

· 论 著 ·

海南黎族 ApoE 基因多态性与脑梗死的关系*

周正艳^{1,2}, 符喜南³, 苏庆杰^{1△}, 龙登毅⁴, 陈志斌¹, 王 焱¹(1. 海南医学院附属医院, 海口 570102; 2. 贵阳中医学院 550002; 3. 海南省保亭黎族、
苗族自治县人民医院 572300; 4. 海南省干部疗养院, 海口 571100)

摘要:目的 探讨海南黎族载脂蛋白 E(apoE) 基因多态性与脑梗死的关系。方法 利用聚合酶链反应(PCR) 技术扩增 apoE 基因编码 112 位和 158 位氨基酸的片段, 并用限制性片段长度多态性(RFLP) 技术, 对黎族脑梗死患者和健康对照者的 apoE 基因型和等位基因频率进行比较, 同时检测两者不同基因型的总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL) 水平。结果 海南黎族脑梗死患者中 apoE 等位基因 $\epsilon 4$ 占 23.7%, 高于其健康对照组的 6.0%; 而等位基因 $\epsilon 2$ 则占 5.8%, 低于健康对照组的 29.0%, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 脑梗死组 $\epsilon 3/4$ 基因型频率明显高于健康对照组($P < 0.01$)。不同 apoE 基因型之间血脂水平差异也具有统计学意义。结论 $\epsilon 4$ 可能为脑梗死的易感因子, 而 $\epsilon 2$ 则为保护因子, $\epsilon 3/4$ 基因型与脑梗死有关, apoE 基因多态性影响血脂水平。

关键词: 脑梗死; 载脂蛋白 E; 基因多态性; 黎族; 血脂

中图分类号: R743.33

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2822-03

Relationship of apoE gene polymorphism and cerebral infarction in Hainan Li nationality population

ZHOU Zheng-yan^{1,2}, FU Xi-nan³, SU Qing-jie^{1△}, et al.

(1. Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China;

2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

3. People's Hospital of Baoting Li and Miao Autonomous County, Baoting, Hainan 572300, China;

4. Hailan Provincial Sanatorium, Haikou, Hainan 571100, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between apoE gene polymorphism and cerebral infarction in Hainan Li race population. **Methods** The apoE gene containing the gene fragments for encoding 112th and 158th amino acid residues was amplified using polymerase chain reaction (PCR). The apoE genotypes and allele frequencies in the patients with cerebral infarction and control group in Hainan Li nationality population were analyzed using restriction fragment length polymorphism(RFLP) techniques. The total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL), and high density lipoprotein (HDL) levels in various genotypes were tested. **Results** In the patients with cerebral infarction, the frequency of apoE allele $\epsilon 4$ was significantly higher than that of the normal control group (23.7% vs 6.0%, $P < 0.01$), and the frequency of $\epsilon 2$ allele was significantly lower (5.8% vs 29.0%, $P < 0.01$); moreover, the $\epsilon 3/4$ genotype frequency in cerebral infarction group was significantly higher ($P < 0.01$). The lipid levels in various apoE genotypes were significantly different. **Conclusion** The apoE allele $\epsilon 4$ and $\epsilon 2$ might be a susceptible factor and a protective factor for cerebral infarction respectively, and $\epsilon 3/4$ genotype is related with cerebral infarction in Hainan Li nationality population. The apoE gene polymorphisms affect serum lipid levels.

Key words: cerebral infarction; apolipoprotein E; gene polymorphism; li race; blood lipid

脑梗死的病死率和致残率较高, 且存在复发风险, 对人类的健康有很大危害。对其病因及发病机制的研究证实, 脑梗死的发生与遗传和环境因素有密切关系^[1]。动脉硬化是脑梗死的常见病因, 脂质代谢异常是导致动脉硬化发生的重要因素, 载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 基因多态性可导致血脂水平差异并与动脉粥样硬化有关^[2]。关于 apoE 基因多态性与脑梗死的关系尚存在争论^[3]。现以仅存在于海南的最古老少数民族——黎族为研究对象, 采用聚合酶链反应——限制性片段长度多态性技术来检测 apoE 基因多态性, 探讨 apoE 基因多态性与黎族脑梗死及血脂代谢的关系。

1 资料与方法

1.1 脑梗死诊断标准 按照全国第 4 届脑血管病会议修订的诊断标准^[4], 并经头颅 CT 或 MRI 确诊。

1.2 一般资料 (1) 黎族脑梗死组: 2006 年 7 月至 2008 年 5 月海南省保亭和昌江县人民医院住院患者 78 例, 其中男 41 例, 女 37 例, 平均年龄 (64.46 ± 11.38) 岁; (2) 黎族健康对照组: 为同期本省保亭和昌江县人民医院体检者共 74 例, 其中男 40 例, 女 34 例, 平均年龄 (63.57 ± 9.13) 岁, 经体检身体健康, 无高血压、心脏病、肝肾及内分泌疾病等。两组的年龄、性别、体质量指数(BMI) 比较差异无统计学意义。

1.3 研究方法

1.3.1 标本收集 所有患者及健康对照者均取肘静脉血 10mL, 其中一部分血液标本用于血脂测定, 余加入 EDTA-Na 抗凝, -20℃ 保存。所有研究对象采血前 1 周内均未服用降血脂药物。

1.3.2 基因组 DNA 提取 采用低渗溶血、酚/氯仿法抽提外

* 基金项目: 海南省自然科学基金项目(80581)。△ 通讯作者, 电话: 0898-66773195; E-mail: hnsqj123@yahoo.com.cn。

周白细胞基因 DNA。

1.3.3 PCR 扩增 扩增 apoE 基因第 4 外显子包含编码第 112 位和第 158 位氨基酸残基的序列在内,长度为 265bp 的 DNA 片段(图 1)。引物序列按照文献设计^[5],由上海生工生物技术公司合成。序列为 P1(上游引物):5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3'; P2(下游引物):5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3'。PCR 反应体系:总体系 30 μ L,基因组 DNA2 μ L,10 \times Buffer3 μ L,4 \times dNTP2 μ L,上游及下游引物各 1 μ L,TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L,无菌双蒸水 21 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,然后按 94 $^{\circ}$ C 变性 50s,67 $^{\circ}$ C 退火 50s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 50s。共 30 个循环,最后进一步 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,Go1dView 荧光染色检测扩增结果。

1.3.4 酶切产物的检测 限制性内切酶消化反应体系为 10 μ L,10 \times Buffer 1 μ L,PCR 产物 8 μ L,限制性内切酶 HhaI 0.5 μ L,无菌双蒸水 0.5 μ L。置 37 $^{\circ}$ C 消化 6h,取消化产物于 8% 聚丙烯酰胺凝胶中,进行 8V/CM 的垂直电泳后,将电泳凝胶放入含溴化乙锭(0.5 μ L/mL)的 1 \times TBE(Tris 硼酸缓冲液中),染色约 30min 后水洗,以 DNA Marker-B 酶解片段作为 DNA 片段的标准物,紫外灯下观察并照相。经特异性限制内切酶消化后 apoE PCR 产物片段可能出现 6 种片段大小的组合:E2/2 为 91、83、61bp;E3/3 为 91、61、48、35bp;E4/4 为 72、61、48、35bp;E2/3 为 91、83、61、48、35bp;E2/4 为 91、83、72、61、48、35bp;E3/4 为 91、72、61、48、35bp。参考标准物根据长度片段确定待测样品 apoE 基因型(图 2)。

1.3.5 统计学方法 应用 SPSS10.0 软件包进行统计分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间率的比较采用 χ^2 检验,组间数的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

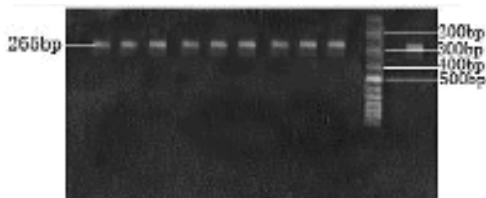


图 1 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳图谱

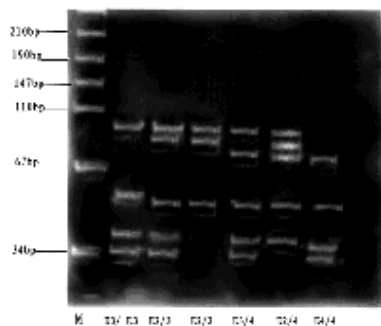


图 2 PCR 产物酶解后 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

2 结 果

2.1 黎族 apoE 基因多态性与脑梗死的关系

2.1.1 黎族脑梗死组与健康对照组基因型频率的比较 $\epsilon 3/3$ 在两组中均为常见基因型,分别占 59.0% 和 58.1%,两组基因频率比较差异无统计学意义($P > 0.05$); $\epsilon 3/4$ 基因型在两组中分别占 16.7% 和 4.0%,两组基因频率比较差异有统计学意义

($P < 0.01$),见表 1。

2.1.2 黎族脑梗死组与健康对照组等位基因频率的比较 两组 $\epsilon 3$ 均为最常见等位基因,经比较 $\epsilon 3$ 等位基因,两组间差异无统计学意义($P > 0.05$); $\epsilon 2$ 等位基因频率脑梗死组(5.8%)明显低于健康对照组(29.0%)($P < 0.01$); $\epsilon 4$ 等位基因频脑梗死组(23.7%),明显高于健康对照组(6.0%)($P < 0.01$),见表 2。

2.2 黎族脑梗死组与健康对照组血脂水平与 apoE 基因多态性的关系 将携带 $\epsilon 2/2$ 和 $\epsilon 2/3$ 基因型者归为 $\epsilon 2$ 型,携带 $\epsilon 3/3$ 基因型者归为 $\epsilon 3$ 型,携带 $\epsilon 2/4$ 、 $\epsilon 3/4$ 和 $\epsilon 4/4$ 基因型者归为 $\epsilon 4$ 型,分别比较两组间血脂水平与 apoE 等位基因型的关系。

2.2.1 黎族健康对照组血脂水平与 apoE 等位基因的关系 在健康对照组中, $\epsilon 2$ 型 22 例, $\epsilon 3$ 型 43 例, $\epsilon 4$ 型 9 例。结果表明 $\epsilon 4$ 等位基因的总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)水平明显高于 $\epsilon 2$ ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),见表 3。

2.2.2 黎族脑梗死组血脂水平与 apoE 等位基因的关系 在脑梗死组中, $\epsilon 2$ 型 5 例, $\epsilon 3$ 型 46 例, $\epsilon 4$ 型 27 例。结果表明 $\epsilon 4$ 组等位基因的 TC、高密度脂蛋白(HDL)水平明显高于 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 组($P < 0.01$),而 HDL 水平明显低于 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 组($P < 0.05$),详见表 4。

表 1 黎族两组 apoE 基因型分布情况比较[n(%)]

组别	n	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
脑梗死组	78	9(5.8)*	110(70.5)	37(23.7)*
健康对照组	74	43(29.0)	96(64.9)	9(6.0)

*:与健康对照组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 黎族两组 apoE 等位基因频率比较[n(%)]

组别	n	$\epsilon 2/2$	$\epsilon 3/3$	$\epsilon 4/4$	$\epsilon 2/3$	$\epsilon 2/4$	$\epsilon 3/4$
脑梗死组	78	0(0.0)	46(59.0)	10(12.8)	5(6.4)	4(5.1)	13(16.7)*
健康对照组	74	15(20.3)	43(58.1)	0(0.0)	7(9.4)	6(8.1)	3(4.0)

*:与健康对照组比较, $P < 0.01$ 。

表 3 黎族健康对照组中不同等位基因的血脂水平比较($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	n	TC	TG	LDL	HDL
$\epsilon 2$ 组	22	3.37 \pm 0.24	1.08 \pm 0.37	2.42 \pm 0.30	1.27 \pm 0.19
$\epsilon 3$ 组	43	3.46 \pm 0.39	1.05 \pm 0.24	2.64 \pm 0.23	1.25 \pm 0.17
$\epsilon 4$ 组	9	4.27 \pm 0.26 Δ	1.12 \pm 0.21	2.71 \pm 0.28*	1.20 \pm 0.16

与 $\epsilon 2$ 组比较,*: $P < 0.05$, Δ : $P < 0.01$ 。

表 4 黎族脑梗死组中不同等位基因的血脂水平比较($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	n	TC	TG	LDL	HDL
$\epsilon 2$ 组	5	5.28 \pm 0.22 Δ	1.83 \pm 0.21	3.02 \pm 0.23 Δ	1.05 \pm 0.29*
$\epsilon 3$ 组	46	5.35 \pm 0.26 Δ	1.76 \pm 0.29	3.10 \pm 0.24 Δ	1.02 \pm 0.24*
$\epsilon 4$ 组	27	6.01 \pm 0.25	1.85 \pm 0.31	3.80 \pm 0.38	0.89 \pm 0.26

与 $\epsilon 4$ 组比较,*: $P < 0.05$, Δ : $P < 0.01$ 。

3 讨 论

脂代谢异常通常被认为是脑血管病的高危因素,而 apoE 在调节脂代谢、维持胆固醇平衡方面起着重要作用^[6]。本研

究结果显示,黎族脑梗死组和健康对照组 apoE 基因型以 $\epsilon 3/3$ 为多,脑梗死组 $\epsilon 3/4$ 基因型、 $\epsilon 4$ 等位基因频率均明显高于健康对照组,提示 $\epsilon 4$ 是黎族脑梗死的一种遗传易感因子, Jin 等^[7] 研究表明 $\epsilon 4$ 作为遗传易感因子在汉族脑梗死中亦然。而与 Cerrato 等^[8] 研究不一致,其认为 apoE 基因中 $\epsilon 4$ 等位基因与脑梗死无明显关系,此结果可能与地域种族差异有关;黎族脑梗死组 $\epsilon 2$ 等位基因频率低于健康对照组,差异有统计学意义,说明 $\epsilon 2$ 具有保护性作用。但目前, $\epsilon 2$ 的作用也有争议,研究认为 $\epsilon 2$ 为保护性因素, $\epsilon 2$ 基因携带者有较低的卒中发病率^[9],但也有研究表明其增加了患脑梗死的危险性^[10]。

黎族 $\epsilon 4$ 等位基因与 TC、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平增高显著相关,其可能机制是:(1)血浆乳糜微粒(CM)残粒、大颗粒极低密度脂蛋白(VLDL)残粒是由 apoE 与肝受体连接,异构体 $\epsilon 4$ 体内代谢速率快,其与受体结合活性高。当 CM 及 VLDL 残粒进入肝细胞增加,被分解为 LDL 的速度增快,导致肝 LDL 受体反馈性下调,通过受体介导的 LDL,肝细胞内吞 LDL 及 LDL 分解速度降低,其结果是血浆 TC、LDL-C 水平增高。(2)人 apoE4 优先与 LDL、VLDL 结合,而 apoE2 和 apoE3 优先结合 HDL,这种与脂蛋白结合的差异是由于 N 端 112 位 Cys-Arg 置换的结果^[11]。(3) $\epsilon 4$ 携带者小肠吸收胆固醇增加^[12]。TC 及 LDL-C 水平增高,容易导致脑梗死的发生,故 $\epsilon 4$ 为脑梗死遗传易感因子。而 $\epsilon 2$ 在脑梗死中起保护性作用可能与 $\epsilon 2$ 等位基因携带者的血 TC 和 LDL-C 水平较低、HDL-C 水平较高有关^[13]。可见 apoE 基因多态性与脑梗死的发生有关,可能通过影响脂质代谢致动脉硬化而最终导致脑梗死。因此,干预 $\epsilon 4$ 表达或有效降血脂治疗可明显减少黎族高脂血症患者脑梗死不良事件的发生。

参考文献:

- [1] 周君,于富敏,李晓霞,等.载脂蛋白 E 基因多态性与脑梗死的关系[J].中国脑血管病杂志,2006,3(6):263.
- [2] Pablos-Méndez A, Mayeux R, Ngai C, et al. Association of apoE polymorphism with plasma lipid levels in a multiethnic elderly population[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997,17(12):3534.
- [3] Sudlow C, Martínez-González NA, Kim J, et al. Does apo-

lipoprotein E genotype influence the risk of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, or subarachnoid hemorrhage systematic review and meta-analyses of 31 studies among 5961 cases and 17 965 controls[J]. Stroke, 2006, 37(2):364.

- [4] 中华神经科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志,1996,29(6):379.
- [5] 王景华,宁宪嘉,卢红艳,等. 脑梗死患者载脂蛋白 E 基因多态性特点研究[J]. 中国综合临床,2006,22(2):118.
- [6] 黄文,谢鹏,董为伟,等. 脂代谢变化在老年人认知功能障碍发病中的作用[J]. 重庆医学,2008,37(16):1782.
- [7] Jin ZQ, Fan YS, Ding J, et al. Association of apolipoprotein E4 polymorphism with cerebral infarction in Chinese Han population[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(3):352.
- [8] Cerrato P, Baima C, Grasso M, et al. Apolipoprotein E polymorphism and stroke subtypes in an Italian cohort [J]. Cerebrovasc Dis, 2005, 20(4):264.
- [9] Ferrucci L, Guralnik JM, Pahor M, et al. Apolipoprotein epsilon 2 allele and risk of stroke in the older population [J]. Stroke, 1997, 28(12):2410.
- [10] Courdec R, Mahieux F, Bailleul S, et al. Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease. A case-control study[J]. Stroke, 1993, 24(5):661.
- [11] Raffai RL, Dong LM, Farese RV Jr, et al. Introduction of human apolipoprotein E4 "domain interaction" into mouse apolipoprotein E[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(20):11587.
- [12] Tammi A, Ronnema T, Rask-Nissila L, et al. Apolipoprotein E phenotype regulates cholesterol absorption in healthy 13-month-old children: The STRIP Study[J]. Pediatr Res, 2001, 50(6):688.
- [13] 肖志杰,赵水平,聂赛,等. 载脂蛋白 E 基因多态性和脑梗死关系的研究[J]. 卒中与神经疾病,2004,11(5):259.

(收稿日期:2009-04-29 修回日期:2009-05-22)

(上接第 2818 页)

肩部(上半身)略抬高,保持气道通畅,有利于呼吸。此外,蝶形凹式枕与蓝光箱内的患儿肌肤接触,增加舒适度,增强安全感,能有效缓解长时间处于蓝光照射环境下出现的烦躁好动、焦虑和哭闹等反应^[5]。

总之,通过应用自制的蝶形凹式枕极大地提高了新生儿,特别是暖箱和蓝光箱中新生儿的护理质量,使得护理过程中常见问题发生率降低,增强了患儿的舒适度。

参考文献:

- [1] 魏菊英,朱玲. 新生儿头皮静脉留置针封管方法探讨[J].

护理学杂志,2005,20(17):68.

- [2] 陈显春,封悦,宋爽,等. 静脉留置针临床应用中的问题与对策[J]. 实用护理杂志,2002,18(1):42.
- [3] 杨新娥,李有莲. 舒适护理在新生儿高胆红素血症蓝光治疗中的应用[J]. 护理研究,2007,21(10):2768.
- [4] 马宁生,欧少玲. 儿科护理学[M]. 上海:同济大学出版社,2007:182.
- [5] 姚俊荣. 蓝光照射治疗新生儿黄疸的护理[J]. 临床和实验医学杂志,2008,7(2):194.

(收稿日期:2009-06-05)