

载脂蛋白 E 基因多态性与 2 型糖尿病脑梗死的关系

周 君¹, 薛雅丽², 关亚新¹, 杨印东¹, 傅松滨², 张巾超³

(1. 黑龙江省牡丹江医学院红旗医院神经内科, 牡丹江 157011; 2. 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室, 哈尔滨 150086;
3. 哈尔滨医科大学附属第二医院内分泌科, 哈尔滨 150086)

摘要:为研究载脂蛋白 E (ApoE) 基因多态性与中国东北汉族 2 型糖尿病合并脑梗死的关系, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术, 检测了 208 例个体的 ApoE 基因多态性, 其中对照 (CON) 组 69 例, 2 型糖尿病无大血管病变 (T2DM) 组 67 例和 2 型糖尿病合并脑梗死 (T2DMCI) 组 72 例; 同时测定了其中 70 例 T2DMCI 患者的血脂含量。CON 组等位基因频率为: ϵ_2 9.6%、 ϵ_3 82.4%、 ϵ_4 8.1%, 基因型频率为: $\epsilon_2\epsilon_3$ 13.2%、 $\epsilon_3\epsilon_3$ 67.6%、 $\epsilon_3\epsilon_4$ 16.2%; T2DM 组等位基因频率为: ϵ_2 10.5%、 ϵ_3 84.3%、 ϵ_4 5.2%, 基因型频率为: $\epsilon_2\epsilon_3$ 19.4%、 $\epsilon_3\epsilon_3$ 70.1%、 $\epsilon_3\epsilon_4$ 9%; T2DMCI 组等位基因频率为: ϵ_2 11.8%、 ϵ_3 84.7%、 ϵ_4 3.5%, 基因型频率为: $\epsilon_2\epsilon_3$ 15.2%、 $\epsilon_3\epsilon_3$ 75%、 $\epsilon_3\epsilon_4$ 4.2%。3 组间等位基因和基因型频率的差异经检验无统计学意义。T2DMCI 患者中各基因型之间的血浆总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平亦无显著性差异。在中国东北汉族人群中, 未发现 ApoE 基因多态性与 T2DMCI 之间存在关联, 亦未发现 ApoE 基因多态性与 T2DMCI 患者的 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平之间存在关联。

关键词:载脂蛋白 E; 基因多态性; 2 型糖尿病; 脑梗死

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)01-0035-04

Association Study of Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Cerebral Infarction in Type 2 Diabetic Patients

ZHOU Jun¹, XUE Ya-Li², GUAN Ya-Xin¹, YANG Yin-Dong¹, FU Song-Bin², ZHANG Jin-Chao³

(1. Affiliated Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 2. Department of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 3. Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to explore the association of apolipoprotein E (ApoE) gene polymorphism with cerebral infarction in type 2 diabetic patients of Han nationality in Northeast China, the genotypes of ApoE gene were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in the 208 cases, including 69 cases in control (CON) group, 67 in type 2 diabetes mellitus (T2DM) group and 72 in type 2 diabetes mellitus with cerebral infarction (T2DMCI) group. Plasma lipid content in T2DMCI group was also detected in 70 cases. The distribution of genotypes in ApoE gene, $\epsilon_2\epsilon_3$, $\epsilon_3\epsilon_3$ as well as $\epsilon_3\epsilon_4$ was no significant difference in three groups ($\epsilon_2\epsilon_3$: 13.2%, $\epsilon_3\epsilon_3$: 67.6%, $\epsilon_3\epsilon_4$: 16.2% in CON group; $\epsilon_2\epsilon_3$: 19.4%, $\epsilon_3\epsilon_3$: 70.1%, $\epsilon_3\epsilon_4$: 9% in T2DM group; $\epsilon_2\epsilon_3$: 15.2%, $\epsilon_3\epsilon_3$: 75%, $\epsilon_3\epsilon_4$: 4.2% in T2DMCI group). The allele frequencies of ϵ_2 , ϵ_3 and ϵ_4 were not significantly different in the three groups, either (ϵ_2 : 9.6%, ϵ_3 : 82.4%, ϵ_4 : 8.1% in CON group; ϵ_2 : 10.5%, ϵ_3 : 84.3%, ϵ_4 : 5.2% in T2DM group; ϵ_2 : 11.8%, ϵ_3 : 84.7%, ϵ_4 : 3.5% in T2DMCI group). The levels of total cholesterol (TC), tryglyceride (TG), high

收稿日期: 2004-02-14; 修回日期: 2004-04-08

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助 (D-0357), 黑龙江省卫生厅科研基金资助 (2003-149) [Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. D-0357) and Science Research Foundation of Heilongjiang Province Healthy Department (No. 2003-149)]

作者简介: 周 君 (1959—), 女, 山东人, 神经内科主任医师, 副教授, 现为哈尔滨医科大学在读博士研究生。Tel: 0453-6582800, E-mail: zhoujunrose@163.com

通讯作者: 傅松滨 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 遗传学。Tel: 0451-86674798, E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) were not significantly different among the different genotypes in T2DMCI group. The study confirmed that the polymorphisms of *ApoE* gene were neither associated with the T2DMCI, nor with the levels of plasma lipid in T2DMCI.

Key words: apolipoprotein E; gene polymorphism; type 2 diabetes mellitus; cerebral infarction

2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者脑梗死的发病率明显高于普通人群,其发病后的复发率、致残率和死亡率明显升高^[1],发病机理至今尚未阐明。国外研究^[2]表明,载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)表型调控 T2DM 患者大血管、微血管并发症的危险性。而 *ApoE* 基因多态性与 2 型糖尿病合并脑梗死(T2DM with cerebral infarction, T2DMCI)关系的研究,迄今尚未见国内外报道。我们采用 PCR-RFLP 技术,对此进行了探讨,旨在寻找 T2DMCI 可能的遗传风险因子。

1 材料和方法

1.1 研究对象

受检者共 208 例,全部为无血缘关系的东北地区汉族人群,来自哈尔滨医科大学附属第二医院住院患者或门诊就诊者,均排除 Alzheimer 病和血管性痴呆,共分成 3 组。T2DM 患者 139 例,其诊断和分型依照 1999 年 WHO 制定的标准,其中无大血管病变的 T2DM 患者(T2DM 组)67 例,按照第四届全国脑血管病学术会议拟定的诊断标准,经脑 CT 或 MRI 确诊,合并急性缺血性脑梗死的患者(T2DMCI 组)72 例(病前未用过影响纤溶和凝血方面的药物)。对照(Control, CON)组 69 例,为健康体检和住院患者,经检查均排除糖尿病、冠心病、脑血管疾病,且均无糖尿病家族史。性别、年龄和体重指数在 3 组间比较均无显著性差异($P > 0.05$)。

1.2 实验方法

1.2.1 标本的采集与处理

所有受试者在上午 6~8 时空腹抽取肘静脉血 2.7 mL,注入含枸橼酸钠抗凝的真空管,置 -70 °C 保存。采用酚-氯仿法提取基因组 DNA, -20 °C 保存至分析用。

1.2.2 *ApoE* 基因的 PCR 扩增

以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *ApoE* 基因第 4 外显子片段。反应引物按 Wenham 等^[3]报道设计,由上海 Sangon 公司合成。上游引物序列为:5'-TCCAAGGAGCTGCAGCGGCGCA-3';下游引物序

列为:5'-ACAGAATTGCCCCGGCCTGGTACACT-GCCA-3'。PCR 扩增在 10 μ L 反应体系中进行,其中包括基因组 DNA 1 μ L (10~20 ng/ μ L), 10 \times Buffer 1 μ L, 4 \times dNTP 0.6 μ L (2.5 mmol/L), 引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L), 二甲亚砜 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U。先进行 94 °C 10 s, 68 °C 10 s, 72 °C 30 s 共 4 个循环,再进行 94 °C 10 s, 62 °C 10 s, 72 °C 30 s 共 30 个循环,最后置于 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色检测扩增结果。

1.2.3 限制性内切酶消化

限制性酶切反应在 20 μ L 反应体系中进行,其中包括 PCR 产物 6 μ L, *Hin6I* 内切酶 6 U (10 U/ μ L) 及相应 Buffer 2 μ L。轻轻混匀后置 37 °C 消化过夜。酶切产物经 8% 中性聚丙烯酰胺凝胶电泳, DNA 快速银染, 电泳图谱按文献^[3]的方法鉴定 *ApoE* 基因型。

1.2.4 血脂测定

用 AEROSSET 全自动生化分析仪检测 70 例 T2DMCI 患者的血脂。血浆总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)测定采用氧化酶法,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定采用一步法。

1.3 统计方法

用 χ^2 检验进行等位基因和基因型频率分布的比较,用方差分析进行组间均数的比较,数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 具统计学意义。所有统计学分析均采用 SAS6.0 统计软件系统进行。

2 结果

2.1 2 型糖尿病患者的一般情况

T2DMCI 组除血压、血浆总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇显著高于 T2DM 组、糖化血红蛋白显著低于 T2DM 组外,其他各项指标(病程、空腹血糖、餐后 2h 血糖、TG、HDL-C)在两组之间比较均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 *ApoE* 基因型鉴定

采用本实验的引物可扩增 *ApoE* 基因第 4 外显

子包含编码第 112 位和 158 位氨基酸残基的序列在内,长度为 227 bp 的 DNA 片段。根据 *ApoE* 第 112 位和 158 位氨基酸因碱基替换产生的 *Hin6I* 识别位点(GCGC)的有无,用特异的限制性内切酶 *Hin6I* 消化 *ApoE* 基因 PCR 产物,将产生不同的特异性片段。 ϵ_2 等位基因含 91、81 bp; ϵ_3 等位基因含 91、48 bp; ϵ_4 等位基因含 72、48 bp。根据 3 种等位基因特异性片段的不同,可在电泳图谱上鉴定 *ApoE* 基因不同的基因型(图 1)。

2.3 3 组人群 *ApoE* 等位基因和基因型频率的分布

经 χ^2 检验显示 ϵ_2 、 ϵ_3 和 ϵ_4 等位基因频率在 CON 组、T2DM 组和 T2DMCI 组间分布均无显著性差异; $\epsilon_2\epsilon_3$ 、 $\epsilon_3\epsilon_3$ 和 $\epsilon_3\epsilon_4$ 基因型频率在 3 组间分布亦无显著性差异,3 组人群中 *ApoE* 基因型分布相似,均以 $\epsilon_3\epsilon_3$ 多见,均未见 $\epsilon_4\epsilon_4$ (表 1)。

表 1 3 组人群 *ApoE* 等位基因及基因型频率分布

Table 1 Distribution of genotypes and alleles of *ApoE* gene in three groups

组别 Groups	例数 n	等位基因频率(%) [*] Frequency of alleles (%) [*]			基因型频率(%) ^{**} Frequency of genotypes (%) ^{**}					
		ϵ_2	ϵ_3	ϵ_4	$\epsilon_2\epsilon_2$	$\epsilon_2\epsilon_3$	$\epsilon_2\epsilon_4$	$\epsilon_3\epsilon_3$	$\epsilon_3\epsilon_4$	$\epsilon_4\epsilon_4$
CON	68	9.6 (13)	82.4 (112)	8.1 (11)	2.9 (2)	13.2 (9)	0 (0)	67.6 (46)	16.2 (11)	0 (0)
T2DM	67	10.5 (14)	84.3 (113)	5.2 (7)	0 (0)	19.4 (13)	1.5 (1)	70.1 (47)	9 (6)	0 (0)
T2DMCI	72	11.8 (17)	84.7 (122)	3.5 (5)	2.8 (2)	15.2 (11)	2.8 (2)	75 (54)	4.2 (3)	0 (0)

*: $\chi^2=3.113, P>0.05$; ** : $\epsilon_2\epsilon_3 \chi^2=0.944, \epsilon_3\epsilon_3 \chi^2=0.955, \epsilon_3\epsilon_4 \chi^2=5.84, P>0.05$.

2.4 *ApoE* 基因多态性与 T2DMCI 患者血脂水平的关系

将 T2DMCI 患者中各基因型之间的 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平分别进行比较,经方差分析显示,各基因型间的 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平均无显著性差异(表 2)。

表 2 T2DMCI 组 *ApoE* 基因多态性与血脂水平的关系($\bar{x} \pm s$)mmol/L

Table 2 Relationship between the polymorphisms of *ApoE* gene and plasma lipid in T2DMCI group

基因型 Genotypes	例数 n	Ch	TG	HDL-C	LDL-C
$\epsilon_2\epsilon_2$	2	6.35±0.64	2.23±0.52	0.95±0.11	4.05±0.02
$\epsilon_2\epsilon_3$	9	6.05±1.43	1.91±0.67	0.87±0.11	3.89±0.98
$\epsilon_3\epsilon_3$	54	6.74±1.46	3.01±2.19	1.03±0.25	4.12±0.95
$\epsilon_3\epsilon_4$	3	6.31±1.18	2.55±1.43	1.0±0.25	3.87±0.17
$\epsilon_2\epsilon_4$	2	7.07±2.82	3.29±2.79	1.29±0.78	4.58±1.68

Note: Ch: $F=0.528$, TG: $F=0.645$, HDL-C: $F=1.368$, LDL-C: $F=0.292$; $P>0.05$.

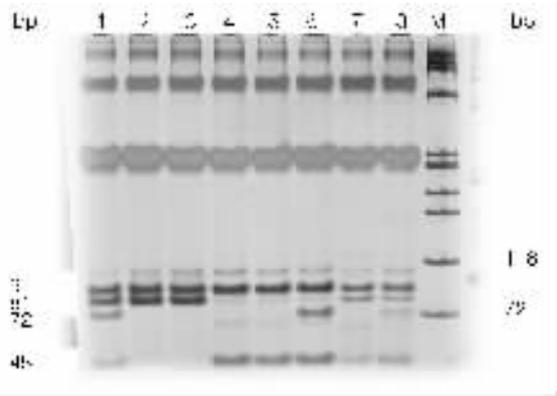


图 1 载脂蛋白 E 基因 PCR-RFLP 电泳结果

1,8 : $\epsilon_2\epsilon_4$; 2,3 : $\epsilon_2\epsilon_2$; 4,5 : $\epsilon_3\epsilon_3$; 6 : $\epsilon_3\epsilon_4$; 7 : $\epsilon_2\epsilon_3$;
M : $\phi \times 174$ Hae III digest 分子量标准。

Fig.1 Electrophoretic result of *ApoE* by PCR-RFLP

1,8 : $\epsilon_2\epsilon_4$; 2,3 : $\epsilon_2\epsilon_2$; 4,5 : $\epsilon_3\epsilon_3$; 6 : $\epsilon_3\epsilon_4$; 7 : $\epsilon_2\epsilon_3$;
M : $\phi \times 174$ Hae III digest marker.

3 讨论

ApoE 基因位于 19 号染色体长臂上(19q13)^[4],其结构基因位点存在多态性。主要有 3 种异构体: ϵ_2 、 ϵ_3 和 ϵ_4 ,分别由 3 个等位基因 ϵ_2 、 ϵ_3 和 ϵ_4 编码^[5],这 3 种等位基因呈共显性表达,在人群中组成了 6 种不同的基因表型,即 $\epsilon_2\epsilon_2$ 、 $\epsilon_3\epsilon_3$ 、 $\epsilon_4\epsilon_4$ 、 $\epsilon_2\epsilon_3$ 、 $\epsilon_2\epsilon_4$ 和 $\epsilon_3\epsilon_4$ 。这种多态性的分子基础源于多态链第 118 位和 112 位单个氨基酸的替换^[6]: ϵ_2 的这两个位置均为半胱氨酸(Cys), ϵ_4 的这两个位置均为精氨酸(Arg),而 ϵ_3 的 112 位是 Cys,158 位是 Arg。国内对汉族人 *ApoE* 等位基因频率的分布作过研究^[7,8],结果显示等位基因 ϵ_3 的频率最高, ϵ_2 和 ϵ_4 相对较少,与本研究结果一致。 ϵ_3 被认为是“野生基因”, ϵ_2 和 ϵ_4 是由它变异得来。

近年来对缺血性脑血管病的 *ApoE* 基因多态性的研究日趋增多,但结果不一。有研究认为 ϵ_4 等位

基因是缺血性脑血管病发作的易感因子^[9],但是,也有研究并未发现 ApoE 基因多态性与缺血性脑血管病相关^[10]。类似的不一致的结论也引起国内学者的进一步研究^[11,12]。本研究以东北地区汉族人群为背景,未发现 $\epsilon_2\epsilon_3$ 、 $\epsilon_3\epsilon_3$ 和 $\epsilon_3\epsilon_4$ 基因型在 CON 组、T2DM 组和 T2DMCI 组间有显著性差异;亦未发现等位基因 ϵ_2 、 ϵ_3 和 ϵ_4 在 3 组间有显著性差异。提示 ApoE 基因多态性与 T2DMCI 之间并无直接的相关关系。也显示了 T2DMCI 致病因素的复杂性,可能是由于 T2DMCI 的危险因子是多元的所致。

近年的研究表明糖尿病与缺血性卒中相关而与出血性卒中无关^[1]。高浓度的胆固醇主要增加缺血性卒中的危险性^[13]。与该结论一致,本实验中 T2DMCI 组的 TC 和 LDL-C 水平明显高于 T2DM 组,两组间有显著性差异。提示 T2DMCI 与 TC 和 LDL-C 升高有关联。

大多数学者认为, ϵ_2 等位基因降低 TC 和 LDL-C 水平, ϵ_4 等位基因升高 TC 和 LDL-C 水平^[14]。我们进一步探讨了 ApoE 基因型对血脂水平的影响与 T2DMCI 之间的关系,结果未发现 T2DMCI 患者中 ApoE 各基因型与 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平之间存在相关关系。本研究的无相关性可能是 $\epsilon_2\epsilon_2$ 、 $\epsilon_3\epsilon_4$ 、 $\epsilon_2\epsilon_4$ 基因型例数太少引起的,也可能还存在其他原因,有必要进行深入研究。

参考文献(References):

- [1] Mankovsky B N, Metzger B E, Molitch M E, Biller J. Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Complications*, 1996, 10 (4): 228 ~ 242.
- [2] Ukkola O, Kervinen K, Salmela P I, von Dickhoff K, Laakso M, Kesaneemi Y A. Apolipoprotein E phenotype is related to macro and microangiopathy in patients with no-insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 1993, 101(1): 9 ~ 15.
- [3] Wenham P R, Price W H, Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet*, 1991, 337 (8750): 1158 ~ 1159.
- [4] Paik Y K, Chang D J, Reardon C A, Davies G E, Mahley R W, Taylor J M. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(10): 3445 ~ 3449.
- [5] Zannis V I, Breslow J I. Human very low density lipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and post-translation modification. *Biochemistry*, 1981, 20(4): 1033 ~ 1041.
- [6] Rall S C Jr, Weisgraber K H, Mahley R W. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *Biol Chem*, 1982, 257 (8): 4171 ~ 4178.
- [7] GUO Yang, GUO Jin-Jin, NAO Jian-Fei, WANG Fu-Wei. The relations between polymorphism of apolipoprotein E gene and atherosclerotic cerebral infarction. *Chin J Neurol*, 1997, 30 (4): 236 ~ 239.
郭 阳,郭津津,佺剑飞,王富伟.载脂蛋白 E 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的关系. *中华神经科杂志*, 1997, 30 (4): 236 ~ 239.
- [8] CHEN Feng, XUE Ya-Li, HUANG Cheng-Bin, DONG Lan, FU Song-Bin, ZHANG Gui-Yin, LI Pu. Distribution of apoE polymorphism in four Chinese national populations. *Acta Anthropologica Sinica*, 1999, 18 (4): 311 ~ 315.
陈 峰,薛雅丽,黄承滨,董 澜,傅松滨,张贵寅,李 璞.载脂蛋白 E 基因多态性在中国 4 个民族中的分布. *人类学学报*, 1999, 18 (4): 311 ~ 315.
- [9] McCarron M O, DeLong D, Alberts M J. APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis. *Neurology*, 1999, 53 (6): 1308 ~ 1311.
- [10] McCarron M O, Muir K W, Nicoll J A, Stewart J, Currie Y, Brown K, Bone I. Prospective study of apolipoprotein E genotype and functional outcome following ischemic stroke. *Arch Neurol*, 2000, 57 (10): 1480 ~ 1484.
- [11] WANG Tong-Ge, HE Zhen-Yu, LI Yue-Qin, LIU Fei-Peng, HUANG Shun-Shao, ZHOU Tian-Hong. The relationship between apolipoprotein E gene polymorphism and atherosclerotic cerebral infarction. *Hereditas (Beijing)*, 2000, 22(1): 4 ~ 6.
王彤歌,何震宇,李月琴,刘飞鹏,黄舜韶,周天鸿.载脂蛋白 E 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗塞关系的研究. *遗传*, 2000, 22(1): 4 ~ 6.
- [12] SHEN Li-Hua, KE Kai-Fu, LI Zuo-Han, PAN Min. Analysis of the relationship between polymorphism of apolipoprotein E gene and cerebral infarction. *Apoplexy and Nervous Diseases*, 2003, 20 (5): 445 ~ 447.
沈丽华,柯开富,李作汉,潘 闽.载脂蛋白 E 基因多态性与脑梗死的相关性分析. *中风与神经疾病杂志*, 2003, 20(5): 445 ~ 447.
- [13] Lindenstrom E, Boysen G, Nyboe J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study. *BMJ*, 1994, 309(6946): 11 ~ 15.
- [14] HU Xue-Fang, ZHANG Xi-Ran, XUE An, CAO Xiang-Rong. Association between apolipoprotein E gene polymorphism and the patients with persistent vegetative state in the Chinese. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(9): 757 ~ 760.
胡学芳,张锡然,薛 安,曹祥荣.载脂蛋白 E 基因多态性与持续性植物状态的关系及其意义. *遗传学报*, 2002, 29(9): 757 ~ 760.