

载脂蛋白 E/CI 基因簇与冠心病关系的研究

汪春红 周新 周光娣 谭晓东 韩定芬 郑芳 刘芳

【摘要】 目的 探讨载脂蛋白(apo)E、apoCI 基因簇多态性与人群冠心病的关系。方法 采用病例对照研究, apoE 基因多态性检测用 multi-ARMS 快速分型法, apoCI 基因启动子 HpaI 位点多态性采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术, 单倍型频率估计采用 EH 软件包。病例组 186 例, 平均年龄(65.0±10.6)岁; 对照组 350 名, 平均年龄(63.6±8.3)岁。结果 病例组 apoE 基因 E4/3 基因型(26.9%)和 ε4 等位基因型(14.5%)频率显著高于对照组(12.6%, 7.0%), $P < 0.05$ 。apoCI HpaI 位点病例组 H2 等位基因频率及携带 H2 等位基因的基因型频率均显著高于对照组。两基因分布在病例组存在显著的连锁不平衡, $P < 0.01$; 病例组 ε3-H2(16.0%)、ε4-H1(11.6%)和 ε4-H2(3.0%)单倍型频率显著高于对照组(9.4%、6.2%、0.8%); apoE-ε4/apoCI-H2 单倍型对冠心病发病的贡献率为 9.87%。结论 ε4 及 H2 等位基因连锁能显著增加患冠心病的危险性。

【关键词】 冠心病; 载脂蛋白; 基因; 单倍型频率

Genetic association of apoE and apoCI gene polymorphisms with coronary heart disease WANG Chun-hong*, ZHOU Xin, ZHOU Guang-di, TAN Xiao-dong, HAN Ding-fen, ZHENG Fang, LIU Fang. *School of public Health, Wuhan University, Wuhan 430071, China
Corresponding author: ZHOU Xin, Email: zhouxjyk@sina.com

【Abstract】 Objective To study the genetic association of apolipoprotein (apo) E and apoCI gene polymorphisms with coronary heart disease(CHD) in China. **Methods** apoE genotypes were identified by multiplex amplification refractory mutation system(multi-ARMS) and the apoCI promoter polymorphisms were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 186 cases with CHD (age: 65.0±10.5 years) and 350 controls (age: 63.6±8.3 years). The haplotype frequencies were estimated. **Results** The frequencies of apoE E4/3 genotype (26.9%) and ε4 (14.5%) in CHD group were significantly higher than that in the control group (12.6%, 7.0%), $P < 0.05$. The significant difference was also found for the apoCI locus and the CHD group showed higher rate of both for the H2 allele and genotypes, carrying this allele. Estimation of the haplotype frequencies indicated that the association between the apoE-CI haplotype and CHD was significantly strong. The apoE-ε4/apoCI-H2 was estimated to be responsible for 9.86% of CHD. **Conclusion** When the subjects carrying both ε4 and H2 alleles, they would have higher risk of suffering from CHD than controls.

【Key words】 Coronary heart disease; apolipoprotein; Gene; Haplotype frequency

冠心病是多基因疾病,是由多个基因的累加作用和某些环境因子作用所致。许多研究认为载脂蛋白 E(apoE)基因变异对血脂浓度及冠心病(CHD)的危险性有强烈而持续的影响^[1-3]。apoE 基因有 3 个不同等位基因(ε2、ε3、ε4),通过影响血低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平而影响人群冠心病的发生。研究显示 ε2 携带者的血浆总胆固醇(TC)和

LDL-C 浓度较低,而 ε4 携带者则较高,在血管造影证实的冠心病患者中 ε4 等位基因出现的频率较高^[3,4]。apoE 和 apoCI 均为乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)和 LDL-C 的结构成分^[5]。编码这两种蛋白质的基因均位于 19 号染色体 q^{13.2},同编码 apoCII 的基因共同组成 apoE-CI-CII 基因簇,跨度 48 kb^[6]。我们采用病例对照研究方法,通过单倍型频率估计,探讨两基因在冠心病中的遗传联系,为分子流行病学的广泛应用提供资料。

对象与方法

1. 研究对象:为湖北地区汉族人群。病例组

基金项目:湖北省教育厅公关项目资助(2000B03012)

作者单位:430071 武汉大学公共卫生学院(汪春红、谭晓东、韩定芬);武汉大学中南医院基因诊断中心(周新、郑芳、刘芳);湖北省宜昌市葛洲坝中心医院(周光娣)

通讯作者:周新,Email:zhouxjyk@sina.com

186 例(男 110 例、女 76 例), 年龄 41~88 岁, 平均(65.0 ± 10.6)岁, 来自 2002 年 3 月至 2003 年 2 月间武汉大学中南医院就诊病例。CHD 诊断以 1979 年世界卫生组织(WHO)的诊断标准, 并排除糖尿病、肝肾疾病、老年性痴呆等。对照组 350 名(男 185 名、女 165 名), 年龄 40~87 岁, 平均(63.56 ± 8.32)岁, 为同一医院、同一时期既往病史、体检和心电图检查等方法确诊的非心血管疾病病例, 并排除与 CHD 有潜在关系的恶性肿瘤、脑血管疾病等人群。

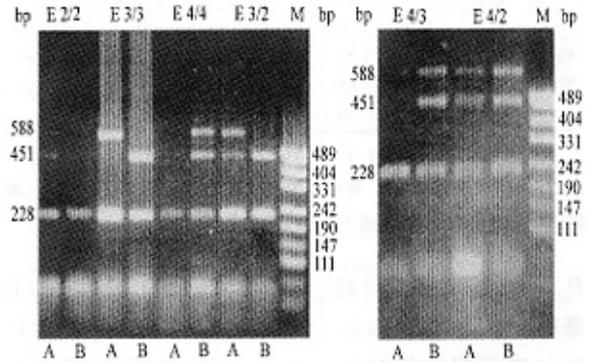
2. 血样本及基因多态性检测: 将 2.0 ml 静脉血置于 EDTA 处理的抗凝试管中, 分离白细胞改良碘化钠法^[7]提取 DNA。apoE 基因采用 multi-ARMS 快速分型法^[8], A、B 双管扩增, 产物片段长度为 588 bp 和/或 451 bp; 为指示两管均扩增成功, 将扩增条件一致的低密度脂蛋白受体(LDL-R)基因第 13 外显子同时扩增作为内标物, 片段长度为 228 bp。apoC1 基因启动子 Hpa I 位点多态性采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)^[9]分析, Hpa I 酶切位点是由于一个 4 bp 的 CGTT 的插入突变引起, 仅呈现于 H2 等位基因, 其 PCR 产物片段长度为 226 bp(无插入突变的纯合子为 222 bp), Hpa I 酶切(BioLabs-inc. New England)产物分别为 160 bp 和 66 bp。所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

3. 统计学分析: 所有资料均以 FoxPro 6.0 软件建库, SPSS 10.0 软件分析。基因频率采用基因计数法计算, 以 χ^2 检验、Fisher's 精确概率等方法进行统计分析; 单倍型频率估计采用 EH 软件^[10,11]。

结 果

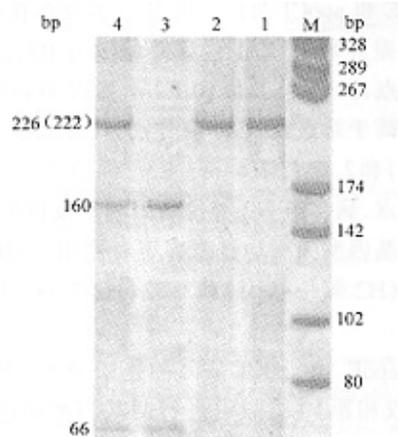
1. apoE、apoC1 基因型和等位基因型频率分布: apoE 基因检测到六种基因型: E2/2、E2/3、E3/3、E2/4、E3/4 和 E4/4, 电泳条带见图 1; apoC1 基因启动子 Hpa I 位点多态性见图 2, 有 H1/1、H1/2 和 H2/2

三种基因型。



M: pUC19/Msp I 分子标记物

图1 apoE 基因型 multi-ARMS 法扩增产物电泳图 (2% 琼脂糖, EB 染色)



1: 未酶切 PCR 产物; 2: H1/1 型; 3: H2/2 型; 4: H1/2 型; M: PGEM-7Zf(+) / Hae III 分子标记物

图2 apoC1 基因启动子 PCR 产物及各基因型酶切片段 (8% 聚丙烯酰胺凝胶, 银染)

病例组和对照组两基因的基因型和等位基因型频率分布见表 1、2, 基因型频率和理论频率差异均无统计学意义, 符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 (apoE: 对照组 $\chi^2 = 2.03, P > 0.05$; 病例组 $\chi^2 = 6.44, P > 0.05$; 病例 + 对照 $\chi^2 = 5.28, P > 0.05$; apoC1: 对照组 $\chi^2 = 0.96, P > 0.05$; 病例组 $\chi^2 = 0.33,$

表1 apoE 基因型和等位基因型频率 (%) 分布

组别	例数	基 因 型*						等位基因型**		
		E2/2	E2/3	E3/3	E2/4	E3/4	E4/4	e2	e3	e4
病例组	186	0(0.0)	25(13.4)	108(58.1)	2(1.1)	50(26.9)	1(0.5)	27(7.3)	291(78.2)	54(14.5)
对照组	350	3(0.9)	43(12.3)	257(73.4)	1(0.3)	44(12.6)	2(0.6)	50(7.1)	601(85.9)	49(7.0)
P 值#		0.2776	0.7021	0.0003	0.2359	<0.0001	0.4451	0.9446	0.0015	<0.0001

* 基因型 $\chi^2 = 21.47, P = 0.0007$; E2/2 + E3/2 vs. E3/3 vs. E4/3 + E4/4 的 $\chi^2 = 17.9335, P = 0.0001$; ** 等位基因型 $\chi^2 = 15.9861, P = 0.0003$; # 两组间同一基因型(等位基因型) χ^2 检验或 Fisher's 检验所得 P 值

表2 apoCI 基因型和等位基因型频率(%)分布

组别	例数	基因型*			等位基因型**	
		H1/1	H1/2	H2/2	H1	H2
病例组	186	119(64.0)	58(31.2)	9(4.8)	296(79.6)	76(20.4)
对照组	350	279(79.7)	65(18.6)	6(1.7)	623(89.0)	77(11.0)
P 值#		<0.0001	0.0009	0.0368		

* 基因型 $\chi^2 = 16.71, P = 0.0002; H1/1 vs. H1/2 + H2/2, \chi^2 = 15.7312, P < 0.001; **$ 等位基因型 $\chi^2 = 17.65, P < 0.0001; \#$ 两组间同一基因型 χ^2 检验或 Fisher's 检验所得 P 值

$P > 0.05$; 病例 + 对照 $\chi^2 = 2.13, P > 0.05$)。apoE 基因: 两组对象均以常见的 E3/3 基因型为主, E2/3、E3/4 基因型也在 10% 以上。apoCI 基因: 以纯合子 H1/1 基因型最常见, 分别为病例组 64.0%, 对照组 79.7%; 其次为杂合子 H1/2 基因型。对比分析显示, apoE 和 apoCI 两位点的基因型分布在病例和对照组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 apoE 基因位点, $\epsilon 4$ 等位基因和 E3/4 基因型频率在病例组显著高于对照组, OR 值分别为 2.28 ($\epsilon 4 vs. \epsilon 3$ 等位基因) 和 2.71 (E3/4 vs. E3/3 纯合子)。在 apoCI 基因位点, 病例组 H2 等位基因频率及携带 H2 等位基因的基因型频率均显著高于对照组。OR 值分别为 2.08 (H2 等位基因) 和 3.52 (H2/2 vs. H1/1 纯合子)。

2. apoE 和 apoCI 基因的连锁分布: 因 apoE 和 apoCI 仅相距 4 kb, 故可进行两基因间的连锁分析。apoE 和 apoCI 基因型的联合分布见表 3, 分析两基因的单倍型频率(表 4), 病例组实际值与理论值间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明两基因分布存在连锁不平衡, 而对照组的差异则无统计学意义 ($P > 0.05$)。进一步分析显示: 病例组 $\epsilon 3$ -H1 基因单倍型频率显著低于对照组, 而 $\epsilon 3$ -H2、 $\epsilon 4$ -H1 和 $\epsilon 4$ -H2 单倍型频率则显著高于对照组 ($P < 0.01$)。

表3 两组对象 apoE 和 apoCI 基因型联合分布

单倍型	病例组					
	E2/2	E2/3	E3/3	E2/4	E3/4	E4/4
H1/1	0	16	84	1	18	0
H1/2	0	9	21	1	26	1
H2/2	0	0	3	0	6	0
单倍型	对照组					
	E2/2	E2/3	E3/3	E2/4	E3/4	E4/4
H1/1	2	32	211	1	32	1
H1/2	0	9	43	0	12	1
H2/2	1	2	3	0	0	0

3. 估计单倍型频率与冠心病的关系: 表 5 表明在 CHD 估计基因频率为 0.001, 杂合子和纯合子外

显率分别为 0.2 和 0.8 的状况下, apoE/CI 单倍型频率与冠心病的关系。结果显示即使在遗传因素作用很小的情况下, apoE/CI 单倍型与冠心病发生有显著性关系。apoE- $\epsilon 4$ /apoCI-H2 与冠心病相关的估计单倍型频率达 0.000 987, 即对冠心病发病的贡献率为 9.87%。

表4 两组对象 apoE 和 apoCI 基因单倍型频率分布

单倍型	病例组*		对照组**		P 值#
	实际值	理论值	实际值	理论值	
$\epsilon 2$ -H1	0.057 752	0.056 343	0.063 571	0.056 532	0.708 0
$\epsilon 2$ -H2	0.014 828	0.016 237	0.007 857	0.014 896	0.284 0
$\epsilon 3$ -H1	0.622 442	0.678 068	0.764 129	0.776 693	<0.000 1
$\epsilon 3$ -H2	0.159 816	0.104 191	0.094 443	0.081 879	0.001 5
$\epsilon 4$ -H1	0.115 505	0.061 288	0.062 300	0.056 775	0.002 3
$\epsilon 4$ -H2	0.029 657	0.083 873	0.007 700	0.013 225	0.005 5

* 病例组: 实际值与理论值比较 $\chi^2 = 25.72, P < 0.01; **$ 对照组: 实际值与理论值比较 $\chi^2 = 4.61, P > 0.05; \#$ 对同一行内单倍型频率实际值进行病例组与对照组间 χ^2 或 Fisher's 检验所得 P 值

表5 apoE/CI 单倍型频率与冠心病的关系

单倍型	理论值	实际值
正常 $\epsilon 2$ -H1	0.061 515	0.056 134
正常 $\epsilon 2$ -H2	0.010 241	0.015 826
正常 $\epsilon 3$ -H1	0.712 617	0.744 801
正常 $\epsilon 3$ -H2	0.118 640	0.089 012
正常 $\epsilon 4$ -H1	0.082 287	0.058 098
正常 $\epsilon 4$ -H2	0.013 699	0.035 129
疾病 $\epsilon 2$ -H1	0.000 062	0.000 003
疾病 $\epsilon 2$ -H2	0.000 010	0.000 003
疾病 $\epsilon 3$ -H1	0.000 713	0.000 004
疾病 $\epsilon 3$ -H2	0.000 119	0.000 000
疾病 $\epsilon 4$ -H1	0.000 082	0.000 003
疾病 $\epsilon 4$ -H2	0.000 014	0.000 987

注: 理论值与实际值比较 $\chi^2 = 32.62, P < 0.01$

讨 论

人类 apoE 有三种等位基因: $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4$, 常见有六种基因型: E2/2、E2/3、E3/3、E2/4、E3/4 和 E4/4^[12]。 $\epsilon 3$ 是 apoE 基因多态性中常见的等位基因, 被认为是“非致病性”的等位基因, 而 $\epsilon 4$ 与冠心病有关^[1-4]。

研究显示冠心病组 E4/3 基因型频率和 $\epsilon 4$ 等位基因频率均显著高于对照组, 与文献报道一致^[3,4]。有趣的是研究同时显示 apoCI 基因多态性也与冠心病密切相关, 病例组 H2 等位基因频率及携带 H2 等位基因的基因型频率均显著高于对照组。且在病例组两基因间存在明显的连锁不平衡, 病例组 $\epsilon 3$ -H1 单倍型频率显著低于对照组, 而 $\epsilon 3$ -H2、 $\epsilon 4$ -H1 和 $\epsilon 4$ -

H2 频率则显著高于对照组; apoE-ε4/apoCI-H2 对冠心病发病的贡献率为 9.87%。

Xu 等^[13]研究发现 apoE/apoCI 多态性还存在种族连锁不平衡, 在欧洲人种中 ε3 主要与 H1 连锁, 而 ε2、ε4 多与 H2 相连。

apoCI 是 VLDL、IDL 和 HDL 的组成成分。Smit 等^[6]认为 apoCI 可通过取代富含甘油三酯 (TG) 乳粒和脂蛋白中的 apoE 而间接干扰脂蛋白的清除。Xu 等^[13]利用 apoCI 启动子报告基因分析显示 4 bp 的 CGTT 插入产生的 Hpa I 位点能引起基因表达的改变, 含 H2 等位基因的启动子活性增高 50%。进一步转基因研究显示 apoCI 超表达主要是抑制肝脂酶的活性而影响 VLDL 残粒的清除^[14], 从而诱导与脂蛋白代谢异常有关的冠心病发生。

综上所述, ε4、H2 等位基因连锁明显增加冠心病发病概率。在人群冠心病防治过程中, 应考虑到这些易感基因的连锁不平衡关系及单倍型与疾病发生的关系, 有条件应检查高危人群基因型, 以便采取相应措施降低冠心病发病风险。

(对美国 Rockefeller 大学遗传统计中心 Jurg Ott 和 ZHAO Jing-huo 的大力帮助, 深表感谢)

参 考 文 献

- 1 Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1988, 8:1-21.
- 2 Xhignesse MS, Lussier CCF, Sing AM, et al. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11:1100-1110.
- 3 Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, et al. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16:1250-1255.
- 4 Cumming AM, Robertson FW. Polymorphism at the apoprotein-E locus in relation to risk of coronary disease. *Clin Genet*, 1984, 25:310-313.
- 5 Windler E, Chao Y, Havel RJ. Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apolipoproteins. *J Biol Chem*, 1980, 255:8303-8307.
- 6 Smit M, van der Kooij-Meijis E, Rune RF, et al. Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19. *Hum Genet*, 1988, 78:90-93.
- 7 Loparev VN, Cantas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell line to identify infectious agents. *J Virol Methods*, 1990, 34:105-106.
- 8 郑芳, 周新, 叶光明, 等. ApoE 基因 multi-ARMS 快速分型法. *基础医学与临床*, 2000, 20:88-90.
- 9 Nillesen WM, Smeets HJM, van Oost BA. Human ApoCI Hpa I restriction site polymorphism revealed by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18:3428.
- 10 Terwilliger J, Ott J. Linkage disequilibrium and disease loci; in: handbook for human genetic linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1994. 199-210.
- 11 Xie X, Ott J. Testing linkage disequilibrium between a disease gene and marker loci. *Am J Hum Genet*, 1993, 53:1107.
- 12 Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E: the complete amino acid sequence. *J Biol Chem*, 1982, 257:4171-4178.
- 13 Xu Y, Berglund L, Ramakrishnan R, et al. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. *J Lipid Research*, 1999, 40:50-58.
- 14 Karin CK, Andre B, Sobel JH, et al. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase. *J Lipid Research*, 2002, 43:21.

(收稿日期:2003-10-28)

(本文编辑:尹廉)

· 消息 ·

《北京大学学报(医学版)》2005 年征订启事

《北京大学学报(医学版)》由北京大学主办, 是国内外公开发行的综合性医药卫生学术期刊, 是中国生物医学核心期刊, 被 MEDLINE、CA 等国内外多家文献检索系统和文摘杂志收录。

本刊为双月刊, 国内外公开发行, 大 16 开本, 每册国内定价 15 元, 全年 90 元, 双月 18 日出版。国内代号: 2-489, 国外代号: BM283。欢迎新老订户向当地邮局订阅。如漏订、增订或向当地邮局订阅有困难者, 可直接向编辑部邮汇书款补订, 平寄免收邮费。汇款时请将收件人详细通讯地址、邮政编码、单位及姓名正楷书写, 以免误投。

编辑部地址: 100083 北京市海淀区学院路 38 号北京大学医学部内《北京大学学报(医学版)》编辑部

电话: 010-82801551 Email: xbbjb2@bjmu.edu.cn 联系人: 贾桂荣 周传敬