

·论著·

武汉地区大动脉粥样硬化型缺血性脑卒中患者载脂蛋白E基因多态性分析

韩瑞玲¹, 万自成¹, 孙思¹, 毛晓露², 汪明¹, 李艳¹

作者单位
1. 武汉大学人民医院
院检验科
武汉 430060
2. 武汉市中心医院
检验科
武汉 430000
基金项目
国家自然科学基金
(No. 81501427);
武汉市科学技术局
应用基础研究计划
(No.2015060101
010048)
收稿日期
2018-05-21
通讯作者
汪明
morgan@whu.edu.
cn

摘要 目的:分析武汉地区大动脉粥样硬化型(LAA)缺血性脑卒中患者载脂蛋白E(ApoE)基因多态性的分布。**方法**:选取武汉大学人民医院神经内科治疗的LAA型缺血性脑卒中患者179例和健康对照者104例为研究对象。采用聚合酶链反应(PCR)-荧光探针技术检测卒中组和对照组外周血样本,统计并分析基因型和等位基因频率的差异,分别比较2组不同等位基因组的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)水平。**结果**:2组均以ε3/ε3基因型频率最多。对照组ε3/ε3基因频率高于卒中组($P<0.05$),卒中组ε3/ε4和ε4/ε4分布高于对照组($P<0.05$);卒中组ε4等位基因频率高于对照组($P<0.05$),ε3等位基因频率低于对照组($P<0.05$)。性别对于ApoE基因型的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组ε4型TC、TG、LDL水平均高于ε2型和ε3型($P<0.05$ 或 $P<0.01$);卒中组ε4型TC水平显著高于ε2型和ε3型,LDL水平显著高于ε2型(均 $P<0.01$)。**结论**:武汉地区LAA型缺血性脑卒中患者ApoE的基因多态性分布与性别无关但影响血脂水平,ε4可能为LAA型缺血性脑卒中的易感因子和危险因素之一。

关键词 大动脉粥样硬化型缺血性脑卒中;载脂蛋白E;基因多态性;血脂异常

中图分类号 R741;R741.02;R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.10.002

Analysis of Polymorphism Distribution of ApoE Gene in Large Artery Atherosclerosis-Subtype Ischemic Stroke Patients in Wuhan HAN Rui-ling¹, WAN Zi-cheng¹, SUN Si¹, Mao Xiao-lu², WANG Ming¹, LI Yan¹. 1. Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430010, China

Abstract Objective: To analyze the polymorphism distribution of the Apolipoprotein E (ApoE) gene in large artery atherosclerosis (LAA)-subtype ischemic stroke (IS) patients in Wuhan. **Methods:** One-hundred and seventy-nine patients of LAA-subtype IS and 104 healthy controls were selected from the Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University. The polymerase chain reaction (PCR)-fluorescence probe technique was used to detect peripheral blood samples from the stroke group and the control group. The differences in the ApoE genotypes and the allele frequency were statistically analyzed. The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL), and low density lipoprotein cholesterol (LDL) in the different allele sub-groups were compared between the two groups. **Results:** The frequency of the ε3/ε3 genotype was the highest in both the stroke group and the control group. The ε3/ε3 genotype frequency of the control group was higher than that of the stroke group ($P<0.05$). The distribution of ε3/ε4 and ε4/ε4 genotypes in the stroke group was higher than that in the control group ($P<0.05$). Compared with the control group, the frequency of ε4 allele was significantly increased and that of the ε3 allele was significantly decreased in the stroke group ($P<0.05$). There was no significant difference in the distribution of ApoE genotypes among stroke patients with different genders ($P>0.05$). In the control group, the levels of TC, TG, and LDL of the ε4 phenotype were higher than those of the ε2 and ε3 phenotypes ($P<0.05$ or $P<0.01$). In the stroke group, the level of TC in ε4 phenotype was significantly higher than that in the ε2 and ε3 phenotypes ($P<0.01$), and the level of LDL in the ε4 phenotype was significantly higher than that in the ε2 phenotype ($P<0.01$). **Conclusion:** The polymorphic distribution of ApoE in the LAA-subtype IS in the Wuhan area is independent with sex but does affect the levels of blood lipid; ε4 may be one of the susceptibility factors and risk factors for the LAA-subtype IS.

Key words large artery atherosclerosis ischemic stroke; ApoE; gene polymorphism; dyslipidemia

缺血性脑卒中占有所有脑卒中的65%~80%^[1],其发生与机体血脂代谢异常密切相关,脂质代谢通路相关调控基因多态性是脑卒中的遗传学研究热点^[2]。载脂蛋白E (apolipoprotein E, Apo E)与血脂水平密切相

关,在机体内参与胆固醇和其他血脂运输。ApoE基因多态性导致其编码蛋白的结构与功能异常,与高脂血症、动脉粥样硬化形成及其严重程度密切相关;而动脉粥样硬化是大动脉粥样硬化型 (large artery atherosclero-

sis, LAA)缺血性脑卒中的发病基础^[3,4]。本研究应用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)-荧光探针技术检测本地区LAA型缺血性脑卒中患者ApoE基因多态性,研究其与脑卒中的关系,为此类疾病的早期预防和治疗提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2017年1月至2017年12月在武汉大学人民医院神经内科住院的急性缺血性脑卒中患者179例为卒中组,男85例,女94例,年龄40~83岁,中位年龄为62岁;均经颅脑CT或(和)MRI确诊,均符合急性卒中治疗低分子肝素试验(trial of org 10172 in acute stroke treatment, TOAST)分型^[5,6]标准的LAA型。选择健康体检者104例为对照组,男51例,女53例,年龄37~81岁,中位年龄为60岁。2组所有成员者均为湖北籍汉族人,无血缘关系和异族通婚史,排除其他亚型的缺血性脑卒中(心源性栓塞型、小动脉闭塞型、其他明确病因型和不明原因型)、糖尿病、癌症、冠心病、肝肾及内分泌系统等疾病,排除正在服用降脂药物者。

1.2 主要仪器和试剂

7500实时荧光定量PCR仪购自美国AB公司,台式高速离心机、Naodrop 2000超微量紫外/可见分光光度计购自美国Thermo公司、涡旋振荡器购自江苏海门其林贝尔仪器厂,ADVIA 2400全自动生化分析仪购自德国西门子医疗系统有限公司。血液基因组DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司、人类ApoE基因检测试剂盒购自武汉友芝友医疗科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 血液基因组DNA提取 受试者静脉采集外周血1~2 mL(EDTA抗凝管抽取,4℃保存),按照血液基因组DNA提取试剂盒说明书进行提取和纯化DNA。纯化后血液基因组DNA浓度为5~15 ng/μL, -20℃保存。

1.3.2 PCR反应体系和扩增条件 反应体系:含特异性引物和探针的2种反应液(ApoE 526C>T和ApoE 388T>C)分别23 μL,基因组DNA 2 μL,总体积25 μL。扩增条件:UNG处理37℃ 10 min;预变性95℃ 5 min;变性95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 40个循环。荧光信号的采集:FAM(Apo ε2 526C、Apo ε4 388T)、VIC(Apo ε2 526T、Apo ε4 388C)、ROX(内标)。所有样本检测中ROX通道Ct<38,且扩增曲线有明显指数增长长期则认

为样本有效。

1.3.3 血脂测定 受试者清晨空腹采集肘静脉血2~3 mL于促凝管,3500 r/min离心5 min,于ADVIA 2400全自动生化分析仪检测样本血清中甘油三酯(triglyceride, TG),总胆固醇(total cholesterol, TC),高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)水平。按照ApoE基因的不同功能,将2组各分为3种基因型^[7]:ε2型,包括ε2/ε2、ε2/ε3;ε3型,包括ε2/ε4、ε3/ε3;ε4型,包括ε3/ε4、ε4/ε4。分别比较2组不同基因表型间的血脂水平。

1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件处理数据。计算各组基因型频率及等位基因频率,经计算确认符合Hardy-Weinberg平衡($\chi^2=3.009$, $P=0.413$),说明各等位基因频率分布数据可靠。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用t检验或方差分析;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ApoE基因多态性分布结果

2组中ε3/ε3均为常见基因型,对照组ε3/ε3基因频率高于卒中组($P<0.05$),卒中组ε3/ε4和ε4/ε4分布高于对照组($P<0.05$);卒中组ε4等位基因频率高于对照组($P<0.05$),ε3等位基因频率低于对照组($P<0.05$),见表1。性别对于ApoE基因型的分布差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

2.2 2组不同基因表型患者血脂水平比较

对照组ε4型TC、TG、LDL水平均高于ε2型和ε3型($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见表3。卒中组ε4型TC水平显著高于ε2型和ε3型,LDL水平显著高于ε2型(均 $P<0.01$),见表4。

3 讨论

ApoE基因位于第19号染色体长臂3区,有4个外显子和3个内含子,目前研究认为其基因多态性与血脂异常的发生存在有一定的关联,是高脂血症及动脉粥样硬化性血管病的易感基因之一^[8]。ApoE基因多态性主要涉及2个突变位点(526C>T和388T>C),可形成3种单倍型基因,即Apo ε2(388T-526T)、Apo ε3(388T-526C)、Apo ε4(388C-526C),这3种单倍型基因可组成3种纯合子基因型(ε2/ε2、ε3/ε3和ε4/ε4)和3种杂合子基因型(ε2/ε3、ε3/ε4和ε2/ε4)。ApoE基因多态

表1 各组 ApoE 基因型及等位基因频率分布[例(%)]

组别	例数	ApoE 基因型						等位基因频率		
		ε2/ε2	ε3/ε3	ε4/ε4	ε2/ε3	ε2/ε4	ε3/ε4	ε2	ε3	ε4
对照组	104	1(1.0)	71(68.3)	1(1.0)	19(18.3)	10 (9.6)	2(1.9)	31(14.9)	163(78.4)	14(6.7)
卒中组	179	3(1.7)	92(51.4)	14(7.8)	20(11.2)	34(19.0)	16(8.9)	60(17.8)	234(69.2)	44(13.0)
χ ² 值		0	6.99	4.88	2.22	3.72	4.32	0.56	4.96	4.72
P值		1.000	0.008	0.027	0.136	0.054	0.038	0.454	0.026	0.030

表2 ApoE 基因型在不同性别 LAA 型脑卒中患者中的分布[例(%)]

性别	例数	ε2/ε2	ε3/ε3	ε4/ε4	ε2/ε3	ε2/ε4	ε3/ε4
男	91	2(2.2)	41(45.1)	6(6.6)	12(13.2)	21(23.1)	9(9.9)
女	88	1(1.1)	51(58.0)	8(9.1)	8(9.1)	13(14.8)	7(8.0)
合计		3(1.7)	92(52.0)	14(7.9)	20(9.8)	34(19.2)	16(9.0)
χ ² 值		0	2.49	0.12	0.4	1.5	0.04
P值		1	0.115	0.729	0.527	0.221	0.841

表3 对照组中不同基因表型患者血脂水平比较(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

基因表型	例数	TC	TG	HDL	LDL
ε2 型	20	4.59±1.15 ^①	1.73±0.46 ^②	1.47±0.43	2.07±0.66 ^②
ε3 型	81	4.49±0.85 ^②	1.39±0.58 ^②	1.40±0.54	2.34±0.79 ^①
ε4 型	3	5.69±1.32	2.27±0.42	1.34±0.37	3.05±0.87

注:与ε4 型比较, ^①P<0.05, ^②P<0.01

表4 卒中组中不同基因表型组血脂水平比较(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

基因表型	例数	TC	TG	HDL	LDL
ε2 型	23	4.37±0.82 ^①	1.76±0.77	1.21±0.31	2.09±0.66 ^①
ε3 型	126	5.00±0.69 ^①	1.79±0.75	1.17±0.42	2.81±0.53
ε4 型	30	6.21±0.78	2.28±1.05	1.17±0.31	3.18±0.80

注:与ε4 型比较, ^①P<0.01

性可编码形成含不同氨基酸成分的 ApoE 异构体,主要区别在第 112 位和第 158 位氨基酸:Apo ε3 编码产物为半胱氨酸和精氨酸,Apo ε4 编码产物均为精氨酸,而 Apo ε2 编码产物均为半胱氨酸。这些异构体激活 ApoE 受体的能力不同,导致血脂代谢速度不同,因而多态性携带者动脉硬化程度及缺血性脑卒中的风险不同。ε4 等位基因编码的异构体分解代谢速率较快且更易于与受体结合,使肝内 ApoE 受体摄取更多的 Apo ε4 脂蛋白,增加 TC 含量,同时反馈性地减少肝细胞表面的 LDL 受体,减慢 LDL 分解代谢,升高 LDL 水平,增加动脉粥样硬化斑块形成^[9],因此ε4 成为缺血性脑卒中的危险因素。而ε3 等位基因对缺血性脑卒中起保护性作用可能与降低 TC 和 LDL 水平、增高 HDL 有关^[10,11]。

本研究结果显示,ε3/ε3 基因型在卒中组和对照组均较多,卒中组ε3/ε4、ε4/ε4 等位基因频率高于对照组,提示武汉地区汉族 LAA 型脑卒中患者中ε4 为遗传易感因子,这与海南^[12]、郑州^[13]、沈阳^[14]等地区的报道相似,而桂西壮族人群的研究表明ε4 等位基因与缺血性脑卒中无明显关系^[15]。本研究中卒中组ε3 等位基因频

率低于对照组,说明本地区 LAA 型脑卒中患者中ε3 可能具有保护性作用,这与海南黎族及郑州汉族人群研究中报道的ε2 具有保护作用的结论不一致^[12,13]。这些不一致的原因与研究对象的遗传背景及选择标准不同、研究例数不同等有关,尚需要进行更大样本的深入调查分析。此外,由于脑卒中的病因和发病机制十分复杂,有研究报道 RYR-3 基因^[16]、C5 基因^[17]、PPARG 基因^[18]等基因多态性与 LAA 型脑卒中亦具有一定相关性,这提示下一步应利用多基因多位点的高通量测序技术对脂质代谢途径中多靶点基因进行更全面的分析和研究。

综上所述,ApoE 基因多态性在武汉地区 LAA 型脑卒中患者中分布比较普遍,ε4 可能为本地区 LAA 型脑卒中人群的遗传易感因子之一且与血脂水平相关,这对于临床实践具有重要的指导意义,根据 ApoE 基因型的检测结果可提示受试者血脂水平,对防治动脉粥样硬化等心脑血管疾病、预防 LAA 型脑卒中有一定价值。本研究为单中心小样本研究,要得到确切结论,尚需进一步研究。

研究的结论较为一致。SNP rs6994992 等位基因分布差异有统计学意义,且等位基因 T 的表达也明显高于等位基因 C。考虑到 SNP rs6994992 等位基因分别的差异,可以通过接触抑制性神经递质谷氨酰胺或磷酸腺苷等的释放,进而促进神经元轴突末梢间神经递质的传递,导致神经元同步放电的发生,促进病情的进展。本研究并未发现 SNP rs62510682 基因型和等位基因分布异常,考虑可能与样本量的选择、癫痫多态性问题的地区性差异及检测试剂盒等不统一有关。

综上所述,rs35753505、rs6994992 可通过影响等位基因的多态性表达,可能在促进癫痫的发生发展过程中发挥了一定的作用。但鉴于本次研究的样本量较小,后续研究将增加样本量,采用多中心的临床研究探讨其内在关系。

参考文献

[1] Wu Y, Yang H, Ding X, et al. Association between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and epilepsy susceptibility: A meta-analysis[J]. *Seizure*, 2014, 23: 411-416.
 [2] 解媛媛,肖波. 中国汉族人群 SLC6A11 基因多态性与耐药性癫痫的相关性研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 22: 219-223.
 [3] 江天丽,马烈,徐常清. 左乙拉西坦对癫痫患儿的症状改善效果及免疫调节作用研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2016, 23: 23-24.

[4] 陈娟,王雪丁,周列民,等. 转运体基因多态性对癫痫患者丙戊酸血药浓度及临床疗效的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 24: 215-217.
 [5] Manna I, Gambardella A, Labate A, et al. Polymorphism of the multidrug resistance 1 gene MDR1/ABCB1 C3435T and response to antiepileptic drug treatment in temporal lobe epilepsy[J]. *Seizure*, 2015, 24: 124-126.
 [6] Chen ZH, Wang C, Wang LG, et al. Analysis of the CHRNA7 gene mutation and polymorphism in Southern Han Chinese patients with nocturnal frontal epilepsy[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8: 330-333.
 [7] 王利军,王建平,蒋超,等. GABABR1 基因(G1465A)多态性与脑梗死继发癫痫关联研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 25: 527-529.
 [8] 李艳梅,黄志,吴惧,等. 儿童难治性癫痫的临床特征及与 CYP3A4*1G 的相关性[J]. *重庆医学*, 2013, 22: 263-265.
 [9] 李瑞瑞,盛晓燕,赵侠,等. 新型抗癫痫药物针对儿童个体化治疗的进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34: 2072-2076.
 [10] Manna I, Labate A, Borzi G, et al. An SNP site in pri-miR-124, a brain expressed miRNA gene, no contribution to mesial temporal lobe epilepsy in an Italian sample[J]. *Neurol Sci*, 2016, 37: 1335-1339.
 [11] 朱孔江,李松,徐广振,等. 颞叶内侧癫痫患者颞叶皮层致痫灶中 Nogo-A 信号通路的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 20: 1076-1079.
 [12] 袁红英,张辉,刘卫. 抗癫痫药的相关代谢酶基因多态性研究进展[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2016, 30: 136-138.
 [13] Zhang N, Ouyang T, Zhou Q, et al. Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy: A meta-analysis[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015, 35: 635-639.
 [14] 朱文叶,江沛,李焕德,等. NRG1 基因多态性与部分性癫痫易感性关系的研究[J]. *中南药学*, 2015, 32: 464-468.

(本文编辑:唐颖馨)

(上接第 494 页)

参考文献

[1] Cassella CR, Jagoda A. Ischemic Stroke: Advances in diagnosis and management [J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2017, 35: 911-930.
 [2] Tsigoulis G, Safouris A, Kim DE, et al. Recent Advances in Primary and Secondary Prevention of Atherosclerotic Stroke[J]. *J Stroke*, 2018, 20: 145-166.
 [3] Huebbe P, Rimbach G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 37: 146-161.
 [4] Shafagoj YA, Naffa RG, El-Khateeb MS, et al. APOE Gene polymorphism among Jordanian Alzheimer's patients with relation to lipid profile[J]. *Neurosciences*, 2018, 23: 29-34.
 [5] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48: 246-257.
 [6] Adams HP Jr, Biller J. Classification of subtypes of ischemic stroke: history of the trial of org 10172 in acute stroke treatment classification[J]. *Stroke*, 2015, 46: e114-117.
 [7] Ban C, Zhang Q, Feng J, et al. Low prevalence of lipid metabolism abnormalities in APOE ε2-genotype and male patients 60 years or older with schizophrenia[J]. *BMC Psychiatry*, 2017, 17: 399-403.
 [8] Niimi M, Yang D, Kitajima S, et al. ApoE knockout rabbits: A novel model for the study of human hyperlipidemia[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 245: 187-193.
 [9] Zhao Y, Yang Y, Xing R, et al. Hyperlipidemia induces typical atherosclerosis development in Ldlr and Apoe deficient rats[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 271: 26-35.

[10] Meena K, Misra A, Vikram N, et al. Cholesterol ester transfer protein and apolipoprotein E gene polymorphisms in hyperlipidemic Asian Indians in North India[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 352: 189-196.
 [11] Zeljko HM, Škarić-Jurić T, Narančić NS, al. E2 allele of the apolipoprotein E gene polymorphism is predictive for obesity status in Roma minority population of Croatia[J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 18: 9-10.
 [12] 周正艳,符喜南,苏庆杰,等. 海南黎族 ApoE 基因多态性与脑梗死的关系[J]. *重庆医学*, 2009, 38: 2822-2824.
 [13] 兰翠霞,李惠勉,贾贺,等. ApoE 基因多态性对老年脑梗死患者颅内血管狭窄病理变化的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 12: 2918-2920.
 [14] 李英,唐英琪. 载脂蛋白 E (ApoE) 基因多态性与 2 型糖尿病 (T2DM) 血脂及其脑梗死并发症的关系研究[J]. *中外医疗*, 2014, 31: 37-38, 41.
 [15] 蒙兰青,黄俊芳,简崇东,等. 桂西壮族人群 ACE、ApoE 和 MTFHR 基因多态性与缺血性脑卒中的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2016, 13: 2083-2086.
 [16] 陈颖聪,钱安民,张建军,等. 高血压患者 RYR-3 基因多态性与大动脉粥样硬化性卒中的相关性研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2018, 13: 9-12.
 [17] Wu H, Weng Y, Zheng L, et al. Polymorphism of the complement 5 gene is associated with large artery atherosclerosis stroke in Chinese patients[J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2016, 74: 881-886.
 [18] Wei WM, Wu XY, Li ST, et al. PPARG gene C161T CT/TT associated with lower blood lipid levels and ischemic stroke from large-artery atherosclerosis in a Han population in Guangdong[J]. *Neurol Res*, 2016, 38: 620-624.

(本文编辑:唐颖馨)