

# 110 例心肌梗死患者载脂蛋白 E 基因多态性

杨志健 朱铁兵 杨兵 贾永平 马根山 孔祥清 曹克将 张馥敏 马文珠

(南京医科大学附属第一医院内科, 南京 210029)

**主题词** 载脂蛋白 E: 心肌梗死: 聚合酶链反应: 多态性: 动脉粥样硬化: 基因型: 等位基因: 基因频率: 患者

**摘要** 为探讨载脂蛋白 E 基因型和心肌梗死之间的关系, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析 110 例心肌梗死患者和 131 例健康对照者的载脂蛋白 E 基因型及其在两组人群中的不同分布。结果发现, 对照组和心肌梗死组 E3/3 基因型发生频率最高, 占整个样本的 70.1%, 含载脂蛋白 E3 的杂合子(E2/3 和 E3/4)居中, 占整个样本的 25.3%, E4/4 基因型的发生频率最低。心肌梗死组 E3/4 和 E4/4 基因型的发生频率较对照组明显要高, 差别具有显著性( $P < 0.01$ ), 且 E4 携带者发生心肌梗死的年龄较为提前。结果提示, 载脂蛋白 E4 是心肌梗死患者的重要遗传标记, 且 E4 携带者心肌梗死的发病年龄提前。

## Apolipoprotein E Polymorphism in 110 Patients with Myocardial Infarction

YANG Zhi- Jian, ZHU Tie- Bing, YANG Bing, JIA Yong- Ping, MA Geng- Shan, KONG Xiang- Qing, CAO Ke- Jiang, ZHANG Fu- Min and MA Wei- Zhu

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**MeSH** Apolipoprotein E: Myocardial Infarction: Polymerase Chain Reaction: Polymorphism: Atherosclerosis: Genotype: Alleles; Gene Frequency; Patients

**ABSTRACT** **Aim** To study the relation between apolipoprotein E polymorphism and myocardial infarction. **Methods** 110 patients with myocardial infarction and 131 normals were enrolled and blood samples were collected. Their apoE genotyping were performed by polymerase chain reaction (PCR). **Results** Both in cases and controls, the allelic frequency of E3/3 was highest, reaching 70.1 percentage of whole volume, homozygote of apo E3 was moderate, and homozygote E4/4 was lowest. The frequencies of E3/4 and E4/4 was significantly high in patients with myocardial infarction compared with controls ( $P < 0.01$ ). It was found primarily that the age of first acute myocardial infarction was earlier in the carriers of E4. **Conclusions** apo E4 is an important genetic mark of the patients with myocardial infarction. The age of first acute myocardial infarction was earlier in the carriers of E4.

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apo E) 在脂质代谢特别是导致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的脂蛋白代谢中起着重要作用。载脂蛋白 E 结构基因位点存在多态性, 三种常见等位基因为:  $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ , 分别编码三种主要载脂蛋白 E 的异构体 E2、E3 和 E4, 三种等位基因表达产生 E2/2、E3/3、E4/4、E2/3、E2/4、和 E3/4 六种表型。研究表明, 在世界人群中,  $\epsilon 4$  等位基因频率分布可能与世界各地冠心病发病率不同有密切的关系。本文应用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术检测心肌梗死患者和正常对照者两组不同人群的载脂蛋白 E 基因的多态性, 观察它们在两组人群中的不同分布, 探讨载脂蛋白 E 基因型和心肌梗死之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

选择本院 1992 年~1997 年住院存活的心肌梗

死患者 110 例, 男性 82 例, 女性 28 例, 平均年龄  $65.3 \pm 7.1$  岁, 均符合 1981 年制订的全国急性心肌梗死诊断标准, 并按 1:1 与本市某企业及同期来本院体检, 无慢性肝、肾、肿瘤及冠心病等相关疾病的健康人 131 例作对照, 其中男性 89 例, 女性 42 例, 平均年龄  $67.5 \pm 7.2$  岁, 两组年龄无统计学差异。

### 1.2 方法

全部受检者均禁食 12 h 后采外周血 10 mL, 用 EDTA 抗凝, 2 000 r/min 离心 10 min 后, 取上层血浆送检血脂, 剩余血细胞 -20℃ 保存。采用外周血 DNA 提取-酚氯法进行载脂蛋白 E 基因型鉴定, 基因扩增方法为: 引物 1: 5' - TAAGCTTGGCAGGCTGTCCAAGGA - 3', 引物 2: 5' - ACAGAATTCGCCCCCGCCTGCTACAC - 3', 由中科院上海细胞生物研究所合成。四种脱氧核苷酸 dNTPs 及 Taq DNA 多聚酶购自上海复华公司, 内切酶 Hba I 购自华美生物工程公司。PCR 总体积 50  $\mu$ L, 含基因组 DNA 1  $\mu$ g,

引物 1 和引物 2 各 50 pmol, dNTPs 0.2 mmol/L (含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP), MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, 5 μL Taq DNA 多聚酶 2 单位, 按下列条件扩增: 95℃变性 5 min, 95℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃1.5 min, 循环 30 次, 72℃延伸 10 min, PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳分离, 若 378 bp 处出现荧光条带, 则为 PCR 特异产物。取 PCR 产物 15 μL 加 Hba I 15 单位, 37℃消化大于 3 h, 凝胶 8%, 以 PUC 18/Hap II 酶解片断为 DNA 片断对照, 于 50 mA 恒流下电泳 2~2.5 h 至溴酚蓝接近电泳玻璃板底部约 2 cm 处(玻璃板长 30 cm, 宽 20 cm, 胶厚 1.5 mm)。停止电泳后, 凝胶浸泡于 0.5 μg/L 溴乙锭 30 min, 紫外线透射灯下观察结果。

1.3 统计学分析

各类数据由本科流行病学研究室采用 SPSS 软件统计处理。

2 结果

2.1 载脂蛋白 E 基因型

在心肌梗死组和对照组中 E3/3 基因型发生频率最高, 占 70.1%, 含载脂蛋白 E3 的杂合子居中, E4/4 基因型发生频率最低。但心肌梗死组 E3/4 和 E4/4 基因型发生频率较对照组要高, 差别具有显著性 ( $P < 0.01$ ), 见表 1 (Table 1)。

2.2 心肌梗死患者基因型和发病年龄的关系

E4 携带者心肌梗死的发病年龄明显提前, 纯合子更加明显(表 2, Table 2)。由于目前的病例数较

少, 有待进一步积累。

表 1. 载脂蛋白 E 基因型分布

Table 1. Distribution of apo E genotypes (case, %)

Groups	E2/3	E3/3	E3/4	E4/4
Control	16(12.2)	98(74.8)	14(10.7)	3(2.3)
MI	10(9.1)	71(64.5)	21(19.1) <sup>a</sup>	8(7.3) <sup>a</sup>
Total	26(10.8)	169(70.1)	35(14.5)	11(4.6)

a:  $P < 0.01$ , compared with control group

表 2. 110 例心肌梗死患者基因型和发病年龄的关系

Table 2. Relationship between genotypes and age of MI onset in 110 patients ( $\bar{x} \pm s$ )

Genotypes	n	Age
E3/3	71	67.4 ± 5.6
E2/3	10	69.3 ± 2.5
E3/4	21	61.2 ± 3.4
E4/4	8	52.6 ± 2.6

2.3 载脂蛋白 E 基因的 Hba I 酶解

在紫外灯下, 各条带清晰易辨, E2/2 出现 91 bp 和 83 bp 片断, E4/4 出现 72 bp 和 48 bp 片断, E3/3 出现 91 bp 和 48 bp 片断, E2/3 出现 91 bp、83 bp 和 48 bp 片断, E3/4 出现 91 bp、72 bp 和 48 bp 片断, E2/4 出现 91 bp、83 bp、72 bp 和 48 bp 片断, 根据片断长度不同而加以鉴别。



图 1. 载脂蛋白 E 基因的 Hba I 酶解图谱  
Figure 1. Hba I enzymolysis of apo E

### 3 讨论

冠状动脉粥样硬化在早期就已经发生,在中老年发生临床冠心病而达到高峰。基因变异通过影响脂蛋白水平也影响粥样硬化(如低密度脂蛋白受体缺乏)<sup>[1]</sup>,最常见的变异是载脂蛋白 E。载脂蛋白 E 是由人类 19 号染色体一个基因位点的三个等位基因所编码,对应三种异构体 E2、E3、E4。E3 是母体形式,E2、E4 是点突变的结果<sup>[2,3]</sup>。大多数人群研究结果表明,与母体 E3 相比,E4 有升高低密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 B 水平的作用,而 E2 恰好相反,具有降低低密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 B 水平的作用。E2 和 E4 均具有升高甘油三酯的作用。目前尚未发现其它等位基因对人群血脂有如此影响<sup>[4]</sup>。三种等位基因携带者血脂水平有如此差异,导致机体在同一环境中患高脂血症和冠状动脉病变的程度不同。

本文研究结果表明,无论是病例组还是对照组,载脂蛋白 E3/3 都是占主导的基因型,但 E4 携带者在心肌梗死组较对照组明显增加,差别具有显著性。以往研究结果大都倾向于 E4 携带者具有发生冠心病的危险性,一份对 Framingham 人群的后代进行横断面研究发现,与载脂蛋白 E3/3 相比,载脂蛋白 E4 携带者低密度脂蛋白胆固醇水平升高,载脂蛋白 E2 和载脂蛋白 E4 者甘油三酯水平升高。不论男性和女性,载脂蛋白 E4 携带者患冠心病的危险性均上升<sup>[5]</sup>。在校正高血压、吸烟、肥胖和糖尿病后,这种关系依然存在。因而作者认为,载脂蛋白 E4 是脂质代谢紊乱和冠心病的重要遗传标记,与已知的能致脂蛋白代谢紊乱基因相比,载脂蛋白 E4 携带者患冠

心病的危险度更大。在 Framingham 人群的后代,有 15% 冠心病患者是载脂蛋白 E4 携带者。Bockxmeer 等<sup>[6]</sup>报告 E4 是早发冠状动脉粥样硬化性心脏病的独立危险因子,纯合子 E4/4 更是导致冠心病发病年龄提前的危险因素。

本文研究结果也表明,心肌梗死组载脂蛋白 E4 等位基因的频率较对照组高得多,且初步发现 E4 携带者心肌梗死的发病年龄较为提前,这一点值得进一步研究。

### 参考文献

- 1 Hixson JE, Vernier DT, Zannis VL, et al. Apolipoprotein polymorphisms affect atherosclerosis in young males. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 1 237- 244
- 2 Zannis VL, Breslow JL, Utermann, et al. Proposed nomenclature of apo E isoprotein apo E genotypes and phenotypes. *J Lipid Res*, 1982, **23**: 911- 914
- 3 Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW, et al. Human E apolipoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo E isoforms. *J Biol Chem*, 1981, **256**: 9 077- 083
- 4 Klausen IC, Gerdes LU, Sihm I, et al. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet Epidemiol*, 1992, **9**: 155- 167
- 5 Peter WF, Paik YK, Dawson PA, et al. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia and coronary heart disease. *JAMA*, 1994, **272**: 1 666- 671
- 6 Van Bockxmeer FM, Ehnholm C, Lukka M, et al. Apolipoprotein epsilon 4 homozygosity in young men with coronary heart disease. *Lancet*, 1992, **340**: 879- 880

(此文 1998- 12- 07 收到, 1999- 07- 12 修回)

(此文编辑 文玉珊)