیپ GG، GD و DD نشان داد که میانگین کلسترول تام، HDL-C و LDL-C در سه ژنوتیپ فوق اختلاف معنی‌داری دارد به طوری که افراد واجد ژنوتیپ DG کلسترول تام، HDL-C و LDL-C بالاتری داشتند. در مطالعه Zheng که روی بیماران CHD انجام شد،[۱۷] آلل 442G با CHD ارتباط داشت به طوری که حامل‌های آلل 442G نسبت به هموزیگوت‌های 442D خطر ابتلا بالاتری داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که آلل 442G با سطح بالاتر TC و LDL-C ارتباط دارد، که مشابه با نتایجی بود که Wu گزارش کرد. در گزارش Wu، آلل Gly با غلظت بالاتر TC و LDL-C ارتباط داشت.[۱۶] جانشینی یک اسید آمینه در ناحیه کد کننده CETP ظاهراً بر فعالیت CETP برای انتقال کلسترول استر اثر می‌گذارد. آزمایشات بیان ژن نشان داد که جهش D442G، که به جایگاه فعال پروتیین نزدیک است، بیوسنتز و فعالیت اختصاصی CETP را تحت تاثیر قرار می‌دهد.[۱۵] آلل 442G با سطح بالاتر HDL-C و فعالیت کم‌تر CETP ارتباط دارد[۱۵و۱۸و۱۹] و به نظر می‌رسد D442G آنتی‌آتروژنیک باشد. اگرچه سطح HDL-C بالا در یک فرد معمولاً به صورت آنتی‌آتروژنیک محسوب می‌شود، در برخی موارد انسانی با وجود سطح بالای HDL، CHD می‌تواند رخ دهد. افزایش قابل ملاحظه در انواع HDL مملو از کلسترول استر نمی‌تواند دلالت بر یک وضعیت آنتی‌آتروژنیک داشته باشد و احتمالاً به علت نقص یا کاهش خروج کلسترول است.[۳۴] بنابراین CETP می‌تواند هم پروآتروژنیک و هم آنتی‌آتروژنیک باشد. در مطالعه Hsu افراد واجد جهش D442G، HDL-C بالاتری در مقایسه با افراد بدون جهش داشتند.[۱۸] نتایج این مطالعه مشابه با مطالعات کره و ژاپن بود که در آن‌ها جهش D442G به‌طور معنی‌داری با افزایش سطح HDL-C ارتباط داشت.[۲۲] نتایج مطالعات دیگر نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم D442G با افزایش HDL-C ارتباط دارد.[۲۵و۳۵] علاوه بر این برخی از مطالعات انجام شده در ایران نیز ارتباط پلی‌مورفیسم‌های این ژن را با الگوی لیپیدی و فعالیت CETP نشان داده است.[۲۰و۳۶و۳۷] از آن‌جایی که این جهش در انتهای کربوکسیل ژن و نزدیک به جایگاه فعال پروتیین قرار دارد، تاثیر آن بر بیوسنتز و فعالیت اختصاصی این پروتیین قابل توجیه می‌باشد.[۱۰و۱۵] نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم D442G ژن CETP می‌تواند تغییراتی را در الگوی لیپیدی و فعالیت CETP جمعیت مورد مطالعه، ایجاد نماید.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "مقایسه فراوانی پلی‌مورفیسم‌های D442G و Msp 1 در ژن کلسترول استر ترانسفر پروتیین (CETP) در افراد هیپرکلسترولمی، هیپرتری‌گلیسریدمی و هیپرلیپیدمی Combine با افراد سالم و ارتباط آن با الگوی لیپیدی "مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان در سال ۱۳۸۷ به کد ۱۶/۳۵/۶۷۵۴۹/پ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان اجرا شده است. نمونه‌های استفاده شده از بیمارستان قلب شهید رجایی تهران تهیه شده است. محل انجام آزمایشات گروه بیوشیمی و تغذیه و مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد. از کلیه همکاران این مرکز تشکر می‌گردد.

References

1. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349(9064):1498-504.
2. Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, Cooper LS, Conwill DE, Clegg L, et al. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Engl J Med* 1998;339(13):861-7.
3. Kromhout D. Epidemiology of cardiovascular diseases in Europe. *Public Health Nutr* 2001;4(2B):441-57.
4. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-10]

cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986;256(20):2835-8.
5. Stamler J, Dyer AR, Shekelle RB, Neaton J, Stamler R. Relationship of baseline major risk factors to coronary and all-cause mortality, and to longevity: findings from long-term follow-up of Chicago cohorts. *Cardiology* 1993;82(2-3):191-222.
6. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1996;77(14):1179-84.
7. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95(8):764-72.
8. Agellon LB, Quinet EM, Gillette TG, Drayna DT, Brown ML, Tall AR. Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry* 1990;29:1372-6.
9. Callen DF, Hildebrand CE, Reeders S. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 16 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1992;60(3-4):158-67.
10. Wang S, Deng L, Milne RW, Tall AR. Identification of a sequence within the C-terminal 26 amino acids of cholesteryl ester transfer protein responsible for binding a neutralizing monoclonal antibody and necessary for neutral lipid transfer activity. *J Biol Chem* 1992;267(25):17487-90.
11. Lagrost L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* 1994;1215(3):209-36.
12. Bruce C, Davidson WS, Kussie P, Lund-Katz S, Phillips MC, Ghosh R, et al. Molecular determinants of plasma cholesteryl ester transfer protein binding to high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1995;270(19):11532-42.
13. Fukasawa M, Arai H, Inoue K. Establishment of anti-human cholesteryl ester transfer protein monoclonal antibodies and radioimmunoassaying of the level of cholesteryl ester transfer protein in human plasma. *J Biochem* 1992;111(6):696-8.
14. Goldberg DI, Beltz WF, Pittman RC. Evaluation of pathways for the cellular uptake of high density lipoprotein cholesterol esters in rabbits. *J Clin Invest* 1991;87(1):331-46.
15. Takahashi K, Jiang XC, Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Bujo H, et al. A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins. *J Clin Invest* 1993;92(4):2060-4.
16. Wu JH, Lee YT, Hsu HC, Hsieh LL. Influence of CETP gene variation on plasma lipid levels and coronary heart disease: a survey in Taiwan. *Atherosclerosis* 2001;159(2):451-8.
17. Zheng K, Zhang S, Zhang L, He Y, Liao L, Hou Y, et al. Carriers of three polymorphisms of cholesteryl ester transfer protein gene are at increased risk to coronary heart disease in a Chinese population. *Int J Cardiol* 2005;103(3):259-65.
18. Hsu LA, Ko YL, Hsu KH, Ko YH, Lee YS. Genetic variations in the cholesteryl ester transfer protein gene and high density lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese Chinese. *Hum Genet* 2002;110(1):57-63.
19. Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Menju M, Arai T, Kobayashi K, et al. Frequency of exon 15 missense mutation (442D:G) in cholesteryl ester transfer protein gene in hyperalphalipoproteinemic Japanese subjects. *Atherosclerosis* 1995;114(2):139-45.
20. Hassanzadeh T, Firoozrai M, Zonouz AE, Zavarehee A, Paoli M. Taq1B polymorphism of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in primary combined hyperlipidaemia. *Indian J Med Res* 2009;129(3):293-8.
21. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996;97(12):2917-23.
22. Song GJ, Han GH, Chae JJ, Namkoong Y, Lee HK, Park YB, et al. The effects of the cholesterol ester transfer protein gene and environmental factors on the plasma high density lipoprotein cholesterol levels in the Korean population. *Mol Cells* 1997;7(5):615-9.
23. Dixit M, Mittal B. Frequencies of CETP gene TaqI B and D442G polymorphisms in North Indian population. *Curr Sci* 2005;88(12):1973-6.
24. Thompson JF, Wood LS, Pickering EH, Dechairo B, Hyde CL. High-density genotyping and functional SNP localization in the CETP gene. *J Lipid Res* 2007;48(2):434-43.
25. Inazu A, Jiang XC, Haraki T, Yagi K, Kamon N, Koizumi J, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest* 1994;94:1872-82.
26. Hirano K, Yamashita S, Funahashi T, Sakai N, Menju M, Ishigami M, et al. Frequency of intron 14 splicing defect of cholesteryl ester transfer protein gene in the Japanese general population: relation between the mutation and hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1993;100(1):85-90.
27. Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and increased HDL cholesterol levels (hyperalphalipoproteinemia). *Rinsho Byori* 1996;44(4):322-6.
28. Zhuang Y, Wang J, Qiang H, Li Y, Liu X, Li L, Chen G. Cholesteryl ester transfer protein levels and gene deficiency in Chinese patients with cardio-cerebrovascular diseases. *Chin Med J (Engl)* 2002;115(3):371-4.
29. Zheng KQ, Zhang SZ, Zhang KL, Zhang L, He Y, Kong XD, et al. Study on the association of cholesteryl ester transfer protein gene mutations with the susceptibility to coronary atherosclerotic heart disease. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2003;20(1):23-6.
30. Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V, McMahon AD, Braund PS, Cheng S, et al. A polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Eur Heart J* 2003;24(20):1833-42.
31. Plengpanich W, Siriwong S, Khovidhunkit W. Two novel mutations and functional analyses of the CETP and LIPC genes underlying severe hyperalphalipoproteinemia. *Metabolism* 2009;58(8):1178-84.
32. Nagano M, Yamashita S, Hirano K, Ito M, Maruyama T, Ishihara M, et al. Two novel missense mutations in the CETP gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects: high-throughput assay by Invader assay. *J Lipid Res* 2002;43(7):1011-8.
33. Moriyama Y, Okamura T, Inazu A, Doi M, Iso H, Mouri Y, et al. A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Prev Med* 1998;27(5 Pt 1):659-67.
34. Ishigami M, Yamashita S, Sakai N, Arai T, Hirano K, Hiraoka H, et al. Large and cholesteryl ester-rich high-density lipoproteins in cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency can not protect macrophages from cholesterol accumulation induced by acetylated low-density lipoproteins. *J Biochem* 1994;116(2):257-62.
35. Akita H, Chiba H, Tsuchihashi K, Tsuji M, Kumagai M, Matsuno K, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene: two common mutations and their effect on plasma high-density lipoprotein cholesterol content. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1615-8.
36. Ghasabeh TH, Firoozrai M, Zonouz AE, Radmehr H, Zavarehee A, Paoli M. One common polymorphism of cholesteryl ester transfer protein gene in Iranian subjects with and without primary hypertriglyceridemia. *Pak J Biol Sci* 2007;10(23):4224-9.
37. Ghasabeh TH, Firoozrai M, Zonouz AE, Radmehr H, Zavarehee A, Paoli M. Association between cholesteryl ester transfer protein Taq1B polymorphism with lipid levels in primary hyperlipidemic patients. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008;110:225-31.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-10]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 12, March 2012: 737-743

Association between cholestryl ester transfer protein D442G polymorphism on serum lipid levels and CETP activity in hypercholesterolemic patients

Asgar Barkhordari M.Sc.[2]
Taghi Hassanzadeh Ph.D.[1,2*]
Masoud Saidijam Ph.D.[1]
Rasoul Esmaeili[3]
Max Paoli Ph.D.[4]

1- Research Center for Molecular Medicines, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
2- Department of Clinical Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
3- Student's Research Committee Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
4- School of Pharmacy and Center for Biomolecular Science, University of Nottingham, Nottingham, UK.

* Corresponding author: Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Shahid Fahmideh St. Hamadan, Iran.
Tel: +98 -811- 8380462
E-mail: hzadeht@yahoo.ca

Received: October 03, 2011 Accepted: December 13, 2011

Abstract

***Background*:** Hypercholesterolemia is considered a major risk factor for pancreatitis, atherosclerosis and coronary heart disease. Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms are known to be associated with changes in lipid levels. We investigated the association between a polymorphism in the CETP gene (D442G) with plasma lipid levels and CETP activity in patients with hypercholesterolemia.

***Methods*:** This case/control study that be done in Hamadan university of medical sciences (from October 2008 to September 2009), included 102 patients with hypercholesterolemia and 200 healthy individuals. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms were used to determine genotypic distribution and allelic frequencies of polymorphisms. The plasma CETP activity was measured by a kit in a fluorescence spectrometer. Lipid concentrations were measured by routine biochemical and enzymatic assays.

***Results*:** Plasma cholesteryl ester transfer protein activity was significantly higher in the cases than the controls ($P<0.05$). The genotypic and allelic frequencies for this polymorphism were not statistically different between the patients with hypercholesterolemia and the controls (in controls: DD 96%, DG 4%, GG 0% and in cases: DD 86%, DG 10%, GG 4%), ($P>0.05$). Plasma HDL-C, LDL-C and TC were higher in both groups with GG and DG genotypes than with DD genotype, whereas serum CETP activity was lower in GG genotype compared with other genotypes (GD or DD), ($P<0.05$).

Conclusion: The results showed that D442G polymorphism of CETP gene was associated with changes in lipid profile and plasma CETP activity in the selected population and it might have a role in contributing to a genetic risk for developing coronary artery disease.

Keywords: Cholesteryl ester transfer protein, hypercholesterolemia, polymorphism.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-10]