

蒙古族人群载脂蛋白(a)五核苷酸重复序列基因多态性与脑梗死的关系*

周 静¹, 莫殿军² (1. 赤峰学院医学院; 2. 赤峰学院第一附属医院, 内蒙古赤峰 024000)

【摘要】 目的 研究载脂蛋白(a)[apo(a)]5'调控区(TTTTA)_n五核苷酸重复序列(PNR)基因多态性在内蒙古地区蒙古族脑梗死患者中的分布特点。**方法** 采用聚合酶链反应-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PCR-PAGE)方法检测 66 例蒙古族健康人群及 67 例蒙古族脑梗死患者的 apo(a)的 PNR 基因多态性。**结果** 脑梗死患者血浆脂蛋白(a)[Lp(a)]、三酰甘油(TG)水平明显高于健康对照组, 高密度脂蛋白-C(HDL-C)水平明显低于健康对照组; 脑梗死患者组检测出(TTTTA)序列重复次数为 5、8、9 共 3 种等位基因, 5/5、5/8、5/9、8/8、8/9、9/9 共 6 种基因型; 健康对照组检测出(TTTTA)序列重复次数为 5、7、8、9 共 4 种等位基因, 5/8、5/5、7/9、8/8、8/9、9/9 共 6 种基因型。两组人群均以重复次数为 8 和基因型 8/8 分布频率最高; 脑梗死组与健康对照组 apo(a)PNR 比较发现各等位基因及基因型频率间差异无统计学意义; 脑梗死组基因型 8/8 与 8/9 间的血浆 Lp(a)水平比较差异无统计学意义。**结论** 蒙古族人群 apo(a)PNR 基因多态性可能与脑梗死发生不存在直接的相关性。

【关键词】 载脂蛋白(a); 五核苷酸重复序列; 蒙古族; 脑梗死; 脂蛋白(a)

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 22. 006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)22-2949-03

Relationship between pentanucleotide repeat polymorphism of apolipoprotein(a) gene and cerebral infarction in Mongolian* ZHOU Jing¹, MO Dian-jun² (1. Medicine College of Chifeng University; 2. Affiliated Hospital of Chifeng University, Chifeng, Inner Mongolia 024000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between pentanucleotide repeat (PNR) polymorphism of apolipoprotein(a) gene and cerebral infarction in Mongolian. **Methods** PNR polymorphism of the apo(a) gene from 66 healthy persons and 67 patients with cerebral infarction were analyzed by polymerase chain reaction-polyacrylamide gel electrophoresis-silver stain(PCR-PAGE). **Results** The concentrations of Lp(a) and TG in cerebral infarction patients were significantly elevated compared with normal subjects. However, HDL-C was obviously decreased. In cerebral infarction patients, there were 3 alleles, which were 5, 8 and 9 repeats. Moreover, we detected 6 apo(a) PNR genotypes, which were 5/5, 5/8, 5/9, 8/8, 8/9 and 9/9. In control group, 4 alleles were detected, namely 5, 7, 8 and 9. At the same time, we found 6 genotypes, they were 5/8, 5/5, 7/9, 8/8, 8/9 and 9/9. Among them, 8 repeats and genotypes 8/8 had the highest distribution frequency. The frequency of apo(a) PNR alleles and genotypes had no significant difference between cerebral infarction patients and controls. **Conclusion** Perhaps, apo(a) PNR polymorphisms have no direct relationship with cerebral infarction in Mongolian.

【Key words】 apolipoprotein(a); pentanucleotide repeat; Mongolian; cerebral infarction; lipoprotein(a)

血浆脂蛋白(a)[Lp(a)]水平主要由载脂蛋白[apo(a)]基因决定, 且 apo(a)基因具有多态性, 其表型具有地区种族差异性, 受遗传基因控制, 每一个个体的基因型是终身固定的, 不会因身体状况而发生改变。研究发现, 位于 apo(a)基因启动子区域上游信号序列五核苷酸重复序列(PNR)的重复次数存在多态性, 国内外学者对 apo(a)的 PNR 基因多态性与脑梗死关系的研究结果并不一致。本研究旨在探讨 apo(a)的 PNR 基因多态性在蒙古族脑梗死患者中的分布情况及特点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择赤峰学院第一附属医院经头颅 CT 明确诊断为脑梗死的三代直系亲属均为蒙古族的患者(脑梗死组), 共 67 例, 平均年龄(56.87±12.06)岁。健康对照组选自在校蒙古族学生、中心血站正常献血蒙古族人员及医院体检未患动

脉粥样硬化、肝脏疾病、糖尿病及癌症的三代直系亲属也均为蒙古族的健康人群, 共 66 例, 平均年龄(30.20±6.87)岁。

1.2 方法

1.2.1 血脂水平的测定 采集清晨空腹受检者乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)抗凝静脉血 4 mL, 及时分离血浆, 密闭-20℃以下冰箱保存, 5 d 内进行检测。血浆 Lp(a)测定使用免疫透射比浊法, 用北京中生生物工程公司试剂盒。为确保测定结果可靠, 每批标本测定均做标准曲线, 同时做质控。血浆三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)测定选用酶学终点分析法。血浆高密度脂蛋白(HDL-C)采用磷钨酸-镁沉淀法进行测定, 血浆 LDL-C 采用聚乙烯硫酸盐沉淀法进行测定。

1.2.2 PCR 扩增 血细胞经过 0.2% 的氯化钠低渗溶液破碎红细胞后, 用北京百泰克生物技术有限公司的细胞/组织基因

* 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2010MS1115); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJ10243)。

组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。

引物设计参照 Hu 等^[1]设计,由北京三博远志生物技术有限责任公司合成,序列为:5'-GAA TTC ATT TGC GGA AAG ATT G-3'和 5'-CTT CAA CCG GGG TGA GAG TCT C-3'。特异性扩增 apo(a)5'端调控区信号密码子上游 1 373 bp 处的 (TTTTA)_n 五核苷酸串联重复序列。

PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 90 s;94 ℃ 变性 40 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,循环 35 次;72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。取产物 2.5 μL 经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,紫外灯下观察结果。

1.2.3 apo(a)PNR 基因多态性的检测 按照丙烯酰胺:N、N'-甲叉双丙烯酰胺 50:2.5 的比例配制 10% 的聚丙烯酰胺凝胶。150 V 预电泳 30 min,加样 1.5 μL 后再 150 V 于 4 ℃ 电泳 10 h。电泳结束后,凝胶首先在 10% 醋酸溶液中固定 10 min,蒸馏水冲洗 1~2 次后,于 0.2% 硝酸银溶液中染色 10 min,水洗 3~5 次,再于含有 0.4% 甲醛的 1.5% NaOH 溶液

中显色,最后用 0.75% 的 Na₂CO₃ 溶液终止。染色后的凝胶用 quantity one 软件分析各条带分子量。

1.2.4 DNA 序列测定 挑选 apo(a) (TTTTA) 串联重复序列数为 5、8、9 的各 2 个标本用 pGEM-T 载体克隆,送至北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

1.3 统计学处理 使用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,apo(a)PNR 等位基因和基因型频率采用基因计数法计算,组间比较采用 χ^2 检验,组间血脂水平及组内不同基因型血脂水平比较均采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组血脂水平比较 脑梗死组血浆 TG、Lp(a) 水平均明显高于健康对照组,而血浆 HDL-C 水平明显低于健康对照组。脑梗死组血脂水平异常率以 HDL-C 的 96.77% 最高,其次为 Lp(a) 的 80.65%。

表 1 健康对照组患者与脑梗死组患者血脂水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	Lp(a)(mg/L)
健康对照组	66	4.58±1.20	1.22±0.47	2.21±0.76	1.30±0.23	162.00±93.22
脑梗死组	67	4.65±1.26	1.76±1.01 [#]	2.31±0.82	0.95±0.18 [#]	254.97±137.06 [#]

注:与健康对照组比较,[#] *P* < 0.05。

2.2 PCR 扩增产物的检测 apo(a)5'端调控区信号密码子上游 1 373 bp 处的 (TTTTA)_n 五核苷酸串联重复序列 PCR 扩增产物经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。

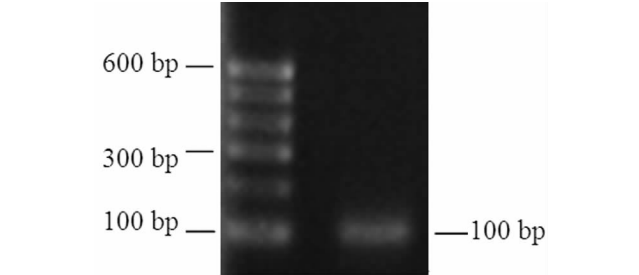


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测结果

2.3 等位基因与基因型频率分布 两组人群检测出 (TTT-TA) 重复次数为 5、7、8、9 共 4 种等位基因,对应 PCR 扩增产物的分子量分别为 81、91、96、101 bp,其中脑梗死组中检测出重复次数为 5、8、9 共 3 种等位基因,两组 apo(a)PNR 等位基因频率见表 2。

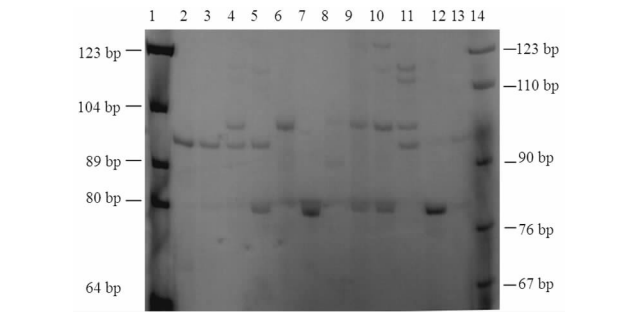
表 2 健康对照组与脑梗死组 apo(a)PNR 等位基因频率分布比较

组别	<i>n</i>	等位基因频率			
		5	7	8	9
健康对照组	66	0.045 5	0.015 2	0.712 1	0.227 3
脑梗死组	67	0.059 7	0.000 0	0.731 3	0.209 0

另外,两组人群检测出 5/8、5/9、5/5、7/9、8/8、8/9、9/9 共 7 种基因型,见图 2;两组 apo(a)PNR 基因型频率见表 3,均差异无统计学意义。

表 3 健康对照与脑梗死组 apo(a)PNR 基因型频率分布比较

组别	<i>n</i>	基因型频率						
		5/8	5/9	5/5	7/9	8/8	8/9	9/9
健康对照组	66	0.030 3	0.000 0	0.030 3	0.030 3	0.545 5	0.303 0	0.060 6
脑梗死组	67	0.074 6	0.014 9	0.014 9	0.000 0	0.582 0	0.223 9	0.089 6



注:1 表示 marker(PBR322/Hae III);2 表示 8/8;3 表示 8/8;4 表示 8/9;5 表示 5/8;6 表示 9/9;7 表示 5/5;8 表示 7/9;9 表示 5/9;10 表示 5/9;11 表示 8/9;12 表示 5/5;13 表示 5/8;14 表示 marker (PBR322/Msp I)。

图 2 apo(a)PNR 基因多态性图谱

脑梗死患者中 apo(a)PNR 中 8/8 与 8/9 基因型的平均血浆 Lp(a) 水平分别为 (255.93±140.68) mg/L 和 (198.40±101.82) mg/L,通过 *t* 检验比对发现差异无统计学意义,其他几种基因型病例数太少,因此未进行统计分析。

3 讨 论

本研究所测蒙古族脑梗死患者 Lp(a) 平均浓度为 (254.97±137.06) mg/L,这与胡波等^[2]测定的湖北地区汉族

动脉硬化性脑梗死患者 Lp(a) 的平均水平 (239.90 ± 225.40) mg/L 接近, 略低于刘晓宁等^[3]测定的 297.00 mg/L。本研究证明, 蒙古族脑梗死患者血浆 Lp(a) 浓度具有明显升高, 异常率也高达到 80.65%, 且血浆 Lp(a) 浓度几乎不受年龄、饮食、生活方式等因素的影响^[4], 这也进一步验证了血浆 Lp(a) 水平是蒙古族动脉粥样硬化患者的独立危险因素。

本次研究发现, 内蒙古地区蒙古族脑梗死患者共存在 3 种 apo(a) 5' 端 PNR 等位基因和 6 种基因型, 明显少于胡波等^[2]发现的湖北地区汉族脑梗死患者的 7 种等位基因和 11 种基因型, 更少于刘晓宁等^[3]发现的 8 种等位基因和 29 种基因型。出现这种现象的原因可能与 apo(a) 基因型分布具有地区、种族的差异有关, 也可能是因为那些基因型分布频率太低, 未能被发现^[4]。

本研究发现, 脑梗死患者各等位基因及基因型频率与健康对照组比较差异无统计学意义, 血浆 Lp(a) 水平明显增高。目前, 研究发现血浆 Lp(a) 水平主要受遗传因素调控, 且与 apo(a) 大小呈反比例关系^[5]。那么, 是否可以间接的说明在蒙古族人群中 apo(a) 5' 端 PNR 序列重复次数的多少与 apo(a) 的大小没有直接的关系呢? apo(a) 基因多态位点非常的多, 目前就已经发现了 34 个, 甚至 Anuurad 等^[6]研究还发现 apo E 的基因多态性也在影响着血浆 Lp(a) 的水平。那么 apo(a) 5' 端 PNR 序列在 apo(a) 的表达上, 甚至血浆 Lp(a) 的合成上究竟起到什么作用呢? 是否与其他多态性位点共同作用下, 完成对 apo(a) 表达的调控呢? 后续笔者准备利用 RNAi 技术, 将 PNR 序列沉默, 以了解其对 apo(a) 的大小、表达量和 Lp(a) 合成的影响。

脑梗死的发生与发展是遗传因素与环境因素共同作用的结果, 在本次研究中, 进一步验证了血浆 Lp(a) 水平是蒙古族

脑梗死患者的独立危险因素, 但蒙古族脑梗死患者 apo(a) 5' 端 PNR 基因多态性与健康对照人群差异无统计学意义, 可能是因为 apo(a) 5' 端 PNR 基因多态性与内蒙古地区蒙古族脑梗死发生无直接相关性。

参考文献

- [1] Hu B, Zhou X, Ye SX, et al. Expression of pentanucleotide repeat polymorphism of apolipoprotein(a) in Chinese Han and the association with coronary heart disease and serum lipid level[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2003, 7(21): 2899-2901.
- [2] 胡波, 周新, 李朝霞, 等. 湖北地区汉族人群动脉硬化性脑梗死与载脂蛋白(a) 5' 调控区 (TTTTA)_n 基因多态性的关系[J]. 中国临床康复, 2005, 9(5): 234-237.
- [3] 刘晓宁, 孙莉, 李昭晖, 等. 心肌梗死和脑梗死患者载脂蛋白 a 五核苷酸重复序列基因多态性与血浆脂蛋白(a) 水平的关系[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(20): 1396-1400.
- [4] 杨简, 涂玉林, 王佐. 脂蛋白(a) 与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(5): 472-476.
- [5] 张国忠, 张丽华, 杨长青. 血浆脂蛋白(a) 检测在肾脏疾病诊断中的应用[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(4): 246-247.
- [6] Anuurad E, Lu G, Rubin J, et al. ApoE genotype affects allele-specific apo(a) levels for large apo(a) sizes in African Americans; the Harlem-Basset Study[J]. J Lipid Res, 2007, 48(3): 693-695.

(收稿日期: 2013-04-09 修回日期: 2013-06-12)

(上接第 2948 页)

平可反映患者的心功能状态, 在 CABG 后的患者, 在早期由于经胸心脏彩超因气体阻挡、引流管、导线、输液管道等因素的限制, 而经食道超声由于气管插管、体位及手术后的应激状态等因素, 两者在评估冠状动脉搭桥手术后的 LVEF 及心脏功能状态存在较大的使用限制。特别是在危重患者, BNP 具有迅速反映心功能状态, 对评估围术期患者血流动力学状态、了解患者的预后、指导治疗方案的实施等均具有重要意义。目前有研究提示氨基末端前体 BNP (NT-proBNP) 与 BNP 在对心脏功能及术后房颤的评估方面均具有重要意义, 而 NT-proBNP 具有半衰期长、稳定性高的优点, 但在肾脏功能不全的患者中会影响其血浆水平, 值得进一步关注^[6-7]。

研究表明, 在临床工作中, 对 CABG 的患者进行动态 BNP 水平的检测, 可以即时了解患者血流动力学及心脏功能情况, 对患者的病情发展、指导治疗方案及预后评估具有重要意义。

参考文献

- [1] Nozohoor S, Nilsson J, Algotsson L, et al. Postoperative Increase in B-Type Natriuretic Peptide Levels Predicts Adverse Outcome After Cardiac Surgery[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2011, 25(3): 469-475.
- [2] Fellahi JL, Daccache G, Makroum Y. The prognostic value of B-type natriuretic peptide after cardiac surgery: a comparative study between coronary artery bypass graft surgery and aortic valve replacement[J]. J Cardiothorac Vasc

Anesth, 2012, 26(4): 624-630.

- [3] Turk T, Ata Y, Ay D. Plasma brain natriuretic Peptide after isolated on-pump coronary artery bypass grafting: prediction of postoperative adverse outcomes[J]. Heart Surg Forum, 2008, 11(2): E84-89.
- [4] Gibson PH, Croal BL, Cuthbertson BH. Use of preoperative natriuretic peptides and echocardiographic parameters in predicting new-onset atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting: a prospective comparative study[J]. Am Heart J, 2009, 158(2): 244-251.
- [5] Hutfless R, Kazanegra R, Madani M, et al. Utility of BNP in predicting postoperative complications and outcomes in patients undergoing heart surgery[J]. J Am Coll Cardio, 2004, 43(6): 1873-1879.
- [6] Leistner DM, Klotsche J, Pieper L. Prognostic value of NT-pro-BNP and hs-CRP for risk stratification in primary care: results from the population-based DETECT study[J]. Clin Res Cardiol, 2013, 102(4): 259-268.
- [7] Liang Y, Wang S, Gu M. Is NT-pro-BNP predictive of atrial fibrillation in patients undergoing coronary artery bypass surgery[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2010, 38(3): 389-390.

(收稿日期: 2013-05-05 修回日期: 2013-06-15)