

载脂蛋白 E 基因多态性对血脂水平的影响及与冠心病的关系

彭 健 龚五星^④ 彭 澍 王 骏^④ 石 理 林岫芳

(暨南大学医学院附属第三医院, 珠海市人民医院 心内科, ④临床分子生物学实验中心, 珠海 519000)

主题词 载脂蛋白 E; 基因型; 多态性, 限制片段长; 基因频率; 基因表达; 冠状动脉疾病; 病人

摘 要 为研究载脂蛋白 E 基因多态性在冠心病发生发展中的作用及其对血脂水平的影响, 应用聚合酶链反应- 限制片段多态性检测法, 测定 220 例冠心病患者和 180 例正常对照者的载脂蛋白 E 基因型; 并按常规方法测定血脂水平。结果发现中国汉族人群中存在 5 种载脂蛋白 E 基因型, 分别为 E3/3、E3/2、E4/3、E4/2 及 E4/4。冠心病组载脂蛋白 E4/3 基因型和 ε4 等位基因频率(分别为 25.0% 和 14.3%) 均显著高于对照组(13.3% 和 8.1%) ($P < 0.01$), 载脂蛋白 E3/3 基因型频率(59.5%) 则低于对照组(70.0%) ($P < 0.05$); 冠心病组总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平显著高于对照组($P < 0.01$); 在冠心病组的各亚型之间, 总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平之间存在统计学差异($P < 0.05$)。上述实验结果说明, 载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病的发生发展密切相关并影响血脂的代谢水平; ε4 等位基因可能是冠心病重要的遗传易患因素之一。

Effect of Apolipoprotein E Gene Polymorphism on Plasma Lipid Level and Association with Coronary Heart Disease

PENG Jian, GONG Wu- Xing, PENG Shu, WANG Jun, SHI Li and LIN Xiu- Fang

(Department of Cardiology, the Affiliated Third Hospital of Jinan University, Zhuhai Municipal People's Hospital, Zhuhai 519000, China)

MeSH Apolipoprotein E; Genotype; Polymorphism, Restriction Fragment Length; Gene Frequency; Gene Expression; Coronary Disease; Patients

ABSTRACT **Aim** To study the function of apolipoprotein E gene polymorphism on coronary heart disease (CHD) and to evaluate the effect of apolipoprotein E gene polymorphism on plasma lipid levels. **Methods** By using polymerase chain reaction (PCR) - restriction fragment length polymorphism (RFLP), we determined apolipoprotein E genotype of 220 CHD patients and 180 healthy controls. Other plasma lipid levels are measured by routine way. **Results** 5 genotypes of apolipoprotein E, E3/3, E3/2, E4/3, E4/2 and E4/4 are detected in our study. There are statistically significant differences in apolipoprotein E4/3 and ε4 frequencies between CHD patients and controls ($P < 0.01$). We also find statistically difference in apolipoprotein E3/3 frequencies between the two groups ($P < 0.05$). CHD patients have significantly higher serum total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) than controls ($P < 0.01$). Among different apolipoprotein E genotypes of CHD patients, there are statistically difference in TC and LDLC levels. **Conclusion** These results suggest that apolipoprotein E gene polymorphism is involved in the occurrence and the development of CHD and affects plasma lipid levels. apolipoprotein Eε4 might be an important genetic factor of CHD.

载脂蛋白 E (apolipoprotein E) 作为脂蛋白的配体和结构与功能蛋白对血脂代谢起重要调节作用。冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是遗传、环境和不良的生活习惯等多因素所致疾病。载脂蛋白 E 基因变异与冠心病发病遗传易患性的相关关系, 近年来已成为临床及流行病学与遗传分子生物学研究的焦点^[1]。我们应用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术和分子生物学方法, 检测了一组汉族正常人与冠心病患者的载脂蛋白 E 基因型, 目的

在于研究分析载脂蛋白 E 基因遗传变异与冠心病发病的关联作用及其对血脂质、脂蛋白水平的影响和意义, 并调查和积累国人冠心病防治的分子流行病学资料。

1 对象与方法

1.1 研究对象

220 例冠心病患者分别来自我院和本市其他医院心内科和心脏监护病房 (coronary care unit, CCU) 的住院病人, 其中男性 124 例, 女性 96 例, 平均年龄 62.4 ± 2.1 岁 (36~ 88 岁)。此为冠心病组。180 例体格检查健康者作为对照组, 其中男性 101 例, 女

性 79 例, 平均年龄 59.1 ± 1.8 岁 (41~78 岁)。两组基本条件互相匹配, 具有可比性。冠心病的诊断以 1979 年世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 确定的诊断标准为依据, 并排除糖尿病、家族性高胆固醇血症、甲状腺疾病、肾脏疾病、肝脏疾病、脑梗塞、重度高血压病等。两组研究对象皆为汉族人群, 研究个体之间无血缘关系。

1.2 血样采集

受试者均禁食 8 h, 于早晨 6~7 时取卧位肘静脉血, 分别置于干燥管及肝素抗凝管中。

1.3 血脂测定

采用标准酶法测定总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC), 用免疫扩散法测定载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B; 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 按现行通用公式计算, 即 $LDLC = TC - (TG/2.2 + HDLC)$ mmol/L。

1.4 DNA 抽提

将上述抗凝血按低渗溶血、酚/氯仿法抽提白细胞基因组 DNA, 适量 TE 溶解, -20°C 保存;

1.5 基因扩增

用热启动 PCR 法对载脂蛋白 E 基因进行扩增, 反应体系包括有 2 μL 模板 DNA, dNTPs 各 160 $\mu\text{mol/L}$, 引物各 0.35 $\mu\text{mol/L}$ (引物 1 为: 5'-AACAACTGACCCCGGTGGCG-3'; 引物 2 为: 5'-ATGGCGCTGAGGCCGCGCTC-3'), 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 10% 二甲基亚砜 (DMSO), Taq DNA 聚合酶 2.4 u, 总反应体积为 20 μL 。PCR 反应参数为: 97°C 变性 5 min 后于 65°C 加入 Taq DNA 聚合酶, 72°C 1 min; 然后 94°C 1 min \rightarrow 65°C 1 min \rightarrow 72°C 1 min, 循环 30 次; 72°C 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳于 292 bp 片段处确定扩增产物质量。

1.6 聚合酶链反应产物酶切

包括 8 μL 特异性 PCR 扩增产物和 12 u Hha I 内切酶; 酶切总体积为 20 μL , 35°C 消化 20 h。

1.7 基因分型

取 7 μL 上述酶切产物, 进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), 200 V 100 min, 银染色法显示带判断载脂蛋白 E 基因型。基因型的判定以 PBR 322 DNA/Hae ㉔为标准分子标记物, 标准参照 Richard 等^[2] 方法。

1.8 统计学处理

载脂蛋白 E 基因型与等位基因频率采用频率计数法计算, 组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验 (pearson 法) 及计算比值比 (odds ratio, OR) 进行相关分析, 组间血脂比较采用 t 检验, 不同基因型间血脂均数比较采用单因素方差分析法 (oneway ANOVA)。均应用国际通用的 SPSS 统计软件包进行统计分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有极显著性意义。

2 结果

2.1 载脂蛋白 E 基因型及等位基因频率分布

400 例研究对象的 DNA 均得到满意扩增。PCR 产物片段大小为 292 bp。共检测出五种载脂蛋白 E 基因型, 分别为 E3/3、E4/3、E3/2、E4/2 和 E4/4 (图 1, Figure 1)。

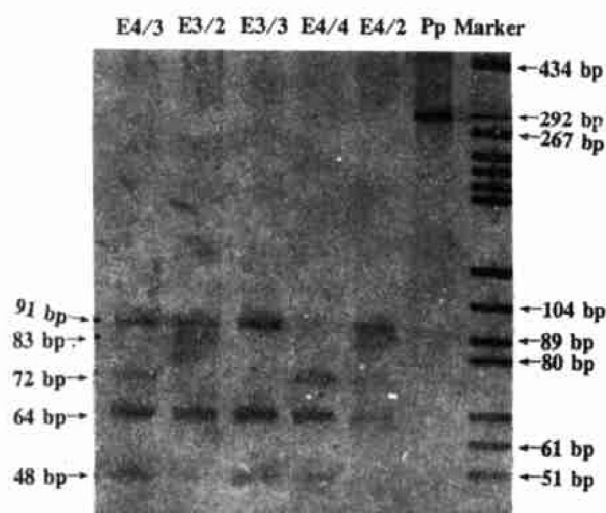


图 1. 载脂蛋白 E DNA 扩增产物及基因型片段

Figure 1. DNA PCR product and genotype fragments of apolipoprotein E. PCR products is abbreviated to Pp.

载脂蛋白 E 基因型和等位基因型频率分布见表 1 (Table 1, E2/2 和 E4/4 基因型例数较少, 未行统计学比较)。从表 1 (Table 1) 可见, 冠心病组 E4/3 基因型和 $\epsilon 4$ 等位基因频率明显高于对照组 ($P < 0.01$), E3/3 频率则低于对照组 ($P < 0.05$)。通过 OR 分析载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病发生之间的相关性发现, $\epsilon 4$ 等位基因与冠心病发病存在密切关系。其 OR (95% confidence interval, CI) = $1.91 (1.43 \pm 2.39, P < 0.01)$ 。 $\epsilon 3$ 等位基因频率低于对照组, 但二者差异处于统计学临界值 ($P = 0.07$)。

表 1. 冠心病组和对照组载脂蛋白 E 基因型与等位基因频率比较

Table 1. Comparison of frequency of apolipoprotein E genotypes and alleles between CHD and control group (n, %)

Groups	n	Genotypes						alleles		
		E2/2	E3/3	E4/4	E3/2	E4/3	E4/2	ε2	ε3	ε4
Control	180	0 (0)	126 (70.0)	0 (0)	25 (13.9)	24 (13.3)	5 (2.8)	30 (8.3)	301 (83.6)	29 (8.1)
CHD	220	0 (0)	131 (59.5 ^a)	3 (1.4)	29 (13.2)	55 (25.0)	2 (0.9)	31 (7.0)	346 (78.7)	63 (14.3 ^b)

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; compared with control group

2.2 载脂蛋白 E 基因多态性对血脂和脂蛋白水平的影响

从表 2 (Table 2) 可见, 冠心病组的 TC 和 LDLC 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 其余各项血脂和脂蛋白水平没有统计学差异 ($P > 0.05$)。将冠心病

患者按基因型分组进行比较分析发现, E4/3 的 TC 和 LDLC 水平和 E3/3 的 LDLC 水平均高于 E3/2 组 ($P < 0.05$) (表 3), 其余各项血脂和脂蛋白水平则没有统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 2. 冠心病组和对照组血脂和脂蛋白水平比较

Table 2. Comparison of serum lipid and lipoprotein levels between CHD group and control group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	Apo A1 (g/L)	Apo B (g/L)
Control	180	5.15 ± 1.31	1.60 ± 0.24	1.93 ± 0.72	2.58 ± 1.00	1.05 ± 0.11	1.23 ± 0.46
CHD	220	5.98 ± 0.68 ^b	1.72 ± 0.31	1.84 ± 0.67	3.45 ± 0.91 ^b	1.10 ± 0.13	1.19 ± 0.67

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

表 3. 冠心病患者各基因型之间血脂和脂蛋白水平比较

Table 3. Comparison of serum lipid and lipoprotein levels between apolipoprotein E genotypes of patients with CHD ($\bar{x} \pm s$)

Apo E genotype	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	Apo A1 (g/L)	Apo B (g/L)
E3/3	5.15 ± 0.68	1.39 ± 0.34	1.10 ± 0.28	3.19 ± 0.19 ^a	1.09 ± 0.11	1.17 ± 0.09
E3/2	4.44 ± 0.52	1.41 ± 0.21	1.12 ± 0.39	2.06 ± 0.27	0.99 ± 0.10	1.21 ± 0.12
E4/3	5.39 ± 0.61 ^a	1.46 ± 0.29	1.06 ± 0.35	2.99 ± 0.28 ^a	1.14 ± 0.13	1.16 ± 0.10

a: $P < 0.05$, compared with E3/2 group.

3 讨论

人群载脂蛋白 E 具有显著的遗传多态性, 由位于第 19 号染色体长臂上的单一结构基因所编码, 有 3 种复等位共显性基因 ε2、ε3 和 ε4, 构成常见的六种表型: 三种纯合子 E2/2、E3/3、E4/4 和三种杂合子 E3/2、E4/3 和 E4/2^[4]。载脂蛋白 E 三种异构体的受体结合活性存在明显差异, 从而可能对血脂水平和冠心病发病产生不同影响。载脂蛋白 E 基因频率在正常人群中的分布有明显的共同特征: E3/3 表型分布频率最高, 均超过 50%, ε3 等位基因均超过 72%; E2/2、E4/4 和 E4/2 表型分布最低, 三者之和不超过 8%。本研究结果与其相符。据报道亚洲人载脂蛋白 E 基因型出现频率较为一致^[2], 但与欧美人群比较显示存在差异, 即不同人种其基因型及表

型分布频率各异。本研究结果与已报道的华人群载脂蛋白 E 基因频率比较显示高度的一致^[5], 并不同于欧美人群。这种差异可能是不同国家或种族人群的血脂水平与冠心病发病率不同的解释原因之一。到目前为止已有一些学者对载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病相关关系进行了研究分析, 得到的结果却不一致。Stengard 等^[6]的研究结果提示载脂蛋白 E 基因多态性与血总胆固醇水平及冠心病死亡率之间有统计学差异, ε4 等位基因尤其为一项有价值的冠心病危险因素。尚有研究发现载脂蛋白 E ε4 等位基因携带者有早发冠心病的可能^[7]。但有报道认为^[8]载脂蛋白 E4 和非载脂蛋白 E4 基因携带者的冠心病死亡率、总心脏事件和冠心病总发病率无显著差异。我国在该领域的研究亦得到不同结果^[9,10]。

赵毅等^[10]得出:载脂蛋白 E 基因多态性可能是通过对血脂的影响从而间接对冠心病发病起作用。本研究表明:冠心病组载脂蛋白 E4/3 基因型和 ε4 等位基因频率明显高于正常对照组, E3/3 基因型频率则低于正常对照组, ε3 等位基因频率在两组间的差异处于统计学临界值,显示载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病的发生有明显相关性。载脂蛋白 E 的重要生理功能是作为脂蛋白的配体参与肝脏的脂质代谢,尤其是乳糜微粒(chylomicron, CM)残基的代谢。载脂蛋白 E2 与脂蛋白受体结合的能力低下,引起乳糜微粒和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein cholesterol, VLDL)残粒分解代谢延缓,造成这些残粒在体内蓄积,总胆固醇水平降低;载脂蛋白 E4 的作用与之相反,表现为总胆固醇水平升高。载脂蛋白 E 不同基因型即可能通过作用于血脂代谢而影响冠心病的发病。本研究显示冠心病组和正常对照组之间总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平存在统计学差异;在载脂蛋白 E 不同基因型之间, E3/2 的总胆固醇水平较低而 E4/3 的总胆固醇水平较高,低密度脂蛋白胆固醇水平亦存在差异,从而揭示载脂蛋白 E 基因多态性、血脂、脂蛋白水平与冠心病之间必然存在有因果关系。高脂血症是冠心病的主要危险因素之一,各种引起血脂代谢异常的疾病几乎均可导致冠心病的发生;吸烟、酗酒、肥胖、性别等也是冠心病的发病混杂因素。许多研究证实载脂蛋白 E 基因多态性是影响血浆总胆固醇浓度的重要遗传因素之一^[11]。本研究排除了可能引起高脂血症及与载脂蛋白 E 基因多态性可能有关的各种疾病,并在病例组和对照组之间平衡各项混杂因素。结果证实:载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病发生密切相关,这不仅与其影响血总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇水平有关,尚可能通过遗传机制发挥作用。载脂蛋白 Eε4 等位基因有理由认为是冠心病一个重要的遗传易患和危险因素;ε3 等位基因频率是否为其保护因素尚待扩大检测人群作进一步研究。在人群中进行载脂

蛋白 E 基因多态性检测,对冠心病的早期预防、筛查、监测和积极的干预治疗均可能有较为重要的意义。

参考文献

- 1 Richard P, David F, Visvikis S, et al. Common and rare genotypes of human apolipoprotein E determined by specific restriction profiles of polymerase chain reaction- amplified DNA. *Clin Chem*, 1994, **40**(1): 24-29
- 2 Evans AE, Zhang W, Moreel JF, et al. Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy Chinese men. *Hum Genet*. 1993, **92**(2): 101-107
- 3 Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet*, 1985, **37**: 268-273
- 4 Zannis V, Breslow JL, Utermann G, et al. Proposed nomenclature of ApoE isoproteins, ApoE genotypes and phenotypes. *J Lipid Res*, 1982, **23**: 911-915
- 5 游学科,赵水平,朱铁兵,等. 人载脂蛋白 E 的 PCR-RFLP 基因分型. 湖南医科大学学报, 1995, **20**: 333-335
- 6 Stengard JH, Weiss KM, Sing CF. An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Hum Genet*, 1998, **103**: 234-241
- 7 Van Bockxmeer FM, Mamotte CDS. Apolipoprotein epsilon homozygosity in young man coronary heart disease. *Lancet*, 1992, **340**: 879-880
- 8 Kuusisto J, Mykkanen L, Kesaniemi YA, 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
- 9 鄢盛凯,周新,林其燧,等. 汉族人群载脂蛋白 E 基因多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病关系的研究. 中华医学杂志, 1998, **78**(10): 790-791
- 10 赵毅,沈霞. 心肌梗塞患者载脂蛋白 E 多态性与血脂的关系. 上海第二医科大学学报, 1998, **18**(5): 378-380
- 11 Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, et al. apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem*, 1995, **41**: 1068-086

(此文 1999-09-01 收到, 1999-11-09 修回)

(此文编辑 胡必利)