

冠心病患者载脂蛋白 A5 基因多态性与冠状动脉病变程度的相关性

邱方¹, 张葵¹, 徐标², 顾光煜¹, 李雷¹

(南京大学医学院附属鼓楼医院 1. 检验科, 2. 心内科, 江苏省南京市 21008)

[关键词] 内科学; 冠心病; 载脂蛋白 A5; 基因多态性; 甘油三酯; 冠状动脉病变

[摘要] 目的 分析冠心病患者载脂蛋白 A5 基因多态性与冠状动脉病变程度的关系。方法 采用聚合酶链反应—限制片段长度多态性技术分别对 260 例经冠状动脉造影确诊为冠心病的研究对象载脂蛋白 A5 基因-1131T>C 和 c.553G>T 多态性位点基因型进行检测; 其冠状动脉病变程度由病变支数及 Gensini 积分表示。结果 冠心病患者载脂蛋白 A5-1131CC 基因型人群和 c.553T 等位基因携带者血清甘油三酯水平明显高于-1131T 等位基因携带者和 c.553GG 基因型人群 ($P=0.016$ 和 0.008); 不同冠状动脉病变支数组间载脂蛋白 A5 基因型分布和不同基因型间 Gensini 积分的差异无统计学意义 ($P>0.05$); 冠状动脉病变支数和 Gensini 积分与糖尿病发病率呈显著正相关 ($r=0.141$ 和 0.143 , P 均 <0.05), 而与血清高密度脂蛋白胆固醇水平则呈显著负相关 ($r=-0.129$ 和 -0.164 , P 均 <0.05)。结论 冠心病患者载脂蛋白 A5 基因-1131T>C 和 c.553G>T 多态性与其血清甘油三酯水平存在一定的相关性, 但与冠状动脉病变程度无关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Associated Study of Apolipoprotein A5 Gene Polymorphisms with the Degrees of Coronary Artery Stenosis in Coronary Heart Disease Patients

QIU Fang¹, ZHANG Kui¹, XU Biao², GU Guang-Yu¹, and LI Lei¹

(1. Department of Medical Laboratory, 2. Department of Cardiology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Apolipoprotein A5; Gene Polymorphism; Triglyceride; Coronary Artery Stenosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association of apolipoprotein A5 (ApoA5) gene polymorphisms of patients with coronary heart disease (CHD) and the degree of coronary artery stenosis. **Methods** Using polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphisms of patients with CHD and the degree of length polymorphism methods, the genotypes of 260 patients with CHD confirmed by coronary angiography were analyzed, the levels of coronary artery stenosis were characterized by the numbers of diseased vessels and Gensini scores. **Results** Serum triglyceride level of the patients with ApoA5 -1131CC genotype and c.553T allele carriers were obviously higher than that of the patients with ApoA5 c.553GG genotype and -1131T allele carriers, but the Gensini scores were not significantly different among them, and the distribution for the genotypes of ApoA5 genetic variants were also not statistically different among variable number of coronary diseased vessels. The number of coronary diseased vessels and Gensini scores had strongly positive correlation with the presence of diabetes ($r=0.141$ and 0.143 , $P<0.05$), and obviously negative correlation with the level of serum high density lipoprotein cholesterol ($r=-0.129$ and -0.164 , $P<0.05$).

Conclusions ApoA5 gene polymorphisms are remarkably associated with the level of triglyceride, but not the extent of coronary artery stenosis among CHD patients.

冠心病的发病中有若干危险因素起重要作用, 其中高甘油三酯血症是冠心病发生的主要危险因素, 也是高血压、肥胖和胰岛素抵抗的易感因素^[1]。新近发现的载脂蛋白 A5 (apolipoprotein A5, ApoA5)

是迄今为止第一个过度表达引起血浆甘油三酯 (triglyceride, TG) 下降的载脂蛋白, 众多研究结果表明载脂蛋白 A5 基因多态性与心脑血管疾病及代谢性疾病有一定的关联性且存在种族差异^[2-5]。相对而言, 其基因变异与冠状动脉病变程度是否存在相关性的报道在国内外尚属少见。我们以 260 例经冠状动脉造影确诊为冠心病的患者为研究对象, 分析载脂蛋白 A5 基因-1131T>C 和 c.553G>T 基因变异与冠状动脉病变程度的关系, 现予报道。

[收稿日期] 2007-03-26 [修回日期] 2007-08-03

[基金项目] 南京市医学科技发展面上项目 (zk06055)

[作者简介] 邱方, 硕士研究生, 研究方向为脂质代谢与心脑血管疾病的关系, E-mail 为 qiudefang1974@hotmail.com。徐标, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病诊断与介入治疗。通讯作者张葵, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脂质代谢与心脑血管疾病的关系, E-mail 为 zk418862@sohu.com。

1 对象和方法

1.1 研究对象

所有研究对象为无血缘关系的汉族人群,经冠状动脉造影确诊为冠心病的患者共 260 例,其中男 172 例,女 88 例,年龄 24~85 岁,平均 63.54 ± 10.44 岁。通过相关理化检查,获得高血压、糖尿病、吸烟、体质指数 (body mass index, BMI)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、TG、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 等冠心病危险因素的数据资料。

1.2 冠状动脉病变评价

由心脏科心导管专业医师按 Judkins 法行冠状动脉造影术,病变冠状动脉支数以造影示冠状动脉腔径狭窄 $\geq 50\%$ 的病变累及左主干、左前降支、左回旋支或右冠状动脉的支数计,分为单支病变、双支病变和三支病变共三组;冠状动脉狭窄程度按 Gensini 标准评分^[6]: (1) 基本评分: 将冠状动脉狭窄程度为 25%、50%、75%、90%、99% 和 100% 分别记为 1 分、2 分、4 分、8 分、16 分和 32 分。(2) 根据冠状动脉病变部位确定评分系数: 左主干的系数为 5; 前降支近段、中段和远段的系数分别为 2.5、1.5 和 1; 回旋支近段的系数为 2.5; 右冠状动脉、第一对角支、钝缘支、心尖支和后降支的系数均为 1, 其它血管系数均为 0.5。每例患者冠状动脉病变程度的最终积分为各支积分乘以系数之和。若一支血管段多处狭窄,则以该段血管最狭窄处记分。

1.3 基因组 DNA 提取

采集 EDTAK₂ 抗凝静脉血 1 mL, 根据 Gentra 公司 DNA 纯化试剂盒提供的操作规程提取基因组 DNA, 并于 -20°C 保存备用。

1.4 聚合酶链反应及限制片长多态性分析

参照文献[2, 7] 设计下述两对引物: 载脂蛋白 A5-1131T>C 位点 P1 为 5'-GAT TGA TTC AAG ATG CAT TTA GGA-3', P2 为 5'-CCC CAG GAA CTG GAG CGA AAT T-3'; 载脂蛋白 A5 c. 553G>T 位点 P1 为 5'-CAG CAA CTG AAG CCC TAC ACG-3', P2 为 5'-ATG CCG CTC ACC AGG CTC TCG-3'。PCR 反应条件为载脂蛋白 A5-1131T>C 位点: 96°C 预变性 2 min, 95°C 变性 30 s \rightarrow 56°C 退火 30 s \rightarrow 72°C 延伸 30 s, 循环 30 次, 末次循环后 72°C 延伸 5 min; 载脂蛋白 A5 c. 553G>T 位点: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s \rightarrow 65°C 退火 40 s \rightarrow 72°C 延伸 50 s, 循环 35 次, 末次循环后 72°C 延伸 7 min。PCR 扩增产物 10 μL 分别加入

限制性内切酶 Mse iv 5 U (-1131T>C 位点) 和 Msp iv 10 U (c. 553G>T 位点), 37°C 消化 4 h。酶切产物经含 EB 的 20 g/L 琼脂糖电泳分离, 经紫外凝胶成像系统分析结果。并随机挑选部分 PCR 产物送上海生物工程公司测序。

1.5 统计学处理

所有资料用 SPSS13.0 软件包进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不符合正态分布的指标经对数转换达到近似正态分布后进行数据分析 (为使结果简明仍以变换前数据表示), 组间计量数据比较采用 t 检验或单因素方差分析; 基因型分布经 Hardy-Weinberg 平衡检验; 采用 χ^2 检验对组间计数资料进行比较; 相关性用 Spearman 双变量相关分析。

2 结果

2.1 载脂蛋白 A5 基因型判定

-1131T>C 位点 PCR 扩增产物长 188 bp, 在其第 165 bp 处存在一多态性位点 T/C, TT 基因型可见 165 和 23 bp 两条带, TC 基因型可见 188、165 和 23 bp 三条带, CC 基因型可见 188 bp 一条带。c. 553G>T 位点 PCR 扩增产物长 227 bp, 在其第 173 bp 处存在一多态性位点 G/T, GG 基因型可见 173 和 54 bp 两条带, GT 基因型可见 227、173 和 54 bp 三条带, TT 基因型可见 227 bp 一条带。由于 54 bp 和 23 bp 的核酸序列较短, 电泳后在凝胶上较难区分, 但并不影响基因型的判定 (图 1)。随后经基因测序证实存在两位点变异 (图 2)。

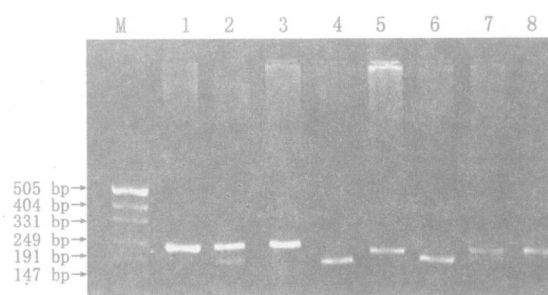
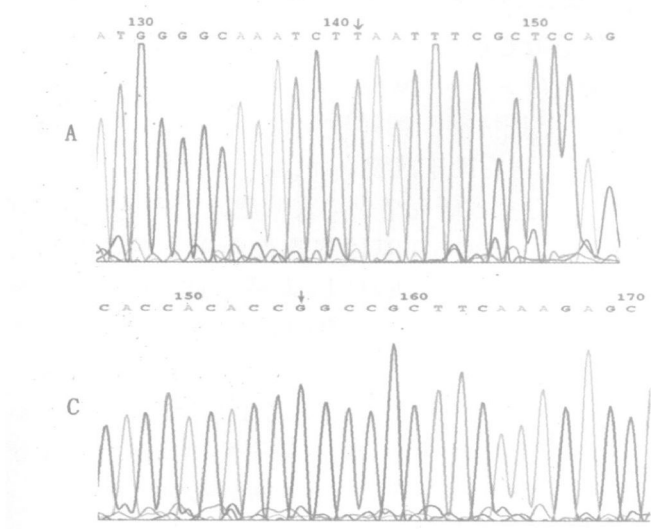


图 1. 载脂蛋白 A5-1131T>C 和 c. 553G>T 基因多态性聚合酶链反应产物酶切电泳图谱 M 为 DNA 标准带, 1 为 c. 553 位点 PCR 产物, 2 为 c. 553GT 基因型, 3 为 c. 553TT 基因型, 4 为 c. 553GG 基因型, 5 为 -1131 位点 PCR 产物, 6 为 -1131TT 基因型, 7 为 -1131TC 基因型, 8 为 -1131CC 基因型。

2.2 冠心病患者不同基因型间冠心病危险因素和 Gensini 积分的比较

冠心病患者 c. 553T 等位基因携带者和 -1131CC

基因型人群的血清 TG 水平明显高于 c. 553GG 和 - 1131T 等位基因携带者(P 均 < 0.05), 而不同基因型人群间其他冠心病危险因素、Gensini 积分的差异则无统计学意义(P 均 > 0.05 , 表 1)。



2.3 不同病变支数基因型分布的比较

不同病变支数组间 - 1131T $>$ C 和 c. 553G $>$ T 位点不同基因型的分布差异均无统计学意义(P 均 > 0.05 , 表 2)。

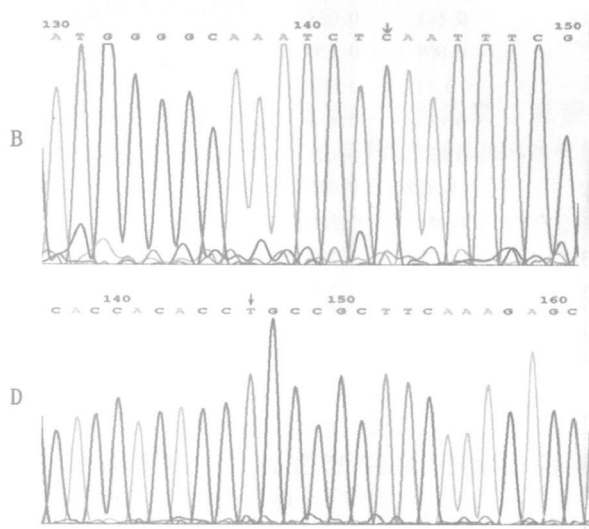


图 2. 载脂蛋白 A5- 1131T $>$ C 和 c. 553G $>$ T 多态性位点的测序图

A 为 - 1131TT 基因型, B 为 - 1131CC 基因型, C 为 c. 553 GG 基因型, D 为 c. 553 TT 基因型, 箭头指示突变位点。

表 1. 冠心病患者载脂蛋白 A5 不同基因型间冠心病危险因素和 Gensini 积分的比较

参数	- 1131T $>$ C 位点基因型			P 值	c. 553G $>$ T 位点基因型		P 值
	TT	TC	CC		GG	GT+ TT	
病例数	126	106	16		216	44	
高血压(例)	70 (55. 6%)	58 (54. 7%)	16 (100%)	0. 973	121 (56. 0%)	23 (52. 3%)	0. 649
糖尿病(例)	31 (24. 6%)	21 (19. 8%)	6 (37. 5%)	0. 678	49 (22. 7%)	9 (20. 5%)	0. 746
吸烟(例)	50 (39. 7%)	47 (44. 3%)	10 (62. 5%)	0. 638	93 (43. 1%)	14 (31. 8%)	0. 167
BMI (kg/ m ²)	24. 62 \pm 3. 20	24. 70 \pm 2. 98	24. 71 \pm 2. 34	0. 796	24. 62 \pm 3. 02	24. 87 \pm 3. 01	0. 625
TC(mmol/ L)	4. 78 \pm 1. 19	4. 84 \pm 1. 02	4. 95 \pm 0. 91	0. 757	4. 78 \pm 1. 08	5. 02 \pm 1. 14	0. 195
TG(mmol/ L)	1. 74 \pm 0. 93	1. 87 \pm 0. 91	2. 36 \pm 1. 37	0. 016	1. 80 \pm 0. 97	2. 17 \pm 1. 06	0. 008
HDLc(mmol/ L)	1. 05 \pm 0. 32	1. 06 \pm 0. 23	0. 99 \pm 0. 23	0. 530	1. 04 \pm 0. 29	1. 05 \pm 0. 23	0. 933
LDLC(mmol/ L)	2. 84 \pm 1. 01	2. 88 \pm 0. 84	2. 87 \pm 0. 70	0. 963	2. 84 \pm 0. 92	2. 97 \pm 0. 88	0. 398
Gensini 积分(分)	39. 5 \pm 35. 3	32. 5 \pm 31. 9	33. 6 \pm 30. 0	0. 258	37. 1 \pm 34. 2	30. 6 \pm 29. 4	0. 241

表 2. 不同病变支数间基因型分布的比较(例)

分 组	n	- 1131T $>$ C 位点			c. 553G $>$ T 位点	
		TT	TC	CC	GG	GT+ TT
单支病变组	105	53(50. 5%)	39(37. 1%)	13(12. 4%)	89(84. 8%)	16(15. 2%)
双支病变组	96	43(44. 8%)	46(47. 9%)	7(7. 3%)	78(81. 2%)	18(18. 8%)
三支病变组	59	30(50. 8%)	21(35. 6%)	8(13. 6%)	49(83. 1%)	10(16. 9%)

2.4 Gensini 积分和冠状动脉病变支数与 - 1131T $>$ C 和 c. 553G $>$ T 多态性以及冠心病危险因素间的相关性

Gensini 积分及冠状动脉病变支数与糖尿病发病率呈显著正相关, 与血清 HDLC 水平则呈显著负

相关(P 均 < 0.05); 冠状动脉病变支数与高血压呈显著正相关($P< 0.05$); 而与 - 1131T $>$ C 和 c. 553G $>$ T 多态性及其他冠心病危险因素无明显相关性(P 均 > 0.05 , 表 3)。

表 3. Gensini 积分及冠状动脉病变支数与冠心病危险因素间的相关性

危险因素	Gensini 积分		病变支数	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
高血压	0.075	0.225	0.128	0.040
糖尿病	0.141	0.023	0.157	0.011
吸烟	0.069	0.270	0.106	0.089
BMI	-0.115	0.063	-0.066	0.291
TC	0.010	0.874	0.056	0.370
TG	0.032	0.611	0.065	0.296
HDLc	-0.129	0.037	-0.166	0.007
LDLC	0.054	0.388	0.102	0.100
-1131T>C	-0.078	0.210	0.007	0.905
c.553G>T	0.077	0.216	-0.026	0.674

3 讨 论

目前认为载脂蛋白 A5 在脂质代谢中可能具有以下作用^[8]: 抑制肝脏合成极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL), 同时还可作为脂蛋白脂肪酶及肝脂酶的激活剂来加速血管内富含 TG 脂蛋白的脂解。众多研究结果表明^[3,4,9], 包括高加索人、西班牙人和中国人在内的不同人群载脂蛋白 A5 - 1131C 等位基因携带者血浆 TG 水平较 - 1131T 等位基因携带者显著增高, 且前者患冠心病的风险明显高于后者。此外, 位于载脂蛋白 A5 基因第 4 外显子的 c. 553G>T 位点变异主要在中国汉族人群中检出, Kao 等^[7]研究表明该位点变异与高甘油三酯血症存在明显相关性, 并与血清 HDLC 水平存在负相关 ($P < 0.001$); 最近, 有两个研究小组先后报道, 在中国大陆和台湾地区汉族人群中 c. 553T 等位基因携带者患冠心病风险比 c. 553G 等位基因携带者高出 2 倍左右^[10,11]。

本研究根据 Gensini 评分标准, 对 260 例冠心病患者冠状动脉狭窄程度进行量化, 并对其载脂蛋白 A5 基因 - 1131T>C 和 c. 553G>T 多态性位点进行分析, 结果表明, 冠心病患者 - 1131CC 基因型人群的血清 TG 水平较 - 1131TT 和 - 1131TC 基因型人群分别升高了 35.6% 和 26.2% ($P = 0.016$), c. 553T 等位基因携带者的血清 TG 水平较 c. 553GG 基因型人群升高了 20.6% ($P = 0.008$); 而不同基因型冠心病患者间其他冠心病危险因素差异则无统计学意义 (P 均 > 0.05)。- 1131TT 基因型人群和 c. 553GG 基因型人群的血清 TG 水平虽较 - 1131C 和 c. 553T 等位基因携带者高, 但差异没有统计学意义 (P 均 > 0.05); 不同冠状动脉病变支数间载脂蛋白 A5 各基因型分布差异均无显著性 ($P > 0.05$)。据此, 可推

断上述两位点基因多态性可影响冠心病患者血清 TG 水平, 但与冠心病患者冠状动脉病变程度无关。同时, 我们的研究结果表明, Gensini 积分及冠状动脉病变支数与糖尿病发病率呈显著正相关 ($r = 0.141$ 和 0.143 , P 均 < 0.05), 提示糖代谢的紊乱有可能加重冠心病的发展, 而与血清 HDLC 水平呈显著负相关 ($r = -0.129$ 和 -0.164 , P 均 < 0.05), 表明 HDLC 是抵抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的保护因子, 将有助于减缓 As 的发生和发展。

尽管众多研究结果均表明载脂蛋白 A5 - 1131T>C 和 c. 553G>T 基因多态性与冠心病存在相关性, 但 As 及冠心病的发生、发展是众多遗传和环境因素共同作用的结果。我们的研究结果表明, 上述两位点基因变异与血清 TG 水平有一定的相关性, 但与冠心病患者冠状动脉病变程度无关。然而, 本研究存在例数稍偏少、缺少对研究对象进行动态分析等不足之处, 有待于在今后的研究中完善。

[参考文献]

- [1] 国家“九五”科技攻关课题协作组. 我国中年人群心血管病主要危险因素流行现状及从 80 年代初至 90 年代末的变化趋势 [J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29 (2): 74-79.
- [2] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing [J]. Science, 2001, 294 (5540): 169-173.
- [3] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels [J]. Hum Mol Genet, 2002, 11 (24): 3 031-038.
- [4] 毕楠, 鄢盛恺, 李国平, 尹志农, 薛红, 吴刚, 等. 冠心病患者 ApoA5 和载脂蛋白 C3 基因多态性的研究 [J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33 (2): 116-121.
- [5] Talmud PJ, Cooper JA, Hattori H, Miller IP, Miller GJ, Humphries SE. The apolipoprotein A-V genotype and plasma apolipoprotein A-V and triglyceride levels: prospective risk of type 2 diabetes [J]. Diabetologia, 2006, 49 (10): 2 337-340.
- [6] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease [J]. Am J Cardiol, 1983, 51 (3): 606.
- [7] Kao J, Wen H, Chien K, Hsu HC, Lin SW. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia [J]. Hum Mol Genet, 2003, 12 (19): 2 533-539.
- [8] Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan bound lipoprotein lipase [J]. J Biol Chem, 2005, 280 (22): 21 553-560.
- [9] Szalai C, Keszei M, Duba J, Prohászka Z, Kozma GT, Császár A, et al. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease [J]. Atherosclerosis, 2004, 173 (1): 109-114.
- [10] Hsu LA, Ko YL, Chang CJ, Hu CF, Wu S, Teng MS, et al. Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan [J]. Atherosclerosis, 2006, 185 (1): 143-149.
- [11] Tang Y, Sun P, Guo D, Ferro A, Ji Y, Chen Q, et al. A genetic variant c. 553C>T in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and altered triglyceride levels in a Chinese population [J]. Atherosclerosis, 2006, 185 (2): 433-437.

(此文编辑 许雪梅)