

· 临床研究 ·

动脉硬化性脑梗塞遗传因素载脂蛋白 A I 基因 DNA 多态性分析

胡学强 刘焯霖 梁秀龄

(神经病学教研室)

罗超权 杨英浩 刘煦文

(生物化学教研室)

提 要 应用限制性片段长度多态性方法分析了52例动脉硬化性脑梗塞患者及60例健康对照ApoA I 基因,并应用酶学方法测定了二种基因型患者血清高密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇及甘油三酯水平。结果表明载脂蛋白 A I 基因 *Pst* I RFLP 由2.2 kb 和 3.3 kb 组成,3.3 kb 片段频率在二组间分别为0.16、0.02,二组间具有极显著性差异 ($P < 0.01$),提示多态片段 3.3 kb 与动脉硬化性脑梗塞相关,是 HDL-L 水平下降的遗传因素之一。

关键词 遗传;动脉硬化性脑梗塞;载脂蛋白 A I 基因;高密度脂蛋白胆固醇

中图分类号 R 743.33

近年来分子和群体遗传学领域的进展,使人们逐渐注意到遗传因素在脑血管病因学中的作用。国内外流行病学文献报道了动脉硬化性脑梗塞的家族聚集现象^[1,2],实验研究也发现患者及其亲属的血脂水平与遗传因素有关。其遗传方式符合多基因遗传^[2]。然而,关于高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 降低是脑血管病的易患因素 (主要的脂类危险因素) 的遗传等问题尚有待深入研究。本文报告52例动脉硬化性脑梗塞患者 HDL 中的主要载脂蛋白 (apolipoprotein, Apo) A I 基因多态性及基因变异与 HDL-C 的关系。

材 料 和 方 法

病例及对照组 病例 52 例,全部为神经内科住院的广东籍汉族病人,诊断参照中华医学会第二次全国脑血管病学术会议 (1986) 修订的“各类脑血管病诊断要点”标准,全部病例均经 CT 检查证实。健康对照组 60 例,全部为广东籍、无血缘关系、血脂正常的志愿者,其年龄、性别、居住地区、民族及生活习惯与病例组相一致。

研究方法

1. HDL-C, TC, TG 测定

测定血脂指标均来自早晨空腹血标本。应用酶学方法测定 HDL-C, 总胆固醇 (total cholesterol, TC), 应用异丙醇抽提, 乙酰丙酮显色法测定甘油三酯 (triglyceride, TG)。

2. 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析^[3]

取外周静脉血 5ml 提取 DNA, 取每份 DNA 10 μ g, 用限制性内切酶 *Pst* I 酶解 (50 U/10 μ g DNA), 酶解后点样于 0.8% 琼脂糖凝胶中以 1~2 V/cm 电压梯度电泳 18~22 h, 电泳后的凝胶经碱变性后用 Southern 印迹转移的方法将 DNA 转移至硝酸纤维素膜上, 80 $^{\circ}$ C 烤 2 h 后备用。探针制备采用碱变性 SDS 法快速提取含 ApoA I cDNA 片段的 pAL-B₃ 质粒 (挪威 Rogné 教授赠送) DNA, 用限制性内切酶切割, 电泳分离, 然后用低熔点胶法回收 Apo A I cDNA (0.8kb) 片段。探针标记采用切口移位法将 α^{32} p-dCTP 标记于探针上。Southern 杂交先将烤干的滤膜预杂交 6 h 后, 再与标记后的 Apo A I cDNA 探针杂交 24 h (68 $^{\circ}$ C),

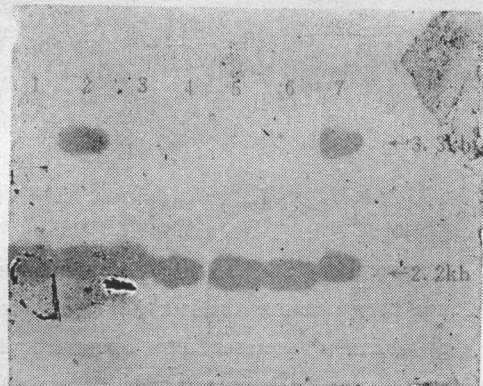
然后洗膜晾干, 用保鲜膜包好, 在暗盒夹内压 X 线片, 加增感屏, -70°C 曝光 3~6 d, 常规冲洗 X 光片。

3. 统计方法 全部数据输入计算机处理。采用 χ^2 检验及 t 检验。

结 果

RFLP 放射自显影图谱及频率

人基因组 DNA 经 *Pst* I 酶解后与 Apo A I cDNA 探针杂交可出现 2.2 kb 和 3.3 kb 二种长度的多态片段, 2.2 kb 片段见于全部个体, 可视为野生型, 称为等位基因 P_1 , 3.3 kb 片段仅出现于部分个体, 可视为突变型, 称为等位基因 P_2 (附图)。



附图 Apo A I 基因 *Pst* I RFLP 放射自显影图谱

1~7 均为动脉硬化性脑梗塞患者

其 P_1 、 P_2 等位基因频率及 P_1P_1 、 P_1P_2 基因型数见表 1。

表 1 动脉硬化性脑梗塞患者及健康对照组 Apo A I 基因 RFLP 频率

例数	基因型		等位基因	
	P_1P_1	P_1P_2	P_1	P_2
病人组	52	35	17*	0.84 0.16*
健康对照组	60	58	2	0.98 0.02

$\chi^2 = 15.03$, $*P < 0.01$

TC、TG 及 HDL-C 水平

52 例患者中 P_1P_1 基因型个体为 35 例, P_1P_2 基因型个体为 17 例, 二种基因型个体其 TC、TG 及 HDL-C 水平(表 2)。

表 2 不同基因型动脉硬化性脑梗塞 TC、TG 及 HDL-C 水平($\bar{x} \pm s_x$)

基因型	例数	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
P_1P_1	35	4.01 ± 0.13	1.22 ± 0.08	1.21 ± 0.04
P_1P_2	17	4.52 ± 0.27	1.50 ± 0.15	0.91 ± 0.06*

$t = 2.927$, $*P < 0.01$

P_1P_2 基因型血清 TC、TG 及 HDL-C 水平与 P_1P_1 基因型相比较, TC、TG 水平 P_1P_2 基因型虽高于 P_1P_1 基因型, 但差异无显著性意义。HDL-C 水平 P_1P_2 基因型低于 P_1P_1 基因型, 差异具极显著性意义。

讨 论

HDL 是体内胆固醇以及甘油三脂所必需的脂蛋白之一, 由 Apo A I、Apo C III 等构成, Apo A I 是 HDL 中的主要蛋白质。Apo A I 基因与 Apo C III 基因紧密连锁, 构成一个基因簇, 位于 11 号染色体长臂上 ($q^{13} \rightarrow qter$)。Apo A I 的 *Pst* I 多态位点位于 Apo A I 与 Apo C III 基因之间的间隔顺序内, *Pst* I 多态片段的产生是由于 Apo A I 和 Apo C III 基因之间的一个 *Pst* I 的识别位点消失所致^[4]。

Karathanasis 等^[5]于 1983 年首先发现 Apo A I 基因区域 DNA 多态性与动脉硬化之间的关系。1986 年 Anderson 和 Ordovas 相继发现 Apo A I *Pst* I 多态的 3.3 kb 片段与早发性冠心病和家族性低 α -脂蛋白血症相关联^[4,6]。1989 年 Wile 等在研究 174 例冠心病患者 Apo A I *Pst* I 多态时发现 3.3 kb 片段等位基因频率显著高于对照组, 结果提示 Apo A I 基因变异与冠心病及动脉粥样硬化之间存在密切联系^[7]。我们比较分析了 Apo A I 基因 *Pst* I 的频率在动脉硬化性脑梗塞患者与健康对照之间的分布, 结果发现患者 3.3 kb 片段出现频率比正常人显著增高 ($P < 0.01$)。动脉硬化性

脑梗塞与冠心病多由动脉硬化所致, 二类疾病都有 HDL 低下, 但动脉硬化性脑梗塞 HDL 与 Apo A I 下降程度远比冠心病明显^[10]。结果表明作为 HDL 主要蛋白质 Apo A I, 其基因 Pst I 3.3 kb 片段不仅与冠心病相关联, 而且也与动脉硬化性脑梗塞相关。从 Apo A I 基因 Pst I 多态片段二者间的一致性, 不难看出在脂蛋白这个因素中, 二类疾病具有共同的遗传背景。

Reed 等^[6]研究一组尸检病例, 测定脑血管中的 HDL, 发现 HDL 与脑动脉硬化呈负相关。在对脑血管病 HDL 异常与遗传关系的研究中发现脑血栓形成病人及其一级亲属的血清 HDL 水平均有显著降低, 配偶则无类似变化, 从而认为低血清 HDL 水平的家族性倾向可能与遗传有关, 是脑血栓形成发生的家族性倾向的原因之一^[9]。

载脂蛋白是脂结合蛋白, 在胆固醇、三酰甘油及磷脂的转运和代谢中起重要作用。载脂蛋白结构、功能方面的任何改变都能导致脂类代谢的改变和可能导致动脉粥样硬化。Apo A I 是 HDL 的主要蛋白质, 临床和实验研究表明 HDL 与动脉硬化性脑梗塞呈负相关, HDL 对动脉硬化性脑梗塞的发生具有防护作用。脑血管病是一种具有多种危险因素的遗传异质性疾病, 为进一步探讨遗传因素在动脉硬化性脑梗塞中的作用, 我们从分析本病 Apo A I 基因多态性入手, 探讨基因变异与本病的遗传关系。本文结果表明 52 例病人中, P₁P₁ 个体为 35 例, 占 67.3%, P₁P₂ 个体为 17 例, 占 32.7%, 而在 60 例健康人中 P₁P₁ 个体为 58 例, 占 96.7%, P₁P₂ 个体为 2 例, 占 3.3%。具有变异的 3.3 kb 片段的 P₁P₂ 个体, 患者组明显高于对照组, 具有极显著性差异 (P < 0.01)。同时结果还表明 P₁P₂ 基因型 HDL-C 水平低于 P₁P₁ 基因型, 具极显著性差异 (P < 0.01)。结果提示 3.3 kb (P₂) 等位基因片段影响 HDL-C 水平, 而且这个片段可作为一种遗传标记, 为人群动脉硬化性脑梗塞的患病危险性提供了一种分子线索。动脉硬化性

脑梗塞是常见的脑血管病, 其发病率、致残率和死亡率都很高, 严重地威胁人类健康。早期检出人群中动脉硬化性脑梗塞的易感者, 有助于尽早争取预防措施, 减少发病率。诸如测定血清 TC、TG、HDL-C 和 Apo 等生化指标来评估是否存在脂质代谢异常及作为动脉硬化性脑梗塞的危险因素是有一定的价值的, 但受年龄、饮食等环境因素影响很大, 有时难于作出合理的解释。相反, 与动脉硬化性脑梗塞相关的 Apo A I 基因 3.3 kb 的多态片段的检测不受环境因素的影响, 稳定可靠, 作为遗传标记及患病危险性的分子线索, 在人群中进行普查和筛选, 对发现的高危人群尽早地采取预防措施, 这样对减少脑血管病的发病率将具有积极的意义。

(本文承蒙挪威 Rogne 教授提供 Apo A I 基因 cDNA 探针, 谨表谢意)

参 考 文 献

1. 袁有和, 等. 脑血管病的病因学研究. 中华流行病学杂志 1988; 9: 8
2. Давиценков, ЕФ, и др. Наследственное предрасположение как фактор риска в развитии ишемического инсульта. Ж невропатол и Психиатр 1982; 82(8): 1124
3. Sambrook J, et al. Molecular cloning: A laboratory manual. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 9.31~9.58
4. Ordovas JM, et al. Apolipoprotein A-I gene polymorphism associated with premature coronary artery disease and familial hypoalphalipoproteinemia. N Engl J Med 1986; 314: 671
5. Karathanasis SK, et al. An inherited polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene locus related to the development of atherosclerosis. Nature 1983 301: 718
6. Anderson RA, et al. Prevalence and associations of apolipoprotein A-I linked DNA polymorphisms: Results from a population study. Genet Epidemiol 1986; 3:

- 385
7. Wile DB, et al. Apolipoprotein A-I gene polymorphisms: Frequency in patients with coronary artery disease and healthy controls and association with serum Apo A-I and HDL-cholesterol concentration. *Atherosclerosis* 1989;78:9
8. Reed DM, et al. Serum lipids and lipoproteins as predictors of atherosclerosis: An autopsy study. *Arteriosclerosis* 1989;9:560
9. 王尚武, 等. 动脉硬化性脑卒中患者核心家庭成员的血脂水平与遗传关系的研究. *中华神经精神科杂志* 1990;23:213
10. 李健斋, 等. 脑血管病患者高密度脂蛋白降低及其意义. *中华医学杂志* 1990;70(5):241
- (1992-01-04收稿 1992-11-03修回)

GENETIC FACTOR OF ATHEROTHROMBOTIC BRAIN INFARCTION: APOLIPOPROTEIN A I GENE DNA POLYMORPHISMS

Hu Xueqiang Liu Zhoulin Liang Xiuling

(Department of Neurology)

Luo Chaoquan Yang Yinghao Liu Xiwen

(Department of Biochemistry)

The authors have investigated the association between serum high density lipoprotein and total cholesterol and triglyceride concentration and *Pst*-I restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein (Apo) A I gene. Two groups of subjects were examined. The first group comprised 52 unrelated Chinese patients with atherothrombotic brain infarction (ABI). The second group consisted of 60 unrelated healthy subjects. For the *Pst* I polymorphism, the frequency of the minor P_2 (allele, 3.3 kb) was 0.16 in the Chinese ABI patients and was higher than that in the control group (P_2 frequency 0.02, $P < 0.01$). ABI patients with the genotype ($P_1 P_2$) had lower serum levels of HDL-C compared to those with the genotype $P_1 P_1$ (0.91 mmol/L vs 1.21 mmol/L, $P < 0.01$). The data showed genetic variation in the Apo A I gene and suggest that the mechanism of this association may operate through an effect in determining the serum concentration of high density lipoprotein and it may provide a molecular clue for ABI risk in certain individuals.

Key words genetic; atherothrombotic brain infarction; apolipoprotein A I gene; high density lipoprotein cholesterol