

国人载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病发病之间的相关性

邹阳春¹, 洪秀芳², 胡大一³, 杨新春¹, 贾兴元¹, 项志敏⁴, 崔亮¹

(1. 北京朝阳医院心脏中心与基础医学中心, 北京市 100020; 2. 新疆医科大学附属第一医院心内科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; 3. 北京大学人民医院心内科, 北京市 100044; 4. 北京阜外医院临床药理室, 北京市 100037)

[关键词] 内科学; 载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病的关系; 聚合酶链反应限制片段多态性; 载脂蛋白 E; 基因多态性; 冠心病

[摘要] 目的 探讨载脂蛋白 E 基因 112 bp 与 158 bp 位点多态性与血脂水平及冠心病发生之间的关系。方法 采用生物化学法分别测量经冠状动脉造影证实的 89 例冠心病患者及 43 例正常人空腹血脂水平, 应用聚合酶链反应限制片段多态性分析方法对载脂蛋白 E 基因 DNA 244 bp 的 5' 末端片段进行限制性片段长度多态性分析。结果 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 ($P < 0.05$), 而载脂蛋白 A1 水平则低于对照组 ($P < 0.05$); 冠心病组载脂蛋白 E $\epsilon 2$ 基因型频率明显为低 ($P < 0.001$)。结论 载脂蛋白 E 基因多态性特征会明显影响人群中个体的血浆脂质水平, 从而增加人群中个体发生冠心病的危险。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relationship Between Apolipoprotein E Gene Polymorphisms and Coronary Heart Disease

ZOU Yang-Chun, HONG Xiu-Fang, HU Da-Yi, YANG Xin-Chun, JIA Xing-Yuan, XU Zhi-Min, and CUI Liang

(Heart Center and the Basic Medical Center, Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein E; Gene Polymorphisms; Coronary Heart Disease; Blood Lipids; Coronary Angiography

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationships between apolipoprotein E gene polymorphism and the occurrence of coronary heart disease (CHD). **Methods** The distributions of the Hha I polymorphisms of the apolipoprotein E gene and blood lipids levels were determined among 132 Chinese subjects in relation to circulating lipids and coronary angiography. **Results** The control group had higher apolipoprotein E $\epsilon 2$ frequencies than the CHD group ($P < 0.001$) and the apolipoprotein E gene alleles were associated with the plasma levels of lipids and lipoproteins (all $P < 0.05$). $\epsilon 2$ was significantly correlated with CHD ($P < 0.001$). **Conclusion** The results suggest that the apolipoprotein E gene polymorphism do have influence on circulating levels of lipids and lipoproteins and individuals with apolipoprotein E $\epsilon 2$ are likely to have a reduced risk of developing CHD.

吸烟、高血压、高血脂、糖尿病作为冠心病主要危险因素已为我们所熟悉, 新的冠心病危险因素如同型半胱氨酸、促凝血因子等也逐渐受到人们的关注。随着人类基因组计划的顺利实施, 人们试图从基因水平对疾病进行重新认识^[1]。载脂蛋白 E 与抗动脉粥样硬化功能效应相关^[2], 载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病相关^[3,4]。为此特进行本研究。

1 对象与方法

1.1 对象

[收稿日期] 2004-03-15

[修回日期] 2005-01-04

[作者简介] 邹阳春, 医学博士后, 主任医师, 主要从事冠心病基础、临床及介入研究, E-mail 为 springzou99@126.com。洪秀芳, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化及冠心病的关系研究。胡大一, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病基础、临床及介入研究。

经冠状动脉造影证实为冠心病者 89 例, 男 68 例, 女 21 例, 年龄 54 ± 12 岁; 冠状动脉造影结果显示至少有 1 支或 1 支以上冠状动脉直径狭窄 $\geq 50\%$, 所有患者均为汉族, 无血缘关系。正常对照组 43 例, 男 33 例, 女 10 例, 年龄 51 ± 10 岁, 亦经冠状动脉造影证实未见明显冠状动脉狭窄性病变。两组年龄、性别及家族史等方面具有可比性。冠状动脉造影结果由两位冠心病介入专家进行分析。

1.2 载脂蛋白 E 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 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。基因多态性分析的具体方法参见文献 [5], 应用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 限制片段多态性分析方法对载脂蛋白 E 基因 DNA 244 bp 的 5' 末端片段进行扩增, 扩增引物序列

P1 为 5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3', P2 为 5'-TTAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'。

1.3 基因型分析

载脂蛋白 E 基因 DNA PCR 扩增区域内存在 2 个 Hha I 酶切位点, 它们分别位于 158 bp 与 112 bp 处, 酶切产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙啶染色 30 min, 然后在瑞典 Pharmacia Biotech 公司 Image Master VSD 下进行观察, 对照标记为 pGEM-7zf (+), 可见 6 种片段 (图 1)。

	112	158	
ϵ_2 5' ——— TGC ——— TGC ——— 3'			
NH ₂ Cys Cys COOH			
ϵ_3 5' ——— TGC ——— CGC ——— 3'			
NH ₂ Cys Arg COOH			
ϵ_4 5' ——— TGC ——— TGC ——— 3'			
NH ₂ Arg Arg COOH			

图 1. 载脂蛋白 E 等位基因 ϵ_2 、 ϵ_3 、 ϵ_4 及其 Hha I 酶切位点

1.4 血脂检测

血脂检测按常规生物化学方法进行^[6,7]。

1.5 统计学分析

资料分析应用 SPSS1.0 统计软件完成。基因型及等位基因型频率按 Hardy-Weinberg 平衡法确定各组样本的群体代表性; 基因型及等位基因型频率差异比较用 χ^2 检验, 计量资料用 t 检验比较其差异的显著性水平, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 表示差别有统计学意义; Logistic 回归 (最大似然估计法) 计算危险比。

表 2. 载脂蛋白 E 等位基因频率

Table 2. The genotype frequency of apolipoprotein E gene

分 组	E2/2	E2/3	E2/4	E3/3	E3/4	E4/4	ϵ_2	ϵ_3	ϵ_4
对照组	7.0% (3)	18.6% (8)	9.3% (4)	46.5% (20)	18.6% (8)	0 (0)	21.0%	65.1%	13.9%
冠心病组	3.4% (3)	6.7% (6)	3.4% (3)	60.7% (54)	24.8% (22)	1% (1)	8.5% ^a	76.4%	15.1%

a: $P < 0.001$, 与对照组比较。

2.3 载脂蛋白 E 基因多态性对血脂水平的影响

载脂蛋白 E 基因多态性对血脂各指标水平均产生不同程度的影响, 自 E2/2 至 E4/4, 个体血 TG、TC、LDLC、载脂蛋白 B、脂蛋白 (a) 水平有依次增高的趋势, 而血 HDLC、载脂蛋白 A1 水平则有依次降低的趋势 (表 3, Table 3)。

2 结 果

2.1 冠心病组与对照组基线血脂特征

在年龄、性别等条件可比时, 冠心病组甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、载脂蛋白 B 及脂蛋白 (a) 水平均高于对照组, 而冠心病组载脂蛋白 A1 水平则低于对照组 (P 均 < 0.05), 见表 1 (Table 1)。

表 1. 两组基线血脂特征

Table 1. The demographic information in CHD group and control group ($\bar{x} \pm s$)

指 标	对照组 ($n = 43$)	冠心病组 ($n = 89$)
甘油三酯 (mmol/L)	1.91 \pm 0.6	32.26 \pm 0.66 ^a
总胆固醇 (mmol/L)	4.85 \pm 0.80	5.32 \pm 0.87 ^a
HDLC (mmol/L)	0.99 \pm 0.17	1.03 \pm 0.21
LDLC (mmol/L)	3.08 \pm 0.73	3.52 \pm 0.76 ^a
载脂蛋白 A1 (g/L)	1.01 \pm 0.25	1.19 \pm 0.23 ^a
载脂蛋白 B (g/L)	0.86 \pm 0.11	1.00 \pm 0.17 ^a
脂蛋白 (a) (g/L)	0.24 \pm 0.18	0.28 \pm 0.20 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 载脂蛋白 E 基因型频率分布

载脂蛋白 E 基因酶切后产物可见 6 种片段, 为 91 bp、83 bp、72 bp、48 bp、36 bp 和 35 bp, 产生 6 种基因型, 为 E2/2、E2/3、E2/4、E3/3、E3/4 和 E4/4, 分别由等位基因 ϵ_2 、 ϵ_3 、 ϵ_4 所决定。由表 2 (Table 2) 可以看出, 与对照组比较, 冠心病组载脂蛋白 E 等位基因 ϵ_2 频率明显为低 ($P < 0.001$)。

2.4 多因素 Logistic 回归分析

除了常见的已经明确的冠心病危险因素以外, 载脂蛋白 E 等位基因 ϵ_2 的缺失也可能与冠心病发病相关联, 载脂蛋白 E 等位基因 ϵ_2 插入或缺失可能是冠心病的遗传性预示因子 ($RR = 4.1695$, 95% CI 为 1.28~ 7.86, $P < 0.001$)。

表 3. 载脂蛋白 E 基因多态性血脂水平比较

Table 3. Blood lipid levels related to genotypes at apolipoprotein E gene ($\bar{x} \pm s$)

指 标	E2/2 (n= 6)	E2/3 (n= 14)	E2/4 (n= 7)	E3/3 (n= 71)	E3/4 (n= 28)	E4/4 (n= 6)
甘油三酯 (mmol/L)	1.86 ± 0.58	1.88 ± 0.61	2.05 ± 0.63 ^a	2.12 ± 0.66 ^a	2.19 ± 0.72 ^a	2.20 ± 0.77
总胆固醇 (mmol/L)	4.62 ± 0.78	4.90 ± 0.88	5.19 ± 0.98 ^a	5.28 ± 0.84 ^a	5.30 ± 0.92 ^a	5.25 ± 0.73
HDLc (mmol/L)	1.10 ± 0.22	1.07 ± 0.19	0.98 ± 0.23 ^a	1.01 ± 0.20	0.93 ± 0.19 ^a	0.96 ± 0.67
LDLc (mmol/L)	3.02 ± 0.78	3.22 ± 0.83	3.29 ± 0.88 ^a	3.36 ± 0.80 ^a	3.41 ± 0.93 ^a	3.39 ± 0.79
载脂蛋白 A1 (g/L)	1.10 ± 0.20	1.11 ± 0.21	1.09 ± 0.19	0.95 ± 0.19 ^a	0.97 ± 0.24 ^a	1.02 ± 0.70
载脂蛋白 B (g/L)	0.89 ± 0.15	0.96 ± 0.20	0.98 ± 0.20	1.09 ± 0.21	1.25 ± 0.25 ^a	1.11 ± 0.76
脂蛋白 (a) (g/L)	0.24 ± 0.19	0.27 ± 0.18	0.29 ± 0.20 ^a	0.25 ± 0.21 ^a	0.29 ± 0.19 ^a	0.29 ± 0.09

a: $P < 0.05$, 与 E2/2 基因型比较。

表 4. 多因素 Logistic 回归分析

Table 4. The Logistic analysis of maximum likelihood estimates in population into the study

指 标	参数估计	标准误	卡方值 (Wald)	P 值	危险比 (RR)
性别	1.5612	0.7711	3.9888	0.0312	3.6512
年龄 (> 45 岁)	1.8732	0.5266	4.6512	0.0127	2.8732
吸烟史	0.9287	0.5112	2.7855	0.0635	2.5452
高血压	0.9102	0.6219	1.9187	0.0987	2.8677
糖尿病	1.8833	0.9756	3.0789	0.0542	3.1988
冠心病家族史	0.1922	0.7988	2.0452	0.0991	2.0232
总胆固醇	0.1645	0.5281	0.9656	0.0865	1.0955
HDLc	-1.4312	0.4622	0.0152	0.0993	0.9121
LDLc	1.2871	0.5977	3.9828	0.0564	3.6645
ε2 缺失	1.2598	0.6018	4.9088	0.0023	4.1695

3 讨论

高胆固醇血症特别是高水平的低密度脂蛋白胆固醇是动脉粥样硬化的主要危险因子,载脂蛋白作为血浆脂质的载体,是构成血浆脂蛋白的主要成分,它对胆固醇代谢起着决定性的作用,对动脉粥样硬化的发生与发展具有重要的意义。载脂蛋白 E 在循环中是一种血清糖蛋白配体,主要存在于乳糜微粒及其残体、极低密度脂蛋白、高密度脂蛋白亚群——HDL 颗粒中,它是受体介导的肝脏及肝外组织摄取富含胆固醇颗粒的一种受体配体。载脂蛋白 E 基因位于人类 19 号染色体上,由 3 597 个核苷酸组成,含有 4 个外显子及 3 个内含子,载脂蛋白 E 异构体是由 3 个等位基因 ε2、ε3、ε4 编码,人群中具有 6 种表型,包括 E2/2、E2/3、E2/4、E3/3、E3/4 和 E4/4。研究表明,载脂蛋白 E 基因变异可明显影响血脂水平^[8,9],但也存在不一致的结果报道^[10]。

本研究对 89 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,并对载脂蛋白 E 基因 112 bp 及 158 bp 位点 Hha I 酶切多态性进行分析,结果为我们提供了冠心病发病机制方面的一些分子生物学方面的信息,与刘欣等^[11]的结果一致,而与张国兵等^[12]的结果不同。本研究结果提示,在冠心病发病的复杂机制中,载脂蛋白 E 基因多态性改变可能也参与其中,载脂蛋白 E 基因由于上述二个位点的多态性改变与血中脂蛋白及载脂蛋白特别是 LDLc 水平与载脂蛋白 B 的功能水平存在相关性。我们知道,作为 LDLc 载体的载脂蛋白 B 功能水平直接影响到血中 LDLc 水平,而载脂蛋白 B 功能水平又受到其配体——载脂蛋白 E 的功能状态的影响。由此可以看出,载脂蛋白 E 基因多态性改变可以通过影响 LDLc 水平及载脂蛋白 B 的功能状态而与冠心病的发生发展存在着某种意义上的内存联系,一种可能就是载脂蛋白 E 基因插入与缺失会改变载脂蛋白 E 基因及载脂蛋白 E 的功能从而也会改变个体对机体环境因素影响的易感性^[13,14]。载脂蛋白 E 基因 112 bp 与 158 bp 位点碱基改变在本文所研究的中国汉族人群中是与 LDLc 及载脂蛋白 B 水平的升高相关联的,载脂蛋白 E 基因结构的改变影响着载脂蛋白 E 分子的结构、向血液中释放与分泌速率及其功能状态进而控制和影响血中载脂蛋白 E 与 LDLc 水平及功能^[15,16],与其它冠心病危险因子一起协同参与冠状动脉粥样硬化性心脏病的形成与发展。

[参考文献]

- [1] ZOU Yangchun, HU Dayi, YANG Xinchun, JIA Xingyuan, WANG Lefeng, CUI Liang, et al. Relationships among apolipoprotein A1 gene polymorphisms, lipid levels and coronary atherosclerosis disease. *Chinese Medical Journal*, 2003, 116 (5): 665-668
- [2] Wang YX, Martin McNulty B, Huw LY, da Cunha V, Post J, Hinchman J, et al. Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on presence of apolipoprotein E. *Atherosclerosis*, 2002, 162: 23-31

- [3] Gijbels MJ, van der Cammen M, van der Laan LJ, Emeis JJ, Havekes LM, Hofker MH, et al. Progression and regression of atherosclerosis in APOE3-Leiden transgenic mice: an immunohistochemical study. *Atherosclerosis*, 1999, **143**: 15-25
- [4] van de Poll SWE, Delsing DJM, Jukema JW, Princen HMG, Havekes LM, Puppels GJ, et al. Raman spectroscopic investigation of atorvastatin, amlodipine, and both on atherosclerotic plaque development in APOE* 3 Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis*, 2002, **164**: 65-71
- [5] Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 545-548
- [6] ZOU Yangchun, HE Bingxia, HU Dayi, YANG Xinchun, LI Xinli, ZHAO Xirguo, et al. Nationality differences in distributions of serum lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in Xinjiang, China. *Chinese Medical Journal*, 2001, **114** (11): 1128-131
- [7] Borque L. Automated turbidimetry of serum Lp(a). *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1994, **12**: 16-22
- [8] 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
- [9] 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**: 3099-104
- [10] Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Angelin B. Modulation of plasma triglyceride levels by apo E phenotype: a meta-analysis. *J Lipids Res*, 1992, **33**: 447-454
- [11] 刘欣, 曹海燕, 陈涛, 钟媛, 解用虹. 121例新生儿载脂蛋白E基因型的分布. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 337-339
- [12] 张国兵, 陈灏珠, 江智文, 温沁竹, 庄文燕. 载脂蛋白E基因多态性与冠心病的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 310-312
- [13] Weggemans R, Zock PL, Ordozabal JM, Pedr   Botet J, Katan MB. Apoprotein E phenotype and the response of serum cholesterol to dietary fat, cholesterol and cafestol. *Atherosclerosis*, 2001, **154**: 547-555
- [14] von M  hlen D, Barrett-Connor E, Kritzer Silverstein D. Apolipoprotein E phenotype and the response of lipid levels to postmenopausal estrogen use. *Atherosclerosis*, 2002, **161**: 209-214
- [15] G  mez Coronado D, Alvarez JJ, Entrala A, Olmos JM, Herrera E, Lasuncion MA. Apolipoprotein E polymorphism in men and women from a Spanish population: allele frequencies and influence on plasma lipids and apolipoprotein. *Atherosclerosis*, 1999, **147**: 167-176
- [16] Kobayashi J, Saito Y, Taira K, Takahashi K, Bujo H, Morisaki N, et al. Effect of apolipoprotein E3/4 phenotype on postprandial triglycerides and retinyl palmitate metabolism in plasma from hyperlipidemic subjects in Japan. *Atherosclerosis*, 2001, **154**: 539-546

(此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

《中国动脉硬化杂志》报道的疾病和诊治方法名称

- 1 肥胖症
- 2 小儿肥胖病
- 3 原发性高脂蛋白血症
- 4 高脂血症
- 5 原发性肺动脉高血压症
- 6 早老症
- 6.1 弥漫性动脉粥样硬化
- 6.2 冠状动脉栓塞
- 7 冠状动脉性心脏病
- 7.1 原发性心跳骤停
- 7.2 心绞痛
- 7.3 心肌梗死
- 7.4 冠状动脉性心力衰竭
- 7.5 缺血性心律失常
- 7.6 冠状动脉综合征
- 8 动脉硬化症
- 8.1 颈动脉硬化症
- 8.2 肾动脉硬化
- 8.3 动脉硬化性主动脉瘤
- 8.4 动脉硬化性闭塞症
- 8.5 动脉硬化性周围动脉缺血
- 9 高血压病
- 10 周围血管疾病
- 10.1 血栓闭塞性脉管炎
- 10.2 雷诺综合征
- 10.3 手足紫绀症
- 10.4 急性动脉栓塞
- 10.5 肢端动脉痉挛病
- 11 伯格氏病
- 12 短暂性脑缺血发作
- 12.1 黑矇
- 12.2 视野异常
- 13 脑梗死
- 13.1 脑血栓形成
- 13.2 脑血管栓塞
- 13.3 腔隙性脑梗死
- 13.4 多发梗死性痴呆
- 14 脑动脉硬化症
- 15 动脉硬化性精神病
- 16 其他缺血性脑血管疾病
- 17 粥样栓塞性肾病
- 18 肾动脉血栓形成或栓塞
- 19 糖尿病合并心血管疾病
- 19.1 糖尿病并发冠心病
- 19.2 糖尿病性心肌梗死
- 19.3 糖尿病并发血管病变
- 20 血管疾病的影像学诊断
- 21 血管疾病的手术疗法
- 21.1 动脉旁路移植术
- 21.2 动脉内膜切除术
- 21.3 激光心肌内血管重建术
- 21.4 经皮腔内血管成形术
- 21.5 其它血管手术
- 22 血管疾病的基因疗法
- 23 血管疾病的其它疗法
- 24 代谢综合征

(胡必利编写)