

两型脑卒中患者载脂蛋白 E 基因型的分布比较

彭道泉 赵水平

(湖南医科大学附属第二医院心内科, 长沙 410011)

主题词 脑出血; 脑梗死; 病人; 载脂蛋白 E; 基因表达; 基因型; 基因频率

摘要 为了解载脂蛋白 E 基因型与两型脑卒中的关系, 采用聚合酶链反应技术对 90 例脑出血和 90 例脑梗死患者及其 107 例性别、年龄配对的对照者进行载脂蛋白 E 基因型检测。结果发现脑出血患者载脂蛋白 E $\epsilon 2/\epsilon 3$ 基因频率高于对照组 ($P < 0.05$), 而载脂蛋白 E $\epsilon 3/\epsilon 3$ 基因频率在对照组较高 ($P < 0.05$)。脑梗死患者中载脂蛋白 E $\epsilon 4$ 携带频率较对照组显著增高 ($P < 0.05$)。研究结果表明载脂蛋白 E $\epsilon 2$ 可能与出血性脑卒中有关, 而载脂蛋白 $\epsilon 4$ 为缺血性脑卒中的重要遗传标志。

Comparison of Apolipoproteins E Genotype Distribution in Two Type of Stroke

PENG Dao-Quan and ZHAO Shui-Ping

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, Hunan Medical University, Changsha 410011, China)

MeSH Cerebral Hemorrhage; Cerebral Infarction; Patients; Apolipoproteins E; Gene Expression; Genotype; Gene Frequency

ABSTRACT **Aim** To evaluate the apolipoprotein E (Apo E) genotype distribution in two type of stroke. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction segment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to examine the Apo E genotype in 180 patients with hemorrhagic stroke (90) and ischemic stroke (90), along with the 107 age- and sex-matched controls.

Results The frequency of Apo E $\epsilon 2/\epsilon 3$ was higher in hemorrhagic stroke group (28.9%) than in the controls (16.7%, $P < 0.05$), while the Apo E $\epsilon 3/\epsilon 3$ frequency was lower in the cases (54.4%) than in the controls (70.0%, $P < 0.05$). The Apo E $\epsilon 3/\epsilon 4$ was more frequent in the ischemic stroke group (21.1%) than in the controls (8.9%, $P < 0.05$).

Conclusion Apo E $\epsilon 2$ may be related to the risk of hemorrhagic stroke and that Apo E $\epsilon 4$ may be an important risk factor for ischemic stroke.

载脂蛋白 E 为脂蛋白的重要成分, 它通过与低密度脂蛋白受体及肝脏载脂蛋白 E 受体作用而调节胆固醇的转运和脂质代谢。载脂蛋白 E 基因有三种: $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4$ 。它们构成人群中载脂蛋白 E 六种基因型, 即三种纯合子: $\epsilon 2/\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4/\epsilon 4$; 三种杂合子 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 、 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 和 $\epsilon 2/\epsilon 4$ 。已有研究证实载脂蛋白 E $\epsilon 4$ 基因与动脉粥样硬化及神经系统疾病特别是 Alzheimer 病有关。但载脂蛋白 E 基因型与脑卒中的关系尚未明确。本研究通过病例-对照设计来了解载脂蛋白 E 基因型与脑卒中不同亚型之间的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究病例来源于 1995 年 11 月至 1996 年 12 月来我院急诊科就诊的急性脑卒中病人。根据临床症状、体征及头颅 CT 检查结果将病例分为脑溢血、脑梗死和腔隙性脑梗死。共纳入 180 例病例, 其中出血性脑卒中组 90 例, 缺血性脑卒中组 90 例 (包括 73 例脑梗

死, 17 例腔隙性脑梗死)。所有病例均为 40 岁或以上的急性期 (24 h 内) 初发脑卒中者。排除蛛网膜下腔出血、心源性脑血管栓塞及严重肝肾功能损害患者, 一月内服用止血抗凝药物者也予排除。107 例对照者来源于同期来我院眼、耳鼻喉和口腔等科就诊的非脑卒中病人, 对照者分别与两组病例按性别和年龄 (10 岁一组) 配对, 其中 73 例为两组共用。

1.2 研究方法

通过问卷访谈收集研究对象的基本情况, 包括职业、婚姻、受教育程度及家庭每月人均收入等。

载脂蛋白 E 基因型的测定是参照 Xixson 等^[1]介绍的聚合酶链反应-限制片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction segment length polymorphism, PCR-RFLP) 方法稍加改良后完成。首先从外周血白细胞中抽提基因组 DNA, 然后使用 PCR 技术对载脂蛋白 E 基因片段进行扩增。PCR 引物序列为: 上游引物

5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCAAGGA-3';

下游引物

5'-AGAATTTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3'

(上海生物生工公司合成)。扩增条件为95℃ 10 min → 72℃ 3 min, 5个循环; 95℃ 1 min → 55℃ 1 min → 72℃ 1 min, 30个循环。PCR产物用HhaI核酸内切酶(Sigma公司)37℃消化4h, 消化产物经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 最后用溴乙啶染色30 min, 紫外线透射灯下观察结果。

1.3 统计学方法

所有数据的统计用STATA软件完成。分类资料的比较采用χ²检验, 等级资料用秩和检验。配对组间载脂蛋白E基因型的比较采用McNemar's卡方检验。比值比(OR)的估计及95%的可信区间(CI)用条件logistic回归分析。以P<0.05作为有统计学显著性差异的标准。

2 结果

2.1 一般资料的比较

出血性脑卒中(脑出血)组和缺血性脑卒中(脑梗死)组的病例与各自的对照者在职业、婚姻状态、受教育程度及经济收入方面无统计学差异。脑出血组、脑梗死组和总对照组平均年龄分别为62.6±8.9岁、62.5±8.9岁和63.1±8.3岁;组间无统计学差异。两组的男女性别比分别为:脑出血组51:39;脑梗死组59:31;组间无统计学差异。

2.2 载脂蛋白E基因型及频率的比较

所有研究对象中(n=287)载脂蛋白E基因型以ε3/ε3出现频率最高(62.0%), ε2/ε2、ε4/ε4及ε2/ε4出现频率很低(分别为0.7%、1.4%和0.7%)。分组比较发现脑出血组ε2/ε3频率显著高于对照组, 而ε3/ε3的分布相反;脑梗死组病例ε3/ε4频率显著高于对照组(表1, Table 1)。根据载脂蛋白E基因型将观察对象分为载脂蛋白E ε2携带者ε2/X(ε2/ε2, ε2/ε3), ε3/ε3携带者和载脂蛋白E ε4携带者ε4/X(ε4/ε4, ε3/ε4, 2例ε2/ε4未包括在内)。表2(Table 2)及表3(Table 3)分别列出脑出血组与脑梗死组配对的病例与对照者中上述三种载脂蛋白E基因携带者的分布, 进一步比较发现脑出血组ε2携带者与对照组比较, 差异没有显著性(P=0.058)。载脂蛋白E ε3/ε3携带者显著低于对照组, 其与脑出血关系的比值比为0.78, 95%可信区间(CI)为0.62~0.97。脑梗死组的载脂蛋白E ε4携带者显著高于对照组, 其比值比为2.57, 95%可信区间(CI)为1.03~7.27。

表1. 各亚型脑卒中与对照的载脂蛋白E基因型和基因频率比较

Table 1. Comparison of Apo E genotype and gene frequencies between two subtype of stroke

Genotype	HS group		IS group	
	Controls	Patients	Controls	Patients
ε4/ε4	1.1	1.1	1.1	2.2
ε3/ε4	10.0	14.4	8.9	21.1 ^a
ε2/ε4	1.1	0	1.1	1.1
ε3/ε3	70.0	54.4 ^a	70.0	61.1
ε2/ε3	16.7	28.9 ^a	17.8	14.4
ε2/ε2	1.1	1.1	1.1	0
Gene frequency				
ε4	6.7	8.3	6.1	13.3
ε3	83.3	76.1	83.3	78.9
ε2	10.0	15.6	10.6	7.8

a: P<0.05, compared with controls. McNemar's ki-square test was used to compare the proportion of the genotype, Ki-square test was used to compare the distribution of gene frequencies

表2. 配对的脑出血者与对照者的三种载脂蛋白E基因型分布

Table 2. Apo E genotype distribution in paired hemorrhagic stroke and controls

Genotype in control group	Genotype in haemorrhagic group			
	ε2/X	ε3/ε3	ε4/X	Total
ε2/X	7	8	1	16
ε3/ε3	16	36	11	63
ε4/X	3	5	2	10
Total	26	49	14	89

表3. 配对的脑梗死者与对照者的三种载脂蛋白E基因型分布

Table 3. Apo E genotype distribution in paired ischemic stroke and controls

Genotype in control group	Genotype in haemorrhagic group			
	ε2/X	ε3/ε3	ε4/X	Total
ε2/X	4	9	4	17
ε3/ε3	8	40	14	62
ε4/X	1	6	2	9
Total	13	55	20	88

3 讨论

脑卒中包括出血性脑卒中(脑出血)与缺血性脑

卒中(脑梗死脑)两大类,它们具有一些共同的危险因素如高血压、但两者却有不同病理基础及其相关因素。已有研究提示两类脑卒中与胆固醇的关系呈现相反的方向,但胆固醇受多种因素的影响且随机变异大,不能可靠预测脑卒中的发生。载脂蛋白E基因多态性作为一种遗传标志,其在心血管病及神经系统疾病的作用受到重视。

早期研究证实载脂蛋白 $\epsilon 4$ 是动脉粥样硬化及冠心病的独立预测因子^[2],后来又发现其与Alzheimer's病密切相关^[3]。近年来对脑卒中病人特别是缺血性脑卒中病人的载脂蛋白E基因型进行了观察,但报道的结果不一致。在一项病例-对照研究中Pedro等^[4]首先发现缺血性脑卒中组 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 频率显著高于对照组,提示载脂蛋白 $\epsilon 4$ 为脑卒中易感性的遗传标志^[4],我们的结果与之相似。另一项类似设计的研究却发现载脂蛋白 $\epsilon 2$ 基因为脑血管病的危险因素,且认为载脂蛋白 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 可能与脑血管病的保护有关^[5]。但后者研究的对照中载脂蛋白E等位基因的频率与以往报道不一致,这可能会影响其结果。本研究的对照组载脂蛋白E基因型分布与其他关于中国人群的研究结果相近^[6],因而对照组选择偏倚可能性小。另外本研究的病例采用严格的纳入及排除标准,增加了结果的真实性。最近关于载脂蛋白 $\epsilon 4$ 与脑血管性痴呆的相关研究间接提示其为缺血性脑卒中的潜在危险因素^[7],但在一项以75岁以上人群为对象的研究中未能证实这一结论^[8]。脑出血与载脂蛋白E基因型关系的研究较少,目前尚无定论。本研究结果表明脑出血组病人载脂蛋白 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 较对照组高,这与Nicoll等^[9]报道的结果一致。同时还发现载脂蛋白 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 频率在对照组显著增高,支持其对脑血管病的保护作用。

载脂蛋白E基因型对脑卒中的影响机制尚不清楚,可能与其对血脂作用有关。载脂蛋白E三种异构体因其与LDL受体的亲和力不同而对血脂影响不同。一般认为,相对载脂蛋白E3而言,载脂蛋白E4具有升高总胆固醇(TC)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的作用,而载脂蛋白E2作用相反。最近一项研究表明载脂蛋白E4与大血管病变所至脑梗死密切相关,可能是通过胆固醇升高起作用^[10]。但Terry等^[11]发现颈动脉内膜厚度与载脂蛋白E4的正相关及与载脂蛋白E2的负相关并不依赖于它们对LDL胆固醇的影响。另外载脂蛋白 $\epsilon 2$ 还可能通过促进脑血管淀粉样变而增加脑出血的危险^[9],但也有研究认为载脂蛋白 $\epsilon 4$ 可通过同样机制使脑出

血危险增加^[12]。

本研究结果初步提示载脂蛋白E基因型为脑卒中的一种重要遗传标志,它为脑卒中的病因研究提供了新的线索,但最终定论还有需更大规模的人群研究来进一步证实。它将有助于脑卒中高危人群的确定和脑卒中的预防。

参考文献

- 1 Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 545-584
- 2 Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, et al. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1993, **71**: 160-165
- 3 Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, et al. Apolipoprotein polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, 1993, **342**: 697-699
- 4 Pedro-Botet J, Senti M, Nogués X, et al. Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke: role of lipoprotein (a) triglyceride-rich lipoproteins, and apolipoprotein E polymorphism. *Stroke*, 1992, **23**: 1556-562
- 5 Couderc R, Mahieux F, Bailleus S, et al. Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease: a case-control study. *Stroke*, 1993, **24**: 661-664
- 6 Seist G, Pillot T, Régis-Bailly A, et al. Apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem*, 1995, **41**: 1068-1086
- 7 Hofman A, Ott A, Breteler MMB, et al. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Rotterdam Study. *Lancet*, 1997, **349**: 151-154
- 8 Basun H, Corder EH, Guo Z, et al. Apolipoprotein E polymorphism and stroke in a population sample aged 75 years or more. *Stroke*, 1996, **27**: 1310-1315
- 9 Nicoll JAR, Burnett C, Love S, et al. High frequency of apolipoprotein E $\epsilon 2$ in patient with cerebral hemorrhage due to amyloid angiopathy. *Ann Neurol*, 1996, **39**: 682-683
- 10 Kessler C, Spitzer C, Stauske D, et al. The apolipoprotein E and β -fibrinogen G/A-455 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke involving large-vessel disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 2880-2884
- 11 Terry J, Howard G, Mercuri M, et al. Apolipoprotein E polymorphism is associated with segment-specific extracranial carotid artery intima-media thickening. *Stroke*, 1996, **27**: 1755-1759
- 12 Greenberg SM, Rebeck W, Vonsattel JPG, et al. Apolipoprotein E $\epsilon 4$ and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann Neurol*, 1995, **38**: 254-259

(此文1998-09-收到, 1999-02-01修回)

(此文编辑 胡必利)