

载脂蛋白 E 基因多态性及血脂与心肌梗死的关系

陆元善 吴文俊 许翔 庄庆祺^① 吴满平^① 梅美珍^①

(上海市第一人民医院检验科, 上海 200080)

主题词 载脂蛋白 E; 基因型; 基因频率; 聚合酶链反应; 多态性, 限制片段; 等位基因; 心肌梗死; 患者

摘要 为了研究载脂蛋白 E 基因多态性及血脂与老年心肌梗死的关系, 本文采用聚合酶链反应-限制片段多态性对 97 例对照者和 49 例心肌梗死患者载脂蛋白 E 基因型进行分析, 同时检测血脂指标。结果发现, 两组的 E3/3 基因型所占百分比最大, 其次是 E3/4 基因型; 对照组和心肌梗死组的 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ 等位基因频率分别为 0.0309、0.8918、0.0773 和 0.0306、0.8163、0.1531。心肌梗死组 $\epsilon 4$ 携带者百分比大于对照组, E3/4 基因型所占百分比大于对照组 (P 均 < 0.05)。与 E3/3 基因型相比, E3/4 基因型在心肌梗死发生中的 OR 值为 5.52, 95% 可信限为 1.02 ~ 29.80 ($P < 0.05$)。结果提示, E3/4 基因型为心肌梗死发生的独立危险因素, 女性心肌梗死的发生受基因型影响较男性更为明显。

Relationship between Apolipoprotein E Polymorphisms, Serum Lipid and Myocardial Infarction

LU Yuan-Shan, WU Wen-Jun, XU Xiang, ZHUANG Qing-Qi, WU Man-Ping and MEI Mei-Zhen

(Department of Laboratory, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China)

MeSH Apolipoprotein E; Genotypes; Gene Frequency; Polymerase Chain Reaction; Polymorphism, Restriction Fragment Length; Alleles; Myocardial Infarction; Patients

ABSTRACT **Aim** To study the relationship between apolipoprotein E (apo E) genotypic polymorphisms, serum lipid and the incidence of myocardial infarction in the old people. **Methods** Apo E genotypes of 97 controllers and 47 myocardial infarction patients were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and their serum lipid were measured at the same time. **Results**

The most frequency genotype was E3/3 and the next was E3/4 in the two groups. The estimated apo E allele frequencies in the sample of control group were 0.0309, 0.8918 and 0.0773 for the $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ alleles, respectively. The estimated frequencies of the $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ alleles in the sample of myocardial infarction group were 0.0306, 0.8163 and 0.1531, respectively. The frequency of $\epsilon 4$ allele carriers in the myocardial infarction group was bigger than in the control group. The frequency of E3/4 genotype of myocardial infarction group was also higher than the control group ($P < 0.05$). Compared to apo E genotype E3/3, a risk associated with genotype E3/4 increased in the myocardial infarction group. The OR of genotype was 5.52 with 95% CI 1.02 ~ 29.80 ($P < 0.05$) after adjusted by sex, age, and lipid pool. **Conclusion**

Apo E genotype E3/4 was the independent risk factor for myocardial infarction in Shanghai. The genetic effect on the occurrence of myocardial infarction was more directly in women than in men.

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apo E) 不仅是参与脂质代谢的重要成份, 而且与临床许多疾病有关, 如高脂血症、冠心病 (coronary heart disease, CHD) 和老年性痴呆症等^[1~3]。许多基因可以引起动脉粥样硬化和血脂代谢异常, 其中以载脂蛋白 E 等位基因的变异最为常见^[4]。研究表明, $\epsilon 2$ 等位基因有降低总胆固醇 (total cholesterol, TC) 的作用, $\epsilon 4$ 有升高 TC 的作用, 在 CHD 的发生中 $\epsilon 2$ 等位基因有保护作用, $\epsilon 4$ 则有危害作用。尽管有研究报道了载脂蛋白 E 多态性与 CHD 之间的关系, 但直接研究载脂蛋白 E 基因型在 CHD 中的作用较少, 同时考虑其它因素如年龄、性别、血脂及以年龄较大的个体作为研究对象的

更少。本研究运用自己建立的聚合酶链反应-限制片段多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分型法对 97 例对照者和 49 例心肌梗死患者载脂蛋白 E 基因型进行分析, 用非条件 Logistic 回归及最大似然法, 分析载脂蛋白 E 基因型和载脂蛋白 E、年龄、性别及血脂在 CHD 发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP、HhaI 内切酶、DNA 参考片段均为 Promega 产品。TC、甘油三酯 (triglyceride, TG)、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)、载脂蛋白 A

I (apolipoprotein A I, apo A I) 和载脂蛋白 B (apolipoprotein B, apo B) 测定试剂均为 Boehringer mannheim 产品。脂蛋白 (a) [lipoprotein (a), Lp (a)] 酶联免疫试剂盒为荣盛公司产品。

1.1.2 检测对象 对照组为体检人员,共 97 例,其中男性 52 例,女性 45 例,平均年龄 59.72 ± 16.61 岁。对照者神志正常,无高血压、糖尿病、心脏病及肝肾功能异常。心肌梗死组 49 例,其中男性 34 例,女性 15 例,平均年龄为 64.9 ± 13.41 岁,根据临床表现、心电图及心肌酶谱测定诊断为心肌梗死 (包括急性和陈旧性)。两组年龄及性别无统计学差异 ($P > 0.05$)。所有受检者均抽静脉血 5 mL,其中 2.7 mL 加 109 mmol/L 枸橼酸钠 0.3 mL 抗凝,另外 2.3 mL 不抗凝 (外院标本只抽抗凝血),分离血浆或血清,均 -20°C 保存备用。

1.2 方法

按文献 [5] 进行基因型检测。用酶法测定 TC 和 TG,用直接法测定 HDLC, TG 浓度大于 4.0 mmol/L 者用直接法测定 LDLC,其余用 Friedewald 公式计算。载脂蛋白 A I 和载脂蛋白 B 采用免疫比浊法测定,脂蛋白 (a) 用酶联免疫法测定。

除脂蛋白 (a) 外,以上测定均在 OLYMPUS 1000 型全自动生化分析仪上进行。

1.3 统计学方法

两组年龄、TC、TG、HDLC、LDLC、载脂蛋白 A I、及 B、脂蛋白 (a) 浓度比较用 t 检验;两组的性别构成、不同载脂蛋白 E 基因型所占百分比用 χ^2 或 Fisher's 检验;各种实验因素对心肌梗死发病的影响用非条件 Logistic 回归。Logistic 回归用 SAS 6.0 分析软件。

表 2. 对照组和心肌梗死组载脂蛋白 E 基因型和等位基因频率比较

Table 2. Comparison of apolipoprotein E genotypes and frequencies of allele between control group and MI group (n, %)

Groups	n	Genotypes				Alleles		
		E2/3	E2/4	E3/3	E3/4	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Control								
male	52	2 (3.85)	3 (5.77)	41 (78.85)	6 (11.53)	5 (4.81)	90 (86.54)	9 (8.65)
female	45	1 (2.22)	0 (0.00)	38 (84.45)	6 (13.33)	1 (1.11)	83 (92.22)	6 (6.67)
MI								
male	34	2 (5.88)	1 (2.94)	25 (73.53)	6 (17.65)	3 (4.41)	58 (85.30)	7 (10.29)
female	15	0 (0.00)	0 (0.00)	7 (46.67)	8 (53.33)	0 (0.00)	22 (73.33)	8 (26.67)

2 结果

2.1 血脂测定值

心肌梗死组 TC、LDLC、载脂蛋白 B 和 Log [Lp (a)] 均高于对照组, HDLC、载脂蛋白 A I 均低于对照组,具有显著性差异 (表 1, Table 1)。

表 1. 对照组和心肌梗死组血脂比较

Table 1. Comparison of serum lipid levels between control group and myocardial infarction group ($\bar{x} \pm s$)

Index	Control group	MI group
TC (mmol/L)	4.55 ± 0.73	4.87 ± 1.21^a
TG (mmol/L)	1.51 ± 1.17	1.93 ± 1.99^b
HDLC (mmol/L)	1.07 ± 0.25	0.96 ± 0.22^c
LDLC (mmol/L)	2.78 ± 0.74	3.15 ± 1.20^a
apo A I (g/L)	1.48 ± 0.16	1.18 ± 0.21^c
apo B (g/L)	0.91 ± 0.20	1.01 ± 0.26^a
Log [Lp (a)] (mg/L)	0.75 ± 5.7	1.24 ± 0.55^c

a: $P < 0.05$, b: $P > 0.05$, c: $P < 0.01$, compared with control group

2.2 载脂蛋白 E 基因型及等位基因

由表 2 (Table 2) 可知,对照组与心肌梗死组的基因型为 E2/3、E2/4、E3/3、E3/4,以 E3/3 所占百分率最大,其次为 E3/4。

心肌梗死组 E3/3 所占的百分比低于对照组, E3/4 所占百分比高于对照组 (P 均 < 0.05)。等位基因比较结果表明,心肌梗死组携带有 $\epsilon 4$ 的百分比高于对照组 ($P < 0.05$),而 $\epsilon 2$ 及 $\epsilon 3$ 与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。同性别配对比较发现,男性心肌梗死患者 $\epsilon 4$ 及 E4/3 基因型阳性百分比与对照组之间无显著性差异,女性心肌梗死患者 $\epsilon 4$ 及 E3/4 基因型阳性百分比显著高于对照组 ($P < 0.05$)。各组内男女性别 $\epsilon 4$ 阳性百分比之间的比较发现,对照组男女性别之间无显著性差异 ($P > 0.05$),而心肌梗死组女性较男性高 ($P < 0.05$)。

2.3 非条件 Logistic 回归

在进行回归时,考虑到其它因素对疾病的影响,所以没有设置自变量的取舍值。以 $P < 0.1$ 为该变量对回归方程有显著影响。回归结果见表 3 (Table 3)。仅考虑基因型对心肌梗死发病的影响时,E3/4 有显著影响,其 OR 值为 E3/3 的 2.88 倍 ($P < 0.05$);同时考虑基因型、年龄及性别对心肌梗死的影

响时,E3/4 的 OR 值为 3.38 ($P < 0.05$),性别对心肌梗死发病也有影响,男性更易发病;若考虑基因型、年龄、性别及血脂对心肌梗死的影响时,E3/4 的 OR 值为 5.52 ($P < 0.05$),而性别、年龄并不是影响心肌梗死发病的显著因素,血脂指标中,只有载脂蛋白 A I 和脂蛋白 (a)对心肌梗死发病有显著影响。

表 3. 心肌梗死组非条件 Logistic 回归

Table 3. Logistic regression in myocardial infarction group

Index	Parameter estimate	Standard error	P	OR
apo E genotypes				
E2/3	0.4982	0.9366	0.5947	1.6458
E2/4	-0.1949	1.1736	0.8681	0.8229
E3/4	1.0579	0.4457	0.0176	2.8803
sex, age and apo E genotypes				
E2/3	0.2232	0.9667	0.8174	1.25
E2/4	-0.5038	1.1886	0.6717	0.6042
E3/4	1.2187	0.4662	0.0089	3.3828
Sex	-0.6940	0.4115	0.0917	0.4996
Age	0.0177	0.0132	0.1808	1.0179
sex, age, serum lipids and apo E genotypes				
E2/3	2.4241	1.4457	0.0936	11.2921
E2/4	-11.278	414.7	0.9783	0.0000
E3/4	1.7083	0.8602	0.0470	5.5196
Sex	0.1083	0.7173	0.8800	1.1144
Age	0.0272	0.0234	0.2445	1.0276
TC	-2.7440	5.9535	0.6449	0.0643
TG	2.3420	2.7430	0.3932	10.402
HDL	7.1712	6.2086	0.2481	1301.41
LDL	4.0182	6.0164	0.5042	55.6009
Apo A I	-16.1901	2.9966	0.0001	0.0000
Apo B	-0.6193	1.6760	0.7117	0.5383
Lp (a)	0.0349	0.0139	0.0120	1.0355

3 讨论

心肌梗死组 TC、HDL、LDL、载脂蛋白 A I 及 B 和脂蛋白 (a)与对照组之间有显著性差异,与李健斋等^[4,6,7]对老年冠心病患者的脂蛋白谱研究及其它学者的研究结果相一致。非条件回归表明,载脂蛋白 A I 与心肌梗死的发生高度负相关,脂蛋白 (a)与心肌梗死的发生正相关。载脂蛋白 A I 主要存在于 HDL 组分中,载脂蛋白 A I 低下,提示 HDL 水平低。由于 HDL 浓度低不能有效地清除血管壁上的胆固醇,因而容易形成动脉粥样硬化,导致心肌梗死的发生。由于脂蛋白 (a)易与动脉壁大分子氨基葡聚多糖结合成脂蛋白 (a)-氨基葡聚多糖复合物,促使单核巨噬细胞堆积大量胆固醇,形成泡沫细胞,导致动

脉粥样硬化形成^[8]。回归方程显示载脂蛋白 A I 和脂蛋白 (a)在预示心肌梗死发生的可能性要优于 HDL 和 LDL,是心肌梗死发生的保护因子和危险因子。基因型及等位基因比较发现,心肌梗死组 E3/4 基因型及 $\epsilon 4$ 等位基因携带的百分比高于对照组,E3/3 基因型低于对照组, $\epsilon 3$ 等位基因携带的百分比亦低于对照组,与文献^[7,9~11]报道相一致。Leheinen 等^[7,11]研究表明血中胆固醇、LDL 的浓度、动脉粥样硬化的面积及严重程度按 E3/3、E3/4、E4/4 顺序增加,心肌梗死的发生率亦按该顺序增加。说明 $\epsilon 4$ 等位基因对心肌梗死的发生有影响。该作用可能是通过血脂间接影响心肌梗死的发生。非条件回归可以看出 E3/4 基因型对心肌梗死的发生不

一定与年龄、性别和血脂有关,为心肌梗死发生的一个独立危险因素。同性别配对比较发现,男性心肌梗死患者携带 $\epsilon 4$ 等位基因百分比与对照组之间无差异,而女性患者携带 $\epsilon 4$ 等位基因百分比比较同性别的对照组要高 ($P < 0.05$)。心肌梗死组内男女性别比较发现女性患者携带 $\epsilon 4$ 等位基因百分比高于男性 ($P < 0.05$),说明载脂蛋白 E 多态性与女性心肌梗死发病的关系更为密切,可能是由于血脂代谢异常对女性粥样硬化发生较男性更为直接^[1]。非条件回归分析可见,在不考虑血脂的情况下,女性心肌梗死的发病危险度为男性的一半 ($OR = 0.4996, P < 0.1$),但考虑血脂对心肌梗死发病的影响时,其 OR 值为 1.1144,显著性差异消失 ($P = 0.88$),进一步说明血脂代谢异常对女性心肌梗死发生的影响可能强于男性。男性可能受其它因素如高血压、吸烟、紧张等影响,也不能排除女性患者百分比较少,抽样所引起的误差。心肌梗死组 E2/3 基因型所占百分比高于对照组,非条件回归将年龄、性别及血脂综合考虑后,其 OR 值从 1.64 上升到 11.29, P 值从 0.5947 下降到 0.0936,与 Andrade 等^[4]在研究 CAAD 病人的结果一致。基因型为 E2/3 者,12 年后发生 CHD 的 OR 值为 1.36,而 E3/4 个体为 1.32。人群调查也发现,基因型为 E2/3 的高加索男性其血清总胆固醇浓度比同性别基因型为 E3/3 者低,标准差则高于同性别基因型为 E3/3 者,尽管其血清总胆固醇较低,但发生 CHD 的危险性增加,发病百分率大于 E3/3^[12],这可能与 E2 清除甘油三酯丰富的脂质较慢有关。同时也说明载脂蛋白 E 多态性在心肌梗死发病中的作用不如想象的通过血脂间接影响那么简单,其对心肌梗死的影响还可能与检测群体的选择、对照的选择及其它一些因素有关,如高血压、吸烟、性别等^[4]。因心肌梗死组的两例 E2/3 基因型均为男性,这就进一步说明男性心肌梗死的发生较女性更为复杂。

综上所述,载脂蛋白 E 基因多态性对心肌梗死

发生的影响较为复杂,不能简单地用血脂异常进行解释,其对女性作用较为显著。

参考文献

- 1 Rall SCJ, Weisgraber KH, Innerarity TL, et al. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**: 4 696 - 700
- 2 Lucotte G, David F, Visvikis S, et al. Apolipoprotein E- $\epsilon 4$ allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 1993, **342**: 1 309
- 3 Luc G, Bard JM, Arveiler D, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1994, **14** (9): 1 412 - 419
- 4 de Andrade M, Thandi I, Brown S, et al. Relationship of the apolipoprotein E polymorphism with carotid artery atherosclerosis. *Am J Hum Genet*, 1995, **56**: 1 379 - 390
- 5 陆元善, 吴文俊, 庄庆祺. Apo E PCR-RFLP 分型的建立和评价. *中国实验诊断学*, 1997, **1** (6): 26 - 28
- 6 李健斋, 王抒, 何青, 等. 老年冠心病患者脂蛋白谱剖析. *中华老年医学杂志*, 1997, **16** (4): 212 - 215
- 7 Lehtinen S, Lehtimäki T, Sisto T, et al. Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 83 - 91
- 8 张华征. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 见: 王克勤 (主编). 脂蛋白与动脉粥样硬化. 北京: 人民卫生出版社, 1995, 417 - 445
- 9 Yamamura T, Li-ming D, Yamamoto A. Apolipoprotein E polymorphism and coronary heart disease. *Chinese Med J*, 1992, **105** (9): 738 - 741
- 10 Kuusi T, Nieminen MS, Ehnholm C, et al. Apoprotein E polymorphism and coronary artery disease: increased prevalence of apolipoprotein E-4 in angiographically verified coronary patients. *Artherosclerosis*, 1989, **9**: 237 - 241
- 11 Lenzen HJ, Assmann G, Buchwalsky R, et al. Association of apolipoprotein E polymorphism, low-density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease. *Clin Chem*, 1986, **32**: 778 - 781
- 12 Maccluer JW, Kammerer CM. Invited editorial: dissecting the genetic contribution to coronary heart disease. *Am J Hum Genet*, 1991, **49**: 1 139 - 144

此文 1998-11-16 收到, 1999-04-21 修回)

此文编辑 文玉珊)