

胆固醇酯转运蛋白 TaqIB 基因多态性与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系

周灵芳¹, 江毅卿², 陈存国¹, 齐激扬¹

(温州医学院附属台州医院 1. 老年医学科, 2. 神经内科, 浙江省临海市 317000)

[关键词] 胆固醇酯转运蛋白; 基因多态性; 脑梗死; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨胆固醇酯转运蛋白(CETP)TaqIB 基因多态性与脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块稳定性之间的关系。**方法** 对 135 例颈动脉易损斑块的脑梗死患者和 158 例颈动脉稳定斑块的脑梗死患者进行研究。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法测定所有研究对象血标本的 CETP TaqIB 基因多态性, 对易损斑块组和稳定斑块组 CETP TaqIB 基因多态性进行比较分析。**结果** 易损斑块组 B1B1、B1B2、B2B2 基因型比例分别是 56.30%、33.33% 和 10.37%, 稳定斑块组分别为 53.80%、36.07% 和 10.13%, 两者比较差异无统计学意义。B1、B2 等位基因在易损斑块组的频率分别为 72.96% 及 27.04%, 在稳定斑块组为 71.84% 及 28.16%, 两者差异也无统计学意义。**结论** 胆固醇酯转运蛋白 TaqIB 基因多态性与脑梗死患者的颈动脉粥样硬化斑块稳定性没有明确的关系。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relationship of Cholesterol Ester Transfer Protein TaqIB Polymorphism with the Stability of Carotid Atherosclerosis

ZHOu Ling-Fang¹, JIANG Yi-Qing², CHEN Cun-Guo¹, and QI Ji-Yang¹

(1. Department of Geriatric Medicine, 2. Department of Neurology, The Affiliated Taizhou Hospital of Wenzhou Medical College, Linhai 317000, China)

[KEY WORDS] Cholesterol Ester Transfer Protein; Gene Polymorphism; Cerebral Infarction; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relation between the genetic polymorphism cholesterol ester transfer protein (CETP) TaqIB and the stability of carotid atherosclerosis of cerebral infarction patients. **Methods** 135 cases of cerebral infarction with vulnerable plaques and 158 cases of cerebral infarction with stable plaques were studied. Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was adopted to determine CETP TaqIB gene polymorphism for all specimens, comparing CETP TaqIB gene polymorphism in the vulnerable plaque group with the stable plaque group, which were statistically analysed. **Results** The proportions of B1B1, B1B2, B2B2 genotype in the vulnerable plaque group were 56.30%, 33.33% and 10.37% respectively, and were 53.80%, 36.07% and 10.13% in the stable plaque group, the difference has no statistical significance. The frequencies of B1, B2 allele in the vulnerable plaque group were 72.96% and 27.04% respectively, and were 71.84% and 28.16% in the stable plaque group, the difference also has no statistical significance in comparison. **Conclusions** CETP TaqIB genetic polymorphism may have no definite relationship with the stability of carotid atherosclerosis of cerebral infarction patients.

动脉粥样硬化(As)是慢性炎症性疾病。在 As 基础上,颈动脉粥样易损斑块不可预测地突然破损(破裂或溃疡形成)、血小板激活、血栓形成是脑梗死的重要发病机制之一。胆固醇酯转运蛋白

(CETP)是参与高密度脂蛋白(HDL)介导的胆固醇逆转运过程的重要成份^[1]。CETP 对 As 有着非常复杂的作用。而 CETP 的基因表达对脂质转活性及体内脂蛋白的组成有着决定性的作用,目前有十

[收稿日期] 2011-08-27

[基金项目] 台州市科技计划项目(100KY06)

[作者简介] 周灵芳,硕士研究生,主治医师,研究方向为老年医学,E-mail 为 56282908@qq.com。江毅卿,硕士,主治医师,研究方向为神经病学,E-mail 为 jiang-yq@163.com。陈存国,副主任医师,研究方向为老年医学,E-mail 为 chencg@tzhospital.com。

几种基因多态性和基因突变引起的新的基因型被陆续发现^[2-4]。其中 TaqIB 基因多态性尤其具有普遍性。但目前尚未见该基因多态性与颈动脉粥样硬化斑块稳定性关系方面的文献。本文采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对 135 例由颈动脉彩色超声显示明确存在颈动脉易损斑块的脑梗死患者和 158 例颈动脉稳定斑块的脑梗死患者进行检测,比较两组间 CETP TaqIB 基因多态性,探讨 CETP TaqIB 基因多态性与颈动脉粥样硬化斑块稳定性之间的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2006 年 8 月至 2009 年 5 月期间在我院神经内科的住院患者,对符合要求且发病 48 h 之内的脑梗死患者行颈动脉血管彩色超声检查。参照文献[5]中的 B 超下颈动脉斑块的分类标准,将颈动脉斑块呈低回声的患者纳入易损斑块组,共 135 例,男 78 例,女 57 例,年龄 44~89(67.94±10.15)岁;颈动脉斑块呈高回声的患者纳入稳定斑块组,共 158 例,男 88 例,女 70 例,年龄 43~90(69.88±9.25)岁。脑梗死的诊断符合全国脑血管病学术会议修订的动脉粥样硬化性血栓性脑梗死的诊断标准^[6],经头颅 CT 和(或)MRI 确诊,除外无症状性脑梗死、梗死后出血和脑出血。两组均无动脉炎、肿瘤、血液病,无动脉瘤、脑血管畸形,无肺、肝、肾及甲状腺疾病,无感染及组织损伤,无心源性脑栓塞、腔隙性脑梗死等病史;所有研究对象均为浙江省汉族人,相互间均无血缘关系和近 3 个月来未服用各类降血脂抗血小板聚集药者。本研究开始前研究方案已征得浙江省台州医院临床研究伦理委员会的批准,所有人员均在参与研究前签署了知情同意书。

1.2 颈动脉超声检查

颈动脉超声检测由超声科高年资医师专人操作,采用美国产 GE Vivid 7 型彩色多普勒超声诊断仪,探头频率为 7.5 MHz,分别检测两侧颈总动脉(CCA)、CCA 分叉处、颈内动脉颅外段纵横轴实时二维图像。舒张末期测量 CCA 分叉处近端 1 cm、CCA 分叉处以及颈内动脉起始段 1 cm 后壁的内膜中膜厚度(IMT),两侧各测量 3 次,取其平均值。粥样斑块定义为 IMT≥1.2 mm。

1.3 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker、人全血基

因组 DNA 提取试剂盒为上海捷瑞生物公司产品;Taq I 内切酶为 MBI Ferments 公司产品;引物由上海基康生物公司合成。

1.4 方法

抽取入组者入院第二天的清晨空腹静脉血 2 mL,以 EDTA-Na₂ 抗凝,用于基因组 DNA 抽提。存于 -80℃ 冰箱中冻存备用,用于基因提取。DNA 抽提:EDTA 抗凝,采用试剂盒(离心柱型)法从白细胞中抽提基因组 DNA,适量双蒸水溶解,核酸分析仪测定 DNA 浓度, -80℃ 保存。PCR 引物上游引物:5'-CTG AGC CCA GCC GCA CAC TAA C-3',下游引物 5'-CAC TAG CCC AGA GAG AGG AGT GCC-3'。PCR 反应体系为 25 μL:DNA 1 μg,10× 缓冲液 2.5 μL,dNTPs(各 10 mmol/L) 0.5 μL,25 mmol/L 的 MgCl₂ 1 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,Taq 多聚酶 0.25 μL,最后加 ddH₂O 补足至 25 μL。Thermo PX2 型 PCR 仪进行扩增,PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 45 s;64℃ 退火 45 s;72℃ 延伸 45 s,共 28 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。酶切反应:PCR 扩增产物经过纯化后,用 Taq I 内切酶 65℃ 水浴酶切 8 h。酶切体系为 20 μL:Buffer R 2 μL,PCR 产物 8 μg,Taq I 内切酶 1.5 μL,最后加 ddH₂O 补足至 25 μL。产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 统计学方法

用基因计数法计算两组的基因型和等位基因频率;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 *t* 检验。基因型频率分布行 χ^2 检验,行 Hardy-Weinberg 平衡分析。

2 结果

2.1 研究人群的一般特征

易损斑块组与稳定斑块组之间性别、年龄、体质指数、吸烟、饮酒、心脏病史、空腹血糖、甘油三酯、总胆固醇、HDLc、LDLc、脂蛋白(a)、血压等无显著性差异(表 1)。

2.2 CETP TaqIB 基因型

两组研究对象的基因型分布,经卡方检验均符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2 = 3.249$ 和 1.858 ; $P = 0.071$ 和 0.172),表明均来自同一群体。PCR 扩增产物经 Taq I 内切酶酶切后有 3 种表现,产生 361 bp 和 174 bp 2 条带的为 B1B1 基因型,产生 535 bp、361 bp 和 174 bp 3 条带的为 B1B2 基因型,只产生 535 bp 1 条带的为 B2B2 基因型(图 1)。

表 1. 研究对象的一般临床资料比较

Table 1. General clinical data comparison of study objects

项 目	易损斑块组 (n = 135)	稳定斑块组 (n = 158)
男/女(例)	78/57	88/70
年龄(岁)	67.94 ± 10.15	69.88 ± 9.25
BMI(kg/m ²)	23.26 ± 2.83	23.11 ± 2.82
饮酒否/是(例)	82/53	96/62
吸烟否/是(例)	103/32	123/35
心脏病史否/是(例)	127/8	150/8
FBG(mmol/L)	6.21 ± 2.53	6.06 ± 2.34
TG(mmol/l)	1.69 ± 1.16	1.59 ± 1.03
TC(mmol/L)	4.67 ± 1.06	4.78 ± 1.03
HDLc(mmol/L)	1.27 ± 0.27	1.31 ± 0.33
LDLC(mmol/L)	2.95 ± 0.86	2.92 ± 0.86
Lp(a)(mg/L)	234.32 ± 129.64	233.92 ± 159.72
SBP(mmHg)	144.38 ± 23.00	147.11 ± 22.08
DBP(mmHg)	83.96 ± 12.82	84.59 ± 11.59

表 2. 两组间 CETP TaqIB 基因型和等位基因频率的分布(例)

Table 2. CETP TaqIB genotype and allele frequencies distribution in the two groups

分 组	n	B1B1	B1B2	B2B2	B1	B2
易损斑块组	135	76(56.30%)	45(33.33%)	14(10.37%)	197(72.96%)	73(27.04%)
稳定斑块组	158	85(53.80%)	57(36.07%)	16(10.13%)	227(71.84%)	89(28.16%)

3 讨 论

急性脑梗死的发病与颈动脉易损斑块破裂有关,探讨易损斑块遗传易患性的基因标记成为近年来脑血管领域的研究热点^[7,8]。易损斑块是指所有具有破裂倾向,易于发生血栓形成和(或)进展迅速的危险斑块,其内部含有大量脂质,易出血、溃烂等,在 B 超下呈现低回声^[5]。

CETP 是目前已知的唯一具有胆固醇逆向运输过程功能的蛋白质,能介导 HDL 与富含 ApoB 的极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL)、低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)的脂蛋白之间胆固醇酯(CE)与甘油三酯(TG)的交换^[9-11]。CETP 活性增高可以明显地影响血脂代谢,造成 TG 和 LDL、VLDL 水平升高,HDL 水平下降。研究表明 CETP 活性升高具有促动 As 作用^[1],而较低 CETP 具有抗 As 作用。CETP 缺陷或活性降低时导致血浆 HDLC 升高,LDLC 颗粒变大,不易发生 As;而由于 CETP 活性降低时又可导致大颗粒的 HDL 堆积,新生的前体 HDL 降低,从外周细胞摄取 TG 的能力下降,影响胆碱酯酶(ChE)的逆向转运,具致 As 作用^[12]。因此,进一步明确

2.3 两组间 CETP TaqIB 基因型和等位基因频率分布

CETP TaqIB 基因型频率(B1B1、B1B2、B2B2)在易损斑块组中分别为 56.30%、33.33% 和 10.37%,在稳定斑块组分别为 53.80%、36.07% 和 10.13%,两组比较差异无统计学意义。易损斑块组 B1、B2 等位基因频率分别为 72.96% 和 27.04%,稳定斑块组 B1、B2 等位基因频率分别为 71.84% 和 28.16%,两者比较无统计学意义(表 2)。

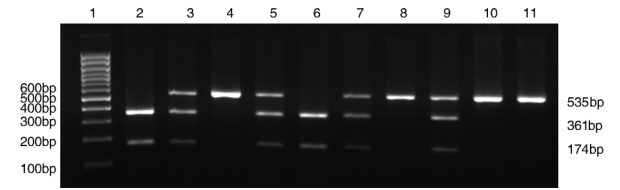


图 1. TaqIB 酶切产物电泳图 1 为 Marker, 2、6 为 B1B1 基因型, 3、5、7 和 9 为 B1B2 基因型, 4、8、10 和 11 为 B2B2 基因型。

Figure 1. TaqIB digestion products by electrophoresis

CETP 是否与颈动脉粥样硬化斑块稳定性有关对脑血管病的发病机制的研究有着一定的价值。

CETP 的活性及转运作用受到遗传学因素及环境因素的影响,而其中 CETP 基因表达对脂质转运活性及体内脂蛋白组成有着决定性作用。CETP 基因含 16 个外显子,约 25 000 个碱基,存在着较多基因多态,其中位于第一内含子 277 号碱基的多态可被 TaqI 内切酶识别,形成 B1 和 B2 等位基因,组合成 B1B1、B1B2 和 B2B2 基因型,其多态性是 HDLC 水平的影响因素,部分或全部 CETP 缺陷的结构基因突变使 HDLC 增高^[3]。等位基因 B1 与血浆 CETP 水平升高及活性增强有密切关联,基因型 B1B1 血浆 CETP 活性最高,B1B2 次之,B2B2 型最低^[3]。另有研究发现 B1B1 型血浆 CETP 活性升高,HDLC 浓度降低,提示等位基因 B1 与低 HDLC 水平相关,与之相反,B2 等位基因的存在伴有明显的 CETP 活性降低^[4]。TaqIB 基因可独立地影响 HDLC 水平、CETP 活性和脂蛋白颗粒大小,B2 等位基因具有抵抗 As 的保护效应。但目前尚无 CETP 及其基因多态性与颈动脉粥样硬化斑块稳定性关系的研究。本研究结果发现,CETP TaqIB 基因型频

率(B1B1、B1B2、B2B2) 在易损斑块组中分别为 56. 30%、33. 33%和 10. 37% ,而在稳定斑块组分别为 53. 80%、36. 07%和 10. 13%。不管是易损斑块组还是稳定斑块组,B1B1 基因型所占比例均最高,B1B2 基因型其次,B2B2 基因型最低,但两组比较差异没有统计学意义。易损斑块组 B1、B2 等位基因频率分别为 72. 96%和 27. 04% ,稳定斑块组 B1、B2 等位基因频率分别为 71. 84%和 28. 16% ,两组比较差异亦没有统计学意义。因此,本研究提示 CETP TaqIB 基因型以及 B1、B2 等位基因与脑梗死患者的颈动脉粥样硬化斑块稳定性均没有明确的关系。

总之,本次研究表明,CETP TaqIB 的各基因型在易损斑块组和稳定斑块组比较差异没有统计学意义。因此,CETP TaqIB 基因多态性与脑梗死患者的颈动脉粥样硬化斑块稳定性没有明确的关系。CETP TaqIB 基因多态性与脑梗死患者 As 的关系有待进一步研究。

[参考文献]

[1] McCaskie PA, Beilby JP, Chapman CM, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene haplotypes, plasma high-density lipoprotein levels and the risk of coronary heart disease [J]. Hum Genet, 2007, 121(3-4): 401-411.

[2] Muendlein A, Saely CH, Marte T, et al. Synergistic effects of the apolipoprotein E epsilon3/epsilon2/epsilon4, the cholesteryl ester transfer protein TaqIB, and the apolipoprotein C3 - 482 C > T polymorphisms on their association with coronary artery disease [J]. Atherosclerosis, 2008, 199(1): 179-186.

[3] Jensen MK, Mukamal KJ, Overvad K, et al. Alcohol consumption, TaqIB polymorphism of cholesteryl ester transfer protein, high-density lipoprotein cholesterol, and risk of coronary heart disease in men and women [J]. Eur Heart

J, 2008, 29(1): 104-112.

[4] Pillois X, Phuong Do Thi N, Reynaud A, et al. TaqIB polymorphism in cholesterol ester transfer protein (CETP) gene predicts future cardiovascular death in patients experiencing an acute coronary syndrome [J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(9): 1 039-046.

[5] Mathiesen EB, Bonna KH, Joakimsen O. Echolcent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis, the tromso study [J]. Circulation, 2001, 103(17): 2 171-175.

[6] 中华神经科学会中华神经外科学会. 各类脑血管病诊断要点 [J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379-380.

[7] Fisher M, Paganini-Hill A, Martin A, et al. Carotid plaque pathology: thrombosis, ulceration, and stoke pathogenesis [J]. Stoke, 2005, 36(5): 253-257.

[8] 王本孝, 许平. 急性脑梗死 OSCP 分型与颈动脉粥样硬化的相关性 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (11): 885-888.

[9] 李俊涛, 李果明, 郭志斌, 等. CETP 基因启动子区多态与他汀类药物调血脂效果的关联分析 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(1): 23-28.

[10] Fielding CJ. Determination and clinical significance of cholesteryl ester transfer protein [M]. Washington DC: AACC press, 2000; 449-507.

[11] Barter PJ, Kastelein JJ. Targeting cholesteryl ester transfer protein for the prevention and management of cardiovascular disease [J]. J Am Coll Cardol, 2006, 47(3): 492-499.

[12] Arca M, Montali A, Ombres D, et al. Lack of association of the common TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with angiographically assessed coronary atherosclerosis [J]. Clin Genet, 2001, 60 (5): 374-380.

(此文编辑 李小玲)