

## 广州市40~65岁居民载脂蛋白E基因多态性与血脂水平的关系

孙丽娜, 张波, 许颖, 周晓星, 黄莉莉, 卓淑雨, 苏宜香  
(中山大学公共卫生学院/预防医学研究所营养系, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)基因多态性与广州市中老年人群血脂水平的关系, 以为进一步研究提供基础和线索。【方法】采用等位基因特异性多重聚合酶链反应(ARMS-PCR)技术对624名40~65岁广州居民进行ApoE基因多态性检测, 分析人群ApoE基因频率分布特点, 并比较分析不同ApoE基因型血脂水平的关系。【结果】共检出6种基因型, 以E3/3型最为常见, 占67.95%, 其次是E2/3和E3/4, 分别占14.74%和13.62%, E2/4、E4/4和E2/2三种基因型分别占1.76%、1.12%和0.80%; 等位基因以 $\epsilon_3$ 分布频率最高, 为82.13%,  $\epsilon_2$ 、 $\epsilon_4$ 等位基因频率分别为9.05%和8.81%; 男性和女性ApoE基因型分布无差异。 $\epsilon_2$ 等位基因携带者的TC、LDL、ApoB和LDL-C/HDL-C水平显著低于 $\epsilon_3$ 和 $\epsilon_4$ 等位基因携带者(all  $P < 0.05$ ), 而ApoA1/ApoB则显著高于 $\epsilon_3$ 、 $\epsilon_4$ 等位基因携带者( $P < 0.01$ )。【结论】 $\epsilon_2$ 等位基因携带者的血浆TC、LDL及ApoB水平较低,  $\epsilon_2$ 等位基因有利于个体血脂维持在较理想水平。

**关键词:**载脂蛋白E; 基因多态性; 血脂

中图分类号: R589.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)02-0181-05

### Relationship between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Serum Lipids in Guangzhou Residents Aged 40-65

SUN Li-na, ZHANG Bo, XU Ying, ZHOU Xiao-xing, HUANG Li-li, ZHUO Shu-yu, SU Yi-xiang  
(Faculty of Nutrition, School of Public Health, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the relationship between apolipoprotein E (ApoE) gene polymorphism and serum lipids in Guangzhou residents (aged 40-65). 【Method】 The ApoE gene polymorphism of 624 subjects was determined by the method of amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (ARMS-PCR). The frequency distributions of ApoE gene and the relationship between ApoE gene polymorphism and serum lipids were also analyzed. 【Result】 Six genotypes were detected. E3/3 was the major genotype, accounting for 67.95%; followed by E2/3 and E3/4, accounting for 14.74% and 13.62%, respectively; E2/4, E4/4, and E2/2 accounted for 1.76%, 1.12%, and 0.80%, respectively. And the frequency of allele  $\epsilon_3$  was the highest, accounting for 82.13%;  $\epsilon_2$  and  $\epsilon_4$  accounted for 9.05% and 8.81%, respectively. There was no significant difference in the distribution of ApoE genotypes between men and women. Subjects with  $\epsilon_2$  had a significantly lower level of TC, LDL, ApoB, the ratio of LDL : HDL than those with  $\epsilon_3$  and  $\epsilon_4$  (all  $P < 0.05$ ), while the ratio of ApoA1 : ApoB of  $\epsilon_2$  group was apparently higher than  $\epsilon_3$  group and  $\epsilon_4$  group ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】 Subjects with allele  $\epsilon_2$  had a better lipid profile with a lower level of plasma TC, LDL, and ApoB.

**Key words:** apolipoproteins E; gene polymorphism; serum lipids

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(2):181-185]

载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)在脂代谢过程中起着主要作用, 是高密度脂蛋白(high

density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和中间密度脂蛋白

收稿日期: 2007-09-05

基金项目: 2006年中国营养学会营养科研基金(200610)

作者简介: 孙丽娜(1983-), 女, 河南漯河人, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学; 苏宜香, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: suyx@mail.sysu.edu.cn

(intermediated density lipoprotein, IDL)的结构和功能成分,同时作为 LDL 受体的配体,调节极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)残粒、乳糜微粒、HDL 和 LDL 吸收,并且参与细胞内胆固醇外溢及胆固醇逆向转运等过程。ApoE 基因位于第 19 号染色体长臂,全长 3.7 kb,含 4 个外显子,有  $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$  三种主要的等位基因,分别编码 ApoE1、ApoE2 和 ApoE3 三种异构体,在人群中表现出 6 种基因型: E2/2、E2/3、E2/4、E3/3、E3/4 和 E4/4,对血脂水平有重要影响<sup>[1]</sup>。2004 年 10 月国务院新闻办公室公布的全国营养调查结果显示,广东省城市居民的血脂异常患病率已达到了 20.8%,超过全国平均水平 18.6%<sup>[2]</sup>。而广东城市居民血脂水平与其 ApoE 基因多态性关系的大样本人群研究较少,故本研究运用 ARMS-PCR 技术,检测广州市 40~65 岁中老年人 ApoE 基因多态性及其血脂水平,以探讨广州市血脂异常易感人群 ApoE 基因多态性与其血脂水平的关系,为心血管疾病的早期预防提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

2005 年 12 月至 2006 年 4 月期间,在参加体检的 40~65 岁广州市本地居民中,排除肝、肾功能异常者、糖尿病患者或糖耐量异常者、肥胖者(BMI > 29)及服用降脂药物或其它影响血脂代谢的药物者后,筛选出 624 例研究对象(男 215 例、女 409 例),平均年龄 53.7(S=5.7)岁,均为汉族。

### 1.2 问卷调查

使用统一的调查问卷,以面对面询问的形式对研究对象进行问卷调查。用背景资料调查表调查研究对象的性别、年龄、学历、职业、经济状况、家族疾病史和烟酒嗜好等;用食物摄入频数问卷调查研究对象既往膳食摄入情况等。

### 1.3 体格测量

测量研究对象身高、体质量、腰围、臀围、血压及皮褶厚度,并计算体质指数(BMI)和腰臀比率(WHR)。

### 1.4 标本采集

所有研究对象均空腹 12~14 h 后静脉采血 5 mL,用于生化指标检测;同时,静脉采枸橼酸钠抗凝血 2 mL,用于检测 ApoE 基因多态性。

### 1.5 生化指标检测

用西班牙 BIOSYSTEMS 全自动生化分析仪测定血清总胆固醇 TC(酶比色法, CHOD-PAP)、甘油三酯 TG(酶比色法, GPO-PAP)、LDL(清除法)、HDL(清除法)、载脂蛋白 A1(ApoA1)及载脂蛋白 B(ApoB)(免疫比浊法)。所用试剂盒均购于中生北控生物科技公司。

### 1.6 基因组 DNA 的提取

采用北京天根生化科技有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒,提取所有研究对象的全血基因组 DNA。用 Eppendorf 蛋白核酸测定仪测定所提取 DNA 的浓度和纯度,并用 1%琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 鉴定。所有 DNA 样品均保存于 -80 °C 冰箱备用。

### 1.7 ApoE 基因多态性的检测

1.7.1 引物设计 参照文献<sup>[3]</sup>方法,用 ARMS-PCR 方法检测 ApoE 基因多态性。设计上游引物序列(由宝生物工程大连有限公司合成): P1, 5'-cgcgacatggaggacgttt-3', P2, 5'-cgcgacatggaggacgttc-3', 分别检测 ApoE112 位的半胱氨酸(Cys)和精氨酸(Arg); P3, 5'-atgccgatgacctgcagaatt-3', P4, 5'-atgccgatgacctgcagaatc-3', 分别检测 ApoE158 位的 Cys 和 Arg; 设计公共下游引物为 P5, 5'-gttcagtattgtcgctggca-3'; 引物 P1 与 P5、P2 与 P5 扩增出的片段为 588 bp, P3 与 P5、P4 与 P5 扩增出的片段为 451 bp。另按照 Newton 等<sup>[4]</sup>方法,设计一对引物扩增  $\alpha$ -抗胰蛋白酶(AAT)基因外显子 3 片段(360 bp),作为内参照。序列: P6, 5'-cccacttcccctctctccaggcatggg-3', P7, 5'-gggcctcagtc ccaacatggctaagaggtg-3'。

1.7.2 PCR 反应体系 总反应体系为 25  $\mu$ L, 每个样本设计 1、2、3、4 四管。各管均加入 10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L、10  $\times$  PCR Buffer (不含  $Mg^{2+}$ ) 0.6  $\mu$ L、10  $\times$  PCR Buffer (含 20 mmol/L  $Mg^{2+}$ ) 1.9  $\mu$ L、Taq DNA 聚合酶 2 U、1.10 g/mL 二甲基亚砜(DMSO) 2  $\mu$ L、公共引物 P5 2  $\mu$ L、内参 P6 和 P7 各 0.5  $\mu$ L, 每个样本 DNA 的 1、2、3、4 管分别加入引物 P1、P2、P3、P4 各 2  $\mu$ L(各引物初始浓度均为 10  $\mu$ mol/L) 及模板 3  $\mu$ L, 最后加水至终体积 25  $\mu$ L。

1.7.3 PCR 反应条件 95 °C 预变性 4 min, 然后按 96 °C 变性 45 s、62 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 45 s, 循环 30 次, 最后 72 °C 延伸 5 min。取 8  $\mu$ L

PCR产物,用浓度为2%的琼脂糖凝胶进行电泳后EB染色、凝胶成像系统进行图像分析,确定ApoE基因型。电泳条件:0.5×TBE电泳缓冲液、恒压90V电泳40min。

1.7.4 结果判定方法 每个样本分别设计1、2、3、4四管,均加入公共下游引物P5,并分别加入上游引物P1、P2、P3、P4。P1与P5扩增出588bp片段,决定ApoE 112位的Cys;P2与P5扩增出588bp片段,决定112位Arg;P3与P5扩增出451bp片段,决定158位Cys;P4与P5扩增出451bp片段,决定158位Arg。E2/2型第112、158位均为Cys,故1、3管扩增阳性,而2、4管除扩增出360bp内参AAT片段外,无目的片段扩增出;E3/3型第112位是Cys、第158位是Arg,故1、4管扩增阳性,而2、3管只扩增出360bp内参片段;E4/4型第112、158位均是Arg,故2、4管扩增阳性,1、3管只扩增出360bp内参片段;E2/3型1、3、4管扩增阳性,2管只扩增出360bp内参片段;E3/4型1、2、4管扩增阳性,第3管只扩增出360bp内参片段;E2/4型1、2、3、4管均扩增阳性。

## 1.8 统计分析

用Microsoft Excel 2000建立数据库,采用SPSS 11.5软件进行分析,检验显著水平为0.05;基因频率采用基因计数法,基因型及等位基因频率比较用 $\chi^2$ 检验;将6种基因型分为E2/2+E2/3、E3/3、E3/4+E4/4三组进行不同基因型组间的血脂水平的分析;所有资料均先进行正态性检验,正态分布且方差齐性者,3个基因型组间血脂水平的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA);方差不齐者及不呈正态分布者,组间比较采用非参数检验(Kruskal-Wallis H检验);率的比较采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 ApoE基因型及等位基因频率分布

本研究共检测到6种ApoE基因型,电泳图可见451bp、588bp及360bp内参片段(图1);各基因型的例数及频率见表1; $\epsilon_2$ 等位基因频率为0.0905, $\epsilon_3$ 等位基因频率为0.8213, $\epsilon_4$ 等位基因频

表1 ApoE基因型及等位基因分布

Table 1 Genotype and allele distributions of ApoE gene

	Genotype							Allele frequency		
	E2/2	E2/3	E2/4	E3/3	E3/4	E4/4	Total	$\epsilon_2$	$\epsilon_3$	$\epsilon_4$
<i>n</i>	5	92	11	424	85	7	624			
%	0.80	14.74	1.76	67.95	13.62	1.12	100	9.05	82.13	8.81

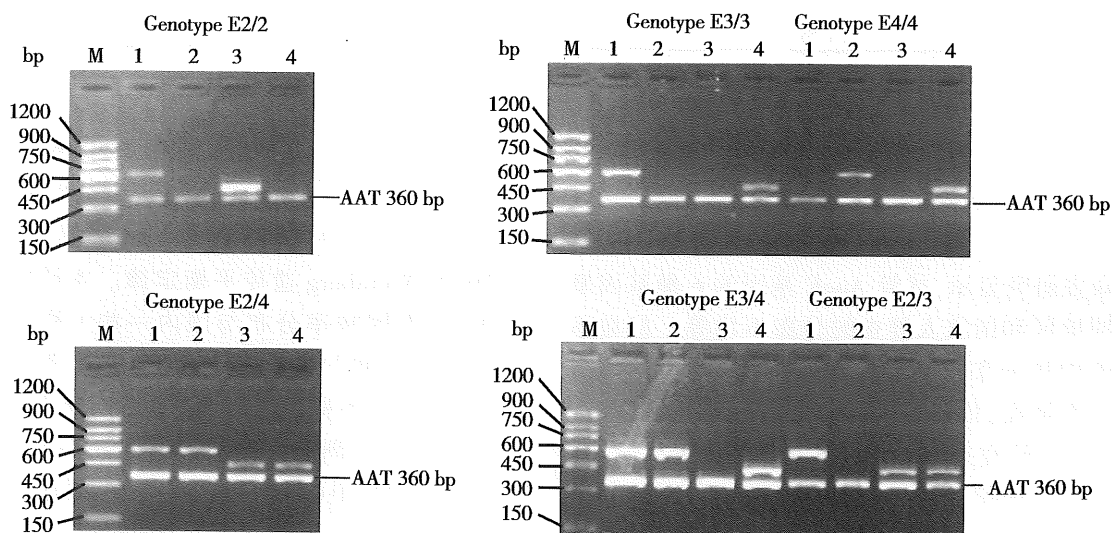


图1 ApoE基因型琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Amplification products of the six common ApoE genotypes on agarose gel

Lane M: 150 bp marker; lane 1~4: PCR reaction mixtures with forward primer P1, P2, P3, P4, respectively

率为 0.0881。经 $\chi^2$ 检验,各基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律( $\chi^2=1.273, P=0.938$ ),且本研究人群中男性和女性的 ApoE 基因型分布无差异( $\chi^2=2.359, P=0.308$ ),故本研究人群的 ApoE 基因型和等位基因频率分布与性别无关。

## 2.2 ApoE 基因各基因型组的一般资料

由于 E2/2 和 E4/4 基因型分布较少,故将 E2/2 型和 E2/3 型、E4/4 型和 E3/4 型分别合并后,与 E3/3 基因型组进行比较;同时由于 E2/4 基因型例数较少,仅 11 例,且其对血脂的作用较为中性,故不对其进行分析。3 个基因型组的研究对象在性别比例、年龄、吸烟状况、BMI、能量、膳食蛋白质供能比、碳水化合物供能比、脂肪供能比、饱和脂肪酸供能比、单不饱和脂肪酸供能比、多不饱和脂肪酸供能比及膳食胆固醇摄入量等指标上不存在显著差异(all  $P > 0.05$ )。

## 2.3 不同 ApoE 基因型组血脂水平的比较

对本研究人群而言,3 个基因型组的 HDL、TG、ApoA 水平不存在显著差异( $P > 0.05$ );而各基因型组间 TC、LDL、ApoB 水平存在显著差异( $P < 0.05$ ,表 2)。其中,E2/2 + E2/3 基因型组的 TC、LDL、ApoB 水平均低于 E3/3 组和 E3/4 + E4/4 组,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ );但本研究未发现 E3/3 组和 E3/4+E4/4 组的 TC、LDL、ApoB 水平存在差异( $P > 0.05$ )。即相对于  $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$  等位基因, $\epsilon 2$  等位基因携带者的 TC、LDL、ApoB 水平较低。另外,对 TC/HDL、LDL/HDL、TG/HDL、ApoA1/ApoB 等心血管疾病重要预测指标进行分析发现, $\epsilon 2$  等位基因携带者的 LDL/HDL 低于  $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$  等位基因携带者( $P=0.000, P=0.002$ ),ApoA1/ApoB 则显著高于  $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$  等位基因携带者( $P=0.000, P=0.002$ )。

表 2 不同 ApoE 基因型组血脂及脂蛋白水平的比较

Table 2 Serum lipids and lipoprotein levels among ApoE genotype groups ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

	E2/2 + E2/3	E3/3	E3/4 + E4/4	F	P
TC	5.24 ± 0.97	5.56 ± 1.04 <sup>1)</sup>	5.52 ± 1.14	3.571	0.024
HDL	1.57 ± 0.32	1.63 ± 0.36	1.62 ± 0.38	1.117	0.328
LDL	3.29 ± 0.92	3.96 ± 1.10 <sup>2)</sup>	3.92 ± 1.14 <sup>2)</sup>	15.573	0.000
TG	2.50 ± 1.57	2.28 ± 1.40	2.44 ± 1.45	0.849	0.428
ApoA1	1.55 ± 0.27	1.52 ± 0.29	1.49 ± 0.28	1.059	0.347
ApoB	1.08 ± 0.26	1.26 ± 0.33 <sup>2)</sup>	1.25 ± 0.35 <sup>2)</sup>	10.217	0.000
TC/HDL	3.42 ± 0.76	3.54 ± 0.91	3.50 ± 0.72	0.835	0.434
LDL/HDL	2.13 ± 0.59	2.50 ± 0.83 <sup>2)</sup>	2.47 ± 0.62 <sup>2)</sup>	13.761	0.000
TG/HDL	1.69 ± 1.09	1.48 ± 0.99	1.57 ± 0.92	1.370	0.255
ApoA1/ApoB	1.58 ± 0.72	1.30 ± 0.53 <sup>2)</sup>	1.30 ± 0.55 <sup>2)</sup>	11.212	0.000

Compared with Group (E2/2 + E2/3), Bonferroni method, 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P \leq 0.001$

## 3 讨论

众多研究显示,尽管 ApoE 基因的 6 种基因型在不同地区和国家人群中的分布不均等,但在不同人群中的分布有明显的共同特征:E3/3 基因型分布频率最高,均超过 50%;E2/2、E4/4 和 E4/2 分布最低。本研究采用 ARMS-PCR 技术对 624 名 40~65 岁广州居民进行 ApoE 基因多态性检测,共检出 6 种基因型,以 E3/3 型最为常见,占 67.95%,其次是 E2/3 和 E3/4,分别占 14.74%和 13.62%,E2/4、E4/4 和 E2/2 三种基因型均较少,分别占 1.76%、1.12%和 0.80%;等位基因以  $\epsilon 3$  分布频率最高,为

82.13%, $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 4$  等位基因频率分别为 9.05%和 8.81%;男性和女性 ApoE 基因型分布无差异;经 $\chi^2$ 检验,本研究所得到的 ApoE 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。本研究所得到的 ApoE 基因频率分布与国内一些大样本人群研究结果较一致<sup>[5,6]</sup>。而不同国家 ApoE 等位基因频率比较显示,不同民族间 ApoE 基因频率分布存在很大差异。非洲和大洋洲人群的  $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 4$  的频率较高( $\epsilon 2: 0.099 \pm 0.083, 0.111 \pm 0.052$ ;  $\epsilon 4: 0.209 \pm 0.090, 0.221 \pm 0.149$ ),而亚洲人群  $\epsilon 3$  等位基因频率普遍较高。亚洲北部地区人群中  $\epsilon 2$  等位基因分布频率明显较低,欧洲北部地区  $\epsilon 4$  等位基因频率则显著升高<sup>[7]</sup>。

ApoE基因的3种等位基因序列的不同造成其结构差异,进而导致由其所编码的3种ApoE异构体具有不同的受体结合活性,必然影响血脂代谢速度,产生机体血脂水平的差异<sup>[8]</sup>:ApoE4与这些受体的结合能力最强,机体的肝脏通过ApoE受体摄取较多胆固醇,使肝细胞内胆固醇含量增加,通过反馈调节使肝细胞膜表面的LDL受体数目减少,降低了肝细胞对LDL的摄取,同时VLDL经IDL转化为LDL增多最终使LDL水平升高;ApoE2的受体结合活性最弱,只有ApoE3的2%,结果导致LDL受体上调,肝细胞摄取LDL增多,血浆LDL水平降低。在本研究中, $\epsilon 2$ 等位基因携带者的TC、LDL及ApoB水平均显著低于 $\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4$ 等位基因携带者,与其他研究结果基本一致<sup>[9]</sup>。

关于ApoE基因多态性对TG、HDL及ApoA等血脂水平影响的研究,目前还没有一致的结论。Muros等<sup>[10]</sup>认为 $\epsilon 4$ 等位基因携带者TG水平最高,HDL及ApoA水平在各个基因型之间不存在显著性差异;但最近的几项研究表明, $\epsilon 2$ 等位基因携带者的TG、HDL及ApoA水平均显著高于 $\epsilon 4$ 等位基因携带者<sup>[11-13]</sup>;而Tan等<sup>[14]</sup>对3个不同种族的人群进行研究发现,ApoE基因多态性与HDL及TG的关系受种族的影响。本研究中,虽然 $\epsilon 2$ 等位基因携带者组HDL的平均水平低于 $\epsilon 3$ 组和 $\epsilon 4$ 组,ApoA和TG水平高于 $\epsilon 3$ 组和 $\epsilon 4$ 组,但差异均未达到显著水平。

综上所述,ApoE基因多态性与血脂水平密切相关,影响血清TC、LDL及ApoB水平。 $\epsilon 2$ 等位基因携带者的TC、LDL、ApoB和LDL/HDL水平明显低于 $\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4$ 等位基因携带者,而ApoA1/ApoB则显著高于 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ 等位基因携带者。因此,通过检测ApoE基因型,发现心血管疾病的易感人群,从而采取有针对性的预防措施,有助于降低心血管疾病的发病率和死亡率、提高人民生活水平。

#### 参考文献:

- [1] 梁茜,董吁钢,杨希力,等. 血管紧张素转换酶、内皮型一氧化氮合酶和载脂蛋白E基因多态性与冠心病的相关性[J]. 中山大学学报:医学科学版,2006,27(4):396-400.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 中国居民营养与健康现状[J]. 中国心血管病研究杂志,2004,2(12):919-922.
- [3] Donohoe G G, Salomäki A, Lehtimäki T, et al. Rapid identification of Apolipoprotein E genotypes by Multiplex Amplification Refractory Mutation System PCR and Capillary Gel Electrophoresis [J]. Clin Chem, 1999, 45:143-145.
- [4] Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 2503-2516.
- [5] 黎旭,赵冬,刘静,等. 北京自然人群载脂蛋白E基因多态性频率分布及与血脂关系研究[J]. 心血管病杂志,2002,21(4):193-197.
- [6] Liu H C, Hong C J, Wang S J, et al. ApoE genotype in relation to AD and cholesterol - A study of 2,326 Chinese adults [J]. Neurology, 1999, 53(5):962-966.
- [7] Singh P P, Singh M, Mastana S S. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK [J]. Ann Hum Biol, 2006, (3):279-308.
- [8] Souza D R, Nakachima L, Biagioni R B, et al. Relevance of apolipoprotein E4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease[J]. Braz J Med Biol Res, 2007, 40(2):189-197.
- [9] Jemaa R, Elasmı M, Naouali C, et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Tunisian population: Frequency and effect on lipid parameters [J]. Clin Biochem, 2006, 39(8):816-820.
- [10] Muros M, Rodriguez-Ferrer C. Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp (a) in a Spanish population underexpressing apoE4 [J]. Atherosclerosis, 1996, 121:13-21.
- [11] Masemola M L, Alberts M, Urdal P. Apolipoprotein E genotypes and their relation to lipid levels in a rural South African population [J]. Scand J Public Health Suppl, 2007, 69:60-65.
- [12] Gronroos P, Raitakari O T, Kahonen M, et al. Influence of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid and lipoprotein changes: a 21-year follow-up study from childhood to adulthood. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study [J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45: 592-598.
- [13] Sivakova D, Zacharova M, Gasparovic J, et al. Apolipoprotein E polymorphism in relation to plasma lipid levels and other risk factors of atherosclerosis in two ethnic groups from Slovakia [J]. Coll Antropol, 2006, 30(2):387-394.
- [14] Tan C E, Tai E S, Tan C S, et al. APOE polymorphism and lipid profile in three ethnic groups in the Singapore population[J]. Atherosclerosis, 2003, 170:253-260.