

[文章编号] 1007-3949(2010)18-03-0227-04

· 临床研究 ·

卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因多态性与家族聚集性脑出血及血脂的相关性

高达^{1,2}, 王依宁¹, 许宏伟¹, 张乐¹, 夏健¹, 刘运海¹, 杨期东¹

(1. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008 2 浏阳市中医医院神经内科)

[关键词] 卵磷脂胆固醇酰基转移酶; 脑出血; 家族聚集性; 遗传多态性

[摘要] 目的 探讨卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因多态性与湖南地区汉族人群家族聚集性脑出血及血脂的关系。方法 采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性分析法检测湖南地区汉族人群 10 个有家族聚集现象脑出血家系 126 例成员、100 例散发性脑出血患者和 100 例正常对照者的卵磷脂胆固醇酰基转移酶 608C/T 位点基因型分布情况。结果 卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因 608C/T 的 CT 基因型分布在三个人群均符合 Hardy-Weinberg 平衡, 家系患者及各级亲属组、散发性脑出血组 608C/T CT 基因型、T 等位基因频率与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。家族聚集现象脑出血组和散发性脑出血组 608CC 亚组患者高密度脂蛋白胆固醇水平均显著高于同组 608CT 亚组 ($P < 0.05$)。结论 卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因 608C/T 位点多态性可能与中国湖南地区汉族人群家族聚集性脑出血无关, T 等位基因可能与高密度脂蛋白胆固醇代谢有关。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Association Between Lecithin Cholesterol Acyltransferase Gene Polymorphism and the Phenomenon of Familial Aggregation of Cerebral Hemorrhage and Lipid

GAO Da, WANG Yinling, XU Hongwei, ZHANG Le, XIA Jian, LIU Yunhai, and YANG Qidong

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] Lecithin Cholesterol Acyltransferase; Cerebral Hemorrhage; Familial Aggregation; Genetic Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To explore the association of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) gene polymorphism with the occurrence of familial aggregation of cerebral hemorrhage and lipid. **Methods** LCAT gene 608C/T polymorphism was detected by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in 10 families of cerebral hemorrhage with family history (CHFH) including 30 cerebral hemorrhage patients (CHFH-P), 38 first degree relatives (CHFH-Iv), 31 second degree relatives (CHFH-II), 27 third degree relatives (CHFH-III), 100 patients with sporadic cerebral hemorrhage (SCH) and 100 healthy controls. **Results** The distribution of LCAT 608C/T gene polymorphism was in accordance with Hardy-Weinberg balance in the three groups. The CT genotype frequency and T allele frequency in familial aggregation of cerebral hemorrhage group, sporadic cerebral hemorrhage group were not significantly higher than those in control group. The serum level of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in 608CC genotype subgroup was significantly higher than that in 608CT genotype subgroup of the same group in familial aggregation of cerebral hemorrhage group, sporadic cerebral hemorrhage group ($P < 0.05$). **Conclusion** There is probably no association of 608C/T polymorphism of LCAT gene with familial aggregation of cerebral hemorrhage in Han population of Hunan province. T alleles of 608C/T are possibly associated with the metabolism of HDL-C.

刘斌等^[1]报道, 脑卒中有家族聚集现象, 一家系 7 例发生脑卒中, 且发病年龄早, 提示有遗传因素参与。其中参与脂代谢的多个基因在脑出血的发生发展中起重要作用, 这是因为血脂紊乱是导致脑出血发生发展病理演变的必要前提。卵磷脂胆固醇

基转移酶 (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) 作为胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transportation, RCT)、血浆高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 等脂蛋白代谢中的一个关键酶, 参与维持血浆胆固醇的稳态平衡, 调节 HDL 等脂蛋白代谢, 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生发展中起重要作用。研究显示 LCAT 为 As 和冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CHD) 的易感基因之一^[2-4], 此后国内研究显示 LCAT 基因 608C/T 和 511C/T 多态性可能是脑梗死

[收稿日期] 2009-12-17 [修回日期] 2010-03-04

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金资助课题 (B2007019)

[作者简介] 高达, 硕士, 医师。王依宁, 硕士, 医师, 主要研究方向为脑血管疾病。通讯作者许宏伟, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为脑血管疾病。Email 为 xhw_xiangya@sina.com。

易感因素,而与散发性脑出血可能无关^[5,6]。由于遗传因素在脑出血发病中的重要作用,LCAT基因多态性在脑出血家系患者的发病中是否存在相关性,国内外尚未见相关报道。我们通过研究初步探讨LCAT已知多态位点608C/T与湖南地区汉族人群家族聚集性脑出血及血脂的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

收集2007年1月~2008年9月在湘雅医院神经内科就诊的散发性脑出血患者、有家族聚集现象的脑出血患者及其部分亲属的血标本。入组人员均为湖南省长沙地区汉族人,并签知情同意书。脑出血的诊断符合全国第四次脑血管疾病学术会议修订的诊断标准,经头颅CT及(或)MRI确诊,不包括动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤所引起的脑卒中;排除梗死后出血、肝肾疾病、自身免疫性疾病和妊娠者。(1)家族聚集现象的脑出血组:脑出血家系的概念为先证者患有脑出血,且iv级亲属中至少有1例为脑出血。有家族聚集现象的脑出血家系组(cerebral hemorrhage with family history, CHFH)共10个家系,126例,并分为4个亚组:

家系患者组(CHFH-patient, CHFH-P)30例,男19例,女11例,平均年龄 54.36 ± 11.60 岁;④iv级亲属组(CHFH-iv)38例(包括先证者的父母、子女及同胞兄弟姐妹),男21例,女17例,平均年龄 43.40 ± 8.36 岁;④iii级亲属组(CHFH-iii)31例(包括先证者的祖父母、外祖父母、孙子女、伯、叔、舅、姑、姨及同胞兄弟姐妹的子女),男16例,女15例,平均年龄 46.29 ± 10.33 岁;④ii级亲属组(CHFH-ii)27例(包括先证者的同胞兄弟姐妹的孙子女及表兄弟姐妹的子女),男15例,女12例,平均年龄 53.96 ± 11.28 岁。(2)散发性脑出血组(sporadic cerebral hemorrhage, SCH)100例,男59例,女41例,平均年龄 55.08 ± 11.08 岁。(3)对照组为中南大学湘雅医院健康体检者共100例,均为湖南地区汉族人,无血缘关系,其中男56例,女44例,平均年龄 53.77 ± 12.27 岁,排除有冠心病、脑血管病、心脑血管疾病家族史、肝肾疾病、血液病、自身免疫性疾病、妊娠、半年内有降脂治疗者。

1.2 血脂测定

采用氧化酶法测定甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC);高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)先用沉

淀剂沉淀,再用酶法测定上清液中的胆固醇;低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)由公式 $LDLC = TC - HDLC - TG/5$ 求出;免疫比浊法测定载脂蛋白Aiv(apoprotein Aiv, ApoAiv)及载脂蛋白B100(apoprotein B100, ApoB100)含量。

1.3 聚合酶链反应-限制性片长多态性分析

利用常规酚/氯仿抽提法提取DNA。引物根据基因组序列(GenBank登录号:NT010478),用Primer3软件设计,并用GCG软件行BLAST比对。608C/T引物序列为上游5'-GGT GAG TGT CTC TGC GGA TG-3',下游5'-CAA TAA AGC GGT CCT TCC AG-3'(引物合成由上海英骏公司完成)。PCR反应在PE4800型PCR反应仪上进行,扩增参数为95℃预变性3 min, 94℃变性45 s, 55℃退火45 s, 72℃延伸45 s, 30个循环,最后72℃充分延伸5 min。经2%琼脂糖凝胶电泳验证PCR产物特异性,PCR目标片段长度为243 bp。取5 μL经2%琼脂糖凝胶电泳验证为特异性好的LCAT基因608C/T的PCR产物,加限制性内切酶Bpiiv配置10 μL的反应体系37℃酶切过夜,电泳后用Eagle Eye 4型凝胶图像分析处理系统观察电泳结果并确定基因型。

1.4 统计学分析

采用HWE软件检验基因型的Hardy-Weinberg平衡吻合度;组间等位基因和基因型频率的差异用 χ^2 检验。组间血脂水平差别用t检验;不同基因型组间血脂水平比较采用ANOVA方差分析;正态变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,血清脂蛋白(a)呈偏态分布,经对数转换后统计。

2 结果

2.1 临床资料

家系患者组、散发性脑出血组和对照组在年龄、性别构成、体质指数、吸烟史、饮酒史及糖尿病史等方面均无统计学差异($P > 0.05$),家系患者组和散发性脑出血组高血压史、冠心病史明显高于对照组($P < 0.05$,表1)。

2.2 血脂水平

家系患者组TG、TC、HDLC、ApoAiv与对照组相比差异有显著性($P < 0.05$);散发性脑出血组TG、HDLC、ApoAiv与对照组相比差异有显著性($P < 0.05$,表2)。

表 1 各组患者及对照组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床资料	家系患者组 (n= 30)	散发性脑出血组 (n= 100)	对照组 (n= 100)
年龄 (岁)	54.36 ±11.60	55.08 ±11.08	53.77 ±12.27
男/女 (例)	19/11	59/41	56/44
体质指数 (kg/m ²)	23.1 ±4.2	22.8 ±4.2	22.6 ±2.9
吸烟史 (例)	5(16.7%)	19(19.0%)	13(13.0%)
饮酒史 (例)	4(13.3%)	15(15.0%)	11(11.0%)
高血压史 (例)	21(70.0%) ^a	64(64.0%) ^a	8(8.0%)
糖尿病史 (例)	2(6.7%)	6(6.0%)	5(5.0%)
冠心病史 (例)	4(13.3%) ^a	15(15.0%) ^a	3(3.0%)

a为 $P < 0.05$ 与对照组相比。

表 2 各组患者血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

血脂	家系患者组	散发性脑出血组	对照组
TG (mmol/L)	1.84 ±1.05 ^a	1.72 ±0.87 ^a	1.32 ±0.45
TC (mmol/L)	4.84 ±1.12 ^a	4.36 ±0.81	4.23 ±0.92
HDLc (mmol/L)	1.16 ±0.45 ^a	1.19 ±0.16 ^a	1.58 ±0.42
LDLc (mmol/L)	2.45 ±0.75	2.53 ±0.77	2.38 ±0.53
ApoAiv (g/L)	1.17 ±0.11 ^a	1.18 ±0.25 ^a	1.32 ±0.43
ApoB100 (g/L)	0.99 ±0.33	0.99 ±0.21	0.82 ±0.58

a为 $P < 0.05$ 与对照组相比。

2.3 卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因 608C/T 基因型分析

取 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下曝光显像,发现 LCAT 608C/T PCR 产物长度为 243 bp。经 BpiV充分酶切后,图像呈两种情况:有 155 bp 和 88 bp 两个片断的为纯合子 CC 型;有 243 bp、155 bp 和 88 bp 三个片断的为杂合子 CT 型;未见无酶切位点仍为一个 243 bp 片断的为纯合子 TT 型(图 1)。

2.4 卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因 608C/T 基因型分布

采用 HWE 软件进行 Hardy-Weinberg 吻合度检验,608C/T 位点基因型在此研究人群中的基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡,表明其具有群体代表

性。家系患者组及 iv 级亲属组、㊟级亲属组、㊟级亲属组、散发性脑出血组的基因型分布和 T 等位基因频率与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 3)。

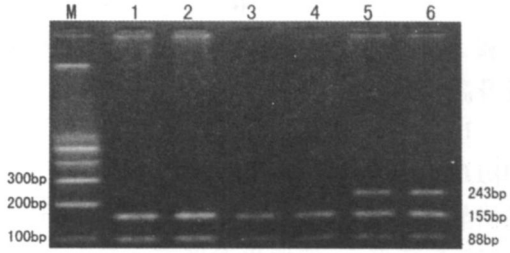


图 1 608C/T PCR 产物酶切后的电泳图谱 M 为 DNA 分子量标准,1、2、3 和 4 为纯合子 CC 型,5 和 6 为杂合子 CT 型。

表 3 各组 608C/T 基因型分布和 T 等位基因频率

分 组	n	基因型 (例)			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
家系患者组	30	28(93.3%)	2(6.7%)	0(0%)	96.7%	3.3%
iv 级亲属组	38	36(94.8%)	2(5.2%)	0(0%)	97.4%	2.6%
㊟级亲属组	31	28(90.3%)	3(9.7%)	0(0%)	95.1%	4.9%
㊟级亲属组	27	25(92.6%)	2(7.4%)	0(0%)	96.4%	3.6%
散发性脑出血组	100	93(93.0%)	7(7.0%)	0(0%)	95.5%	4.5%
对照组	100	96(96.0%)	4(4.0%)	0(0%)	96.3%	3.7%

2.5 卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因 608C/T 基因型与血脂水平的关系

将家系患者组、散发性脑出血组和对照组分别分为 608CC 和 608CT 两亚组,比较各组组内两个亚组之间血脂水平的差异。结果表明,家系患者组和散发性脑出血组 608CC 亚组患者的 HDLc 水平显著高于 608CT 亚组 ($P < 0.05$),其它血脂指标在两亚组之间差异无显著性;对照组各血脂指标在两亚组间差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 4)。

表 4 家系患者组、散发性脑出血组和对照组中 608CC 和 608CT 两亚组间血脂比较 ($\bar{x} \pm s$)

血脂	家系患者组		散发性脑出血组		对照组	
	608CC	608CT	608CC	608CT	608CC	608CT
TG (mmol/L)	1.85 ±0.74	1.78 ±0.55	1.73 ±0.21	1.60 ±0.79	1.31 ±0.51	1.34 ±0.32
TC (mmol/L)	4.85 ±1.18	4.76 ±1.12	4.35 ±1.12	4.53 ±1.09	4.22 ±0.57	4.30 ±0.42
HDLc (mmol/L)	1.25 ±0.41	0.95 ±0.31 ^a	1.26 ±0.31	1.02 ±0.38 ^a	1.60 ±0.44	1.45 ±0.36
LDLc (mmol/L)	2.47 ±0.77	2.38 ±1.13	2.61 ±0.56	2.34 ±0.89	2.31 ±0.72	2.47 ±0.65
ApoAiv (g/L)	1.18 ±0.73	1.15 ±0.23	1.17 ±0.34	1.23 ±0.57	1.30 ±0.22	1.35 ±0.27
ApoB100 (g/L)	0.96 ±0.71	1.08 ±0.35	0.99 ±0.45	1.03 ±0.12	0.82 ±0.34	0.85 ±0.14

a为 $P < 0.05$ 与本组 608CC 亚组比较。

3 讨论

LCAT 是在肝内合成的 α/β 水解酶,分泌进入血循环后位于 HDL,其作用底物绝大部分是 HDL 中

的胆固醇,LCAT 通过促进 HDL 成熟代谢、加速 RCT 起到抗 As 作用。最近有学者提出 LCAT 拮抗 As 在于它能水解血浆中氧化的 LDL,继而抑制巨噬细胞

吞噬氧化 LDL 形成泡沫细胞^[7], 从而起到抗 As 作用。研究发现, 在 CHD 患者中, LCAT 活性降低与 HDLC 浓度呈高度正相关, 而与 As 的发生呈高度负相关^[2]。转基因动物研究也提示, LCAT 活性与 TC 水平和 As 严重程度负相关, LCAT 过表达使 HDLC 浓度升高, 能降低动物 As 的易感性, 具有抗 As 的作用^[8]。LCAT 基因敲除动物实验中发现, LCAT 活性和 HDLC 浓度明显下降, 加重血管内膜损伤, As 易感性明显升高^[9]。近年来的动物和临床研究均表明 LCAT 在减少 As 的发生发展方面具有潜在有益作用^[10]。

目前对于 LCAT 基因研究多集中在突变所致低蛋白血症和鱼眼病方面, 而对于多态性研究报道较少。在正常人群的 LCAT 基因编码区中共发现了 3 个 cSNP, 即 608C/T、911T/C 和 1188C/T (参照序列: NM 000229)^[11], 但对它们的研究迄今相对有限, 且群体较小。国内研究发现中国人群中 608C/T 多态性与 CHD 易感性有关, T 等位基因参与 HDL 脂代谢; 同时还发现 511C/T 一新的多态位点与 CHD 易感性及 HDL 代谢紊乱显著相关^[3, 4]。朱晓岩等^[5, 6]研究结果表明 LCAT 第四外显子 608C/T、511C/T 多态性可能为中国汉族人群脑梗死易感因素, T 等位基因可能与 HDLC 代谢有关。关于 LCAT 基因多态性与家族聚集性脑出血的相关性研究, 国内外尚未见报道。

目前在复杂疾病有关遗传因素研究领域, 以人群为基础的病例-对照研究是最常用的方法, 但其最大的缺点就是人群遗传背景混杂以及分层效应所导致的假阳性和假阴性结果。我们运用家系相关性分析方法尽量减小遗传背景混杂以及人群分层效应的影响^[12], 通过对 LCAT 已知多态位点 608C/T 的研究, 来初步探讨 LCAT 基因 608C/T 与家族聚集性脑出血及血脂的关系。结果表明家系患者组及 iv、㉔、㉕级亲属组、散发性脑出血组与对照组间 608C/T CT 基因型分布差异无显著性; 608C/T 等位基因频率各组间比较差异无显著性。由此可初步推断 LCAT 基因 608C/T 多态性可能与湖南地区汉族人群家族聚集性脑出血发病无关。

我们还分别对家系患者组、散发性脑出血组和对照组中不同基因型亚组间血脂进行了比较, 结果发现家系患者组和散发性脑出血组中 608CC 亚组 HDLC 水平显著高于 608CT 亚组, 对照组 608CC 亚组 HDLC 水平虽然高于 608CT 亚组, 但差异无显著性; 而其它几项血脂指标各组内两亚组间比较差异均无显著性。故我们推测 LCAT 608 位点 T 等位基

因可能与较低的 HDLC 水平有关, T 等位基因可能是通过降低 LCAT 活性, 从而导致 HDLC 水平下降, 这与 Cohen 等^[13]研究结论相似。

本实验结果初步表明, LCAT 基因 608C/T 多态现象与湖南地区汉族人群家族聚集性脑出血易感可能无关, T 等位基因可能与 HDLC 代谢有关。但是 LCAT 基因存在多个多态性位点, 608C/T 多态位点与其它多态位点可能存在连锁关系, 要明确 608C/T 多态位点是否通过与 LCAT 基因其它多态位点共同作用而参与脑出血的发生, 需要进一步从多位点联合分析的角度来探讨 LCAT 基因多态性的作用。同时由于 LCAT 基因 608C/T 多态性在不同种族和人群之间的分布存在很大差异, 故有必要在不同种族人群中进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘斌, 李世英, 张强. 脑卒中一家系七例 [J]. 中华医学遗传学杂志, 1997, 14: 92
- [2] Hovingh GK, Hutten BA, Holleboom AG, et al. Compromised LCAT function is associated with increased atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2005, 112 (6): 879-884
- [3] 张克兰, 张思仲, 郑克勤, 等. 卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因单核苷酸多态性与冠心病脂代谢易感性的关联研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20: 135-137
- [4] Zhang KL, Zhang SZ, Zheng KQ, et al. Novel P143L polymorphism of the LCAT gene is associated with dyslipidemia in Chinese patients who have coronary atherosclerotic heart disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 38: 4-10
- [5] 朱晓岩, 侯荣耀, 许宏伟, 等. 卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2008, 10 (9): 677-682
- [6] 朱晓岩, 许宏伟, 侯荣耀, 等. 卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因 608C/T 多态性与动脉粥样硬化性脑梗塞的关联研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23: 419-422
- [7] Kapur NK, Ashen D, Blumenthal RS. High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease [J]. *Vascular Health Risk Manag*, 2008, 4 (1): 39-57
- [8] Brousseau ME, Kauffman RD, Henderick EE, et al. LCAT modulates atherogenic plasma lipoproteins and the extent of atherosclerosis only in the presence of normal LDL receptors in transgenic rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (2): 450-458
- [9] Furbee JW Jr, Sawyer JK, Parks JS. Lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency increases atherosclerosis in the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E knockout mice [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (5): 3511-519
- [10] Rousset X, Vaissan B, Amar M, et al. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009, 16 (2): 163-171
- [11] Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes [J]. *Nat Genet*, 1999, 22: 231-238
- [12] Laird NM, Lange C. Family-based designs in the age of large scale gene-association studies [J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7 (5): 385-394
- [13] Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, et al. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol [J]. *Science*, 2004, 305 (5685): 869-872

(此文编辑 许雪梅)