

冠心病患者脂蛋白脂肪酶多态性的分布分析

朱铁兵 王海燕 王 强 钱卫冲 王连生

(南京医科大学附属第一医院心脏科, 南京 210029)

The Distribution of Lipoprotein Lipase Gene Polymorphisms in Patient with Coronary Heart Disease

ZHU Tie-Bin, WANG Hai-Yan, WANG Qiang, QIAN Wei-Chong and WANG Lian-Sheng
(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT

Aim Whether the mutation of lipoprotein lipase (LPL) gene is associated with coronary heart disease (CHD) or not has been yet known. We study relationship between mutation in intro 6 (Pvu II) and 8 region of LPL gene and CHD.

Methods We analysed 106 patients in myocardial infarction survivors through a case-control study.

The technique of polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment lengths polymorphism (RFLP) was used to analysed the genotype of LPL gene. 23 factors maybe involved in CHD was chosed. Simple and multiple non-conditioned logistic regression analysis demonstrated that 6 factors were association with CHD.

Results The risk factors were diabetes, smoke, hypertension, LPL genotype Pvu II $P^{-}P^{-}$ and haplo-type $H^{+}P^{-}$. While Apo A/B ratio was regarded as a protective factor.

Conclusion LPL genotype Pvu $P^{-}P^{-}$ or $H^{+}P^{-}$ other than the standard risks was contributing to CHD.

KEY WORDS Lipoprotein lipase; Coronary heart disease; Mutation

摘要 为了探讨脂蛋白脂肪酶基因内含子 6 区 (Pvu II) 和 8 区 (Hind III) 位点变异与冠心病的关系, 应用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性方法分析 106 例

心肌梗塞存活病人及 106 例正常健康人的脂蛋白脂肪酶基因 Pvu II、Hind III 位点多态性, 并采用非条件的 logistic 单元及多元回归分析。结果发现, 糖尿病史、吸烟史、高血压、脂蛋白脂肪酶等位基因 P^{-} 和单倍体 $H^{+}P^{-}$ 是冠心病独立的危险因素, 其中 P^{-} 和 $H^{+}P^{-}$ 在多元回归分析后其比值比为 3.59 和 2.54, 载脂蛋白 A/B 的比值比为 0.06。因此认为除传统的危险因素外, 脂蛋白脂肪酶 P^{-} 和单倍体 $H^{+}P^{-}$ 也是冠心病独立的危险因素, 载脂蛋白 A/B 比值可能是较其他血脂指标更好的冠心病独立的预测危险因素。

关键词 脂蛋白脂肪酶; 冠心病; 多态性

流行病学证实, 高血压、高脂血症、吸烟、糖尿病等是冠心病独立的危险因素, 但以上因素只能解释大部分患者的冠心病发病机制, 另有小部分患者可能归结于遗传基因的变异。脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 可促进乳糜微粒 (chylomicron, CM) 和极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 中甘油三酯的分解。脂蛋白脂肪酶基因的异常可导致血浆中甘油三酯的升高和高密度脂蛋白胆固醇的降低, 促进冠状动脉粥样硬化的形成与发展^[1]。本文采用对照研究方法调查了心肌梗塞存活病及健康人的冠心病传统的危险因素, 并应用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)—限制片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 的方法测定脂蛋白脂肪酶的 Pvu II 和 Hind III 基因多态性, 以探讨脂蛋白脂肪酶基因多态性与冠心病的关系

1 对象和方法

1.1 对象

病人来源为 1992 年 1 月至 1996 年 3 月在南京医

科大学附属第一医院住院的现仍存活的心肌梗塞(myocardial infarction, MI)患者 106 人,所有患者均符合 1981 年制定的全国诊断标准,按 1:1 与性别相同,年龄相差不超过 2 岁的健康人作配对对照。这些健康人为同期来我院体检者,排除慢性肝、肾疾患以及肿瘤、冠心病等相关疾病。

1.2 调查内容与方法

1.2.1 调查内容 调查内容为问卷、体格检查、血脂检测及 LPL 基因多态性测定。有 23 个因素选入调查内容:①问卷为一般情况、高血压病史、高脂血症史、糖尿病史、吸烟史、饮酒史、饮茶史、体育锻炼史及精神刺激史;②体格检查包括身高、体重、体重指数和腰臀比;③血脂测定包括总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、载脂蛋白 A1(apolipoprotein A1)、载脂蛋白 B(apolipoprotein B)和脂蛋白(a)(lipoprotein-a)。

1.2.2 脂蛋白脂肪酶的 Pvu I 和 Hind III 基因型分析方法 脂蛋白脂肪酶基因 Pvu I、Hind III 位点多态性检测采用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性的方法^[1]。冠心病组有 11 个,对照组有 5 个因标本因血液凝固,无法提取 DNA,故未作基因型分析。

1.3 统计方法

对 23 个主要的冠心病危险因素进行了单因素非条件的 logistic 回归分析,以 $P=0.10$ 为显著性水平,取有意义的因素作多因素非条件的 logistic 回归分析。为重点探讨 LPL 的 Pvu I、Hind III 基因型及单倍体与冠心病的关系,则分别与其他危险因素作多因素非条件的 logistic 回归分析,全部统计采用 SPCC+ 软件。

2 结果

2.1 Pvu I 和 Hind III 基因型分析

用内切酶酶解 Pvu I 的 PCR 产物后,电泳可以分离不同的碱基片段。Pvu I 位点 PCR 产物为 189 bp 的碱基片段,如存在切点,则产生 150 bp 和 39 bp 的碱基片段。因而纯合子 P^+P^+ 含 150 bp、39 bp 的碱基片段,杂合子 P^+P^- 含 189 bp、150 bp 和 396 bp 的碱基片段; P^-P^- 含 189 bp 单一条带(图 1, Figure 1)(因 396 bp 片段太小,照片上难以察觉)。同样 Hind III 位点 PCR 产物为 715 bp 的碱基片段,如存在 Hind III 切点,则产生 600 bp 和 1156 bp 片段,因而

纯合子 H^+H^+ 含 600 bp 和 115 bp 的碱基片段,杂合子 H^+H^- 含 715 bp、600 bp 和 115 bp 的碱基片段; H^-H^- 含 715 bp 单一条带(图 2, Figure 2),由于 115 bp 与 600 bp 和 715 bp 相比,碱基片段差别大,因而经紫外摄影后,该片段仍从照片上丢失。

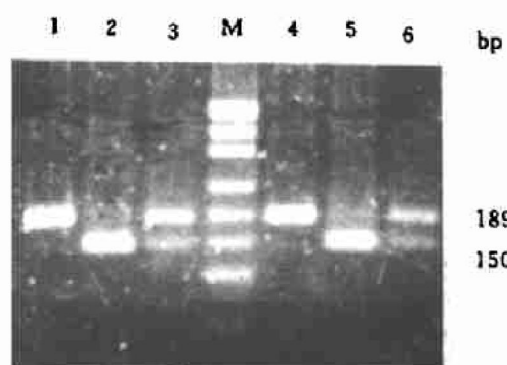


Figure 1. Genotype of Pvu I. 1 and 4: P^-P^- ; 2 and 5: P^+P^+ ; 3 and 6: P^+P^- ; M: mark.



Figure 2. Genotype of Hind III. 1 and 6: H^-H^- ; 3 and 4: H^+H^+ ; 2 and 5: H^+H^- ; M: mark.

2.2 两组间 Pvu I 和 Hind III 基因型及等位基因频率的比较

从表 1(Table 1)可见,两组间无论 Pvu I 还是 Hind III 基因型分布无差异。从表 2(Table 2)可见 P^- 等位基因频率在病例组高于对照组 ($P<0.01$)。Hind III 位点的等位基因频率在两组间无差别。

2.3 单倍体基因型频率在两组间的比较

从表 3(Table 3)可见,病例组单倍体 H^+P^- 基因型明显高于对照组,其余单倍体基因型

在两组间无差别。

Table 1. The distribution of Pvu I and Hind III RFLP in patients with MI and controls.

Groups	n	P+P+	P+P-	P-P-	H+H+	H+H-	H-H-
Control	101	45.5	44.6	9.9	56.4	42.6	1.0
MI	95	34.7	45.5	16.8	57.9	41.1	1.1

Pvu I : $\chi^2=3.36$, $df=2$, $P>0.05$; Hind III : $\chi^2=0.5$, $df=2$, $P>0.05$.

Table 2. The frequency distribution of Pvu I and Hind III alleles in patients with MI and in control groups.

Groups	n	P+	P-	H+	H-
Control	202	67.8	32.2	77.7	22.0
MI	190	58.9	41.1	78.5	21.5

Pvu I : $\chi^2=7.62$, $df=1$, $P<0.01$; Hind III : $\chi^2=0.04$, $df=1$, $P>0.05$.

2.4 单因素及多因素非条件 logistic 回归分析

单因素分析中,23 个变量进入回归分析,共有 15 个变量与冠心病——心肌梗塞联系较大。其中高血压病史、高脂血症史、糖尿病史、吸烟状况和指数、饮茶史、精神刺激史、现有高血压、肥胖、高胆固醇血症等是危险因素,而经常锻炼、较高的 HDLC 和载脂蛋白 AI/B 是冠心病的保护因素。LPL 的 P⁻P⁻ 及单倍体基因型 H⁻P⁻ 也是冠心病的危险因素,比值比分别为 2.23 和 2.

26,而 Hind III 基因型与冠心病无关(表 4, Table 4)。对于单因素分析有显著意义的 15 个变量作多因素非条件的 logistic 回归分析,结果仅糖尿病史、吸烟状况、高血压、载脂蛋白 AI/B 比值、Pvu II 基因型 P⁻P⁻ 及单倍体 H⁺P⁻ 基因型与冠心病有密切联系(表 5, Table 5)。

Table 3. The distribution of LPL haplotype in MI and control groups.

Haplotype	Controls			MI		
	n	total	%	n	total	%
H ⁺ P ⁺ /H ⁺ P ⁺	44			33		
H ⁺ P ⁺ /H ⁻ P ⁺	2	81	80.2	0	61	64.2
H ⁺ P ⁺ /H ⁻ P ⁻	34			27		
H ⁻ P ⁻ /H ⁻ P ⁻	1			1		
H ⁺ P ⁻ /H ⁺ P ⁺	11			19		
H ⁺ P ⁻ /H ⁺ P ⁻	2	20	19.8	3	34	35.8
H ⁺ P ⁻ /H ⁻ P ⁻	7			12		

$\chi^2=6.27$, $df=1$, $P<0.01$.

Table 4. The univariate non-conditioned logistic regression analysis.

Exposed factor (y,n)	Regression coefficient	Standard error	Ratio	95% confidence	P
Hypertensive history (y,n)	1.1549	0.2970	3.17	1.77~5.68	0.0001
Hyperlipodemia (y,n)	1.7319	0.6484	5.65	1.59~20.14	0.0076
Diabetus (y,n)	1.3489	0.5289	3.85	1.37~10.86	0.0108
Smoke (y,n)	1.3403	0.2919	3.82	2.16~6.77	0.0000
Smoke index	0.9965	0.2827	2.71	1.56~4.71	0.0004
Drink tea (y,n)	0.4871	0.2866	1.63	0.93~2.85	0.0893
Exercise (y,n)	-0.5695	0.2876	0.57	0.32~0.99	0.0477
Psy trauma (y,n)	0.8734	0.2897	2.40	1.36~4.23	0.0026
Hypertension (y,n)	0.9592	0.3049	2.61	1.44~4.74	0.0017
Fatness (y,n)	0.5001	0.2897	1.65	0.93~2.91	0.0843
TC (mmol/L)(≥5.70,<5.70)	0.7465	0.3337	2.11	1.10~4.06	0.0253
HDL.C (mmol/L)(≥1.01,<1.01)	-0.9605	0.3288	0.38	0.20~0.73	0.0035
Apo A/B (mmol/L)(≥1.30,<1.30)	-1.6878	0.3309	0.18	0.10~0.35	0.0000
LPL Pvu I (---)	0.8021	0.4632	2.23	0.90~5.53	0.0833
(---, no---)	0.6114	0.4314	1.84	0.79~4.29	0.1565
LPL hyplotype (H ⁻ P ⁻ , no H ⁺ P ⁻)	0.8142	0.3289	2.26	1.18~4.30	0.0133

Table 5. The multivariate non-conditioned logistic regression analysis.

Factor	Regression coefficient	Standard error	Ratio	95% confidence	Wald	P
model A						
Diabetes	1.6224	0.7747	5.07	1.11~23.12	4.3861	0.0362
Smoke	1.9131	0.4442	6.77	2.84~16.18	18.6471	0.0000
Hypertension	1.6862	0.4438	5.40	2.26~12.88	14.4348	0.0001
ApoA/B	-2.7622	0.4953	0.06	0.02~0.17	31.1057	0.0000
LPL Pvu II	1.2793	0.6295	3.59	1.05~12.34	4.1295	0.0421
$\chi^2=83.155, df=5, P<0.0001$						
model B						
Diabetes (y,n)	1.6106	0.7879	5.01	1.07~23.45	4.1783	0.0409
Smoke (y,n)	1.8951	0.4372	6.65	2.82~15.67	18.7919	0.0000
Hypertension	1.6297	0.4392	5.10	2.16~12.07	13.7717	0.0002
ApoA/B	-2.5425	0.4723	0.08	0.03~0.20	28.9773	0.0000
LPL phenotype (H ⁺ P ⁺ , NO H ⁺ P ⁺)	0.9316	0.4669	2.54	1.03~6.26	4.0862	0.0432
$\chi^2=83.005, df=5, P<0.0001$						

3 讨论

以往对脂蛋白脂肪酶的 Pvu II 和 Hind III 基因多态性分析多采用 Southern 印迹杂交。该方法操作复杂, 成本昂贵, 不适合大规模的人群研究。本研究显示, 聚合酶链反应—限制性片段长度多态性方法简单、迅速、实用。

为了研究冠心病的遗传背景, 已提出许多冠心病相关的候选基因。有关脂蛋白脂肪酶基因多态性与冠心病的关系, 国外虽见较多报道, 但结论尚不一致。脂蛋白脂肪酶基因位于人类第 8 号染色体短臂上, Pvu II 和 Hind III 位点分别在内含子的 6 区和 8 区。这两个位点的变异可能通过连锁不平衡原理影响脂蛋白脂肪酶调控基因的表达, 从而影响脂蛋白脂肪酶的活性, 导致甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇的血浆浓度变化, 促进冠状动脉粥样硬化的发生和发展[3]。

本课题研究中, 病例组 P⁺P⁺ 等位基因、单倍体 H⁺P⁺ 基因型的频率均高于对照组, 推测以上两个因素可能与冠心病有一定的关联。为了考察它们是否是独立的危险因素, 我们把 P⁺P⁺ 和 H⁺P⁺ 作为暴露因素, 分别进行单因素和多因素 logistic 回归分析。在单因素分析中, 有 15 个变量具有显著性意义, 而 P⁺P⁺ 和 H⁺P⁺ 为其

中之二。为控制混杂因素的影响, 较客观地评价各因素所起的作用, 全面考虑各因素之间的相互关系, 在单因素分析的基础上, 做了多因素非条件的 logistic 回归分析, 结果表明脂蛋白脂肪酶的 P⁺ 等位基因及单倍体 H⁺P⁺ 仍是冠心病独立的危险因素, 其比值比分别是 3.59 和 2.54。余外的危险因素包括糖尿病史、吸烟状况、高血压病史。载脂蛋白 AI/B 比值是保护因素。

我们的结论与某些作者不一致。Peacock 等[2]发现 P⁺ 等位基因与冠心病相关。导致这些结论不一致的原因可能与冠心病发病的复杂性以及种族差异有关。

以前一致认为, 高胆固醇血症、糖尿病史、吸烟和高血压是冠心病独立的危险因素[1], 但本文在多因素回归分析后, 未发现高胆固醇血症是冠心病独立的危险因素。其原因可能与本文系回顾性研究, 不能排除降脂药物的应用及饮食方式变化的影响。

总之, 对冠心病相关基因进行深入研究, 有可能找到冠心病的遗传标记, 为临床防治提供理论基础。

参考文献

1. 王克勤 (主编). 脂蛋白与动脉粥样硬化. 北京: 人民卫生出版社, 1995; 222~237.

- 2 朱铁兵, 王海燕, 王强, 等. 人脂蛋白脂酶基因多态性分析. 南京医科大学学报, 1997, 17(6): 562~564.
 - 3 Wang XL, Mccredie RM. Common DNA polymorphism at the lipoprotein lipase gene association with severity of coronary artery disease and diabetes. *Circulation*, 1996, 93: 1 339.
 - 4 Peacock RE, Hamsten A, Nilsson EH, et al. Association between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlation of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Swede. *Atherosclerosis*, 1992, 97: 171.
 - 5 陈在嘉, 徐义枢, 孔华宇. 临床冠心病. 北京: 人民军医出版社, 1991; 46~60.
- (1998-05-31 收到, 1998-08-18 修回. 编辑: 胡必利)