

脑梗死患者载脂蛋白 AI 基因多态性分布的病例对照研究

王绿娅 顾云 吴桂贤 王薇 刘静 刘军 吴兆苏

【摘要】 目的 观察载脂蛋白 AI 基因多态性频率在动脉粥样硬化性脑梗死患者中的分布, 探讨基因型与脑梗死的关系。方法 用聚合酶链反应技术(PCR)检测北京地区 199 例脑梗死患者及 204 例健康人的载脂蛋白 AI 基因启动子(MspI₁, -75 bp)和第一内含子(MspI₂, +83 bp)两个 MspI 酶切位点限制性片段长度多态性(RFLP)。结果 北京地区 403 例受检者中载脂蛋白 AI 基因启动子均以 M1++ 和 M1+- 为主要基因型, 第一内含子大多数为 M2++ 基因型; 脑梗组 M1+- 基因型频率分布明显高于对照组(0.487 vs 0.368, $P < 0.05$, $OR = 1.64$); 脑梗组 M1+-/M2++ 单体型基因型频率显著高于对照组(0.437 vs 0.314, $P < 0.05$, $OR = 1.70$)。结论 ApoAI 基因 5' 端 MspI 位点 M1+- 基因型、M1+-/M2++ 单体型基因型可能与动脉粥样硬化性脑梗死发病有一定的关系。

【关键词】 载脂蛋白 AI; 基因; 脑梗死, 动脉粥样硬化性

A case-control study on the distribution of apolipoprotein AI gene polymorphisms in the survivors of atherosclerosis cerebral infarction WANG Luyi*, GU Yun, WU Guixian, et al. *Department of Atherosclerosis, Beijing Heart Lung and Blood Vessel Medical Institute, Beijing 100029, China

【Abstract】 Objective To investigate the frequency of the restrict fragment length polymorphisms (RFLP) at 2 MspI sites in the 5' end of apolipoprotein AI (ApoAI) gene and its potential interaction to atherosclerotic cerebral infarction (ACI) in Chinese Han population. **Method** Polymerase chain reaction (PCR) technique was used in a sample of 199 cases with documented ACI and 204 healthy matched by age and sex individuals selected from Chinese Han nationality in Beijing. The studied loci include promoter region (-75 bp) and the intron-1 (+83 bp). **Results** (1) Both ACI and control groups M1++ and M1+- were major frequent genotypes in Beijing area. M2++ were major frequent genotypes in intron-1; (2) M1+- genotype appeared more common among patients than in controls (0.487 vs 0.368, $P < 0.05$, $OR = 1.64$); (3) Individuals with M1+-/M2++ haplotype were significantly increased in patients compared with controls (0.437 vs 0.314, $P < 0.05$, $OR = 1.70$). **Conclusion** It is suggested that both M1+- genotype and M1+-/M2++ haplotype of ApoAI gene might associate with ACI in our study.

【Key words】 Apolipoprotein AI (ApoAI); Gene; Atherosclerotic cerebral infarction (ACI)

载脂蛋白 AI(ApoAI)基因是研究动脉粥样硬化的重要候选基因, 近年来发现 ApoAI 基因存在多个限制性酶切位点, 其中 5' 端启动子(-75 bp)和第一内含子(+83 bp)核苷酸突变产生的两个 MspI 多态性位点可影响血清高密度脂蛋白和 ApoAI 水平^[1-3], 或与冠心病的严重程度有关^[4], 但其与脑血管病的关系尚未见报道。我们应用 PCR 技术, 检测北京地区汉族动脉粥样硬化性脑梗死(ACI)患

者的 ApoAI 基因 MspI 两个位点的多态性频率分布, 以期探讨 ApoAI 基因型与脑梗死之间的关系。

材料和方法

一、研究对象与分组

1. 脑梗死(脑梗)组: 为 1996 年 5 月至 1997 年 10 月, 在北京市 MONICA 心血管病监测网回访病人及本院住院患者中选取 199 例临床确诊的脑梗死患者, 诊断符合全国第二届脑血管病诊断标准^[6], 全部病例均经临床及头颅 CT 扫描确诊, 排除脑栓塞、脑出血及影响血脂代谢的肝、肾、内分泌疾病, 年龄 32~64 岁, 其中男 144 例, 女 55 例。

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(7952004)

作者单位: 100029 北京市心肺血管疾病研究所动脉粥样硬化研究室(王绿娅、顾云); 心血管流行病学研究室(吴桂贤、王薇、刘静、刘军、吴兆苏)

2. 正常对照组: 于 1996 年 9~10 月北京市城乡 10 万自然人群危险因素随机抽样调查中, 选取 204 名无血缘关系的健康汉族人, 排除心血管疾病及肝、肾、内分泌疾病, 按性别年龄配对, 年龄 33~64 岁, 其中男性 146 例, 女性 58 例。

二、研究方法

1. 基因组 DNA 的提取: 受检者禁食 12 h, 于清晨采集静脉血加入 2% EDTA 抗凝, 离心收集白细胞-20℃保存, 用低渗溶血法破坏红细胞, 盐析法^[7]提取基因组 DNA。

2. 多聚酶链反应: 特异的 DNA 引物参照文献^[1]合成序列为:

P1: 5'-AGGGACAGAGCTGATCCTTGAAGCTCTTAAG-3'

P2: 5'-TTAGGGACACCTAGCCCTCAGGAAGAGCA-3'

扩增 ApoAI 基因 5' 端 -141 bp ~ +292 bp 片段长度为 433 bp, 包含两个 MspI 多态性位点。PCR 反应体系为: 2.5 mmol/L MgCl₂, 1 μg 基因组 DNA, 1 U Taq DNA 聚合酶, 引物各 1 μmol/L, 200 μmol/L dNTP 和 1× 反应缓冲液, 总体积为 25 μl (以上试剂及引物购于上海生工生物工程公司)。在 PROGENE II 型扩增仪 (英国) 中进行 30 次热循环: 95℃变性 50 s, 55℃退火 1 min, 延伸 2 min。在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 PBR322/MspI 为标准分子量鉴定 PCR 扩增产物。

3. DNA 多态性分析: 取扩增产物 14 μl, 加入 30 U MspI 内切酶 (购于华美生物工程公司), 37℃温育 4 h 终止反应。将全部酶切产物混以样品缓冲液, 在 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 70 V 电压分离酶切片段 6 h, 0.5 μg/ml 溴化乙锭染色 10 min 后在紫外透射仪 (上海天能有限公司) 观察 DNA 带并照相。扩增产物酶解完全可获得 66、113、45 及 209 bp 4 个片段。-75 bp 无切点的 M1- 等位基因特征为 179 bp 片段; 而 -75 bp 有切点的 M1+ 等位基因则产生 113 bp 和 66 bp 两个片段; +83 bp 无切点的 M2- 等位基因特征为 254 bp 片段; +84 bp 有切点的 M2+ 等位基因则显现长度为 209 bp 和 45 bp 两个

片段。在杂合子中几种片段可同时出现。

三、统计学分析

建立数据库, 基因型频率用基因计数法, 各组基因型频率比较及分布是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律用 χ^2 检验, 以上数据采用 SPSS 和 EPI 统计软件分析。

结 果

一、ApoAI 基因 MspI 多态性频率在脑梗组及对照组的分布

北京地区汉族人群 (脑梗组及对照组) ApoAI 基因 MspI₁ 位点多态性以 M1++ 和 M1+- 基因型占优势。脑梗组与对照组比较 M1+- 基因型频率显著增高 (0.487 vs 0.368, $P < 0.05$, $OR = 1.64$), 表明 M1+- 基因型个体发生脑梗死的危险性明显增高 (表 1); MspI₂ (+83 bp) 位点, 脑梗组和对照组均以 M2++ 基因型占绝大多数, 未见 M2-- 基因型, 病例与对照组间频率分布未见明显差异。

人群 ApoAI 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 (脑梗组: MspI₁ $\chi^2 = 2.01$, $df = 2$, $P > 0.05$; MspI₂ $\chi^2 = 1.01$, $df = 2$, $P > 0.05$; 对照组: MspI₁ $\chi^2 = 0.03$, $df = 2$, $P > 0.05$; MspI₂ $\chi^2 = 1.11$, $df = 2$, $P > 0.05$), 表明两组人群样本均来自同一群体。

二、两组间 ApoAI 基因 MspI 位点等位基因频率分布

少见的 M1- 等位基因频率在脑梗组中的分布频率明显高于正常对照组 (0.314 vs 0.248, $P < 0.05$), 见表 2。由于 M1- 等位基因频率主要与 M1+- 和 M1-- 基因型有关, 但 M1-- 基因型在以上两个人群中的分布频率均很低, 故 M1- 等位基因频率主要与 M1+- 基因型有关 (等位基因频率 = 等位基因数 / 染色体总数, 一对等位基因频率之和等于 1)。

病例及对照组少见的 M1- 等位基因频率均显著高于文献报道的欧美白种人 (0.314、0.248 vs

表1 脑梗组与对照组 ApoAI 基因 MspI 位点多态性的分布

组别	例数	男/女例数	MspI ₁ (-75 bp) 基因型频率			MspI ₂ (+83 bp) 基因型频率		
			M1++	M1+-	M1--	M2++	M2+-	M2--
脑梗组	199	144/55	88(0.442) *	97(0.487) **	14(0.071)	173(0.869)	26(0.131)	0
对照组	204	146/58	116(0.569)	75(0.368)	13(0.063)	179(0.877)	25(0.123)	0

* 与对照组比较 $df = 1$, $\chi^2 = 6.44$, $P = 0.011$, $OR = 0.61$; ** 与对照组比较 $df = 1$, $\chi^2 = 5.91$, $P = 0.013$, $OR = 1.64$

0.120, 0.147, 0.157, $P < 0.01$)^[5]。

表2 ApoAI 基因 MspI 位点等位基因频率在两组间的分布

组别	染色体数	MspI ₁ (-75 bp) 等位基因频率		MspI ₂ (+83 bp) 等位基因频率	
		M1+	M1-	M2+	M2-
脑梗组	398	273 (0.686)	125 (0.314) *	372 (0.359)	26 (0.065)
对照组	408	307 (0.752)	101 (0.248)	383 (0.939)	25 (0.061)

* 与对照组比较 $df = 1, \chi^2 = 4.42, P = 0.036, OR = 1.39$

三、脑梗组及对照组之间 ApoAI 基因单体型分布比较

脑梗组 M1++/M2++ 单体型基因型频率显著低于对照组 (0.362 vs 0.500, $P < 0.01$), M1+-/M2++ 单体型频率显著高于对照组 (0.437 vs 0.314, $P < 0.05, OR = 1.70$), 表明 M1+-/M2++ 单体型基因型个体发生脑梗死的危险性明显增高(表3)。

讨 论

ApoAI 基因位于第 11 号染色体长臂。MspI 位点多态性是由于启动子-75 bp 核苷酸鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)置换, 此单点突变破坏 1 个 MspI 内切酶识别位点即产生 M1 等位基因; 第一内含子+83 bp 胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)或+84 bp 鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)置换突变, 破坏另一个 MspI 酶切识别位点, 即产生 M2 等位基因。

不同国家的研究表明, 位于 ApoAI 基因启动子-75 bp 的 MspI₁ 位点的等位基因频率存在种族差异^[5], 本研究中北京汉族人突变型等位基因 M1- 频率显著高于文献报道的欧美白种人 ($P < 0.01$)。然而据我国多省市心血管人群监测研究报道^[10],

在我国虽然血清总胆固醇低于国际平均水平, 但脑梗卒中的发病率却高于国际平均水平。因此, 在脑动脉粥样硬化的形成过程中, 除饮食及生活方式等环境因素的影响外, 遗传变异因素也起一定的作用, 可能影响不同的人种罹患动脉粥样硬化性脑梗死的易感性。

本研究中脑梗组 M1+- 基因型、M1+-/M2++ 单体型基因型频率均显著高于对照组 (0.487 vs 0.368, $P < 0.05, OR = 1.64$; 0.435 vs 0.335, $P < 0.05, OR = 1.70$), 表明 ApoAI 基因 MspI 位点变异与颅内动脉粥样硬化病变形成可能有一定的内在联系, 携带以上基因型个体发生脑梗死的危险性明显增高。我们曾报道 ApoB 基因 XbaI 位点的 X+ 等位基因^[11]、3'VNTR 位点的大等位基因在脑梗死患者中分布频率较高^[12], 表明其它基因变异与脑梗死的易感性也有一定的关系。因此, ApoAI 基因启动子 MspI 位点多态性作为与动脉粥样硬化相关的多种基因变异之一, 可能与多个基因、多种心血管病危险因素相互作用, 共同影响颅内动脉粥样硬化的形成, 但其作用机制有待于进一步的研究。

总之, 北京地区汉族脑梗死患者中载脂蛋白 AI 基因 MspI₁ 位点的 M1+- 基因型、M1+-/M2++ 单体型频率的分布频率增高, 提示: 载脂蛋白 AI 基因 M1+- 基因型和 M1+-/M2++ 单体型可能与动脉粥样硬化性脑梗死发病有一定的关系。因此, 研究基因多态性在不同人群中的分布, 将有助于揭示疾病的遗传本质, 对预防动脉粥样硬化性脑梗死的发生有一定的意义。

(本工作承蒙中国医学科学院基础医学研究所陈保生教授及薛红老师的热情帮助)

表3 脑梗组与对照组之间 ApoAI 基因单体型分布比较

组别	例数	单 体 型 基 因 型					
		M1++/M2++	M1++/M2+-	M1+-/M2++	M1+-/M2+-	M1--/M2++	M1--/M2+-
脑梗组	199	72(0.362) *	16(0.080)	87(0.437) **	10(0.050)	14(0.070)	0
对照组	204	102(0.500)	14(0.069)	64(0.314)	11(0.054)	13(0.064)	0

* 脑梗组与对照组比较, $df = 1, \chi^2 = 7.84, P < 0.01, OR = 0.57$; ** 脑梗组与对照组比较, $df = 1, \chi^2 = 6.55, P < 0.05, OR = 1.70$

参 考 文 献

- 1 XL Wang, R Badenhop, KE Humphrey, et al. New MspI polymorphism at +83 bp of the human apolipoprotein AI gene: Association with increased circulating high density lipoprotein cholesterol levels. Genet Epidemiol, 1996, 13:1-10.
- 2 Philippa JT, Shu Ye, Humphries EH, et al. Polymorphism in the

- promoter region of the apolipoprotein AI gene associated with differences in apolipoprotein AI levels: the European atherosclerosis research study. Genet Epidemiol, 1994, 11:265-280.
- 3 Rigoil L, Rai MG, Di BA, et al. Apolipoprotein AI-C III- AIV genetic polymorphisms and coronary heart disease in type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetol, 1995, 32:251-258.
- 4 Wang XL, Liu RM, Wlicken DEL. Polymorphisms at 5'-end of the apolipoprotein AI gene and severity of coronary artery disease. J

- Clin Invest, 1996, 98:372-377.
- 5 王绿娅, 顾云, 吴桂贤, 等. 北京汉族人群载脂蛋白 A1 基因多态性及对血脂水平关系的研究. 中国病理生理杂志, 1998, 14: 478-483.
 - 6 王新德. 各类脑血管病诊断要点. 中华神经精神科杂志, 1998, 21:60.
 - 7 Gardar Sigurdsson, Vilundur Gudnason, Gunnar Sigurdsson, et al. Interaction between a polymorphism of ApoA-I promoter region and smoking determines plasma level of HDL and ApoA-I. Arteriosclerosis and Thrombosis, 1992, 12:1017-1022.
 - 8 H Paul-Hayase, Rosseneu, D Robinson, et al. Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-C-III gene cluster: detection of genetic variation determining plasma apo AI, apo CIII and apo AIV concentrations. Hum Genet, 1992, 88:439-446.
 - 9 Saha N, Tay JSH, Low PS, et al. Guanidine (G/A) substitution in the promoter region of apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI levels in Chinese non-smokers. Genet Epidemiol, 1994, 11:255-264.
 - 10 吴兆苏, 姚崇华, 赵冬, 等. 中国多省市心血管病人群监测(中国 MONICA 方案)研究结果 I. 发病率死亡率监测结果. 中华心血管病杂志, 1997, 25:6-11.
 - 11 王绿娅, 顾云, 吴桂贤, 等. 载脂蛋白 B 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的关系. 中华医学杂志, 1999, 79:603-606.
 - 12 顾云, 王绿娅, 吴桂贤, 等. 载脂蛋白 B 基因多态性与冠心病及脑梗塞关系的研究. 中华心血管病杂志, 1999, 27:13-16.
- (收稿日期: 1999-04-22)

· 论著摘要 ·

太原地区老年人根面龋齿发病情况调查

赵彬 刘瑛年 范勇斌

根面龋齿(根龋)是指发生在釉牙骨质界下根面的龋坏, 是老年人常见的口腔疾患。为了解太原地区根龋在人群中的流行情况, 于 1995 年对太原地区某工厂 55~70 岁以上离退休职工 400 人的根龋进行调查。

一、材料和方法

1. 对象: 太原市某厂矿 55~70 岁以上离退休职工 400 人, 其中男 210 人, 女 190 人, 共检查牙齿 7 200 颗。

2. 牙龈退缩和根龋诊断标准: 凡看到釉牙骨质界, 龋损在釉牙骨质界上及根面上者, 可以认为已发生牙龈退缩。根龋诊断标准采用世界卫生组织和美国国立牙病研究所(NIDR)推荐的标准。

3. 评分记录方法: 记录姓名、性别、年龄、牙龈退缩牙面数、饮茶嗜好、刷牙次数等。采用 Katz 根龋指数公式〔根面龋指数(RCI) = 根面龋数/牙龈退缩数 × 100〕进行评分。

二、结果

1. 年龄分布情况: 50~岁组 107 人, 55~岁组 125 人, 60~岁组 101 人, 65~岁组 67 人。

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学口腔系(赵彬); 山西医科大学附属第二医院(刘瑛年、范勇斌)

2. 根龋患龋率: 400 人中, 患龋者 274 例, 患龋率 68.50%, 其中男性患龋率为 72.38%, 女性患龋率为 64.21%, 二者之间有差异($\chi^2 = 4.85, P < 0.05$)。男性患龋率高于女性。

3. 各年龄组男女之间 RCI 均值比较: 由表 1 可见, 女性 RCI 值均有大于男性 RCI 值的趋势, 55~岁和 65~岁年龄段的女性 RCI 值明显高于男性($P < 0.05$)。

表 1 各年龄组男女间 RCI 比较

年龄(岁)	$\bar{x} \pm s$		u 值	P 值
	男	女		
50~	4.68 ± 6.06	5.86 ± 8.24	0.83	> 0.05
55~	4.83 ± 7.45	7.82 ± 6.31	2.43	< 0.05
60~	5.45 ± 7.28	4.61 ± 6.43	0.61	> 0.05
65~	6.01 ± 9.12	8.18 ± 8.22	0.99	< 0.05

4. RCI 值与年龄的关系: 由表 1 可见, RCI 随年龄递增而有增高的趋势, 此规律女性不明显, 在 55~岁和 65~岁呈两个峰, 经统计学检验各年龄组之间无明显差异($F_{男} = 0.35, P > 0.05; F_{女} = 3.02, P > 0.05$)。

5. 根龋与刷牙次数及饮茶习惯的关系: 400 人中有饮茶嗜好者 72 人, 大部分为男性, 根龋患龋率 52.78%; 无饮茶嗜好者 328 人, 根龋患龋率 71.95%

($\chi^2 = 10.06, P < 0.01$), 说明有饮茶嗜好者患龋率低。每天不刷牙或刷牙次数为 1 次者 286 人, 根龋患龋率 76.91%; 刷牙次数为 2~3 次者 114 人, 患龋率 47.37% ($\chi^2 = 33.00, P < 0.01$), 说明刷牙次数 2~3 次者患龋率低。

6. 根龋的好发牙位和牙面: 274 例根龋患者中共有根龋 468 颗, 根龋的好发牙位顺序为下颌磨牙(103 颗)、下颌双尖牙(81 颗)、上颌双尖牙(79 颗)、上颌磨牙(57 颗)、下颌尖牙(42 颗)、下颌切牙(38 颗)、上颌尖牙(35 颗)、上颌切牙(33 颗)。好发牙面顺序为颊面(248 颗)、远中邻面(173 颗)、近中邻面(144 颗)、舌腭面(59 颗)。

三、讨论

从本组资料看, 男女根龋患龋率差异有显著性, 男性高于女性。RCI 女性有高于男性的趋势, 特别是 55~岁组和 65~岁组, 女性明显高于男性($P < 0.05$)。前者说明男性患根龋的人数较女性多, 这可能与男性人群有饮茶嗜好等生活习惯有关。后者说明女性一旦患根龋对个体来讲较男性龋坏牙面数要多, 流行程度高, 特别是 55~岁和 65~岁组女性更应作为高危人群看待。

(收稿日期: 1999-10-13)