

载脂蛋白 E 基因多态性与血脂水平的关系

祝成亮, 周新, 刘芳, 胡汉林

(1. 武汉大学中南医院临床基因诊断中心, 2. 武汉大学医学院检验系, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 内科学; 载脂蛋白 E 基因多态性; 聚合酶链反应; 载脂蛋白 E; 基因多态性; 高脂血症

[摘要] 目的 研究载脂蛋白 E 基因多态性与血脂水平的关系。方法 应用等位基因特异性多重聚合酶链反应对 113 例高脂血症患者和 108 例健康对照者进行载脂蛋白 E 基因型进行分析, 并对其血脂水平进行检测。结果

高脂血症患者总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平明显高于健康对照组 ($P < 0.05$), 而高密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 A iv 水平明显低于正常对照组 ($P < 0.05$); 在载脂蛋白 E 的 3 种基因型中以载脂蛋白 E3/3 型多见, 高脂血症患者中载脂蛋白 E $\epsilon 4$ 等位基因频率明显高于健康对照组 ($P < 0.05$)。结论 载脂蛋白 E 基因多态性可能是高脂血症患者的遗传因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationship Between Polymorphisms of Apolipoprotein E Gene and Serum Lipid

ZHU Cheng-Liang, ZHOU Xin, LIU Fang, and HU Han-Lin

(1. Center of Clinical Gene Diagnosis, Zhong Nan Hospital of Wuhan University; 2. Department of Clinical Laboratory, Wuhan Medical College, Wuhan 430071, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein E; Gene Polymorphism; Hyperlipoproteinemia; Serum Lipid; Allele Frequency

[ABSTRACT] Aim To study the relationship between polymorphisms of apolipoprotein E and serum lipid. Methods

The multiplex amplification refractory mutation system polymerase chain reaction technique was used to analyze the apolipoprotein E (apo E) genotype of 113 hyperlipoproteinemia patients and 108 healthy controls, as well as serum lipid. The results was processed by the statistical analysis.

Results The serum levels of triglyceride, total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol in the hyperlipoproteinemia patients were significantly higher than in the healthy controls ($P < 0.05$), however, high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A iv was much lower in hyperlipoproteinemia patients ($P < 0.05$); Among the three genotypes of apolipoprotein E, apolipoprotein E3/3 was the most common one, the apolipoprotein E $\epsilon 4$ allele frequency in the hyperlipoproteinemia patients was much higher than in the healthy controls ($P < 0.05$).

Conclusions High density lipoprotein cholesterol was of great importance in reducing serum lipid, and gene polymorphisms of apolipoprotein E may be a genetic factor in hyperlipoproteinemia patients.

人载脂蛋白 E 基因位于 19 号染色体长臂 3 区, 含有四个外显子和三个内含子, 在脂蛋白代谢中起到重要的作用。它有 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ 三种异构体, 有 E2/2、E3/3、E4/4、E2/3、E2/4 和 E3/4 六种基因型。研究认为高脂血症是冠心病的重要易患因素, 血脂水平与遗传因素有着密切的关系。本文以高脂血症患者和健康对照者为研究对象, 采用等位基因特异性多重聚合酶链反应 (amplification refractory mutation system polymerase chain reaction, ARMS-PCR) 对载脂蛋白 E 基因进行分型, 探讨载脂蛋白 E 基因多态性与血脂水平的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

高脂血症患者 113 例, 汉族, 其中男性 59 例, 女性 54 例, 年龄 58~75 岁, 平均 62.5 ± 7.2 岁, 根据 WHO 诊断标准甘油三酯 (triglyceride, TG) ≥ 5.7 mmol/L 和 (或) 总胆固醇 (total cholesterol, TC) ≥ 1.7 mmol/L 确诊, 排除肝、肾、甲状腺病变和糖尿病等。健康对照者 108 例, 汉族, 男性 48 例, 女性 60 例, 年龄在 56~77 岁, 平均 63.8 ± 6.2 岁。

1.2 标本采集

所有受试对象均空腹 12~14 h 后静脉采血, EDTA 和肝素抗凝血各一管, 分别供血脂检测和载脂蛋白 E 基因分型用。

1.3 血脂测定

用酶法测定 TC、TG 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC); 免疫比浊法测

[收稿日期] 2004-08-24 [修回日期] 2005-02-25

[作者简介] 祝成亮, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的生物化学诊断。周新, 教授, 博士研究生导师。通讯作者刘芳, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail 为 xinchengzhu@126.com。

定载脂蛋白 A iv和载脂蛋白 B100; 直接法测定高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。

1.4 载脂蛋白 E 基因分型

基因组 DNA 提取采用碘化钠法, 全血用蒸馏水溶血后, 加入适量的碘化钠, 用酚、氯仿进行抽提, 异丙醇沉淀基因组 DNA 后, 加入 TE 缓冲液溶解, 置 4℃保存。根据文献[1]方法对载脂蛋白 E 基因进行分型。引物序列设计: P1 为 5' TGTCAGATGACCTG-CAGAATT3' (Cys158), P2 为 5' GTGCAGATGACCTG-CAGAATC3' (Arg158), 分别检测 158 位的半胱氨酸 (Cys) 和精氨酸 (Arg)。P3 为 5' CGAGGCCATGGA-CATTTT3' (Cys112), P4 为 5' CGAGGCCATGGA-CATTTTC3' (Arg112), 分别检测 112 位的半胱氨酸和精氨酸。设计公共引物 P5 为 5' GGTCAGT-GATTGTCGCTGGCCA3'。引物由上海生物工程研究所合成。PCR 反应体系为 25 μL, 每个样本分为 A、B 两管。A 管和 B 管均加入 10×buffer 2.5 μL(含 1.5 mmol/L MgCl₂), 二甲亚砜 (DMSO) 2.5 μL, dNTP 0.5 μL, P5 20 pmol, Taq DNA 聚合酶 1 u, 模板 DNA 3 μL, 然后 A 管加入 P1 18 pmol, P3 12 pmol; B 管加入 P2 18 pmol, P4 12 pmol, 最后加水至终体积 25 μL。反应条

件为 95℃预变性 5 min, 然后按 96℃变性 45 s, 66℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 循环 30 次, 最后 72℃延伸 5 min。产物进行 1% 琼脂糖电泳。

1.5 统计学分析

基因频率采用基因计数法, 基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验, 血脂测定值的比较用方差分析。使用 SPSS11.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 载脂蛋白 E 基因型

共检出 4 种载脂蛋白 E 基因型。电泳结果可见 451 bp 和 588 bp 两个片断, 载脂蛋白 E 基因分型判断如图 1(Figure 1)。高脂血症组与健康对照组载脂蛋白 E 表型及等位基因检测结果见表 1(Table 1)。经 Hardy-Weinberg 定律检验, 两组载脂蛋白 E 基因型符合遗传平衡($P > 0.05$)。在 4 种载脂蛋白 E 基因型中, 以 E3/3 频率最高, 在高脂血症组为 65.48%, 在健康对照组为 75%, 高脂血症组载脂蛋白 E E3/3 基因型频率明显低于健康对照组($P < 0.05$)。而高脂血症组载脂蛋白 E E4 等位基因频率又明显高于健康对照组($P < 0.05$)。载脂蛋白 E E4/4 基因型例数太少, 未作比较。

表 1. 高脂血症患者组与健康对照组载脂蛋白 E 基因型及等位基因频率分布

Table 1. Distribution of apolipoprotein E genotypes and allele frequencies between hyperlipoproteinemia group and healthy control group

分 组	n	基因型				等位基因		
		E2/3	E3/3	E3/4	E4/4	ε2	ε3	ε4
高脂血症组	113	14.2% (16) ^a	65.5% (74) ^a	18.6% (21)	1.8% (2)	7.1	81.9%	11.1% ^a
健康对照组	108	18.5% (20)	75.0% (81)	6.5% (7)	0	9.3%	87.5%	3.2%

a: $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

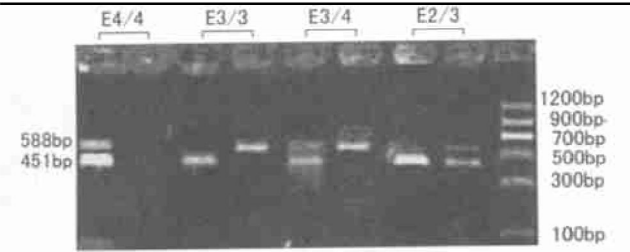


图 1. 载脂蛋白 E 基因分型电泳图 其中 A、B 分别代表 A 管和 B 管产物, M 为 marker。

Figure 1. Electrophoretic map of apolipoprotein E genotypes

2.2 血脂水平

高脂血症组 TG、TC、LDLC 水平明显高于健康对照组($P < 0.05$), HDLC、载脂蛋白 A iv 水平均低于健康对照组($P < 0.05$), 两组载脂蛋白 B100 水平无显

著性差异, 见表 2(Table 2)。

表 2. 高脂血症组与健康对照组血脂水平比较

Table 2. Comparison of serum lipid levels between hyperlipoproteinemia patients group and healthy control group ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

指 标	高脂血症组 (n= 113)	健康对照组 (n= 108)
总胆固醇	6.9 ± 0.7 ^a	4.7 ± 0.6
甘油三酯	3.2 ± 1.2 ^a	1.3 ± 0.4
高密度脂蛋白胆固醇	0.9 ± 0.2 ^a	1.2 ± 0.3
低密度脂蛋白胆固醇	3.5 ± 0.5 ^a	2.1 ± 0.6
载脂蛋白 A iv	1.2 ± 0.3 ^a	1.4 ± 0.4
载脂蛋白 E	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2

a: $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

2.3 载脂蛋白 E 基因型与血脂的关系

在载脂蛋白 E 各基因型中, 高脂血症组 TC、TG、HDLc 水平与健康对照组之间有显著性差别(表 3, Table 3)。高脂血症组载脂蛋白 E ε4 携带者 TC、TG

和 LDLc 水平明显高于 ε2 和 ε3 携带者, 载脂蛋白 E ε2 携带者 TC、LDLc 水平最低, 载脂蛋白 E 等位基因与其他血脂指标之间无统计学差异(表 4, Table 4)。

表 3. 载脂蛋白 E 不同基因型间血脂水平比较

Table 3. Comparison of serum lipid levels in apolipoprotein E genotypes ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

基因型	n	总胆固醇	甘油三酯	高密度脂蛋白胆固醇	低密度脂蛋白胆固醇	载脂蛋白 A iv	载脂蛋白 B100
E2/3							
高脂血症组	16	5.9±0.2 ^a	2.4±0.6 ^a	0.9±0.2 ^a	3.0±0.4 ^a	1.1±0.2	1.0±0.2
健康对照组	20	4.3±0.3	1.2±0.4	1.3±0.3	1.9±0.4	1.2±0.2	0.9±0.2
E3/3							
高脂血症组	74	6.3±0.5 ^a	2.9±0.4 ^a	0.9±0.3 ^a	3.4±0.5 ^a	1.2±0.2	1.0±0.2
健康对照组	81	4.5±0.3	1.2±0.3	1.2±0.2	2.0±0.3	1.4±0.3	0.9±0.2
E3/4							
高脂血症组	21	7.1±0.4 ^a	3.5±0.5 ^a	0.9±0.3 ^a	3.7±0.2 ^a	1.3±0.2	1.0±0.2
健康对照组	7	4.9±0.4	1.4±0.2	1.2±0.2	2.1±0.4	1.5±0.3	0.9±0.2
E4/4							
高脂血症组	2	7.3±0.2	4.2±1.2	0.9±0.2	3.8±0.2	1.1±0.2	1.0±0.2
健康对照组	0	-	-	-	-	-	-

a: $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

表 4. 高脂血症组载脂蛋白 E 不同等位基因型间血脂水平比较

Table 4. Comparison of serum lipid levels in apolipoprotein E genotype of hyperlipoproteinemia groups ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

等位基因型	总胆固醇	甘油三酯	高密度胆固醇脂蛋白	低密度胆固醇脂蛋白	载脂蛋白 A iv	载脂蛋白 E
ε2	6.0±0.2 ^a	2.4±0.6 ^a	0.9±0.2 ^a	3.1±0.4 ^a	1.1±0.2	0.9±0.2
ε3	6.5±0.5	3.0±0.4	0.9±0.2	3.5±0.4	1.2±0.2	1.0±0.3
ε4	7.1±0.3 ^a	3.7±0.2 ^a	0.9±0.3 ^a	3.8±0.2 ^a	1.2±0.3	1.0±0.3

a: $P < 0.05$. 与 ε3 组比较。

3 讨论

载脂蛋白 E 主要是由肝合成的 299 个氨基酸组成的糖蛋白, 具有明显而丰富的多态性, 一直以来都是脂代谢研究中的热点。载脂蛋白 E 的三种常见的异构体 ε2、ε3、ε4, 它们的区别在于 112 位和 158 位氨基酸残基不同。

高脂血症是动脉粥样硬化的危险因素, 载脂蛋白 E 基因多态性与动脉粥样硬化有着密切的关系^[2]。但高脂血症与载脂蛋白 E 基因多态性之间的关系还不清楚。本研究对高脂血症患者和健康对照者的载脂蛋白 E 基因型和三种常见的异构体 ε2、ε3、ε4 进行了比较。在载脂蛋白 E 的 3 中基因型中以

E3/3 型多见, 高脂血症患者中载脂蛋白 E ε4 等位基因频率明显高于对照组($P < 0.05$)。众多的研究也表明对人群血脂浓度的影响尚无比载脂蛋白 E 更明显的等位基因存在。缺乏载脂蛋白 E 的大鼠自发地 TG、TC 水平升高和 HDL 下降。静脉给予人工合成的乙酰化载脂蛋白 E 多肽在 3~ 30 min 内可见 TC 水平下降^[3]。流行病学调查显示高脂血症是冠心病的主要危险因素之一。载脂蛋白 E 基因多态性与脂质代谢异常有关^[4]。本研究检测到的载脂蛋白 E 基因型与血脂水平的关系表明, ε2 等位基因携带者 TC、TG、LDLc 水平最低, ε3 等位基因携带者血脂水平次之, ε4 等位基因携带者血脂水平最高。其可能机制是 ε4 由于与受体结合力相对较强, 致使乳糜微粒

(chylomicrons, CM) 和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL) 浓度下降, LDL 水平升高, 故胆固醇浓度升高; ④ $\epsilon\epsilon$ 等位基因携带者小肠吸收胆固醇增加; ⑤载脂蛋白 E 可促进 HDLC 的形成, 介导其在肝脏的降解, 从而完成胆固醇的转运。对于 $\epsilon\epsilon$ 其解释是 CM 残粒、大颗粒 VLDL 残粒是由载脂蛋白 E 与肝受体连接, 且中密度脂蛋白转化位 LDL 必须有载脂蛋白 E 参与, 由于 $\epsilon\epsilon$ 与受体结合力低下, CM 及 VLDL 残粒进入肝细胞减少, 对 LDL 分解加速, 其结果是血浆 TG 浓度升高, 而胆固醇浓度降低; ④ $\epsilon\epsilon$ 携带者体内脂肪合成速度明显高于 $\epsilon\epsilon$ 携带者; ④脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL) 是 VLDL 降解的关键酶, 从 $\epsilon\epsilon$ 纯合子分离的 VLDL 发现其与硫酸乙酰肝素糖蛋白-脂蛋白脂酶(heparan sulphate proteoglycans³ lipoprotein lipase, HSPG-LDL) 复合物结合缺乏使 VLDL 水解作用下降, 故导致高脂血症^[5]。本研究与国外相关报道相似^[6]。同时该研究也表明 HDLC 水平在高脂血症患者明显低于健康对照者。

载脂蛋白 E 基因多态性与其他血脂指标之间如载脂蛋白 A iv、HDLc 等无统计学差异。

[参考文献]

- [1] 郑芳, 周新, 叶光明, 贺小玲, 刘芳, 陈谦. 载脂蛋白 E 基因 multi-ARMS 快速分型法. 基础医学与临床, 2000, 20: 568-570
 - [2] 杨胜利, 何秉贤, 何作云, 张华, 洪秀芳, 邹阳春. 新疆维汉两民族冠心病患者载脂蛋白 e 基因的多态性. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (5): 429-434
 - [3] Nikoulin IR, Curtiss LK. An apolipoprotein E synthetic peptide targets to lipoproteins in plasma and mediates both cellular lipoprotein interactions in vitro and acute clearance of cholesterol-rich lipoproteins in vivo. J Chin Invest, 1998, 101 (1): 223-234
 - [4] Lin SK, Kao JT, Tsai SM, Tsai LY, Lin MN, Lai CJ, et al. Association of apolipoprotein E genotypes with serum lipid profiles in a healthy population of Taiwan. Ann Clin Lab Sci, 2004, 34 (4): 443-448
 - [5] De Man FH, de Beer, van de laarse A, Smelt AH, Leuven JA, Havekes LM. Effect of apolipoprotein E variants on lipolysis of very low density lipoproteins by heparan sulphat proteoglycan-bound lipoprotein lipase. Atherosclerosis, 1998, 136 (2): 255-262
 - [6] Tan CE, Tai ES, Tan CS, Chia KS, Lee J, Chew SK, et al. APO E polymorphism and lipid profile in three ethnic groups in the Singapore population. Atherosclerosis, 2003, 170 (2): 253-260
- (此文编辑 文玉珊)

《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》 (生物医药类) 一览表(2003 年度)

温州医学院学报
武汉大学学报医学版
西安交通大学学报医学版
西北国防医学杂志
西南国防医药
细胞生物学杂志
细胞与分子免疫学杂志
现代妇产科进展
现代护理
现代口腔医学杂志
现代免疫学
现代神经疾病杂志
现代医学
现代预防医学
消化外科
小儿急救医学
心肺血管病杂志
心血管康复医学杂志
心脏杂志
新生儿科杂志
新乡医学院学报

血栓与止血学
循证医学
牙体牙髓牙周病学杂志
眼科
眼科新进展
眼科研究
眼视光学杂志
眼外伤职业眼病杂志
扬州大学学报农业与生命科学版
药物不良反应杂志
药物分析杂志
药物流行病学杂志
药物生物技术
药学服务与研究
药学学报
医疗设备信息
医疗卫生装备
医师进修杂志
医学临床研究
医学研究生学报
医学影像学杂志