

急性心肌梗死患者载脂蛋白 E 基因多态性 及其与血脂代谢的关系

金 炜 陆元善^① 李为真 徐英华 郑明芳

(上海市第一人民医院心内科, 上海 200080)

主题词 载脂蛋白 E; 基因型; 多态性; 基因频率; 心肌梗死, 急性; 患者; 胆固醇

摘 要 为探讨载脂蛋白 E 基因多态性与心肌梗死的相关性, 以及载脂蛋白 E 基因多态性对心肌梗死患者血脂代谢的影响, 选取 100 例正常人及 50 例急性心肌梗死患者, 采用聚合酶链反应—限制片长多态性法来分析载脂蛋白 E 的基因型, 并按常规酶法及免疫法测定血脂和载脂蛋白。结果发现 E3/3 基因型及 $\epsilon 3$ 等位基因频率均多见于正常人及病例组中, 但两组间 E3/3 基因型频率存在明显差异 ($P < 0.05$); $\epsilon 4$ 等位基因及 E4/3 基因型频率在病例组中均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 且病例组中 $\epsilon 4$ 携带者血胆固醇、低密度脂蛋白也均高于 E3/3 携带者 ($P < 0.05$)。表明载脂蛋白 E 基因多态性与急性心肌梗死相关, 并影响血胆固醇的代谢。

Apolipoproteins E Polymorphism in Acute Myocardial Infarction and Its Relation to Serum Lipids

JIN Wei, LU Yuan-Shan, LI Wei-Zhen, XU Ying-Hua and ZHEN Ming-Fang

(Department of Cardiology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China)

MeSH Apolipoprotein E; Genotype; Polymorphism; Gene Frequency; Myocardial Infarction, Acute; Patients; Cholesterol

ABSTRACT **Aim** To investigate the relationship between apolipoprotein E (apo E) genotype and acute myocardial infarction (AMI) and the influence of apolipoprotein E phenotype on serum cholesterol metabolism. **Methods** Polymorphism of apolipoprotein E gene were detected by polymerase chain-reaction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in a cross sectional study of 50 patients with AMI and 100 healthy subjects. The lipids of these subjects were measured with enzyme's methods. **Results** Compared with control group, the distribution of apolipoprotein E $\epsilon 4$ allele's and genotype's frequencies in AMI group were increased ($P < 0.05$), patients with $\epsilon 4$ carrier had higher total cholesterol. Low-density-lipoprotein (LDL)-cholesterol and apolipoprotein B concentrations than subjects with homozygous for $\epsilon 3$ ($P < 0.05$).

Conclusion Apolipoprotein E polymorphism is associated with AMI and affects the metabolism of serum cholesterol.

大量的流行病学研究表明载脂蛋白 E 结构变化影响血总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 和载脂蛋白 B 的代谢^[1,2], 载脂蛋白 E 有 3 种异构体, 分别由 3 种共显性的复等位基因 ($\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4$) 所控制。文献^[3]报道载脂蛋白 E 基因多态性与冠状动脉粥样硬化程度密切相关, $\epsilon 4$ 基因携带者有早发冠心病的可能^[4]。本文采用聚合酶链反应—限制片长多态性 (polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism, PCR RFLP) 分析心肌梗死患者载脂蛋白 E 基因型, 旨在探讨载脂蛋白 E 基因多态性与心肌梗死的相关性及载脂蛋白 E 基因型对血胆固醇代谢的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 选择 50 例急性心肌梗死后恢复期患者并且未用任何降脂药及对血脂代谢有影响的其它药物, 其中男性 32 例, 女性 18 例, 平均年龄 67.6 ± 7.4 岁, 急性心肌梗死的诊断参照世界卫生组织 (WHO) 诊断标准。所有患者均排除合并以下情况: 家族性高脂固醇血症、糖尿病、甲状腺疾病、脂肪肝及尿毒症、妊娠等。

1.1.2 正常对照组 选择经常规体检, 血生物化学、胸片及心电图等检查均正常的健康体检者, 共 100 例, 其年龄、性别与病例组相匹配。

1.2 研究方法

^①上海市第一人民医院检验科

1.2.1 血脂分析 所有入选病例均于清晨空腹静脉采血8 mL,其中3 mL放置于含枸橼酸钠抗凝管中待测载脂蛋白E基因型。另5 mL直接离心后将血清冻存待查血脂。血TC、TG、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)测定采用中华医学检验学会推荐的方法^[5],载脂蛋白A、B的测定采用免疫比浊法。所有操作均由专人使用全自动生物化学分析仪(olympus公司)完成,本院血脂测定符合质控标准。

1.2.2 载脂蛋白E基因型分析 ①引物p503: 5'-AACAACTGACCCCGGTGGGG-3'; P504: 5'-AT AA AT AT AA AT AT AT AAT AAT AAT GG CGCT-3', ②DNA抽提^[6]:全血溶血后,离心弃上清液,沉淀物加入蒸馏水,将沉淀物打碎离心,再加入10% SDS,蛋白酶孵育,然后用等体积饱和酚和氯仿抽提,取上层水相加入乙醇沉淀,用TE缓冲液溶解。③DNA扩增:取DNA抽提物2 mL加入反应混合液系混匀后放在PCR扩增仪中扩增DNA片段。④扩增产物酶切及基因型的鉴定:取扩增反应物加入HhaI酶及缓冲液,37℃过夜,然后取酶切产物,进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,按酶切DNA片段大小判断载脂蛋白E基因型。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验及 χ^2 分析处理实验结果。

2 结果

2.1 载脂蛋白E基因型

表2. 病例组和对照组基因型及等位基因频率

Table 2. Comparison of apo E allele's frequencies between the patient and control group

Groups	Genotypes				Allele		
	E3/3(%)	E3/4(%)	E2/4(%)	E2/3(%)	ε3(%)	ε4(%)	ε2(%)
Control	78(18.0%)	13(13.0%)	6(6.0%)	3(3.0%)	172(86.0%)	19(9.5%)	9(4.5%)
Patient	33(66.0%) ^a	14(28.0%)	1(2.0%)	2(4.0%)	82(82.0%)	15(15.0%) ^a	3(3.0%)

a: $P < 0.05$, compared with control group

表3. 对照组不同载脂蛋白E基因表型之间血脂水平的比较

Table 3. Comparison of different apo E genotypes with plasma lipid level in control group ($\bar{x} \pm s$)

Genotypes	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	APOAI (g/L)	APOB (g/L)
E4/3	13	5.52±0.83 ^a	1.63±0.69	1.04±0.15	3.67±1.03 ^a	1.48±0.19	1.01±0.18
E4/2	6	4.87±0.57	1.58±0.74	1.13±0.18	3.92±1.10	1.37±0.08	0.96±0.10
E3/3	78	5.15±0.90	1.82±0.99	1.09±0.29	3.39±0.98	1.45±0.19	1.05±0.28
E2/3	3	4.64±0.51	2.21±1.03	0.92±0.26	2.54±0.96	1.51±0.12	0.91±0.12

a: $P > 0.05$, compared with E3/3 carrier group

采用PCR-RFLP方法分析扩增产物的片段大小为312 bp,表1 (Table 1)显示经HhaI酶切后共发现4种基因型,即E3/3、E3/4、E2/4和E2/3。

表1. 载脂蛋白E的基因型

Table 1. The fragment length of different apo E genotypes

E2/2(bp)	E3/3(bp)	E4/4(bp)
91	91	72
83	61	61
61	48	48
—	35	35

2.2 载脂蛋白E基因型及等位基因频率分布

由表2 (Table 2)可见在正常对照组中,E3/3基因型及ε3等位基因频率分别为78.0%及86.0%,病例组中则分别为66.0%及82.0%,均常见于病例组和正常对照组中,两组间E3/3基因型频率存在明显差异($P < 0.05$)。病例组E3/4基因型及ε4等位基因频率分别为28.0%及15.0%,均明显高于正常对照组的13.0%及9.5%($P < 0.05$)。

2.3 载脂蛋白E基因型与血脂水平关系

按4种基因型将正常对照组和病例组分别分成4组。从表3 (Table 3)可见,正常对照组中,E4/3者其血总胆固醇、载脂蛋白B较E3/3者有增高趋势,但无统计学差异($P > 0.05$)。从表4 (Table 4)可见,在病例组中E4/3者血胆固醇、低密度脂蛋白和载脂蛋白B均明显高于E3/3者($P < 0.05$)。E4/2组因只有1例,未做统计。

表4. 病例组不同载脂蛋白 E 基因表型之间血脂水平的比较

Table 4. Comparison of different apo E genotypes with plasma lipid level in patient group ($\bar{x}\pm s$)

Genotypes	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	APOAI (g/L)	APOB (g/L)
E4/3	13	5.24±1.23 ^b	1.66±0.64	0.95±0.27	3.51±1.28 ^a	1.11±0.22	1.18±0.29
E3/3	33	4.53±0.95	1.42±0.55	1.02±0.21	2.93±0.83	1.16±0.20	0.95±0.22
E2/3	2	4.77±1.5	2.02±0.87	1.01±0.06	3.75±1.53	1.58±0.07	1.17±0.36

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, compared with E3/3 carrier group

3 讨论

载脂蛋白 E 基因呈多态性,常见有6种基因型。本研究对象中只发现4种基型即 E3/3、E3/4、E3/2 和 E2/4,其中 E3/3基因型最多见于正常对照组及病例组,与国内有关报道相似^[7]。

既往的研究证实载脂蛋白在血脂代谢中起很重要的作用,有关载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病关系的研究引起很多学者的重视,但由于各种结果并不一致,目前仍未达到共识。本人发现急性心肌梗死患者其 E3/4基因型 $\epsilon 4$ 等位基因频率均明显高于正常人组($P<0.05$),表明载脂蛋白 E 基因多态性与急性心肌梗死之间存在相关性,可能是心肌梗死的独立危险因子。其机制可能是,① $\epsilon 4$ 等位基因与血管紧张素转换酶(ACE)基因型有协同作用,载脂蛋白 E 基因与 ACE D 基因密切相关,而 ACE D 等位基因与心肌梗死发作有关^[8];② $\epsilon 4$ 携带者血 TC、LDLC 及载脂蛋白 B 代谢障碍,从而使血液粘滞度增高,血小板容易聚集,这些结果将促进心肌梗死的发生。Wang 等^[9]研究发现冠心病 $\epsilon 4$ 携带者其冠状动脉病变比非 $\epsilon 4$ 携带者更严重,Eichner 等^[10]研究证实 $\epsilon 4$ 携带者较 E3/3携带者有更高的冠心病死亡率,这些结果均支持本文的研究成果。但 Kuusisto^[11]等认为 $\epsilon 4$ 等位基因不是冠心病的独立危险因子,国内共也有报道载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病无相关性存在^[12]。这些发现与本文的结果不一致,其原因可能是研究的对象,范围不同所造成。

由于三种载脂蛋白 E 异构体在体内对血脂代谢的调节作用不同,因此不同等位基因及基因型携带者其血 TC、LDLC 及载脂蛋白 B 代谢情况也可能不一致。本文正常对照组中基因 $\epsilon 4$ 携带者较 E3/3携带者中血 TC 和 LDLC 有升高趋势,而病例组中 $\epsilon 4$ 携带者其血 TC、LDLC、载脂蛋白 B 水平则明显高于 E3/3携带者,表明 $\epsilon 4$ 等位基因将影响血 TC 和 LDLC 代谢,从而促进急性心肌梗死的发生、发展。

参考文献

1 Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1988, **8**(5): 1-21

2 Eichner JE, Kuller LH, Ferrell RE, et al. Phenotypic effects of apolipoprotein structure variation on lipid profiles; III. Contribution of apolipoprotein E phenotype to prediction of total cholesterol, apolipoprotein B and low density lipoprotein cholesterol in the Healthy women study. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**(3): 379-385

3 Kosunen O, Talasniemi S, Lehtovirta M, et al. Relation of coronary atherosclerosis and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer patients. *Stroke*, 1995, **26**(5): 743-748

4 Van Bockxmeer FM, Mamotte CDS. Apolipoprotein epsilon homozygosity in young man with coronary heart disease. *Lancet*, 1992, **340**(24): 879-880

5 李健斋,杨昌国,李清华,等. 中华医学检验学会血脂测定推荐方法. *中华医学检验杂志*, 1995, **18**(5): 185-187, 311-312

6 宋后燕,朱运松. 医用分子遗传学. 上海:上海医科大学出版社, 1992; 218-219

7 朱大明,陈在嘉,曾武威,等. 载脂蛋白 E 基因多态与冠心病关系的研究. *中国循环杂志*, 1997, **12**(5): 347-350

8 Van Bockxmeer FM, Cyril Ds, Frances A, et al. Angiotension-converting enzyme and apolipoprotein E genotypes and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*, 1995, **92**(8): 2066-2071

9 Wang XL, McGredie RM, Wilcken DEL. Polymorphisms of the apolipoprotein E gene and severity of Coronary artery disease defined by angiography. *Arterioscler Thromb*, 1995, **15**(8): 1030-1034

10 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**(2): 160-165

11 Kunisto J, Mykanen L, Kervinen K, et al. Apolipoprotein E4 phenotype is not an important risk factor for coronary heart disease or stroke in elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**(9): 1280-286

12 Weisgraber KH, Innerarity TJ, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apolipoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem*, 1982, **257**(24): 518-521

(此文1998-07-22收到,1999年-12-30修回)
(此文编辑 朱雯霞)