

· 临床研究 ·

内皮脂肪酶启动子-384A/C 多态性与老年急性冠脉综合征及血脂的相关性

蔡高军*, 何国平, 戚传平

(江苏大学附属武进人民医院心内科, 常州 213000)

【摘要】目的 探讨内皮脂肪酶基因启动子-384A/C 基因多态性与老年急性冠脉综合征及血脂的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法检测 241 例老年急性冠脉综合征 (ACS) 患者和 181 例健康体检者内皮脂肪酶基因启动子-384A/C 基因型。**结果** 中国常州地区汉族人群老年人存在 EL-384A/C 基因多态性, C 等位基因频率为 13.74%。对照组与老年 ACS 组 EL-384A/C 基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义; 经校正性别、年龄、糖尿病、高血压、吸烟、高脂血症等冠心病危险因素后, 结果仍然表明该多态性与老年 ACS 无明显相关性。不同基因型亚组间血脂水平差异无统计学意义。**结论** EL-384A/C 基因多态性与老年 ACS 及血脂无明显相关性, 该多态性可能不是中国常州地区汉族人群老年 ACS 发病的易感因素。

【关键词】 内皮脂肪酶; 基因多态性; 老年人; 急性冠脉综合征; 血脂

【中图分类号】 R541.4

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00208

Association of endothelial lipase-384A/C gene polymorphism with acute coronary syndrome and blood lipids in Chinese elderly

CAI Gaojun*, HE Guoping, QI Chuanping

(Department of Cardiology, Affiliated Wujin People's Hospital, Jiangsu University, Changzhou 213000, China)

【Abstract】 Objective To explore the potential relationship of EL-384 A/C gene polymorphism with acute coronary syndrome(ACS) and blood lipids in the elderly. **Methods** The EL gene promoter-384A/C genotype in 241 aged ACS patients and 181 controls was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. **Results** There was EL gene-384A/C polymorphism in elderly Chinese Han population in Changzhou region. The C allele frequency was 13.74%. There was no significant difference in the genotypes and allele frequencies of EL-384A/C between the controls and elderly ACS patients. After adjusting for the risk factors of coronary heart disease, including gender, age, diabetes mellitus, hypertension, smoking and hyperlipidemia, no association between EL-384 A/C gene polymorphism and ACS was observed in the elderly. Additionally, the levels of blood lipids were not significantly different between AA genotype and AC+CC genotype. **Conclusion** There is no significant association between EL gene-384A/C polymorphism and ACS and blood lipids in the elderly. This EL gene-384A/C polymorphism might not be involved in the pathogenesis of ACS in elderly Chinese Han population in Changzhou region.

【Key words】 endothelial lipase; gene polymorphism; aged; acute coronary syndrome; blood lipids

内皮脂肪酶 (endothelial lipase, EL) 是近年来发现的甘油三酯脂肪酶家族新成员, 可能通过裂解高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 及其他多条途径参与动脉粥样硬化和冠心病的发病^[1]。近年来国内外研究发现 EL 基因多态性与冠心病关系密切^[2,3]。Yamakawa-Kobayashi 等^[4]和 Hutter 等^[5]研究均表明 EL 启动子

区-384A/C 基因多态性 (rs3813082) 与血浆 HDL 水平相关。但到目前为止, EL-384A/C 基因多态性是否与中国常州地区汉族人群老年人急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 发病存在相关性尚未见到。本研究旨在通过采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism, PCR- RFLP) 方法, 检

测 241 例老年 ACS 患者和 181 例健康体检者的基因型, 以了解中国常州地区汉族人群 EL-384A/C 基因多态性频率分布, 并探讨其与老年 ACS 之间的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

2008 年 8 月至 2011 年 1 月在江苏大学附属武进人民医院心内科住院的老年 ACS 患者 241 例, 其中男 156 例, 女 85 例, 年龄 60~88 岁, 平均 (69.70 ± 6.77) 岁, ACS 定义按照美国心脏病学会/美国心脏协会标准^[6], 大部分患者进行冠状动脉造影检查, 结果由两名有经验的心导管室医师判断。对照组为同期住院并经冠状动脉造影检查排除冠心病者 181 例, 其中男 88 例, 女 93 例, 年龄 60~93 岁, 平均 (67.12 ± 6.12) 岁。入选患者均为中国常州地区汉族人群。排除标准: 患有感染性疾病、风湿性心脏病、严重肝肾功能不全和肿瘤等疾病。该研究征得所有入选对象知情同意。

1.2 方法

1.2.1 一般资料采集 收集所有入选对象的基本资料, 包括年龄、性别、高血压史、糖尿病史、吸烟史和冠状动脉造影等结果。

1.2.2 入院次日空腹抽取静脉血检测生化指标 血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、HDL-C、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和血糖水平检测采用氧化酶法; 血清载脂蛋白-A1 (apolipoprotein, Apo-A1)、Apo-B 和脂蛋白 (a) [lipoprotein (a), LP (a)] 水平检测采用放射免疫法。各生化指标均由全自动生化分析仪 (奥林巴斯 AU5400) 检测分析。

1.2.3 EL-384A/C 基因型的检测 采用标准酚氯法提取患者外周血基因组 DNA, 采用 PCR-RFLP 方法检查 EL-384A/C 基因型。参考文献^[4]合成引物, 上游引物 5'-TAG CTC CGC CGG GTT ATT GTG C-3', 下游引物 5'-CCA GAT CCT CCT CTC CCC ACT G-3', 引物由大连宝生物有限公司合成。总 PCR 反应体系 50 μ l, 包括 1 μ l 基因组 DNA, 5 μ l 10 $\times$ PCR Ex Taq Buffer (Mg^{2+}), 4 μ l dNTP Mixture, 0.25 μ l TaKaRa Ex Taq, 上下游引物各 1 μ l, 去离子水补充至 50 μ l。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 66 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经限制性内切酶 Hha I (由大连宝生物有限公司提供) 酶切, 37.0 $^{\circ}$ C 水浴过夜。酶切产物经胶红染色的 3% 琼脂糖凝胶 100V 电泳

45min, 紫外灯下观察分型。约 10% 左右样本被随机重复检查。为证实我们的结果, 部分 PCR 产物送上海生工行基因测序。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用独立样本 *t* 检验; 计数资料比较采用卡方检验。老年 ACS 的多种相关因素分析采用 logistic 回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与 ACS 组患者一般资料比较

与对照组相比, 老年 ACS 组患者以男性居多、年龄较大 ($P < 0.05$), 高血压、糖尿病和吸烟者比率明显较高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。老年 ACS 组血清 TG、TC/HDL-C 和 LDL-C/HDL-C 明显高于对照组, 而血清 HDL-C 水平明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 1)。

表1 对照组与ACS组患者一般资料
Table 1 The clinical characteristics controls and ACS group

指标	对照组(n=181)	ACS组(n=241)
男/女(n/n)	88/93	156/85*
年龄(岁)	67.12 $\pm$ 6.12	69.70 $\pm$ 6.77*
高血压(%)	60.8	71.8*
糖尿病(%)	12.7	26.1*
吸烟(%)	18.02	27.4*
TC(mmol/L)	4.64 $\pm$ 1.11	4.49 $\pm$ 0.94
TG(mmol/L)	1.58 $\pm$ 0.92	1.80 $\pm$ 1.27*
HDL-C(mmol/L)	1.21 $\pm$ 0.38	1.14 $\pm$ 0.29*
LDL-C(mmol/L)	2.67 $\pm$ 0.83	2.68 $\pm$ 0.70
TC/ HDL-C	4.07 $\pm$ 1.29	4.48 $\pm$ 0.96*
TG/ HDL-C	2.38 $\pm$ 0.96	2.45 $\pm$ 0.81
LDL-C/ HDL-C	1.48 $\pm$ 1.13	1.82 $\pm$ 2.08*

注: ACS: 急性冠脉综合征; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇。与对照组比较, * $P < 0.05$

2.2 EL-384A/C 基因多态性位点基因型的鉴定

PCR 扩增获得 254bp 的特异性片段。该片段经 Hha I 限制性内切酶酶切后显示 AA (254bp)、AC (254bp、142bp 和 112bp) 和 CC (142bp 和 112bp) 三种基因型 (图 1)。

2.3 对照组及老年 ACS 组 EL-384A/C 基因型分布

两组 EL-384A/C 基因型分布达到 Hardy-Weinberg 平衡 (分别为 0.13, 1.73; $P > 0.05$), 具有群体代表性。对照组 AA、AC、CC 基因型和 A、C 等位基因分布频率分别为 133 (73.48%)、45 (24.86%)、3 (1.66%) 和 85.91%、14.09%; 老年

ACS 组 AA、AC、CC 基因型和 A、C 等位基因分布频率分别为 178 (73.86%)、61(25.31%)、2(0.83%) 和 86.51%、13.49%。两组间基因型及等位基因频率分布差异无统计学意义 (表 2)。

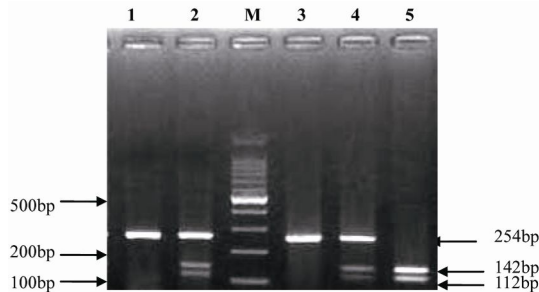


图1 EL-384A/C PCR产物酶切电泳图

Figure 1 Restriction endonuclease digestion of EL-384A/C PCR products

1, 3: AA 基因型; 2, 4: AC 基因型; 5: CC 基因型; M: 100bp Marker

表2 对照组及ACS组EL-384A/C基因型及等位基因频率分布
Table 2 The genotype and allele frequencies of EL-384 A/C between controls and ACS group

		[n(%)]			
组别	n	AA	AC+CC	A	C
对照组	181	133(73.48)	45+3(26.52)	311(85.91)	51(14.09)
ACS 组	241	178(73.86)	61+2(26.14)	417(86.51)	65(13.49)

2.4 EL-384A/C 不同基因型间血脂水平及血脂比值比较

EL-384A/C 不同基因型间血脂水平及血脂比值比较, 差异均无统计学意义 (表 3)。

2.5 老年 ACS 危险因素 logistic 回归分析

将基因型、性别、年龄、糖尿病、高血压、吸烟和血脂纳入回归模型进行分析, 结果显示在校正性别、年龄等因素后, EL-384A/C 基因多态性与老年 ACS 发病仍然无明显相关性 (表 4)。

表 3 不同基因型间血脂水平及血脂比值比较

Table 3 Comparison of lipids and the ratios between different genotypes ($\bar{x} \pm s$)

基因型	n	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	TC/HDL-C	TG/HDL-C	LDL-C/HDL-C
AA	311	4.51±1.01	1.72±1.14	1.16±0.32	2.65±0.76	4.26±1.12	1.73±1.94	2.42±0.89
AC+CC	111	4.67±1.03	1.69±1.14	1.20±0.36	2.75±0.74	4.42±1.17	1.50±1.01	2.43±0.83

注: TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇

表 4 老年 ACS 危险因素 logistic 回归分析

Table 4 The logistic regression analysis of risk factors in aged ACS

危险因素	β_i	Sx	χ^2	P	OR	95% CI
性别	-0.850	0.208	15.670	0.000	0.427	0.280~0.651
年龄	0.071	0.216	17.903	0.000	1.074	1.039~1.110
糖尿病	0.870	0.276	9.605	0.002	2.387	1.377~4.139
甘油三酯	0.250	0.213	5.641	0.018	1.284	1.045~1.579

3 讨 论

EL 定位于人类染色体 18q21.1, 由 483 个氨基酸组成, 分子量约为 55ku。EL 主要由血管内皮细胞合成, 与肝脂肪酶、脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 三者同属于脂肪酶, 共同参与脂蛋白代谢。EL 主要表现为较强的磷脂酶活性, 作用底物为 HDL-C, 通过在血管内皮细胞表面介导 HDL-C 与硫酸肝素蛋白聚糖结合后, 水解 HDL-C 产生游离脂肪酸和溶血卵磷脂以及 Apo-A1, 后来研究发现 EL 也具有较弱的甘油三酯酶活性。

自从 2002 年 deLemos 等^[7]首次发现 EL 基因 17 个多态性位点以来, 陆续又有多个新的多态性位点被报道。到目前为止, 对于 EL 基因多态性是否影响血脂水平以及是否与冠心病发病有关, 国内外研究结论尚不一致^[2,3,8]。2003 年 Yamakawa-Kobayashi 等^[4]研究日本学龄儿童 HDL-C 水平与 EL 基因变异

的关系时, 报道了 6 个 EL 基因变异, 并且发现启动子-384A/C 和第 10 个外显子 2237G/A 的变异与 HDL-C 水平升高有关。2006 年, Hutter 等^[5]对日裔美国人家系人群研究中也发现-384A/C 基因多态性与 HDL 水平有关, 并且可能增加人群心血管疾病的患病风险。最近黄焱等^[9]对我国成都地区 214 名正常人和 103 例高甘油三酯血症患者 EL 基因-384A/C 位点多态性进行分析, 发现中国人 EL 基因-384A/C 多态位点 C 等位基因频率为 0.178, 但未见正常人和 HTG 患者之间 C 等位基因频率存在差异。与 AA 基因型者比较, 正常中国人 C 等位基因携带者(AC 及 CC 型者)血清 HDL 水平无显著性差异。本研究发现, 中国常州地区汉族人群老年人存在 EL-384A/C 基因多态性, 且这一多态性位点已达到遗传平衡, 具有群体代表性。C 等位基因频率为 13.74%, 与 Yamakawa-Kobayashi 等和 Hutter 等的研究结果一致, 但是显著低于黄焱等的报道 ($P <$

0.05), 这可能与入选人群不同有关。

对照组与老年 ACS 组 EL-384A/C 基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义; 经校正性别、年龄、糖尿病、高血压、吸烟、高脂血症等冠心病危险因素后, 结果仍然表明该多态性与老年 ACS 无明显相关性。而男性、高龄、糖尿病和 TG 是老年 ACS 发病独立的危险因素。同时本研究发现, 与 AA 基因型者比较, C 等位基因携带者 (AC+CC) HDL-C 水平差异无统计学意义, 这与 Yamakawa-Kobayashi 等和 Hutter 等^[4,5]的研究结果不同, 两组间其他血脂水平和血脂比值差异也无统计学意义。出现上述结论不一致的原因可能为: 等位基因频率在不同种族人群存在较大差异; 确定基因型所使用的试验方案不同, 选择偏差不容忽视; 许多研究样本数量不够大、统计效能有限。

本研究首次对 EL 基因-384A/C 多态性与老年 ACS 的发病进行研究, 结果显示 EL -384A/C 基因多态性与老年 ACS 的发病无明显相关性, 提示该基因变异可能不是中国常州地区汉族人群老年 ACS 发病的易感因素。但是由于本文病例数量有限, 患者来源于常州地区汉族老年人群, 尚需多地区、大样本的研究对其多态性进行检测, 以及在功能学方面进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] 方玉强, 黄 岚, 赵晓辉, 等. 脐静脉内皮细胞高表达内皮脂肪酶后其生物学特性的变化及意义[J]. 心血管康复医学杂志, 2007, 16(6): 529-532.
- [2] Tang NP, Wang LS, Yang L, *et al.* Protective effect of an

endothelial lipase gene variant on coronary artery disease in a Chinese population[J]. J Lipid Res, 2008, 49(2): 369-375.

- [3] Shimizu M, Kanazawa K, Hirata K, *et al.* Endothelial lipase gene polymorphism is associated with acute myocardial infarction, independently of high-density lipoprotein-cholesterol levels[J]. Circ J, 2007, 71(6): 842-846.
- [4] Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Endo K, *et al.* Relationship between serum HDL-C levels and common genetic variants of the endothelial lipase gene in Japanese school-aged children[J]. Hum Genet, 2003, 113(4): 311-315.
- [5] Hutter CM, Austin MA, Farin FM, *et al.* Association of endothelial lipase gene (LIPG) haplotypes with high-density lipoprotein cholesterol subfractions and apolipoprotein AI plasma levels in Japanese Americans[J]. Atherosclerosis, 2006, 185(1): 78-86.
- [6] Chen MS, Bhatt DL. Highlights of the 2002 update to the 2000 American College of Cardiology/American Heart Association acute coronary syndrome guidelines[J]. Cardiol Rev, 2003, 11(3): 113-121.
- [7] deLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, *et al.* Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol[J]. Circulation, 2002, 106(11): 1321-1326.
- [8] Jensen MK, Rimm EB, Mukamal KJ, *et al.* The T111I variant in the endothelial lipase gene and risk of coronary heart disease in three independent populations[J]. Eur Heart J, 2009, 30(13): 1584-1589.
- [9] 黄 焱, 白 怀, 范 平, 等. 正常中国人及内源性高甘油三酯血症患者内皮脂肪酶基因启动子-384A > C 多态性的研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2008, 25(4): 443-446.

(编辑: 王雪萍)