

国人载脂蛋白 A1 基因多态性与血脂水平及冠心病的关系

邹阳春¹, 胡大一³, 杨新春², 贾兴元³, 王乐丰¹, 刘晓惠¹, 魏 妤¹, 高明明¹, 项志敏¹, 崔 亮¹

(1. 北京朝阳医院心脏中心; 2. 北京朝阳医院基础医学中心, 北京市 100020;

3. 北京大学人民医院心内科, 北京市 100044)

[关键词] 流行病学; 载脂蛋白 A1 基因多态性与血脂及冠心病的关系; 基因多态性; 聚合酶链反应; MspI 酶; 高密度脂蛋白; 冠心病

[摘要] 为探讨载脂蛋白 A1 基因 - 75 bp/+ 83 bp 位点多态性与血脂水平及冠心病发生之间的关系, 采用生物化学方法分别测量经冠状动脉造影证实的 92 例冠心病患者及 45 例正常人空腹血脂水平, 应用聚合酶链反应对载脂蛋白 A1 基因 DNA 433 bp 的 5' 末端片段进行限制性片段长度多态性分析。结果发现, 冠心病组甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白、载脂蛋白 B 及脂蛋白(a)水平均高于对照组(均 $P < 0.05$), 而高密度脂蛋白($P < 0.005$)与载脂蛋白 A1($P < 0.05$)水平则低于对照组; 冠心病组较对照组 M_1- 及 M_2- 基因型频率明显为低($P < 0.005$, $P < 0.05$); 与 $M_1+/+$ 相比, $M_1+/-$ 者血中高密度脂蛋白及载脂蛋白 A1 水平分别升高 18.09% 和 15.68%, 而 $M_2+/-$ 者血中高密度脂蛋白及载脂蛋白 A1 水平较 $M_2+/+$ 分别升高 6.19% 和 8.65%。以上结果表明, 载脂蛋白 A1 基因 - 75 bp 位点 C 被 A 取代及 + 83 bp 位点 C 被 T 取代或 G 被 A 取代后个体血载脂蛋白 A1 及高密度脂蛋白水平升高; 这些碱基变化可能会导致个体发生冠心病的危险性降低。

[中图分类号] R18

[文献标识码] A

Studies on Relationships among Apolipoprotein A1 Gene Polymorphisms, Lipid Levels and Coronary Atherosclerosis Disease

ZOU Yang-Chun¹, HU Da-Yi³, YANG Xin-Chun¹, JIA Xing-Yuan², WANG Le-Feng¹, LIU Xiao-Hui¹, WEI Yu¹, GAO Ming-Ming¹, XU Zhi-Min¹, and CUI Liang¹

(1. The Heart Center and the Basic Medical Center; 2. Capital University of Medical Science, Affiliated Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020; 3. The Department of Cardiology, Affiliated Renmin Hospital, Peking University, Beijing 100044, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A1; DNA Polymorphism; MspI Enzyme; High Density Lipoprotein; Lipids; Coronary Atherosclerosis Disease

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationships between - 75 bp / + 83 bp polymorphism in apolipoprotein (apo) A1 gene, lipids levels and the occurrence of coronary atherosclerosis disease (CAD). **Methods** The distributions of two MspI polymorphisms of the apo A1 gene, - 75 bp and + 83 bp, and blood lipids levels were determined among 137 Chinese patients in relation to circulating lipids and coronary angiography. **Results** The control group had higher M_1- / M_2- frequencies than the coronary atherosclerosis disease group (M_1- : $P < 0.005$; M_2- : $P < 0.05$) and the M_1- and M_2- alleles were associated with increased high density lipoprotein (M_1- : $P < 0.0001$; M_2- : $P < 0.05$) and apo A1 (M_1- : $P < 0.0001$; M_2- : $P < 0.05$) levels. M_1- and M_2- were significantly correlated with CAD ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). **Conclusions** The results suggest that the base changes from G to A at the - 75 bp site and C to T/G to A at the + 83 bp site do have increased circulating levels of apo A1 and high density lipoprotein and that individuals with these base changes are likely to have a reduced risk of developing CAD.

流行病学研究提示, 高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平与冠心病 (coronary atherosclerosis

sis disease, CAD) 呈负相关关系^[1]。载脂蛋白 A1 在脂代谢过程中起着十分重要的作用, 是卵磷脂胆固醇酰基转移酶的主要激活因子, 是胆固醇逆向转运过程中的一个关键组分。降低的载脂蛋白 A1 及高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平是冠心病的独立危险因素, 而载脂蛋白 A1 是 HDL 的重要组成部分, 遗传学研究表明, 载脂蛋白 A1 基因多态性与血载脂蛋白 A1 及高密度

[收稿日期] 2002-10-16 [修回日期] 2003-05-25

[作者简介] 邹阳春, 男, 1963 年出生, 湖南省衡阳市人, 副主任医师, 医学博士后, 主要从事冠心病基础、临床及介入研究, Tel/FAX: 010-65951064, E-mail: yangchunzou@hotmail.com。胡大一, 男, 1946 年出生, 河南省开封人, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事冠心病与心律失常基础、临床及介入研究。杨新春, 男, 1957 年出生, 河南省唐河人, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事冠心病与心律失常基础、临床及介入研究。

脂蛋白胆固醇水平的升高或降低密切相关^[2]。本研究旨在探讨载脂蛋白 A1 基因- 75 bp 与+ 83 bp 位点多态性对国人血脂水平及冠心病发病的影响。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

所有研究对象均为我院住院病人,由 2 位冠心病介入专家对患者的冠状动脉造影结果进行评估,将冠状动脉狭窄程度 $\geq 50\%$ 或有明确的心肌梗死病史者列为冠心病组,而将冠状动脉血管造影正常者列为对照组。冠心病组:共 92 例,男 67 例,女 25 例,年龄 54 ± 11 岁;冠状动脉造影结果显示至少有 1 支或 1 支以上冠状动脉的直径狭窄 $\geq 50\%$,所有患者均为汉族,无血缘关系;④对照组:45 例,男 33 例,女 12 例,年龄 52 ± 9 岁,经冠状动脉造影证实未见明显冠状动脉狭窄性病变。经统计学分析两组年龄、性别及家族史等条件具可比性。

1.2 载脂蛋白 A1 基因多态性分析

冠状动脉造影前取空腹静脉血 4 mL 放入含 EDTA- Na_2 的样本管,2 h 内于 4°C 下 $1\,500\text{ r/min}$ 离心分离出血浆与细胞成份,并分开保存于 -70°C 低温冰箱中待测。

基因多态性分析具体方法参见文献[3]。

应用聚合酶链反应方法对载脂蛋白 A1 基因 DNA 433 bp 的 5' 末端片段进行扩增,扩增引物为: P1: 5'-AGGGACAGAGCTGATCCCTTGAACCTCTTA AG-3', P2: 5'-TTAGGGGACACCTAGCCCTCAGGAAGAGCA-3'。

1.3 基因型分析

载脂蛋白 A1 基因 DNA 聚合酶链反应扩增区域内存在 3 个 MspI 酶切位点,它们分别位于- 75 bp、+ 37 bp 和+ 83 bp 处,而- 75 bp 处的 G 被 A 取代及+ 83 bp 处的 C 被 T 取代或 G 被 A 取代后将导致 MspI 酶切位点的丢失,- 75 bp 处由于碱基的变异而形成 GG、GA 和 AA 3 种等位基因型^[4],同样+ 83 bp 处的碱基变异也会导致 CC、CT 和 TT 或 GG、GA 和 AA 3 种等位基因型的形成,为避免混淆,我们人为地将- 75 bp 位点定义为 M_1 位点,于是有野生型 $M_1+/+$ 与变异型 $M_1+/-$ 、 $M_1-/-$ 3 种等位基因型,而将+ 83 bp 位点定义为 M_2 位点,其等位基因型也有野生型 $M_2+/+$ 与变异型 $M_2+/-$ 、 $M_2-/-$ 3 种。这里“+”代表存在 MspI 酶切位点,而“-”则代表 MspI 酶切位点的丢失。

1.4 血脂分析

参照文献[5,6]按常规生物化学方法进行甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 B 和脂蛋白(a)水平的测定。

1.5 统计分析

资料分析应用 SPSS 10.0 软件完成,计算各组基因型及等位基因型频率按 Hardy-Weinberg 平衡法确定各组样本 RFLPS 频率的群体代表性;用 χ^2 检验对两组基因型及等位基因型频率差异进行比较,计量资料用 t 检验比较其差异的显著性水平,其值用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冠心病组与对照组基线血脂的比较

在年龄可比的条件下,冠心病组与对照组的基线血脂各指标水平之间的差异均存在显著性,冠心病组总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 B 及脂蛋白(a)水平均高于对照组,而高密度脂蛋白胆固醇与载脂蛋白 A1 水平则低于对照组(表 1, Table 1)。

表 1. 冠心病组与对照组基线血脂特征($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The demographic information in CAD group and control group

指 标	对照组 ($n=45$)	冠心病组 ($n=92$)
年龄 (years)	52 ± 9	54 ± 11
甘油三酯 (mmol/L)	1.90 ± 0.72	2.23 ± 0.69^a
总胆固醇 (mmol/L)	4.84 ± 0.78	5.23 ± 0.86^a
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	1.05 ± 0.20	0.95 ± 0.18^b
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	3.19 ± 0.56	3.47 ± 0.86^a
载脂蛋白 A1 (g/L)	1.12 ± 0.21	1.03 ± 0.20^a
载脂蛋白 B (g/L)	0.95 ± 0.15	1.00 ± 0.17^a
脂蛋白(a) (g/L)	0.23 ± 0.15	0.29 ± 0.16^a

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

2.2 载脂蛋白 A1 基因- 75 bp 及+ 83 bp 位点多态性在冠心病组及对照组中的频率分布特点

与冠状动脉正常组比较,冠心病组中载脂蛋白 A1 M_1- 及 M_2- 的基因型频率明显为低,经 χ^2 检验(χ^2 值分别为 8.79 与 4.78),其差异均有显著性意义(分别为 $P < 0.005$ 和 $P < 0.05$)(表 2, Table 2)。

表 2. 冠心病组与对照组患者载脂蛋白 A1 M₁ 和 M₂ 位点等位基因频率比较Table 2. The genotype frequency of apolipoprotein A1 gene M₁/M₂ sites in CAD group and control group

分 组	M ₁				M ₂			
	+ / +	+ / -	- / -	-	+ / +	+ / -	- / -	-
对照组	26 (57.78%)	12 (26.67%)	7 (15.56%)	0.2889	30 (66.67%)	8 (17.78%)	7 (15.56%)	0.2444
冠心病组	78 (84.78%)	8 (8.7%)	6 (6.52%)	0.1087 ^c	77 (83.7%)	10 (10.87%)	5 (5.43%)	0.1087 ^a

a: $P < 0.05$; c: $P < 0.005$, 与正常对照组比较。

2.3 载脂蛋白 A1 基因 M₁ 和 M₂ 位点多态性对血脂水平的影响

载脂蛋白 A1 基因 M₁(-75 bp) 及 M₂(+83 bp) 位点多态性特征均对血中载脂蛋白 A1 与 HDLC 水平产生影响, 尤以 M₁ 位点的影响最为显著, 与 M₁ +/+ 相比, M₁ + -/- 者血中 HDLC 水平及载脂蛋白 A1 水平分别升高 18.09% 和 15.68%, 而 M₂ +

-/- 者血中 HDLC 水平及载脂蛋白 A1 分别升高 6.19% 和 8.65% (表 3, Table 3)。

各指标间相关分析结果表明, 冠心病发病与 TC 及 LDLC 水平的升高和 HDLC 及载脂蛋白 A1 水平的降低密切相关; 载脂蛋白 A1 基因 M₁ 和 M₂ 位点多态性除与冠心病发病密切相关外, 也与 HDLC 水平及载脂蛋白 A1 水平密切相关。

表 3. 载脂蛋白 A1 基因 M₁ 及 M₂ 位点多态性与血脂水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Blood lipid levels related to genotypes at apo A1 gene -75 bp and +83 bp

指 标	M ₁		M ₂	
	+ / + (n=104)	+ - / - (n=33)	+ / + (n=107)	+ - / - (n=30)
甘油三酯 (mmol/L)	2.14 ± 0.72	2.05 ± 0.68	2.13 ± 0.72	2.07 ± 0.67
总胆固醇 (mmol/L)	5.06 ± 0.88	5.21 ± 0.75	5.10 ± 0.87	5.09 ± 0.80
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	0.94 ± 0.17	1.11 ± 0.19 ^d	0.97 ± 0.18	1.03 ± 0.23 ^a
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	3.35 ± 0.82	3.44 ± 0.65	3.37 ± 0.80	3.36 ± 0.73
载脂蛋白 A1 (g/L)	1.02 ± 0.19	1.18 ± 0.21 ^d	1.04 ± 0.20	1.13 ± 0.22 ^a
载脂蛋白 B (g/L)	0.97 ± 0.17	1.04 ± 0.15	0.97 ± 0.17	1.03 ± 0.12
脂蛋白 (a) (g/L)	0.28 ± 0.16	0.25 ± 0.14	0.27 ± 0.16	0.28 ± 0.16

a: $P < 0.05$; d: $P < 0.001$, 与野生型(+ / +) 比较。

3 讨论

既往研究已经识别出了多种冠心病危险因素, 但仍有约 50% 的冠心病发病不能用已知危险因素来解释, 冠心病一级和二级预防也只能使部分个体受益, 因而进一步探讨其病因和研究其病理生理非常必要。冠心病病因研究目前主要集中在两大方面: 继续从宏观水平寻找危险因素和从微观水平探讨其发病的环境与遗传易感机理^[5-7]。作者曾在对新疆哈萨克族人群血脂谱流行病学调查中发现, 新疆哈萨克族人群血脂谱与汉族人群存在较大的不同, 特别是载脂蛋白 A1 及高密度脂蛋白水平在新疆哈萨克族人群与汉族人群之间有较大的差异, 结果提示遗传因素可能在各自的血脂水平差异方面起着决定性作用^[8]。本研究对 92 例冠状动脉造影明

确诊断为冠心病汉族患者的血脂及脂蛋白与载脂蛋白水平的变化进行对比观察并对与高密度脂蛋白胆固醇及载脂蛋白 A1 水平可能存在关联的载脂蛋白 A1 基因-75 bp(M₁) 及+83 bp(M₂) 位点 MspI 酶切多态性进行分析, 结果提示在冠心病发病的复杂机制中, 载脂蛋白 A1 基因-75 bp 与+83 bp 位点多态性改变(包括-75 bp 位点碱基 G 被 A 替代及+83 bp 位点碱基 C 被 T 碱基或 G 被 A 替代多态性) 也参与其中, 载脂蛋白 A1 基因由于上述二个位点的多态性改变而影响血中脂蛋白及载脂蛋白特别是高密度脂蛋白胆固醇与载脂蛋白 A1 水平, 这与 Barre 等^[9] 及 Wang 等^[10] 的研究结果比较一致。而高密度脂蛋白胆固醇及载脂蛋白 A1 已被定性为冠心病发病的负向危险因素, 这是由高密度脂蛋白胆固醇及

载脂蛋白 A1 在脂代谢过程中的作用决定的^[11-14]。由此可以得出,载脂蛋白 A1 基因-75 bp 及+83 bp 位点 MspI 酶切长度多态性改变通过影响高密度脂蛋白胆固醇及载脂蛋白 A1 血浆水平而与冠心病的发生发展存在着某种意义上的内存联系,载脂蛋白 A1 基因-75 bp 与+83 bp 位点碱基的替代可能改变了载脂蛋白 A1 基因的表达以致于改变了个体对环境因素影响的易感性^[15,16]。

载脂蛋白 A1 基因-75 bp 与+83 bp 位点碱基改变在本文所研究的中国汉族人群中是与高密度脂蛋白胆固醇及载脂蛋白 A1 水平的升高相关联的,这些位点碱基的替代与冠心病发病亦呈现负相关关系。载脂蛋白 A1 基因结构的改变影响着载脂蛋白 A1 的分子结构、向血液中释放与分泌的速率及其功能状态,进而控制和影响血中载脂蛋白 A1 与高密度脂蛋白胆固醇的水平及功能^[17-19],从而参与冠心病发生与发展。我们将进一步研究分析载脂蛋白 A1 基因-75 bp 及+83 bp 位点 MspI 酶切长度多态性改变与冠心病严重程度之间的相关关系。

[参考文献]

- [1] Vega GL, Grundy SM. Hypoalphalipoproteinemia as a risk factor for coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*, 1996, **7**: 209-216
- [2] Sylvie B, Cynthia RC, Tracey AMN, Darren MH. Effect of acylglyceride content on the structure and function of reconstituted high density lipoprotein particles. *J lipid Res*, 2001, **42**: 79-87
- [3] Oscar PM, Eric B, Guide F, Nathalie D, Brigitte L, Jearr-Paul B, et al. Metabolism of apolipoproteins A1 and AII in subjects carrying similar ApoA1, mutations, ApoA1 Milano and ApoA1 Paris. *Atherosclerosis*, 2001, **148**: 317-326
- [4] Mirian L, Patrizia u, Daniela G, Alberico LC, Petri TK. Identification of domains in ApoA1 susceptible to proteolysis by mast cell chymase: implications for HDL function. *J Lipid Res*, 2000, **41**: 975-984
- [5] Luc G, Bard JM, Evans A, Arveiler D, Ruidavets JB, Amouyel P, et al. The relationship between apolipoprotein A-I-containing lipoprotein fractions and environmental factors: the prospective epidemiological study of myocardial infarction (PRIME study). *Atherosclerosis*, 2000, **152**: 399-405
- [6] Lahoz C, Schaefer EJ, Cupples LA, Wilson PWF, Levy D, Osgood D, et al. Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*, 2001, **154**: 529-537
- [7] Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*, 2001, **103**: 3 099-104
- [8] 邹阳春, 何秉贤, 胡大一, 杨新春, 赵新国, 李新立, 等. 新疆哈、汉两民族血脂、载脂蛋白 A1 和 B 水平的比较研究. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 340-343
- [9] Barre DE, Guerra R, Verstraete R, Wang Z, Grundy SM, Cohen JC. Genetic analysis of a polymorphism in the human apolipoprotein A1 gene promoter: effect on plasma HDL-cholesterol levels. *J Lipid Res*, 1994, **35**: 1 292-296
- [10] Wang XL, Badenhop R, Humphrey K, Wilcken EDL. New MspI polymorphism at the +83bp of the human apolipoprotein A1 gene: association with increased circulating high density lipoprotein. *Genet Epidemiol*, 1996, **13**: 1-10
- [11] Miller M, Aiello D, Prithard H, Friel G, Zeller K. Apolipoprotein A1 zavalala (Leu159-pro), HDL cholesterol deficiency in a kindred associated with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1 242-247
- [12] Miettinen HE, Gylling H, Miettinen TA, Viikari J, Paulin L, Kontala K. Apolipoprotein A1 in dominantly inherited hypoalphalipoproteinemia due to a single base substitution in the apolipoprotein A1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 83-90
- [13] Calabresi L, Tedeschi G, Treu C, Ronchi S, Galbati D, Airolidi s, et al. Limited proteolysis of a disulfide-linked apoA-I in reconstituted HDL. *J Lipids Res*, 2001, **42**: 935-942
- [14] Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TWA, Dallinger-Thie GM. New genetic variants in the apoA-I and apoC-III genes and familial combined hyperlipidemia. *J Lipids Res*, 2001, **42**: 188-194
- [15] Cho KH, Durbin DM, Jonas A. Role of individual amino acids of apolipoprotein A1 in the activation of lecithin: cholesterol acyltransferase and in HDL rearrangements. *J Lipids Res*, 2001, **42**: 379-389
- [16] Cho KH, Jonas A. A key point mutation (V156E) affects the structure and functions of human apolipoprotein A1. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 26 821-827
- [17] Lee M, Uboldi P, Giudice D, Catapano AL, Kovanen PT. Identification of domains in apoA-I susceptible to proteolysis by mast cell chymase: implication for HDL function. *J Lipids Res*, 2000, **41**: 975-984
- [18] Beer MC, Durbin DM, Cai L, Jonas A, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Res*, 2001, **42**: 309-313
- [19] Sviridov D, Pyle L, Jauhainen M, Elmholt C, Fidge NH. Deletion of the propeptide of apolipoprotein A-I reduces protein expression but stimulates effective conversion of pre β -high density lipoprotein to α -high density lipoprotein. *J Lipids Res*, 2000, **41**: 1 872-882

(此文编辑 朱霞霞)

•征订•

欢迎订阅全国唯一的高血压专业杂志

你知道?

全国有 1 亿以上的高血压病患者

每年新增加 300 万人以上

现有脑卒中患者 500 万人以上

年新发病 150 万人,死亡 20 万人

76% 脑卒中者有高血压病史

冠心病患者 1000 万人,65% 有高血压病史

双月刊 全国各地邮局订阅,邮发代号:34-65 每期 6 元,全年价:36 元

地址:福州市茶中路 20 号 邮编:350005 电话:0591-3357199-2216

传真:0591-3574968 E-mail: zgxyzz@fjmu.edu.cn

《高血压杂志》告诉您:

最新最可靠的防治措施

世界与我国最新的研究动向

医师可能从中提高自己的医学实践能力为病人服务

病人可以直接了解自己的病情轻重