

· 论 著 ·

# 脑梗死患者载脂蛋白 E 基因多态性相关研究

刘红娟,汪青松,管叶明,刘学春,王 静,黄海丽

**[摘要]** **目的** 探讨脑梗死患者载脂蛋白 E (Apo E) 基因多态性分布及其与 C 反应蛋白 (CRP)、美国国立卫生院卒中量表 (NIHSS) 的关系。**方法** 收集脑梗死 108 例 (其中急性脑梗死 70 例,非急性脑梗死 38 例) 和健康对照者 76 例,利用多聚酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术,测定其 Apo E 基因型;采用生化全自动仪分别对总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和 CRP 水平进行测定;对所有脑梗死患者入院时、入院后 1 周和 2 周进行 NIHSS 评分。**结果** 脑梗死患者 Apo E $\epsilon$ 2、Apo E $\epsilon$ 4 的频率分别为 6.9% 和 9.7%,而对照组分别为 19.1% 和 3.9%,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );脑梗死组 TC、TG、LDL-C 明显高于对照组,而 HDL-C 明显低于对照组 ( $P < 0.05$ );急性脑梗死组 Apo E $\epsilon$ 4 携带者的 CRP 明显高于非 Apo E $\epsilon$ 4 携带者 ( $P < 0.05$ );脑梗死患者 Apo E $\epsilon$ 4 携带者的 NIHSS 评分高于非 Apo E $\epsilon$ 4 携带者的 NIHSS 评分 ( $P < 0.05$ );急性脑梗死患者 Apo E $\epsilon$ 2 携带者的 NIHSS 评分低于非 Apo E $\epsilon$ 2 携带者的 NIHSS 评分,而急性脑梗死患者 Apo E $\epsilon$ 4 携带者 NIHSS 评分高于非携带者的 NIHSS 评分 ( $P < 0.05$ )。**结论** Apo E $\epsilon$ 2 可能为保护因子,而 Apo E $\epsilon$ 4 可能为脑梗死的易感因子;联合检测 Apo E 基因型、血清 CRP 含量和 NIHSS 评分,对判断脑梗死预后有一定的意义。

**[关键词]** 脑梗死;载脂蛋白 E;基因多态性;C 反应蛋白;美国国立卫生院卒中量表

**[中图分类号]** R743.32 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)03-0195-04

## The polymorphism of apolipoprotein E gene in patients with cerebral infarction

LIU Hong-juan, WANG Qing-song, GUAN Ye-ming, LIU Xue-chun, WANG Jing, HUANG Hai-li. Department of Neurology, 105 Hospital of PLA, Clinical College, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230031, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between polymorphism of Apo E gene and CRP or NIHSS in cerebral infarction. **Methods** 108 patients with cerebral infarction (70 cases in acute cerebral infarction, 38 cases after acute cerebral infarction) and 76 healthy control group were enrolled. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine Apo E genotype. The total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL-C), high density lipoprotein (HDL-C) and C-reactive protein (CRP) levels were tested with the automatic biochemical analyzer. NIHSS scores in patients with cerebral infarction were scaled within admission, one week and two weeks after admission. **Results** In the patients with cerebral infarction, the frequency of Apo E allele  $\epsilon$ 2 and  $\epsilon$ 4 account for 6.9% and 9.7% respectively, while the frequency of Apo E allele  $\epsilon$ 2 and  $\epsilon$ 4 account for 19.1% and 3.9% respectively in the healthy control group ( $P < 0.05$ ). The TC, TG, LDL-C levels in cerebral infarction group were significantly higher than that of control group while the HDL-C levels in cerebral infarction group were significantly lower than that of control group ( $P < 0.05$ ). In patients with acute cerebral infarction, CRP level with  $\epsilon$ 4 alleles was increased significantly compared with that of without Apo E  $\epsilon$ 4 ( $P < 0.05$ ). The scores of NIHSS with  $\epsilon$ 4 alleles was significantly increased without  $\epsilon$ 4 ( $P < 0.05$ ). In patients with acute cerebral infarction, the scores of NIHSS with  $\epsilon$ 2 alleles was significantly declined compared with that of without Apo E  $\epsilon$ 2, while the scores of NIHSS with Apo E  $\epsilon$ 4 alleles was increased without Apo E  $\epsilon$ 4 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The Apo E  $\epsilon$ 4 might be a susceptible factor and  $\epsilon$ 2 be a protective factor for cerebral infarction respectively. Examination of Apo E genotype, serum CRP level and NIHSS score may be helpful for prediction of acute cerebral infarction.

**[Key words]** cerebral infarction; apolipoprotein E; gene polymorphism; C-reactive protein; The National Institute of Health Stroke Scale

**基金项目:** 全军“十一五”医药卫生科研基金课题(06H009);南京军区医药卫生科研基金课题(06MA051)

**作者简介:** 刘红娟(1984-),女,安徽桐城人,硕士研究生,医师,从事神经内科临床工作

**作者单位:** 230031 安徽合肥,安徽医科大学解放军临床学院(解放军 105 医院)神经内科

**通讯作者:** 汪青松, E-mail: wangqs65@yahoo.com

脑梗死已成为危害人类生命健康的危重病之一,且存在复发风险。有学者<sup>[1]</sup>认为其发病机制可能是环境因素和遗传因素共同作用的结果。载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, Apo E)是中枢神经系统中重要的载脂蛋白,其基因多态性与血脂水平密切相关,是目前的研究热点之一。国内外学者对 Apo E 基因多态性与脑梗死的关系进行了相关的研究,但目前仍存在争议。Jin 等<sup>[2]</sup>研究提示 Apo E $\epsilon$ 4 等位基因是脑梗死的遗传易感因子;而 Cerrato 等<sup>[3]</sup>研究认为 Apo E $\epsilon$ 4 等位基因与脑梗死无明显关系。

C 反应蛋白(C-reactive prorein, CRP)是人血清中非抗体性蛋白质,是一种独特的炎性标志物。有报道<sup>[4-5]</sup>指出血清 CRP 含量是判断急性脑梗死患者病情轻重的好指标。美国国立卫生院卒中量表(The National Institutes of Health Stroke Scale, NIH-SS)作为一种评价卒中患者神经功能缺损严重程度的量表,目前已得到广泛认可及应用。但对于 Apo E 基因型与 CRP 和 NIHSS 评分的相关研究甚少。为此我们采用多聚酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,对 108 例脑梗死患者和 76 例健康对照者进行了 Apo E 基因多态性分布的研究,以了解其与血清 CRP 含量和 NIHSS 评分的关系。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** ①脑梗死组:2009 年 10 月至 2011 年 1 月在我院神经内科住院的脑梗死 108 例,其中急性脑梗死 70 例,非急性脑梗死 38 例,男 59 例,女 49 例,年龄 25~89(66 $\pm$ 11)岁。均经头部 CT 和(或)MRI 证实。诊断符合全国第四届脑血管病会议修订的诊断标准<sup>[6]</sup>。排除心源性、动脉炎、脂肪栓子、药物、肿瘤等引起的脑梗死。②对照组:为正常体检者 76 例,其中男 40 例,女 36 例,年龄 24~86(63 $\pm$ 10)岁。均经过临床检查和(或)影像学检查排除脑血管病。健康者入选标准:既往身体健康,排除有阿尔茨海默病、脑血管病、心肝肾疾病、糖尿病、血液病、自身免疫性疾病、甲状腺疾病。以上两组年龄、性别无明显差异( $P>0.05$ )。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 所有被检查者均隔夜禁食 12 h,次日清晨抽取肘静脉血 10 ml,其中一部分血液标本用于生化检测,余加入 EDTA- $\text{Na}_2$  抗凝, -20℃ 保存,以备基因检测。所有研究对象采血前 1 周内均未服用降血脂和降血糖药物。

**1.2.2 Apo E 基因多态性的检测** 取空腹静脉血 2 ml,用 EDTA- $\text{Na}_2$  抗凝,应用 Takara DNA 提取试剂盒提取全血基因组 DNA。上游引物:5'-TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA-3',下游引物:5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A-3'。反应总体积为 25  $\mu$ l 进行 PCR 扩增。95℃ 预变性 5 min,然后按 95℃ 变性 30 min、65℃ 退火 30 min、72℃ 延伸 30min 的循环条件扩增 45 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物 5  $\mu$ l 经 2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外线凝胶成像仪下观察电泳结果。

**1.2.3 Apo E 基因型判定** 限制性内切酶酶切反应体系为 20  $\mu$ l,反应终止后取酶切产物于 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,并在紫外凝胶成像仪下观察结果并照相。参考标准物根据长度片段确定待测样品 Apo E 基因型。等位基因频率采用平衡法: $E_2 = \text{Apo E}2/2 + 1/2(\text{Apo E}2/3 + \text{Apo E}2/4)$ ;  $E_3 = \text{Apo E}3/3 + 1/2(\text{Apo E}2/3 + \text{Apo E}3/4)$ ;  $E_4 = \text{Apo E}4/4 + 1/2(\text{Apo E}3/4 + \text{Apo E}2/4)$ 。

**1.2.4 血脂测定** 由我院检验科采用日立 7600-120 全自动生化分析仪检测。

**1.3 NIHSS 评定** 由神经内科高年资住院医师和硕士研究生进行 NIHSS 评分,均经过统一培训,一致性检验达到 95%。在脑梗死患者入院时、入院 1 周时和 2 周时的 3 个时点分别进行。量表各条目均填写完整为合格量表。

**1.4 统计学处理** 全部数据应用 SPSS 13.0 软件包进行分析。Apo E 基因型分布及等位基因频率应用基因平衡法得出并通过  $\chi^2$  检验;按照 Hardy-Weinberg 平衡定律进行群体平衡验证;计量资料两组间均数比较采用  $t$  检验,两组以上均数比较采用单因素方差分析检验; $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Apo E 基因型、基因频率与脑梗死的关系** 两组人群 Apo E 基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡。脑梗死组与健康对照组中皆以  $\epsilon$ 3/3 型最常见,差异无统计学意义( $P>0.05$ );而脑梗死组  $\epsilon$ 2/2 基因型低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );在脑梗死中未发现  $\epsilon$ 2/4。两组  $\epsilon$ 3 基因频率均为最常见,差异无统计学意义( $P>0.05$ );脑梗死组  $\epsilon$ 2 基因频率(6.9%)明显低于健康对照组(19.1%,  $P<0.01$ );脑梗死组  $\epsilon$ 4 基因频率明显高于对照组( $P<0.05$ ,表 1)。

表 1 脑梗死组 and 对照组基因型分布和基因频率的比较		
指标	脑梗死组 (n = 108)	对照组 (n = 76)
基因型		
ε2/2	2 *	5
ε3/3	77	49
ε4/4	3	1
ε2/3	11 *	17
ε2/4	0	2
ε3/4	15 *	2
基因频率 (%)		
ε2	6.9 * *	19.1
ε3	83.3	77.0
ε4	9.7 *	3.9

注:与对照组比较, \* P < 0.05, \* \* P < 0.01

2.2 脑梗死组基因频率与 NIHSS 评分的关系  
Apo Eε2 携带者与非 Apo Eε2 携带者在入院时、入院 1 周时和 2 周时的 NIHSS 评分差异无统计学意义 (P > 0.05); Apo Eε4 携带者 NIHSS 评分明显高于

非携带者 (P < 0.05); 急性脑梗死患者中 Apo Eε2 携带者 NIHSS 评分低于非携带者, Apo Eε4 携带者 NIHSS 评分高于非携带者, 差异有统计学意义 (P < 0.05, 表 2)。

2.3 脑梗死组与对照组生化指标比较 脑梗死组具有明显的血脂代谢紊乱, TC、TG 和 LDL-C 水平显著高于对照组, HDL-C 显著低于对照组 (P < 0.05, 表 3)。

2.4 不同等位基因频率的急性和非急性脑梗死患者 CRP 的比较 不论是急性或非急性脑梗死患者, Apo Eε2 携带者与非 Apo Eε2 携带者在入院时的血清 CRP 含量无统计学差异 (P > 0.05), 且 Apo Eε2 携带的急性脑梗死患者和 Apo Eε2 携带的非急性脑梗死患者之间也无统计学差异 (P > 0.05); 急性脑梗死患者中 Apo Eε4 携带者血清 CRP 含量明显高于非 Apo Eε4 携带者和非急性脑梗死中 Apo Eε4 携带者 (P < 0.05, 表 4)。

表 2 不同等位基因频率的脑梗死患者 NIHSS 评分的比较 (x̄ ± s)

时间	ε2 携带者	非 ε2 携带者	ε4 携带者	非 ε4 携带者
入院时	9.00 ± 3.36	13.5 ± 9.56	18.3 ± 7.67 *	11.5 ± 9.08
入院 1 周时	4.43 ± 1.40	7.95 ± 6.34	12.0 ± 7.72 *	6.35 ± 4.88
入院 2 周时	3.42 ± 1.81	7.63 ± 5.79	11.5 ± 6.43 *	7.31 ± 5.48
急性脑梗死组	8.56 ± 2.34 *	13.9 ± 9.61	18.1 ± 6.67 *	11.1 ± 8.14

注:相同基因携带者与非携带者比较, \* P < 0.05

表 3 脑梗死组与对照组的生化指标比较 (mmol/L, x̄ ± s)

指标	脑梗死组 (n = 108)	对照组 (n = 76)
TG	1.65 ± 0.85 *	1.28 ± 0.58
TC	5.02 ± 1.30 *	4.66 ± 1.29
HDL-C	1.16 ± 0.38 *	1.38 ± 0.32
LDL-C	2.97 ± 1.03 *	2.47 ± 0.86
Glu	6.60 ± 2.51 *	5.07 ± 0.48

注:与对照组比较, \* P < 0.05

表 4 不同等位基因频率的脑梗死患者  
CRP 比较 (mg/L, x̄ ± s)

基因频率	急性脑梗死组		非急性脑梗死组	
	n	CRP	n	CRP
ε2 携带者	7	2.31 ± 0.62	6	1.86 ± 0.83
非 ε2 携带者	63	2.69 ± 1.00	32	1.84 ± 0.52
ε4 携带者	10	3.27 ± 1.31 * Δ	8	1.94 ± 0.96
非 ε4 携带者	60	2.18 ± 1.26	30	1.97 ± 0.45

注:与非急性脑梗死组比较, \* P < 0.05; 与非携带者比较, Δ P < 0.05

3 讨论

Apo E 结构基因位点存在多态性, 位于 19 号染色体长臂 13 区 2 带 (19q13, 2) 全长 3.7 kb, 含有 4 个外显子及 3 个内含子。Apo E 的合成是由位于一个基因位点上的三个等位基因所控制, 即 ε2、ε3 和 ε4, 每一个等位基因对应于一个主要异构体产生三种纯合子 (ε2/2, ε3/3, ε4/4) 和三种杂合子 (ε2/3, ε2/4, ε3/4) 共六种常见表型, Apo Eε3/3 型又称野生型, ε2 和 ε4 是由其变异得来<sup>[7]</sup>。它存在于血浆的乳糜微粒 (CM)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 及其残粒和 β-VLDL 中。Apo E 是 LDL-C 受体的配体, 也是肝细胞 CM 残粒受体的配体, 在调节脂质代谢、维持胆固醇平衡方面起着重要作用<sup>[8]</sup>, 在脑血管病的发生发展中占重要地位。本研究表明脑梗死组 TC、TG、LDL-C、血糖明显升高, 而 HDL-C 明显降低, 这些结果符合脑血管疾病的特点。

许多学者对脑血管疾病与 Apo E 基因多态性的关系进行了研究, 其结果存在分歧<sup>[9]</sup>。Apo E 基因

与 NIHSS 关系的研究报道也甚少。为此,本研究将脑梗死组和对照组混合,分为携带 Apo E $\epsilon$ 4 等位基因组和非  $\epsilon$ 4 携带等位基因组。研究显示 Apo E $\epsilon$ 4 等位基因脑梗死组明显高于对照组, Apo E $\epsilon$ 4 携带患者在入院时、1 周时和 2 周时的 NIHSS 评分均明显高于非 Apo E $\epsilon$ 4 携带者,急性脑梗死患者中 Apo E $\epsilon$ 4 携带者 NIHSS 评分明显高于非携带者。提示 Apo E $\epsilon$ 4 等位基因与脑梗死密切相关,为脑梗死的易感因子,与夏昱等<sup>[10]</sup>研究结果一致。有学者通过对脑梗死患者行 MRI 检查也发现卒中后 Apo E $\epsilon$ 4 等位基因携带者的脑组织损伤更严重<sup>[11]</sup>,也提示 Apo E $\epsilon$ 4 携带的脑梗死患者神经缺损严重,从而影响到神经功能的康复,导致致残率的增加。Apo E 是神经系统中髓鞘磷脂代谢重要因子,而髓鞘磷脂代谢与神经元损伤后的修复过程密切相关。缺血性及创伤性所致的神经变性和再生时,星形细胞或临近巨噬细胞释放 Apo E 量增加,促进胆固醇酯化从而为轴突膜的生长提供脂质,利于神经元的生长及神经树突重建。而这一作用被证实是 Apo E $\epsilon$ 3 单体特异性的,而 Apo E $\epsilon$ 4 却无此特异作用。故推测在脑梗死患者中 Apo E $\epsilon$ 4 的存在时,可能会加重神经变性或血管性原因造成的脑损伤修复困难,导致神经功能缺损程度更重。本研究表明:脑梗死组 Apo E $\epsilon$ 2 等位基因频率明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ),说明 Apo E $\epsilon$ 2 有可能是脑梗死的保护因子。何江等<sup>[12]</sup>认为 Apo E $\epsilon$ 2 对脑梗死的发生起一定保护作用,但也有研究表明其增加了患脑梗死的危险性<sup>[13]</sup>。研究结果出现差异可能由于种族、地域等方面差异或者样本量不足等原因引起。

CRP 是由肝脏合成,是人体非特异性炎症反应最敏感的指标之一。Terruzzi 等<sup>[14]</sup>通过对 648 例脑梗死患者入院 6 h 内测定 CRP 含量,发现血清 CRP 含量可能是脑梗死预后的预测因子。而目前 CRP 与 Apo E 基因频率关系的研究报道很少。为此,本研究把脑梗死患者分为急性期脑梗死组及非急性期脑梗死组,分别将 CRP 与 Apo E 基因的携带者和非携带者进行比较,结果显示 Apo E $\epsilon$ 4 携带的急性脑梗死患者血清 CRP 含量均高于 Apo E $\epsilon$ 4 携带的非急性脑梗死患者和非 Apo E $\epsilon$ 4 携带的急性脑梗死患者。Dziedzic 等<sup>[15]</sup>研究结果证实,脑卒中患者在脑局部缺血缺氧 2 h 后,脑组织就会出现病理性改变,直接导致炎性介质白细胞介素的释放,诱导 CRP 的产生。本研究结果提示:脑梗死患者 Apo E $\epsilon$ 4 基因频率与 CRP 水平存在相关性, Apo E $\epsilon$ 4 携带者的血清 CRP 含量可能会较高,非特异性炎症反

应重,预后差。脑梗死后炎症反应是否与遗传因素有关,尚需进一步研究。

本研究表明, Apo E 基因多态性与脑梗死发生和预后有关系, Apo E $\epsilon$ 4 等位基因是脑梗死的易感因子。因此,联合监测 Apo E 基因型、血清 CRP 含量和 NIHSS 评分,对判断的脑梗死预后有一定的意义。

## 【参考文献】

- [1] 王景华,宁亮嘉,卢红艳,等. 脑梗塞患者载脂蛋白 E 基因多态性特点研究[J]. 中国综合临床, 2006, 22(2): 118-120.
- [2] Jin ZQ, Fan YS, Ding J, et al. Association of apolipoprotein E4 polymorphism with cerebral infarction in Chinese Han population[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(3): 352-355.
- [3] Cerrato P, Baima C, Grasso M, et al. Apolipoprotein E polymorphism and stroke subtypes in an Italian cohort[J]. Cerebrovasc Dis, 2005, 20(4): 264-268.
- [4] Terruzzi A, Valente L, Mariani R, et al. C-reactive protein and aetiological subtypes of cerebral infarction[J]. Neurol Sci, 2008, 29(4): 245-249.
- [5] Kitagawa K. Cerebral vessel disease and inflammatory proofs[J]. Brain Nerve, 2009, 61(9): 1061-1068.
- [6] 卫生部疾病控制司, 中华医学会神经科分会. 中国脑血管病防治指南(节选)[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7(2): 200-209.
- [7] 刘学春, 汪青松. 载脂蛋白 E 基因多态性与神经系统疾病的研究进展[J]. 中国中医药咨讯, 2011, 10(3): 18-20.
- [8] 黄文, 谢鹏, 董为伟, 等. 脂代谢变化在老年人认知功能障碍发病中的作用[J]. 重庆医学, 2008, 37(16): 1782-1784.
- [9] Lai CL, Liu CK, Lin RT, et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with ischemic stroke subtypes in Taiwan[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2007, 23(10): 491-497.
- [10] 夏昱, 李红乐, 王继立. 载脂蛋白 E 多态性与脑梗死及脂类代谢关系的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(3): 131-132.
- [11] Liu Y, Laakso MP, Karonen JO, et al. Apolipoprotein E polymorphism and acute ischemic stroke: a diffusion and perfusion-weighted magnetic resonance imaging study[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(11): 1336-1342.
- [12] 何江, 桂俊豪, 余伍忠, 等. 乌鲁木齐市老年人群 Apo E 基因与脑梗死、心肌梗死关联性研究[J]. 中国医师杂志, 2004, (S1): 49-51.
- [13] 周正艳, 符喜南, 苏庆杰, 等. 海南黎族 Apo E 基因多态性与脑梗死的关系[J]. 重庆医学, 2009, 38(22): 2822-2824.
- [14] Terruzzi A, Valente L, Mariani R, et al. C-reactive protein and aetiological subtypes of cerebral infarction[J]. Neurol Sci, 2008, 29(4): 245-249.
- [15] Dziedzic T, Gryz EA, Turaj W, et al. Serum interleukin-6 soluble receptor in relation to interleukin-6 in stroke patients[J]. J Mol Neurosci, 2004, 24(2): 293-298.

(收稿日期: 2011-11-18; 修回日期: 2012-01-19)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)