

• 论著 •

载脂蛋白(a)基因增强子DHIII多态性与湖南地区汉族人群动脉粥样硬化血栓性脑梗死的相关性

何双英¹,许宏伟²,王爱民¹,谭红¹,唐红宇¹

1. 长沙市第一医院神经医学中心,湖南省长沙市 410005

2. 中南大学湘雅医院老年病科,湖南省长沙市 410008

摘要:目的 研究载脂蛋白(a)基因DHIII增强子-1230A/G多态性与湖南地区汉族人群动脉粥样硬化血栓性脑梗死的关系。方法 应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性技术及DNA序列测定法检测湖南地区汉族人群134例动脉粥样硬化血栓性脑梗死患者、110名健康对照者的载脂蛋白(a)基因DHIII增强子-1230A/G多态,同时用免疫比浊法检测所有研究对象的血浆脂蛋白(a)水平。结果 在动脉粥样硬化血栓性脑梗死组载脂蛋白(a)基因DHIII增强子-1230A/G多态G等位基因频率(0.728)明显高于对照组(0.618; $P=0.01$);GG型频率(0.500)明显高于对照组(0.400; $P<0.05$)。动脉粥样硬化血栓性脑梗死组各基因型血浆脂蛋白(a)水平均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 载脂蛋白(a)基因DHIII增强子-1230A/G多态性可能与中国湖南地区汉族人群动脉粥样硬化血栓性脑梗死有关;G等位基因可能是动脉粥样硬化血栓性脑梗死的危险因素之一。

关键词:载脂蛋白(a)基因;DHIII增强子;-1230A/G;动脉粥样硬化血栓性脑梗死;基因多态性

Association between polymorphism in apolipoprotein (a) gene enhancer (DHIII) and atherothrombotic cerebral infarction in Han population in Hunan Province, China

HE Shuang-Ying, XU Hong-Wei, WANG Ai-Min, TAN Hong, TANG Hong-Yu. Department of Neurological Medical Center, The First Hospital of Changsha, Changsha 410005, China

Corresponding author: XU Hong-Wei, E-mail: xhw_xiangya@sina.com

Abstract: Objective To investigate the association between polymorphism in DHIII enhancer -1230A/G in apolipoprotein (a) gene and atherothrombotic cerebral infarction (ATCI) in Han population in Hunan Province, China. **Methods** The polymorphism in DHIII enhancer -1230A/G in apolipoprotein (a) gene was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing for 134 patients with ATCI and 110 healthy controls. The plasma lipoprotein (a) level was assayed by immunoturbidimetry. **Results** The frequency of G allele in ATCI group (0.728) was significantly higher than that in the control group (0.618) ($P=0.01$), and the frequency of GG genotype in ATCI group (0.500) was also significantly higher than that in the control group (0.400) ($P<0.05$). The plasma lipoprotein (a) level of patients with each genotype in ATCI group was significantly higher than that in controls ($P<0.05$). **Conclusions** Polymorphism in DHIII enhancer -1230A/G in apolipoprotein (a) gene may be associated with ATCI in Han population in Hunan, and G allele may be a risk factor for ATCI.

Key words: apolipoprotein (a) gene; DHIII enhancer; -1230A/G; atherothrombotic cerebral infarction; genetic polymorphism

载脂蛋白(a) [Apolipoprotein (a), Apo(a)]基因的多态性是导致脂蛋白(a) [lipoprotein (a), LP(a)]水平变化的主要原因^[1]。由于Lp(a)与动脉粥样硬化有关的各类疾病有紧密关系^[2],因此,被国

内外学者认为是与其它血脂代谢无关的脑卒中独立危险因素^[3,4]。以动脉粥样硬化性狭窄和斑块不稳定为病理基础的动脉粥样硬化血栓性脑梗死(atherothrombotic cerebral infarction, ATCI)是人群缺

收稿日期:2015-06-28;修回日期:2015-08-20

作者简介:何双英(1977-),女,主治医师,硕士研究生,主要从事脑血管疾病方面的研究。

通讯作者:许宏伟,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事脑血管疾病的研究。E-mail: xhw_xiangya@sina.com。

血性脑卒中的最常见类型,具有高发病率、高死亡率、高致残率和高复发率的特点,严重影响人类生存质量、危害健康^[5]。

2003年 Puckey 等^[6]发现 DH III 增强子-1230G 等位基因能将增强子功能放大 2.5 倍,成为影响 Lp(a) 的因素之一。迄今为止,对载脂蛋白(a) 基因 DH III 增强子-1230A/G 多态性与 ATCI 关系的研究国内外尚未见报道。本文应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性技术及 DNA 序列测定法检测湖南地区汉族 ATCI、正常人群的 Apo(a) 基因 DH III 增强子-1230A/G 多态性,旨在探索 Apo(a) 增强子基因多态性与 ATCI 的关系,为 ATCI 的遗传易感性及其发病机制研究提供科学依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 ATCI 组 共 134 例,其中男 77 例,女 57 例,平均年龄(59.19 ± 10.52)岁。为 2004 年 10 月至 2006 年 12 月湘雅医院神经内科住院病人,祖籍为湖南地区,均为汉族,无血缘关系,符合全国第四届脑血管病学术会议修订的诊断标准,经头颅 CT 和/或 MRI 确诊的动脉粥样硬化血栓性脑梗死,不包括动脉炎、外伤、血液病、药物、肿瘤、脑血管畸形或动脉瘤所引起的脑梗死。排除梗死后出血,出血后梗死、肝肾疾病,自身免疫性疾病,服用雌激素者及妊娠者,半年内有降脂治疗者及确诊为冠心病者。

1.1.2 对照组 中南大学湘雅医院健康体检者共 110 例,祖籍湖南地区,均为汉族,无血缘关系,其中男 56 例,女 54 例,平均年龄 57.27 ± 7.86 岁,排除有冠心病、脑血管病、心脑血管疾病家族史、肝肾疾病、血液病、自身免疫性疾病、妊娠、半年内有降脂治疗者。

1.2 研究方法

1.2.1 人基因组 DNA 样品的制备 抽取研究对象外周静脉血 4 ml,肝素抗凝,利用常规酚/氯仿抽提法提取 DNA。

1.2.2 Apo(a) 基因型检测 扩增 Apo(a) 基因增强子-1230A/G 的引物由 Puckey 等^[6]提供,并用 GCG 软件作 Blast 确定其特异性高,引物序列为:上游为 5'-GCTTGGCTGGGAAAACCTATT-3',下游为 5'-TGTTGGAATACCCAGCCGTG-3'。反应在 PE4800 型 PCR 仪(美国 PE 公司)上进行,反应条件为 94℃ 预变性 10 min,94℃ 变性 30 s,51℃ 退火 30 s,

72℃ 延伸 1 min,32 个循环,最后 72℃ 充分延伸 10 min。RFLP 分析过程:取 8 μl 经 2% 琼脂糖凝胶电泳验证为特异性好的 Apo(a) 增强子-1230A/G PCR 产物,加入 1 μl 限制性内切酶 Bgl II、2 μl 的 10 × Buffer 及 9 μl 的 ddH₂O,配成 20 μl 的反应体系 37℃ 酶切 4 h。然后经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳,用 Eagle Eye II 型凝胶图像分析处理系统观察电泳结果并确定基因型。DNA 测序分析:取酶切结果显示为一条带、二条带、三条带的模版 gDNA 标本各 10 个,PCR 扩增后进行 DNA 正反双向测序,测序结果在 Genebank 和 SNP 的数据库中进行比较分析。

1.2.3 血脂测定 应用氧化酶法测定甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC);测定高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)先用沉淀剂沉淀,再用酶法测定上清液中的胆固醇;低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C),由公式(LDL-C) = (TC) - (HDL-C) - (TG/5) 求出;免疫比浊法测定 Lp(a)。

1.3 统计学方法

所有资料在 Dbase 软件中建立数据库,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。基因型频率和等位基因频率的差异用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。Lp(a) 组间比较用 Mann-Whitney 非参检验;其它计量资料两组比较采用 t 检验,两组以上比较采用方差分析。按 Hardy-Weinberg 平衡法检验样本的群体代表性。

2 结果

2.1 ATCI 组和对照组的一般临床资料

ATCI 组和对照组在年龄、性别、体重指数、吸烟史、饮酒史无显著性差异($P > 0.05$),提示对照组与病例组具有可比性。见表 1。

表 1 ATCI 组和对照组一般临床资料比较

组别	例数 (n)	年龄 (岁)	性别 (男/女)	体重指数 (kg/m ²)	吸烟史 (%)	饮酒史 (%)
ATCI 组	134	59.19 ± 10.52	77/57	23.07 ± 2.18	32.2	13.4
对照组	110	57.27 ± 7.86	56/54	22.66 ± 2.74	27.3	10.1

2.2 Apo(a) 基因 DH III 增强子-1230A/G 多态分析

PCR-RFLP 分析显示 Apo(a) 基因 DH III 增强子-1230A/G 有 3 种不同的基因型,分别为 AA、GG、AG。见图 1、图 2、图 3。

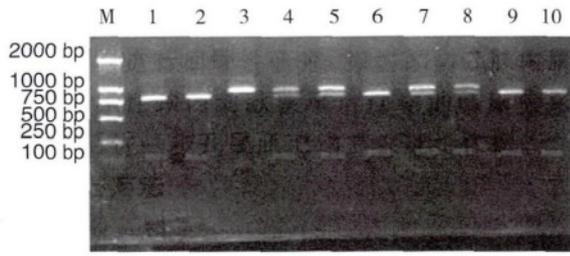


图1 Apo(a) DH III 增强子-1230A/G PCR 产物酶切后电泳图。M: Marker; 3: 纯合子 AA 型; 1、2、6、9、10: 纯合子 GG 型; 4、5、7、8: 杂合子 AG 型。

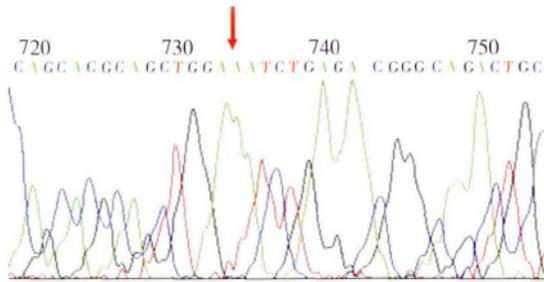


图2 Apo(a) DH III 增强子-1230A 等位基因测序图

2.3 群体平衡检验

对照组及 ATCI 组基因型及等位基因频率分布

表2 ATCI 组和对照组 Apo(a) 基因 DHIII 增强子-1230A/G 同一基因型血脂之间的比较

组别	基因型(例数)	TG(mmol/l)	TC(mmol/l)	HDL-C(mmol/l)	LDL-C(mmol/l)	Lp(a) (mg/l)
ATCI 组	AA(6)	1.55 ± 0.47	4.97 ± 1.02	1.25 ± 0.23	3.01 ± 1.08	138.9(1344.9)*
	GG(67)	1.82 ± 1.21	4.81 ± 1.08	1.22 ± 0.33	2.74 ± 0.87	284.4(1280.8)*
	AG(61)	1.92 ± 1.25	4.56 ± 1.17	1.26 ± 0.51	2.67 ± 0.95	193.6(1186.5)*
对照组	AA(18)	1.89 ± 0.92	5.23 ± 0.66	1.52 ± 0.38	2.48 ± 0.74	49.25(150.4)
	GG(44)	1.54 ± 0.56	5.00 ± 1.06	1.57 ± 0.66	2.36 ± 0.70	53.20(98.3)
	AG(48)	1.24 ± 0.37	5.00 ± 0.87	1.53 ± 0.33	2.32 ± 0.71	52.05(102.7)

注: * 为与对照组相比 $P < 0.05$ 。

2.5 ATCI 组与对照组 Apo(a) 基因 DH III 增强子-1230A/G 多态分布

ATCI 组基因型 AA、GG、AG 的比率分别为 4.5%、50.0%、45.5%; 等位基因 A、G 的频率分别为 27.2% 和 72.8%。对照组基因型 AA、GG、

均符合 Hardy-Weinberg 平衡检验 ($P > 0.05$), 表明来自同一人群达到遗传平衡。

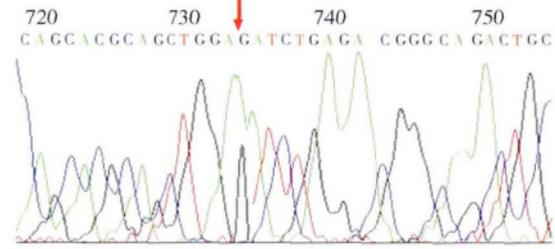


图3 Apo(a) DH III 增强子-1230G 等位基因测序图

2.4 Apo(a) 基因 DH III 增强子-1230A/G 基因型与血脂的关系

ATCI 组各基因亚型血清 Lp(a) 水平均明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而其他血脂指标: TG、TC、HDL-C、LDL-C 在同一基因型的组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。同时比较 ATCI 组不同基因型 Lp(a) 水平, 发现 AA、GG、AG 基因型中虽然以 GG 型 Lp(a) 水平最高, 但在不同基因型间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

AG 的比率分别为 16.4%、40.0%、43.6%; 等位基因 A、G 的频率分别为 38.2% 和 61.8%。ATCI 组与对照组组间比较结果显示, GG 型频率、G 等位基因频率显著高于对照组 ($P = 0.006$, $P = 0.01$, $OR = 1.65$)。见表 3。

表3 ATCI 组和对照组 Apo(a) 基因 DHIII 增强子-1230A/G 基因型频率和等位基因频率比较

组别	例数(n)	基因型[n(%)]			等位基因频率[n(%)]		
		AA	GG	AG	A	G	
ATCI 组	134	6(4.5)	67(50.0)	61(45.5)	73(27.2)	195(72.8)	
对照组	110	18(16.4)	44(40.0)	48(43.6)	84(38.2)	136(61.8)	
	χ^2					6.63	
	P					0.01	

3 讨论

Apo(a) 作为 Lp(a) 的特异性载脂蛋白, 在动脉

粥样硬化与血栓形成中占主要地位^[1], 通过以下几种途径发挥作用: ①作为纤溶酶原同源体的 Apo(a)

竞争有活性的纤溶酶原受体而干扰血凝过程、延长血栓。②Apo(a)与富含脯氨酸或羟脯氨酸的胶原质、弹性蛋白等细胞外基质结合。③Apo(a)通过对纤溶酶原活性及激发的依赖纤溶酶激活的转化生长因子- β 的抑制,刺激人类平滑肌细胞的增殖和迁移,增加氧化脂质作用,从而促使动脉硬化的发展。④在转基因动物模型中Apo(a)能影响血小板功能、促使内皮功能紊乱、抑制残余乳糜微粒的清除^[7]。

目前已确定的影响血浆Lp(a)水平的Apo(a)多态主要有四种^[8],包括Apo(a)kringle IV-2数目可变串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)、位于5'端调控区的五核苷酸TTTTA重复序列(pentanucleotide TTTTA repeats, PNTR)、位于启动子下游93位的G/T突变、位于DH III增强子的-1230A/G突变。低重复数目的Apo(a)Kringel IV VNTR可独立预测卒中、冠心病、进展期动脉粥样硬化等心脑血管疾病^[9]。孙莉等^[10]2000年开始对3642例中国人回顾性病例对照研究发现,Apo(a)PNTR与血浆Lp(a)呈微弱负相关、低重复数目的PNTR片段与脑血栓和脑出血独立相关,可使卒中发病风险提升32%,提示此多态性在中国人部分卒中患者中可能有预测发病的价值。位于Apo(a)上游的DH III增强子-1230位点A→G,可导致Apo(a)基因的转录增加2.5倍,使Lp(a)的水平升高70%^[6]。该位点在人群中的突变率大于20%^[6]。关于该位点的研究,在国外仅见于2003年Puekey等^[6]对362例健康白种高加索人的研究和2006年Zidkova等^[11]对713例脂质障碍的捷克门诊病人的研究。以上两项研究均提示DH III增强子-1230位点A→G影响血浆中Lp(a)水平。

本研究首次把Apo(a)上游DH III增强子的-1230位点A/G多态同以动脉粥样硬化为主要病理基础的ATCI联系起来。研究发现Lp(a)水平在ATCI组显著高于对照组,而两组间的TG、TC、HDL-C、LDL-C均无显著性差异,提示Lp(a)水平升高可能与ATCI的发病有关,这一结论与LP(a)是与其它血脂代谢无关的脑卒中独立危险因素的观点相一致^[3,4]。进一步研究发现,ATCI组与对照组Apo(a)DH III增强子-1230的基因型AA、GG、AG百分比分别为6.6/16.4、50.2/40.0和43.2/43.6;等位基因频率A/G分别为28.2/38.2和71.8/61.8。ATCI组与对照组比较,Apo(a)DH III增强子-1230 A/G基因型分布和等位基因频率

有显著性差异,GG基因型及G等位基因频率在ATCI组明显高于对照组。由此推测Apo(a)DH III增强子-1230 A/G多态性与中国湖南汉族人群ATCI的发病有关,G等位基因可能是其易感基因,其患ATCI的发病风险是A等位基因的1.65倍。

总之,本研究结果提示Apo(a)DH III增强子-1230 A/G多态性与湖南汉族人群ATCI的发病有一定的关联。因此,研究Apo(a)DH III增强子-1230 A/G多态性有助于湖南地区汉族易感人群的筛选,对ATCI的早期防治具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Pati U, Pati N. Lipoprotein(a), Atherosclerosis, and Apolipoprotein(a) Gene Polymorphism. *Mol Genet Metab*, 2000, 71(1-2): 87-92.
- [2] 段朋仓,刘俊艳. 颅内动脉粥样硬化的易感性与相关危险因素. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2014, 41(2): 152-155.
- [3] Sacco RL. Newer risk factors for stroke. *Neurology*, 2001, 57(5 Suppl 2): S31-S34.
- [4] 游咏,杨期东,成志,等. 卒中患者脂蛋白(a)水平及其相关性. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(2): 163-164.
- [5] 姚德斌,万慧. 动脉粥样硬化性脑梗死与侧支循环研究进展. *江西医药*, 2014, 49(9): 926-930.
- [6] Puckey LH, Knight BL. Sequence and functional changes in a putative enhancer region upstream of the Apolipoprotein(a) gene. *Atherosclerosis*, 2003, 166: 119-127.
- [7] Koschinsky ML. Novel insights into Lp(a) physiology and pathogenicity: More questions than answers? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2006, 6(4): 267-278.
- [8] Beneš P. Polymorphisms in the Apolipoprotein(a) Gene, Plasma Lp(a) and Cardiovascular Risk. *Heart Drug*, 2003, 3: 217-224.
- [9] Chiu L, Hamman RF, Kamboh MI. Apolipoprotein A polymorphisms and plasma lipoprotein(a) concentrations in non-Hispanic Whites and Hispanics. *Hum Biol*, 2000, 72(5): 821-835.
- [10] Sun L, Li ZH, Zhang HY, et al. Pentanucleotide TTTTA Repeat Polymorphism of Apolipoprotein(a) Gene and Plasma Lipoprotein(a) Are Associated With Ischemic and Hemorrhagic Stroke in Chinese: A Multicenter Case-Control Study in China. *Stroke*, 2003, 34(7): 1617-1622.
- [11] Zidková K, Kebrdlová V, Zlatohlávek L, et al. Detection of variability in Apo(a) gene transcription regulatory sequences using the DGGE method. *Clin Chim Acta*, 2007, 376(1-2): 77-81.