

## 脑梗死、冠心病患者载脂蛋白 AI 基因 第三内含子 MspI 位点多态性研究

顾云, 王绿娅, 吴桂贤<sup>1</sup>, 王薇<sup>1</sup>, 秦兰平<sup>1</sup>, 刘军<sup>1</sup>, 吴兆苏<sup>1</sup>

(北京心肺血管疾病研究所 动脉硬化研究室; 1. 心血管流行病学研究室, 北京市 100029)

[主题词] 载脂蛋白 AI; 基因; 多态性; 血脂; 冠状动脉疾病; 脑梗死

[摘要] 为了观察载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 位点多态性在北京地区汉族人群冠心病患者和脑梗死患者中的分布特点, 探讨其与脂质代谢的关系, 采用聚合酶链反应扩增技术对 783 例个体载脂蛋白 AI 基因型进行分析, 其中脑梗死组 236 例, 冠心病组 226 例, 对照组 321 例, 同时测定血脂及载脂蛋白。结果显示载脂蛋白 AI 基因第三内含子 M<sub>2</sub> 等位基因频率与冠心病密切相关。M<sub>2</sub> 等位基因频率为 0.387, 与对照组相比增加 ( $P < 0.05$ ); M<sub>2</sub> 等位基因频率脑梗死组与对照组相比有所增加, 但统计学上未见差异 ( $P > 0.05$ )。M<sub>2</sub>M<sub>2</sub> 纯合等位基因型组的血脂变量与 M<sub>1</sub>M<sub>1</sub> 及 M<sub>1</sub>M<sub>2</sub> 等位基因型组比较无论是在对照组还是在冠心病、脑梗死组中均存在显著差异。提示载脂蛋白 AI 基因第三内含子 M<sub>2</sub> 等位基因的检出为进一步揭示该基因在冠心病发病及冠心病、脑梗死脂质代谢中的作用提供了良好的遗传标记, 对预测血脂相关性疾病的危险性具有重要意义。

[中图分类号] Q754

[文献标识码] A

### Association of Polymorphisms of the Apolipoprotein AI Gene with Coronary Heart Disease and Atherosclerotic Cerebral Infarction Patients

GU Yun, WANG Lu- Ya, WU Gui- Xian, WANG Wei, QIN Lan- Ping, LUI Jun, and WU Zhao- Su

(Medical Institute of Beijing Heart Lung and Blood Vessel, Beijing 100029, China)

**MeSH** Apolipoprotein AI; Gene; Polymorphisms; Lipids; Coronary Artery Disease; Cerebral Infarction

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the polymorphisms of the apolipoprotein AI (apoAI) gene with coronary heart disease (CHD) and atherosclerotic cerebral infarction (ACI) patients in Beijing area. And to evaluate the association of polymorphisms of MspI with variable of lipid. **Methods** Using the polymerase chain reaction (PCR), We studied the polymorphism of MspI in 226 patients with CHD and 236 patients with ACI and 321 age- matched healthy individuals. **Results** The polymorphic site was the MspI site in the third intron of apoAI gene, whose presence has previously been shown to be associated with CHD. The frequencies of the MspI minor allele M<sub>2</sub> were 0.387 in CHD patients ( $P < 0.05$ ). There were no difference in the frequencies of minor allele M<sub>2</sub> between ACI patients and controls ( $P > 0.05$ ). There were apparent differences in the genotypes of apoAI gene and several lipid variables among the CHD patients, ACI patients and control group. **Conclusions** M<sub>2</sub> allele in the third intron of the apoAI gene may associated with CHD and ACI and presumably through its influences on lipid metabolism to increase the susceptibility to atherosclerosis disease.

国内外有学者开展血浆中载脂蛋白 AI 基因多态性与动脉粥样硬化、冠心病 (coronary heart disease, CHD) 和心肌梗死等疾病关系的研究, 但载脂蛋白 AI 基因与动脉粥样硬化性脑梗死 (atherosclerotic cerebral infarction, ACI) 的关系尚少见报道。Qing 等<sup>[1]</sup>研究发现载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 位点多态性与日本西部高甘油三酯血症人群密切相关。我们

也对载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 位点多态性在北京地区汉族人群冠心病及脑梗死患者中的分布特点及其与血脂表现型的关系进行了研究, 以期了解该基因 MspI 位点多态性与动脉粥样硬化性心脑血管病的关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 研究对象

对照组 321 例, 按照 WHO MONICA 方案危险因素调查标准<sup>[2]</sup>从随机调查样本中选择体检健康人,

[基金项目] 北京市自然科学基金资助项目 (7952004)

[作者简介] 顾云, 女, 1960 年出生, 副研究员, 从事病理生理研究。  
吴兆苏, 男, 1942 年出生, 研究员, 从事流行病学研究。

血脂正常,排除心脑血管病、肝、肾、甲状腺疾病及糖尿病。其中男性 218 例,女性 103 例,平均年龄  $48.8 \pm 11.4$  岁。

冠心病组 226 例,其中男性 184 例,女性 42 例,平均年龄  $52.1 \pm 10.2$  岁(均符合世界卫生组织冠心病诊断标准<sup>[3]</sup>)。

脑梗死组 236 例,其中男性 166 例,女性 70 例,平均年龄  $53.0 \pm 14.0$  岁(全国第二届脑血管学术会议修订的脑血管病诊断标准<sup>[4]</sup>)。

## 1.2 血浆脂类检测

空腹 12~14 h 后,周围静脉取血 5 mL,用 2% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 1:9 抗凝,室温下离心 10 min,取上层血浆用来测定血清中脂质及载脂蛋白,血细胞用于提取染色体 DNA。胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)采用氧化酶法测定;高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)用磷钨酸镁法;低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)采用 Friedewald 公式计算;载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B100 采用透射免疫比浊法。

## 1.3 DNA 提取及扩增

将抗凝血低渗溶血,高盐提取方法提取白细胞基因组 DNA。采用 PCR 技术特异性扩增载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 多态性位点。引物参考文献[1]设计,序列为 5'-CAGCGGCAGAGACTATGTGT-3', 5'-CGTGTGCACTGGACCGA-3'。PCR 扩增反应体系为 25  $\mu$ L,含有 0.5~1.0  $\mu$ g 基因组 DNA、2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、100  $\mu$ mol/L dNTPs、1.0 u Taq DNA 聚合酶和 20 pmol/L 引物以及反应缓冲液,加 20~30  $\mu$ L 液体石蜡。扩增温控条件:变性 96  $^{\circ}$ C 30 s;退火 58  $^{\circ}$ C 1 min,延伸 72  $^{\circ}$ C 3 min,共 30 个循环。

## 1.4 载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 等位基因限制性片段长度多态性检测

将 MspI 限制性内切酶 24 u 及 3  $\mu$ L 10 $\times$  缓冲液加入 15  $\mu$ L 的 DNA 扩增产物中(扩增产物为 493 bp),终反应体积为 30  $\mu$ L。反应混合物于 37  $^{\circ}$ C 恒温过夜。载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 多态性是由于限制性酶切位点的存在或缺如而形成的。反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,得到 303 bp 和 190 bp 两个片段,即为 M<sub>1</sub> 等位基因,酶切位点缺失则为 M<sub>2</sub> 等位基因。

载脂蛋白 AI 的基因图(图 1, Figure 1)显示了 MspI 多态性位点,相应的缓冲液由 Promega 公司生产。

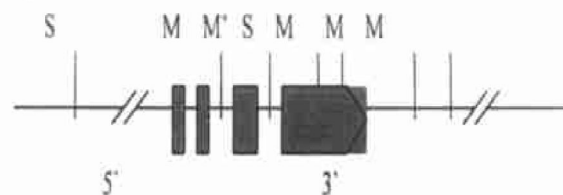


图 1 载脂蛋白 AI 基因图. M<sup>+</sup> 显示 MspI 内切位点

Figure 1 The polymorphic site of the MspI in the third intron of apoAI gene

## 1.5 统计分析

统计分析用 SPSS 软件包。组间等位基因频率差异用  $\chi^2$  检验。对不同基因型亚组间血脂和载脂蛋白水平的差异分别用  $t$  检验及单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 血浆脂质及载脂蛋白水平比较

从表 1(Table 1)可见,冠心病组和脑梗死组与对照组比较,胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 B 升高( $P < 0.001$ ),高密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 AI 降低( $P < 0.001$ ),载脂蛋白 AI 与 B100 比值下降( $P < 0.001$ )。

表 1 对照组与冠心病组和脑梗死组血浆脂质及载脂蛋白水平比较

Table 1 Comparison of serum lipids levels between control group and CHD, ACI group( $\bar{x} \pm s$ )

Index	Control	CHD	ACI
TC (mmol/L)	$4.6 \pm 0.8$	$4.9 \pm 1.3^b$	$5.0 \pm 1.4^b$
TG (mmol/L)	$0.9 \pm 0.4$	$1.4 \pm 1.0^b$	$1.5 \pm 0.9^b$
LDLC (mmol/L)	$2.8 \pm 0.8$	$3.2 \pm 1.2^b$	$3.4 \pm 1.2^b$
HDLC (mmol/L)	$1.4 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.4^b$	$1.0 \pm 0.4^b$
ApoAI (g/L)	$1.2 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.4^b$	$1.0 \pm 0.4^b$
ApoB100 (g/L)	$0.7 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.2^a$	$0.9 \pm 0.2^b$
ApoAI/B100	$1.6 \pm 0.4$	$1.3 \pm 0.5^b$	$1.2 \pm 0.4^b$

a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.001$ , compared with control group.

### 2.2 载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 等位基因频率分布比较

从表 2(Table 2)可见,对照组中 M<sub>2</sub> 等位基因频率为 0.335,而冠心病组中 M<sub>2</sub> 等位基因频率为 0.387,与对照组比较差异具有显著性( $P < 0.05$ );脑梗死组中 M<sub>2</sub> 等位基因频率为 0.352,与对照组比较

虽有所增加但统计学上无明显差异( $P > 0.05$ )。

表 2 北京地区汉族人群载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 位点多态性频率分布

Table 2 Genotype distribution and allele frequencies for the apoAI polymorphisms in diseases and control group

Groups	n	MspI genotypes			MspI allele frequencies	
		M <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> M <sub>2</sub>	M <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>
CHD	226	100(0.442) <sup>a</sup>	77(0.341)	49(0.217) <sup>b</sup>	277(0.613)	175(0.387) <sup>c</sup>
ACI	236	116(0.492)	74(0.314)	46(0.195)	306(0.648)	166(0.352)
Control	218	159(0.495)	109(0.340)	53(0.165)	427(0.665)	215(0.335)

a: OR= 0.80,  $\chi^2= 5.64$ ,  $P < 0.05$ ; b: OR= 1.40,  $\chi^2= 8.75$ ,  $P < 0.01$ ; c: OR= 0.08,  $\chi^2= 5.86$ ,  $P < 0.05$

### 2.3 MspI 多态性与血浆脂质及载脂蛋白的关系

冠心病组中的 M<sub>2</sub>M<sub>2</sub> 纯合子等位基因型组甘油三酯及载脂蛋白 B 血浆浓度较 M<sub>1</sub>M<sub>1</sub> 纯合子及 M<sub>1</sub>M<sub>2</sub> 杂合子基因型组显著升高( $P < 0.05$ ), 而载脂蛋白 AI 与 B 比值较其他两基因型组显著降低( $P < 0.05$ ) (表 3, Table 3)。

脑梗死组中的 M<sub>2</sub>M<sub>2</sub> 纯合子等位基因型组甘油

三酯血浆浓度较 M<sub>1</sub>M<sub>1</sub> 纯合子及 M<sub>1</sub>M<sub>2</sub> 杂合子基因型组显著升高( $P < 0.05$ ), 而血浆载脂蛋白 AI 浓度、载脂蛋白 AI 与 B 比值较其他两基因型组显著降低( $P < 0.001$ )。

对照组中 M<sub>2</sub>M<sub>2</sub> 纯合子等位基因型组甘油三酯血浆浓度较 M<sub>1</sub>M<sub>1</sub> 纯合子及 M<sub>1</sub>M<sub>2</sub> 杂合子基因型组显著升高( $P < 0.05$ )。

表 3 冠心病组、脑梗死组及对照组中载脂蛋白 AI 基因多态性与血浆脂质及载脂蛋白的关系

Table 3 Comparison of different apoAI MspI genotypes with serum lipids level in control group, CHD and ACI group( $\bar{x} \pm s$ )

Genotypes		TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDL (mmol/L)	ApoAI (g/L)	Apo B100 (g/L)	Apo AI/B100
CHD	M <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	5.8 ± 1.5	1.6 ± 0.9	3.4 ± 1.4	1.6 ± 0.7	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.4
	M <sub>1</sub> M <sub>2</sub>	5.6 ± 1.6	1.7 ± 1.0	3.3 ± 1.4	1.5 ± 0.6	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.3	1.5 ± 0.3
	M <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	6.0 ± 2.1	1.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	3.5 ± 2.0	1.6 ± 0.7	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
ACI	M <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	5.3 ± 1.4	1.4 ± 1.1	3.2 ± 1.4	1.7 ± 0.8	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.4
	M <sub>1</sub> M <sub>2</sub>	5.2 ± 1.3	1.3 ± 1.0	3.2 ± 1.4	1.6 ± 0.6	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.7
	M <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	5.0 ± 1.5	1.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	3.2 ± 1.3	1.6 ± 0.5	0.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.3 <sup>b</sup>
Control	M <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	4.5 ± 0.6	0.8 ± 0.4	2.7 ± 0.6	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.3	1.6 ± 0.4
	M <sub>1</sub> M <sub>2</sub>	4.6 ± 0.7	0.7 ± 0.3	2.8 ± 0.6	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.7 ± 0.7
	M <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	4.5 ± 0.6	0.9 ± 0.5	2.7 ± 0.6	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.6 ± 0.4

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.001$ , Compared with control group.

## 3 讨论

载脂蛋白 AI 是高密度脂蛋白的主要载脂蛋白, 约占其总蛋白的 60%~70%, 载脂蛋白 AI 也是高密度脂蛋白代谢中的一个重要的酶——卵磷脂胆固醇酰基转移酶的激活物。它能促进主动脉成纤维细胞中游离胆固醇的清除, 酯化周围组织中的游离胆固醇并将其转入肝内代谢, 参与胆固醇的逆向运转过程, 这对防止外周组织脂质沉积引起的粥样硬化有重要意义。因而, 载脂蛋白 AI 对体内脂类转运和代谢以及维持体内恒定的血脂水平起到重要作用。由于载脂蛋白 AI 对含载脂蛋白 AI 脂蛋白的组装、分泌和分解过程至关重要, 故其基因变异可能导致血

浆中这些脂蛋白数量和性质的变化, 从而引发某些疾病。

载脂蛋白 AI 基因位于第 11 号染色体长臂, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 与载脂蛋白 C ④及载脂蛋白 A ⑤基因紧密相邻, 载脂蛋白 AI 第三内含子长 588 bp, 在编码成熟载脂蛋白 AI 第 40 号氨基酸残基的密码处插入, 5' 端均为 GT, 3' 端为 AG。

本实验研究结果表明冠心病组中 M<sub>2</sub> 等位基因频率为 0.387( $P < 0.05$ ), 而脑梗死组中 M<sub>2</sub> 等位基因频率为 0.352, 与对照组比较有增加的趋势, 但统计学上未见明显差异。在载脂蛋白 AI 基因第三内含子 MspI 位点不同基因型与血脂变量是否相关的

研究中发现,不论是在冠心病组、脑梗死组或是在对照组中,不同基因型组的血脂和载脂蛋白水平均有不同程度的改变。

载脂蛋白 AI 基因  $M_2M_2$  等位基因的检出为进一步揭示载脂蛋白 AI 基因在冠心病的发病及冠心病和动脉粥样硬化性脑梗死脂质代谢中的作用提供了良好的遗传标记。具有  $M_2M_2$  纯合子等位基因型者较具有  $M_1M_1$  及  $M_1M_2$  等位基因型者有易患血脂异常性疾病的倾向,载脂蛋白 AI 基因  $M_2M_2$  等位基因的检出对预测血脂相关性危险因素可能具有重要意义。

**致 谢** 感谢中国医学科学院基础医学研究所陈保生教授及薛红老师的热情帮助。

## 参考文献

- [1] Qing Z, Marilyn D, Yoichi T, et al. An apolipoprotein C  $\epsilon$  marker associated with hypertriglyceridemia in Caucasian population [J]. *Hum Genet*, 1995, **95**: 371- 375
  - [2] 吴兆苏,姚崇华,赵冬,等. 我国多省市心血管病趋势及决定因素的人群监测(中国 MONICA 方案) I. 发病率和死亡率监测结果 [J]. 中华心血管病杂志, 1997, **25**(1): 6- 11
  - [3] Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Ischemic Heart Disease. Report of the joint international society and federation of cardiology/WHO task force on standardization of clinical nomenclature [J]. *Circulation*, 1979, **59**: 607- 609
  - [4] 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点 [J]. 中华神经精神科杂志, 1988, **21**: 60
- (此文 2000- 02- 18 收到, 2000- 06- 20 修回)  
(此文编辑 朱雯霞)