

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2000)-01-0054-04

载脂蛋白 E 基因多态性对血脂水平的影响及
与冠状动脉狭窄的关系李卫华¹, 黄德嘉², 杜修海¹, 张卫泽¹, 胡静玲¹

(1. 兰州军区总医院心内科, 兰州 730050; 2. 华西医科大学附属第一医院心内科, 成都 610041)

[主题词] 载脂蛋白 E; 基因; 多态性; 血脂; 冠状动脉疾病; 再狭窄

[摘要] 为探讨载脂蛋白 E 基因多态性对血脂水平的影响及与冠状动脉狭窄程度的关系, 采用聚合酶链反应—限制片段长度多态性对 95 例冠心病患者和 46 例正常对照者载脂蛋白 E 基因型进行分析, 同时测定血脂及载脂蛋白 B 水平。并根据冠状动脉受累支数不同将冠心病患者分为冠状动脉多支病变组和单支病变组。结果显示, 55 例冠状动脉病变多支组和 40 例冠状动脉单支病变组 E3/4 基因型和 E4 等位基因频率均高于对照组 ($P < 0.01$), 且多支病变组 E3/4 基因型和 E4 等位基因频率高于单支病变组 ($P < 0.05$)。与 E3/3 及 E2/3 基因型比较, E3/4 基因型者有较高的总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 B 水平及较低的高密度脂蛋白胆固醇水平。与对照组比较, 冠心病组 E3/4 基因型升高总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 B 的作用及降低高密度脂蛋白胆固醇的作用更明显。表明载脂蛋白 E 基因多态性影响血脂代谢, E4 等位基因与冠心病危险性增加有关, E4 等位基因频率升高的冠心病者冠状动脉受累支数加重, 推测 E4 等位基因可能与冠状动脉狭窄程度存在内在联系。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

Effect of Apolipoprotein E Polymorphisms on Serum Lipids and Relation to Coronary Stenosis

LI Wei-Hua, HUANG De-Jia, DU Xiu-Hai, ZHANG Wei-Ze, and HU Jing-Ling

(Department of Cardiology, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, China)

MeSH Apolipoprotein E; Genes; Polymorphisms; Serum Lipids; Coronary Artery Disease; Stenosis**ABSTRACT** **Aim** To evaluate the effect of apolipoprotein E (apo E) polymorphism on serum lipids and the relationship between apo E polymorphism and coronary stenosis.**Methods** The polymorphisms of apo E gene were studied using polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism (PCR—RFLP) in 95 cases with coronary artery disease (CAD) and in 46 controls of equivalent age. The serum lipids and apolipoprotein B (apo B) levels were measured in the two groups.**Results** The frequencies of apo E3/4 genotype and apo E4 allele were significantly higher in 55 cases of CAD with multiple vessel disease (MVD) and in 40 cases of CAD with single vessel disease (SVD) than in 46 controls ($P < 0.01$), while there were significantly higher in the MVD groups than in the SVD groups ($P < 0.05$). Apo E3/4 genotype had significantly higher serum total cholesterol (TC), LDL-cholesterol (LDLC) and apo B levels and lower HDL-cholesterol (HDLC) level compared to apo E3/3 and apo E2/3 genotypes in the patients and in the controls. In the patients, apo E3/4 genotype had significantly higher TC, LDLC and apo B levels and lower HDLC levels compared with in the controls.**Conclusions** It is concluded that apoE polymorphism is involved in cholesterol metabolism, where apo E4 allele is associated with an increased risk of CAD. In CAD cases, an increased frequency of apo E4 allele is associated with an increased severity of coronary stenosis. Therefore it is assumed that there is certain relation between apoE4 allele and severity of coronary stenosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发病机制受多种因素的影响, 其中脂质沉积在 As 形成过程中起重要作用。研究发现, 载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apo E) 在脂代谢及巨噬细胞聚集脂质中发挥重

要作用^[1]。载脂蛋白 E 结构基因存在多态性, 这种多态性是决定个体血脂水平差异的重要遗传因素之一^[2]。急性心肌梗死与 As 的发生发展密切相关, 是早发冠心病的预测因子^[3]。最近的研究表明, 载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病的严重程度相关^[4]。但对这一假说迄今尚未得到明确的结论。本文通过对经冠状动脉造影证实的不同狭窄程度的冠状动脉病

[作者简介] 李卫华, 女, 1968 年 2 月出生, 硕士研究生毕业, 现为住院医师。

变者与冠状动脉正常者进行载脂蛋白 E 基因型分析及血脂测定,以探讨载脂蛋白 E 基因多态性对血脂水平的影响及与冠状动脉狭窄程度间可能的内在联系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 冠心病组 造影结果显示至少一支冠状动脉主支狭窄 $\geq 50\%$,并根据病变累及大冠状动脉及其主要分支的血管条数分为两组:单支病变组 40 例,男性 28 例,女性 12 例,平均年龄 59.1 ± 8.3 岁;④多支病变组(左主干或冠状动脉主要分支狭窄 ≥ 2 支)55 例,男性 35 例,女性 20 例,平均年龄 59.1 ± 9.5 岁。

1.1.2 对照组 造影结果显示冠状动脉正常者 46 例,男性 28 例,女性 18 例,平均年龄 57.9 ± 9.0 岁。以上研究对象排除家族性高胆固醇血症、糖尿病、甲状腺功能异常及肝肾功能障碍者。近两个月内未服用降脂、抗凝及止血药等。两组在年龄、体重指数、吸烟状况、血压及心功能方面均无统计学差异($P > 0.05$)。

1.2 血脂水平检测

所有研究对象均于清晨空腹采静脉血 10 mL,其中 5 mL 放置含 EDTA 抗凝管中待测载脂蛋白 E 基因型,另 5 mL 离心后将血清置 -70°C 冻存待查血脂。血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)采用标准酶法测定,低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)采用 Friedewald 公式计算: $\text{LDLC} = (\text{TC} - \text{HDLC} - 1) / 5\text{TG}$ (各项指标单位均为 mmol/L, $\text{TG} < 4 \text{ mmol/L}$ 时此公式适用),载脂蛋白 B 采用免疫比浊法测定。以上指标测定均由专人操作,由同一台全自动生物化学分析仪完成。

1.3 载脂蛋白 E 基因型分析

1.3.1 基因组 DNA 的提取 参照文献[5],取 EDTA 抗凝血 5 mL,离心后的沉淀物加 5 倍体积双蒸水混匀,3 500 rpm 离心 20 min,弃上清,加生理盐水 10 mL 洗涤,收获白细胞。加入 10 mL 细胞裂解液,混匀,3 500 rpm 离心 15 min,弃上清,加 STE 3 mL,10% SDS 0.3 mL 和蛋白酶 K 0.2 mL 混匀,置 37°C 孵育 12 h。以酚、氯仿萃取三次,10 000 rpm 离心 10 min;上清加 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠,2 倍体积无水乙醇,沉淀 DNA,70% 乙醇漂洗二次。TE 溶解,置

-20°C 保存。备用模板 DNA。

1.3.2 聚合酶链反应引物扩增 参照文献[6],引物序列为:引物 F4: $5' - \text{ACAGAATTCGCCC}-\text{CGGCCTGGTACAC}-3'$,引物 F6: $5' - \text{TAAGCITG}-\text{GCACGGCTGTCCAAGGA}-3'$ (上海细胞研究所合成)。PCR 反应总体积 50 μL ,包括 10 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCl、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl_2 、引物 F4 和 F6 各 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、dNTPs 各 0.12 mmol/L、模板 DNA 0.1 ~ 0.3 μg 及 Taq 聚合酶 2u,混匀后加等体积石蜡油覆盖。反应程序:加 Taq 聚合酶前以 95°C 10 min 预变性,以后每个循环均以 95°C 变性 1 min, 57°C 复性 1.5 min, 72°C 延伸 2 min,循环 30 次后于 72°C 保温 5 min,终止反应。取 5 μL 扩增产物进行 2% 琼脂糖电泳鉴定。

1.3.3 聚合酶链反应扩增产物的检测 取扩增的 PCR 产物(244 bp) 10 μL ,加入 HhaI 1 μL , 37°C 进行酶切反应 3 h,取 10 μL 产物行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染法判定结果。

1.4 统计学处理

数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 冠心病组与对照组血脂水平比较

从表 1 (Table 1) 可见,冠心病多支病变组和单支病变组 TC、LDLC 及载脂蛋白 B 水平均高于对照组($P < 0.01$),且随冠状动脉受累支数的加重,TC、LDLC 及载脂蛋白 B 水平呈上升趋势,而 HDLC 呈降低趋势。

表 1. 不同冠状动脉病变组与对照组血脂水平比较

Table 1. Comparison of serum lipids levels between control group and different vessels disease group ($\bar{x} \pm s$)

| Index | Control group (n= 46) | SVD group (n= 40) | MVD group (n= 55) |
|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| TC (mmol/L) | 4.07 \pm 0.83 | 4.41 \pm 0.86 ^b | 5.75 \pm 0.91 ^a |
| TG (mmol/L) | 1.41 \pm 0.27 | 1.44 \pm 0.23 | 1.47 \pm 0.29 |
| HDLC (mmol/L) | 1.26 \pm 0.21 | 1.07 \pm 0.24 ^b | 1.05 \pm 0.23 ^b |
| LDLC (mmol/L) | 2.53 \pm 0.57 | 3.06 \pm 0.58 ^a | 4.41 \pm 0.62 ^a |
| Apo B (g/L) | 0.61 \pm 0.30 | 0.80 \pm 0.31 ^a | 0.84 \pm 0.31 ^a |

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, compared with control group. MVD group: multiple vessel disease group; SVD group: single vessel disease group

2.2 冠心病组与对照组载脂蛋白 E 基因型比较

从表 2 (Table 2) 可见,141 例研究对象中,载脂

蛋白 E 基因型以 E3/3 频率最高, 而 E2/2、E2/4 及 E4/4 频率则很低。冠状动脉多支病变组和单支病变组 E3/4 频率均高于对照组, 而 E3/3 频率略低于对照组。冠状动脉多支病变组 E2/3 频率较对照组低。各组等位基因累积频率按公式计算, 冠状动脉多支病变组和单支病变组 $\epsilon 4$ 频率均明显高于对照组, 且多支病变组 $\epsilon 4$ 频率高于单支病变组。此外, 多支病变组 $\epsilon 2$ 频率低于对照组。

2.3 冠心病组与对照组不同载脂蛋白 E 基因型血脂水平比较

按载脂蛋白 E 六种基因型分为三组: E2/2+ E2/3、E3/3、E3/4+ E4/4。E2/4 因中性作用而排除在外。由表 3 (Table 3) 可见, 在不同基因型间, TC、LDLC 及载脂蛋白 B 水平均按 E3/4+ E4/4> E3/3> E2/2+ E2/3 顺序递减, 而 HDLC 水平按 E3/4+ E4/4< E3/3< E2/2+ E2/3 顺序递增。在不同基因型组中, 冠心病组 TC、LDLC 及载脂蛋白 B 水平均高于对照组 ($P<0.05$), HDLC 水平均低于对照组 ($P<0.05$), TG 水平在冠心病组高于对照组, 但无显著性差

异 ($P>0.05$)。

表 2. 不同冠状动脉病变组与对照组载脂蛋白 E 基因型及等位基因频率分布比较

Table 2. Comparison of apolipoprotein E genotypes and frequencies of allele between different vessels disease group and control group (n, %)

| Genotypes | Control (n = 46) | SVD (n = 40) | MVD (n = 55) | Total (n = 141) |
|--------------|---------------------|----------------------|------------------------|--------------------|
| E2/2 | 1(2.2) | 1(2.5) | 0(0) | 2(1.4) |
| E2/3 | 4(8.7) | 3(7.5) | 3(5.4) ^{bd} | 10(7.1) |
| E2/4 | 1(2.2) | 1(2.5) | 2(3.6) | 4(2.8) |
| E3/3 | 34(73.9) | 27(67.7) | 34(61.8) | 95(67.4) |
| E3/4 | 6(13.0) | 7(17.3) ^b | 14(25.6) ^{ac} | 27(19.1) |
| E4/4 | 0(0) | 1(2.5) | 2(3.6) | 3(2.1) |
| Alleles | | | | |
| $\epsilon 2$ | 3(7.6) | 3(7.5) | 3(4.5) ^{bd} | 9(6.4) |
| $\epsilon 3$ | 40(84.8) | 32(80.1) | 42(77.3) | 114(80.5) |
| $\epsilon 4$ | 3(7.6) | 5(12.4) ^b | 10(18.2) ^{ad} | 18(13.1) |

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

表 3. 冠心病组与对照组不同基因型间血脂水平比较

Table 3. comparison of different ApoE genotypes with serum lipids level in control group and CHD group ($\bar{x} \pm s$)

| Index | E2/2+ E2/3 | | E3/3 | | E3/4+ E4/4 | |
|---------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| | CHD(n = 7) | Control(n = 5) | CHD(n = 61) | Control(n = 34) | CHD(n = 24) | Control(n = 6) |
| TC (mmol/L) | 5.05 \pm 0.85 ^a | 3.97 \pm 0.81 | 5.20 \pm 0.82 ^b | 4.18 \pm 0.80 | 5.95 \pm 0.86 ^a | 4.35 \pm 0.83 |
| TG (mmol/L) | 1.87 \pm 0.80 | 1.36 \pm 0.28 | 1.55 \pm 0.84 | 1.16 \pm 0.31 | 1.23 \pm 0.81 | 1.15 \pm 0.29 |
| HDLC (mmol/L) | 1.26 \pm 0.31 ^b | 1.33 \pm 0.30 | 1.16 \pm 0.29 ^b | 1.27 \pm 0.29 | 1.05 \pm 0.28 ^b | 1.15 \pm 0.31 |
| LDLC (mmol/L) | 3.42 \pm 0.38 ^a | 2.37 \pm 0.45 | 3.37 \pm 0.36 ^b | 2.63 \pm 0.44 | 4.28 \pm 0.42 ^a | 2.97 \pm 0.46 |
| Apo B (g/L) | 0.71 \pm 0.20 ^a | 0.51 \pm 0.19 | 0.82 \pm 0.19 ^a | 0.62 \pm 0.18 | 0.88 \pm 0.20 ^a | 0.69 \pm 0.21 |

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

3 讨论

载脂蛋白 E 结构基因存在多态性, 三种常见等位基因 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4$ 分别编码载脂蛋白 E 的三种主要异构体 E2、E3 和 E4。不同载脂蛋白 E 异构体显示不同的受体结合活性, 从而导致个体间血脂水平的差异, 这是载脂蛋白 E 与 As 的发生发展密切相关的重要基础^[7]。本文观察到, 在不同基因型的冠心病组与对照组中, $\epsilon 4$ 等位基因携带者均伴有血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇及载脂蛋白 B 水平的升高, 其升高趋势为: E3/4+ E4/4> E3/3> E2/2+ E2/3, 且冠心病组 $\epsilon 4$ 等位基因升高总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇及载脂蛋白 B 的作用较对照组更明显。

与多数研究认为 $\epsilon 4$ 等位基因变异影响血胆固醇和载脂蛋白 B 水平的结果相符^[2~4]。提示载脂蛋白 E 基因多态性是影响个体血脂水平差异的内在遗传因素之一, 推测其机制除与不同载脂蛋白 E 异构体的受体结合活性及体内代谢速率明显差异有关外, 尚可能与肠道对胆固醇摄取能力的差异有关^[8]。此外, 本文研究显示, 冠心病组总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇及载脂蛋白 B 水平均高于对照组, 而高密度脂蛋白胆固醇低于对照组, 且随冠状动脉病变累及条数的加重, 总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇水平明显升高, 进一步支持血脂异常是冠心病的重要危险因素, 尤其是血清高胆固醇水平与 As

程度呈正相关。

由于载脂蛋白 E 基因多态性与血脂之间, 以及血脂异常与冠心病之间的密切联系, 载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病之间的可能内在联系成为人们关注的热点。近年来有研究表明, 在经冠状动脉造影证实的冠心病患者及急性心肌梗死患者中, $\epsilon 4$ 等位基因频率明显升高^[9, 10]。本文观察显示, 冠状动脉多支病变组和单支病变组 $\epsilon 4$ 等位基因频率均明显高于对照组。此外, 多支病变组 $\epsilon 4$ 等位基因频率高于单支病变组, 而 $\epsilon 2$ 等位基因频率低于后者, 提示随着 $\epsilon 4$ 等位基因频率的升高, 冠状动脉狭窄的严重程度可能进一步加重。Wang 等^[11]研究发现, 冠心病患者 $\epsilon 4$ 等位基因携带者其冠状动脉病变程度明显加重。随着病变累及大冠状动脉及其主要分支血管条数的递增, 其 $\epsilon 4$ 等位基因频率呈增加趋势。Lehtinen 等^[9]报道, $\epsilon 4$ 等位基因与冠状动脉病变的严重程度具有相关性。冠状动脉三支或三支以上病变者血浆总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇及 $\epsilon 4$ 频率分布均明显高于一支或二支病变者。这些结果均支持本文的观察结果。其机制可能是 $\epsilon 4$ 等位基因不仅与血浆高胆固醇和载脂蛋白 B 水平相关, 而且还与动脉粥样硬化性损伤有关, 但也有一些研究持相反观点。Kusisto 等^[12]认为, $\epsilon 4$ 等位基因与冠心病的严重性无关。最近国内有人报道载脂蛋白 E 基因多态性与冠状动脉受累数目无关^[13], 其原因可能与冠心病危险因素的多源性以及存在冠心病诊断标准, 标本量大小和研究手段的限制等问题有关。

载脂蛋白 E 基因多态性是影响个体间血脂水平的内在遗传因素之一, 尤其对血浆胆固醇和载脂蛋白 B 水平的影响, 并在一定程度上影响冠状动脉病变的严重性。推测 $\epsilon 4$ 等位基因频率升高可能对冠状动脉狭窄程度有预测价值, 还需在大样本的前瞻性研究中进一步证实。

参考文献

- [1] Ross R. Atherosclerosis: A defense mechanism gone away [J]. *Am J Pathol*, 1993, **143**: 987- 991
- [2] de Andrade M, Thandi I, Brown S, et al. Relationship of the apolipoprotein E polymorphism with carotid artery atherosclerosis [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, **56**: 1 379- 390
- [3] Yamamura T, Li-ming D, Yamamoto A. Apolipoprotein E polymorphism and coronary heart disease [J]. *Chinese Med J*, 1992, **105** (9): 738- 741
- [4] 袁如玉, 梁爽霖, 毛用敏, 等. 载脂蛋白 E 等位基因多态性与冠心病相关性的研究 [J]. *中国心血管病杂志*, 1998, **3**: 320- 322
- [5] 王申五, 主编. 基因诊断技术及其应用—非放射性操作手册 [M]. 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社出版, 1991: 36- 37
- [6] James E, Hixson Daniel T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI [J]. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 545- 548
- [7] Xhignesse M, Lussiev- Cacan S, Sing CF, et al. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health [J]. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 1 100- 105
- [8] 赵水平, 主编. 临床血脂学 [M]. 长沙: 湖南科技出版社, 1997, 29- 36
- [9] Lehtinen S, Lehtimäki T, Sisto T, et al. Apolipoprotein E Polymorphism, serum lipid, myocardial infarction and severity of angiographically verified artery disease in man and women [J]. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 83- 91
- [10] 金 炜, 陆元善, 李为真, 等. 急性心肌梗塞患者载脂蛋白 E 基因多态性及其与血脂代谢的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 51- 53
- [11] Wang XL, McCreddie RM, Wileken DE. Polymorphisms of the apolipoprotein E gene and severity of coronary artery disease defined by angiography [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1 030- 036
- [12] Kusisto J, Mykkänen L, Kervinen K, et al. Apolipoprotein E4 phenotype is not an important risk factor for coronary heart disease or stroke in elderly subjects [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1 280- 286

(此文 1999- 08- 25 收到, 2000- 02- 08 修回)

(此文编辑 文玉珊)