

肝脂酶基因 - 250G /A 多态性与腔隙性脑梗死的关系

陈李芳¹, 谭利明², 肖志杰², 聂赛³, 谢湘竹³, 韩漫夫¹

(1 广东省深圳市第二人民医院神经内科, 广东省深圳市 518035; 2 中南大学湘雅二医院神经内科, 湖南省长沙市 410011; 3 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 肝脂酶; 基因; 多态性; 单核苷酸; 腔隙性脑梗塞

[摘要] 目的 探讨肝脂酶基因 (LIPC) - 250G /A 多态性与腔隙性脑梗死的关系。方法 采用病例对照研究, 筛选 152 名腔隙性脑梗死患者及 108 名正常对照人群为研究对象。采用聚合酶链反应-单核苷酸多态性方法测定 LIPC - 250G /A 基因多态性。结果 在腔隙性脑梗死人群中, LIPC - 250G /A 基因型分布为 GG 51.32%、GA 36.84% 和 AA 11.84%, 等位基因 G 和 A 的分布频率分别为 0.697 和 0.303。GA 型和 AA 型的血浆高密度脂蛋白胆固醇水平显著高于 GG 型 ($P < 0.05$)。LIPC - 250G /A 基因型和等位基因频率分布在腔隙性脑梗死组与对照组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 LIPC - 250G /A 多态性产生有益的临床血脂谱, 但可能与腔隙性脑梗死发病无关。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

The Relationship between Polymorphism of Hepatic Lipase Gene - 250G /A Polymorphism and Lacunar Infarction

CHEN Li-Fang¹, TAN Li-Ming², XIAO Zhi-Jie², NIE Sai³, XIE Xiang-Zhu³, HAN Man-Fu¹

(1 Department of Neurology, Shenzhen Second Hospital, Shenzhen, Guangdong 518035, China; 2 Department of Neurology, Xiangya Second Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China; 3 Department of Cardiology, Xiangya Second Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Hepatic Lipase Gene Polymorphism; Single Nucleotide Lacunar Infarction

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between hepatic lipase gene (LIPC) - 250G /A polymorphism and lacunar infarction (LI). **Methods** A case-control study was performed in 152 patients with LI and 108 healthy controls. The polymerase chain reaction-single nucleotide polymorphism (PCR-SNP) was used to determine the LIPC - 250G /A polymorphism. **Results** The LIPC - 250G /A genotype distribution in patients with LI was GG 51.32%, GA 36.84% and AA 11.84%, respectively. Allele frequencies for G and A were 0.697 and 0.303 respectively. The serum high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level of the GA and AA genotypes were significantly higher than the GG genotype ($P < 0.05$). There were no differences in the distribution of genotypes and alleles of LIPC - 250G /A Polymorphism between patients and their counterparts ($P > 0.05$). **Conclusion** The LIPC - 250G /A polymorphism results in a beneficial profile of blood lipids while it may not be associated with LI.

肝脂酶 (hepatic lipase HL) 属于脂肪酶家族, 在血脂代谢中发挥重要作用。肝脂酶基因 (hepatic lipase gene, LIPC) 启动子区域常见的基因多态性, 引起 HL 活性下降, 与血脂水平、动脉粥样硬化产生和冠心病的严重程度明显相关, 并可能是脑卒中的遗传标志^[1-7]。腔隙性脑梗死 (lacunar infarction, LI) 是脑卒中的常见类型, 是多因素疾病, 目前的研究表明, 血脂异常及颅内穿支动脉粥样硬化是腔隙性脑

梗死的重要病因^[8,9]。本研究采用病例对照研究方法, 首次探讨 LIPC - 250G /A 多态性与腔隙性脑梗死的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

病例组来源于 2001 年 2 月 ~ 2002 年 11 月在中

[收稿日期] 2011-03-14

[作者简介] 陈李芳, 硕士, 主治医师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化疾病。谭利明, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为神经免疫。通讯作者韩漫夫, 博士, 主任医师, 研究方向为神经科常见病和疑难病, E-mail 为 angel.cl@tom.com。

南大学湘雅二医院神经内科住院的腔隙性脑梗死患者,共 152例,其中男性 89例,女性 63例,平均年龄 64.3 ± 11.1 岁。腔隙性脑梗死患者严格按照全国第 4 届脑血管病学术会议修订的标准诊断^[10],并经头颅磁共振成像 (magnetic resonance imaging MRI) 证实,梗死灶直径小于 20 mm。对照组 108例,来源于长沙市雨花区普查的非心脑血管疾病人群,其中男性 59例,女性 49例,平均年龄 61.7 ± 13.4 岁,部分经电子计算机 X 射线断层扫描 (computed tomography, CT) MRI 证实无卒中。因脑卒中后血压短时升高,因此以发病前记录的血压高值为病例组研究对象的平常血压。所有研究对象均为三代以上久居中国湖南地区的汉族居民。通过问卷访谈收集研究对象的基本资料。凡有下列情况者予以剔除:脑栓塞、合并周围血管疾病或周围血管栓塞性疾病者、大动脉炎、血液病、结核、恶性肿瘤及严重肝肾功能不全者及入院前 1 周使用降脂等药物者。

1.2 研究方法

取肘静脉血 3~5 mL,以常规酚/氯仿法抽提外周白细胞基因组 DNA。引物设计参考国外有关文献^[3],由上海生工生物工程公司合成。上游引物: 5'-CCTACCCCGACCTTTGGCAG-3', 下游引物: 5'-GGGCTCCAGGCTTTCTTGG-3'。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 反应体系 10 μ L: 基因组 DNA 0.1~0.3 μ g 上游和下游引物分别为 5 μ mol dNTP mix 2.5 nmol Taq 酶 1 U, 10 \times Taq 酶缓冲液 1 μ L, MgCl₂ 20 nmol 灭菌去离子水适量补充至终体积。扩增条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min; 反应循环: 变性 94 $^{\circ}$ C 50 s 退火 64 $^{\circ}$ C 50 s 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 32 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。限制性内切酶消化反应体系 10 μ L: PCR 产物 5 μ L, DraI 2.5 U, 10 \times Buffer 缓冲液 [含牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)] 1 μ L, 灭菌去离子水补充至终体积, 37 $^{\circ}$ C 消化 16 h。3% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以 pUC19DNA/MspI 酶解片段作为 DNA 片段的标准物, 于恒压 (90 V) 下电泳 4 h。肝脂酶 PCR 产物片段总长度 327 bp 其内含有固有的 1 个 DraI 酶切位点及出现 -250G \rightarrow A 后的 1 个新的 DraI 酶切位点, 经特异性限制性内切酶消化后, 可出现 3 种片段大小的组合, 分别为 GG: 161 bp 166 bp GA: 161 bp 47 bp 114 bp 166 bp AA: 47 bp 114 bp 166 bp (图 1)。

1.3 血脂测定

采用酶法测定血清总胆固醇 (total cholesterol TC) 和甘油三酯 (triglyceride TG); 用磷钨沉淀法测

定高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC); 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 采用公式计算。

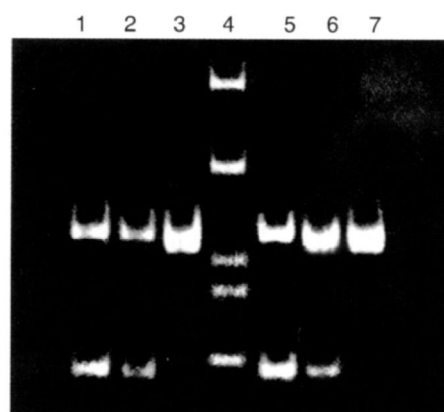


图 1. 酶切产物电泳图像 4 道为 Puc19DNA/MspI marker 3、7 道为 GG 型, 显示两个片段, 从上到下依次为 166 bp 和 161 bp 6 道为 GA 型, 显示 4 个片段, 从上到下依次为 166 bp, 161 bp, 114 bp 和 47 bp 1、2、5 道为 AA 型, 显示 3 个片段, 从上到下依次为 166 bp, 114 bp 和 47 bp。注: 166 bp 和 161 bp 位置紧密相邻, 分界尚清楚; 47 bp 片段已经跑出胶外。

Figure 1. Digestion products electrophoresis

1.4 统计学方法

应用 SPSS 18.0 软件包进行统计分析。多数计量资料近似正态分布, 而 TG 呈偏态分布, 将其进行对数转换后再行检验。计量资料的组间比较采用独立样本 *t* 检验。两组以上采用 One-way ANOVA 检验, Bonferroni 方法进行两两比较。分类资料的组间比较采用卡方检验。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。采用 Logistic 回归模型判断腔隙性脑梗死危险因素作用的大小。

2 结果

2.1 两组一般临床资料比较

两组在年龄、性别构成和体重指数 (body mass index, BMI) 上差异无显著意义 ($P > 0.05$), 提示对照组与病例组具有可比性。常见的腔隙性脑梗死危险因素如收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)、高血压病史、卒中家族史, 病例组明显高于对照组 ($P < 0.05$)。糖尿病史、吸烟史无显著性差异 (表 1)。

2.2 两组生化指标比较

两组谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和肌酐 (creatinine, Cr) 水平差异无显著意义 ($P > 0.05$), 血糖差异有显

著意义 ($P < 0.05$)。腔隙性脑梗死组 TG 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而 HDL-C 水平显著低于对

照组 ($P < 0.05$)。两组的 TC 和 LDL-C 水平差异无显著意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 1. 两组一般临床资料比较

Table 1. Comparison of the clinical data

分 组	例数	年龄 (岁)	男 / 女 (例)	BM I (kg/m ²)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	卒中家族史	高血压史	糖尿病史	吸烟史
对照组	108	61.7 ± 13.4	59/49	23.3 ± 3.3	109.1 ± 15.4	73.4 ± 10.2	4.6%	13.0%	6.5%	34.3%
腔隙性脑梗死组	152	64.0 ± 11.5	89/63	23.9 ± 3.6	154.0 ± 25.6 ^a	92.0 ± 14.2 ^a	23.0% ^a	68.4% ^a	11.0%	35.5%

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; 1mm Hg = 0.133 kPa

表 2. 两组血脂指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Comparison of lipid levels

分 组	例数	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	血糖 (mmol/L)	ALT (U/L)	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
对照组	108	1.40 ± 1.28	4.95 ± 1.08	1.36 ± 0.33	2.90 ± 0.86	4.90 ± 1.15	24.51 ± 20.92	4.56 ± 0.79	89.33 ± 8.31
腔隙性脑梗死组	152	1.73 ± 1.00 ^a	4.91 ± 1.40	1.17 ± 0.24 ^a	3.01 ± 1.12	6.67 ± 3.31 ^a	29.03 ± 23.39	5.55 ± 2.68	120.83 ± 98.81

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.3 腔隙性脑梗死组与对照组肝脂酶基因型和等位基因频率的比较

腔隙性脑梗死组 GG 型频率低于对照组, 而 GA 和 AA 型频率高于对照组, 但差异均无显著意义 ($P > 0.05$)。腔隙性脑梗死组 G 等位基因频率低于对照组, 而 A 等位基因频率高于对照组, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$)。腔隙性脑梗死组 - 250G/A 携带者 (GA + AA 型) 的频率为 30.26%, 而对照组为 24.07%, 两者差异无显著意义 ($P > 0.05$)。由此可见, 两组间的基因型和等位基因的频率差异无显著意义 ($P > 0.05$)。对对照组的基因型分布进行了平

衡检验, 结果显示符合 Hardy-Weinberg 平衡。因此, 本研究所选择的受试者基因频率能够代表群体的基因分布 (表 3)。

2.4 肝脂酶基因型与血脂的关系

在所有研究对象中, LIPC 各基因型之间 TC、TG 和 LDL-C 水平差异无显著意义 ($P > 0.05$), 而 HDL-C 差异有显著意义 ($P < 0.05$)。各基因型两两比较显示, GA 型和 AA 型的 HDL-C 显著高于 GG 型 ($P < 0.05$)。各基因型之间的年龄、性别和 BMI 差异无显著意义 ($P > 0.05$) (表 4)。

表 3. 腔隙性脑梗死组与对照组 LIPC 基因型及等位基因比较

Table 3. Comparison of LIPC genotype and allele in lacunar infarction group and the control group

分 组	例数	基因型 (例)			基因频率	
		GG	GA	AA	G	A
对照组	108	65 (60.19%)	34 (31.48%)	9 (8.33%)	0.759%	0.241%
腔隙性脑梗死组	152	78 (51.32%)	56 (36.84%)	18 (11.84%)	0.697%	0.303%

表 4. LIPC 基因型对血脂的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4. The effect of LIPC genotype on blood lipid

指 标	GG (n = 143)	GA (n = 90)	AA (n = 27)
年龄 (岁)	62.4 ± 12.5	65.1 ± 11.7	60.3 ± 13.4
性别 (男 / 女)	84/59	51/39	15/12
BM I (kg/m ²)	23.7 ± 3.6	23.4 ± 3.2	24.5 ± 4.2
TG (mmol/L)	1.64 ± 1.28	1.55 ± 0.95	1.51 ± 0.84
TC (mmol/L)	4.96 ± 1.41	4.89 ± 1.05	4.89 ± 1.24
HDL-C (mmol/L)	1.15 ± 0.28	1.34 ± 0.27 ^a	1.45 ± 0.23 ^a
LDL-C (mmol/L)	2.98 ± 1.11	2.92 ± 0.83	3.04 ± 1.14

a 为 $P < 0.05$ 与 GG 型比较。

2.5 脑梗死危险因素的分析

通过 Logistic 回归进行单变量分析, GG 基因型 OR = 0.697, 95% CI 0.423 ~ 1.149, A 等位基因携带者 (GA + AA 型) OR = 1.434, 95% CI 0.870 ~ 2.363, 均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

腔隙性脑梗死是发生于脑深穿通动脉 (或其他

微小动脉)的缺血性微梗死(或软化灶),经慢性愈合后所形成的不规则腔隙,直径<20 mm,一般位于基底节、视丘、内囊、脑干。本病由Fisher等在20世纪60年代最先描述,并认为腔隙性梗死几乎都是由高血压引起的穿支动脉的小动脉病变导致的。但目前认为除高血压引起小动脉壁脂质玻璃样变(玻璃样变动脉硬化)外,颅内穿支动脉粥样硬化也是腔隙性脑梗死的重要病因^[8]。微动脉粥样斑块在本质上是一种微小的局部动脉粥样硬化沉积,高脂血症是动脉粥样硬化的首要危险因素^[11,12],目前国外报道高脂血症是腔隙性脑梗死的独立危险因素^[9]。由此可见,除高血压外,高脂血症和动脉硬化也是腔隙性脑梗死的发病基础和重要病因。

肝脂酶具有磷脂酶A-1和甘油三酯酶活性,能催化高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的甘油三酯和磷脂成分水解,使大的富含TG的HDL₂转变为小而致密的HDL₃颗粒,并使血浆HDL水平下降,表现出促进动脉粥样硬化作用。LIPC-250G/A多态性是HL基因启动子区域常见的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),可引起HL活性下降^[13],与血脂异常及动脉粥样硬化相关,而且与心脑血管疾病的发生和发展有密切联系。目前国内外尚无LIPC多态性与腔隙性脑梗死关系的报道。因此,研究LIPC-250G/A多态性与腔隙性脑梗死的关系有利于为探讨脑血管病危险因素提供线索。

肝脂酶基因-250G/A多态性是转录起始点上游250位的碱基G被A取代,产生限制性内切酶DraI的酶切位点。本研究采用PCR-单核苷酸多态性方法对中国湖南汉族人群进行测定发现,PCR产物的特异性酶切导致限制性酶切片段长度发生改变,结果提示LIPC DNA序列存在碱基G到A的突变,这与国外报道一致^[3]。LIPC-250G/A等位基因的频率分布存在种族和个体差异。在本研究的正常对照的中国湖南人群中以GG基因型为主,其频率为52.1%,等位基因G和A的频率分别为0.759和0.241。

肝脂酶基因-250G/A多态性能导致HL活性下降,从而引起HDL-C水平升高,所产生的血脂变化是延缓粥样硬化进程的^[3]。本研究也显示,LIPC-250A等位基因携带者(GA+AA型)血浆HDL-C水平升高,产生有益的临床血脂谱,这与在巴西人、丹麦人以及中国台湾人中的研究结果一致^[2,6,13]。但是本研究中LIPC-250G/A基因型和等位基因频率在正常组和脑梗死组的分布差异无显著意义,进一

步进行Logistic回归也显示LIPC-250G/A多态性不是脑梗死发病的危险因素。

这种现象的产生可能与多种原因有关。首先,可能与样本量和种族差异有关。其次,腔隙性脑梗死是多因素疾病,高脂血症和动脉硬化是腔隙性脑梗死的发病基础和重要病因之一,LIPC基因多态性影响血脂代谢和动脉硬化,在腔隙性脑梗死的发病中起作用。基因多态性只能增加或减少个体对疾病或环境因素的易感性,或呈中性表现,有可能影响疾病的发生和进展。单独一个基因多态性可能不至于影响到疾病的发生发展,但如果与其它的遗传或环境因素联合作用,则有可能对腔隙性脑梗死发病产生显著作用。再次,HL具有与其脂肪酶活性无关的作用,即HL可以作为配体促进胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT);促进富含TG的脂蛋白(包括极低密度脂蛋白和乳糜微粒)与肝脏结合并被清除,表现出抗动脉粥样硬化作用^[14,15]。LIPC-250G/A引起HL活性下降,一方面引起HDL-C水平增高,表现出抗动脉粥样硬化的作用;另一方面又使RCT和富含TG的脂蛋白代谢受损,使动脉粥样硬化风险增加。两方面的作用相互抵消,使得LIPC-250G/A多态性在动脉粥样硬化及脑梗死的发病中呈现中性作用。

综上所述,HL以复杂的机制参与动脉粥样硬化及脑血管疾病的发生和发展,具体机制仍未完全阐明。LIPC-250G/A基因多态性与动脉粥样硬化和脑血管疾病的关系还不确定。大规模的前瞻性研究和谱系研究,将有助于进一步明确肝脂酶基因变异在腔隙性脑梗死发病中的作用。

[参考文献]

- [1] Meng L, Ruixing Y, Yiyang L, et al. Association of LIPC-250G/A polymorphism and several environmental factors with serum lipid levels in the Guangxi Bai Ku Yao and Han populations[J]. *Lipids Health Dis*. 2010; 11(9): 28.
- [2] Granup N, Andreassen CH, Andersen MK, et al. The -250G/A promoter variant in hepatic lipase associates with elevated fasting serum high-density lipoprotein cholesterol modulated by interaction with physical activity in a study of 16 156 Danish subjects[J]. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(6): 2 294-299.
- [3] Hodoglugil U, Williamson DW, Mahley RW. Polymorphisms in the hepatic lipase gene affect plasma HDL-cholesterol levels in a Turkish population[J]. *J Lipid Res*. 2010; 51(2): 422-430.
- [4] Vakićielso P, Ariza M J, de la Vega-Román C, et al. As-

- sociation of the -250G/A promoter polymorphism of the hepatic lipase gene with the risk of peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes Complications* 2008; 22(4): 273-277.
- [5] Wei M, Lu YS, Li PP. Association of the hepatic lipase gene -250G/A promoter polymorphism with the susceptibility to type 2 diabetes mellitus combining with coronary heart disease[J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2009; 26(2): 219-222.
- [6] de Andrade FM, Silveira FR, Arsand M, et al. Association between -250G/A polymorphism of the hepatic lipase gene promoter and coronary artery disease and HDL-C levels in a Southern Brazilian population[J]. *Clin Genet* 2004; 65(5): 390-395.
- [7] Fu Y, Ni PH, Ying YY, et al. The linkage disequilibrium of four loci in hepatic lipase promoter gene of cerebral infarction patients in Shanghai[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87(31): 203-208.
- [8] Nah HW, Kang DW, Kwon SU, et al. Diversity of single small subcortical infarctions according to infarct location and parent artery disease: analysis of indicators for small vessel disease and atherosclerosis[J]. *Stroke* 2010; 41(12): 822-827.
- [9] Kim MH, Moon JS, Park SY, et al. Different risk factor profiles between silent brain infarction and symptomatic lacunar infarction[J]. *Eur Neurol* 2011; 65(5): 250-256.
- [10] Chinese Neurological Society, Chinese Neurosurgery Society. Diagnostic standard of cerebrovascular disease (1995)[J]. *Chin J Neurol* 1996; 29(6): 376-380.
- [11] Koba S, Hirano T. Dyslipidemia and atherosclerosis[J]. *Nippon Rinsho* 2011; 69(1): 138-143.
- [12] Lee EJ, Kim HJ, Bae M, et al. Relevance of common carotid intima-media thickness and carotid plaque as risk factors for ischemic stroke in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Am J Neuroradiol* 2007; 28(6): 916-919.
- [13] Ko YL, Hsu LA, Hsu KH, et al. The interactive effects of hepatic lipase gene promoter polymorphisms with sex and obesity on high-density-lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese-Chinese[J]. *Atherosclerosis* 2004; 172(1): 135-142.
- [14] Zamboni A, Bertocco S, Vitarini N, et al. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins[J]. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(5): 1070-1074.
- [15] Annema W, Tietge UJ. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport[J]. *Curr Atheroscler Rep* 2011; 13(3): 257-265.

(此文编辑 曾学清)