

载脂蛋白 E 基因多态性与氟伐他汀降脂疗效的关系*

李卫宁, 夏勇[△], 徐安平(北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518036)

【摘要】 目的 研究载脂蛋白 E (ApoE) 基因多态性与氟伐他汀降脂疗效的关系。方法 运用等位基因特异性多重 PCR 技术, 对 93 例采用氟伐他汀治疗的高脂血症患者 ApoE 基因进行分型, 分析基因型与血脂水平及氟伐他汀降脂疗效的关系。结果 不同 ApoE 基因型总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 差异有统计学意义($\epsilon 4/3 > \epsilon 3/3 > \epsilon 3/2$, $P < 0.05$); 氟伐他汀治疗 12 周后(20 mg/d), $\epsilon 3/2$ 基因型个体较 $\epsilon 3/3$ 基因型个体 TC、LDL-C 水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ApoE 基因多态性与氟伐他汀降低 TC、LDL-C 的疗效相关。

【关键词】 载脂蛋白 E 类; 降血脂药; 氟伐他汀; 多态现象, 遗传; 高脂血症

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.18.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)18-2181-02

Relationship of apolipoprotein E gene polymorphisms with lipid-lowering effect of fluvastatin* LI Wei-ning, XIA Yong[△], XU An-ping (Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen, Guangdong 518036, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the relationship of apolipoprotein E (ApoE) gene polymorphism with the lipid-lowering effect of fluvastatin. **Methods** The multi-AMRS PCR method was used to detect the ApoE gene polymorphism in 93 hyperlipemia patients treated with fluvastatin. The relation of ApoE gene polymorphism with the lipid levels and the lipid-lowering effect of fluvastatin was analyzed. **Results** The TC and LDL-C levels in different genotype subgroups had statistical differences ($\epsilon 4/3 > \epsilon 3/3 > \epsilon 3/2$, $P < 0.05$); After 12-week treatment with fluvastatin 20 mg/d, the cases with $\epsilon 3/2$ genotype had a significantly greater reduction in TC and LDL-C levels compared to those with $\epsilon 3/3$ genotype ($P < 0.05$). **Conclusion** The ApoE polymorphism is associated with lowering TC and LDL-C levels by fluvastatin treatment.

【Key words】 apolipoproteins E; antilipemic agents; fluvastatin; polymorphism, genetic; hyperlipidemias

他汀类药物属 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 对降低血脂尤其是低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的作用显著, 作为 20 年来最成功的治疗动脉粥样硬化、冠心病的药物之一, 其降脂疗效、减少临床事件及不良反应均存在较大的个体差异^[1-2]。不断地遗传药理学研究发现, 脂代谢过程中相关基因多态性引起其表达的蛋白结构、功能改变, 是他汀类药物降脂疗效差异的重要来源^[3]。人类载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 基因具有显著遗传多态性, 位于第 19 号染色体长臂 13 区 2 带, 基因全长 3.7 kb, 包含 4 个外显子和 3 个内含子, 由单个碱基替换产生 ApoE 基因多态性。ApoE 有 3 种复等位共显性基因产生 6 种表型 ($\epsilon 2/2$ 、 $\epsilon 3/3$ 、 $\epsilon 4/4$ 、 $\epsilon 2/3$ 、 $\epsilon 2/4$ 、 $\epsilon 3/4$)。不同的 ApoE 基因型在 112 位和 158 位上半胱氨酸 (Cys) 和精氨酸 (Arg) 相互取代, 导致其与 LDL 受体结合的能力产生较大差异, 并进一步影响血脂代谢及其水平。本文旨在探讨 ApoE 基因多态性与氟伐他汀降脂疗效是否存在相关性。

1 资料与方法

1.1 标本来源 标本采自北京大学深圳医院门诊及住院的血脂异常患者 93 例, 其中男 51 例, 女 42 例, 年龄 (54.1 ± 10.3) 岁。均确诊为高脂血症, 诊断符合中华医学会心血管病学分会制定的《血脂异常防治建议》中的诊断治疗标准^[4], 且排除严重肝、肾功能损害, 未控制的糖尿病, 内分泌失调, 甲状腺疾病等。

1.2 仪器与试剂 聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪 (EPPENDORF 5331 型), 电泳仪 (WEALTEC 型), 凝胶成像仪

(Dovphin-COC 型)。PCR Master Mix (Fermentas 公司)、琼脂糖及其他试剂均为分析纯。Olympus AU5400 全自动生化分析仪及 Olympus 原装试剂、校准品和质控品。

1.3 检测指标 患者服用氟伐他汀 (商品名: 来适可, 北京诺华制药有限公司产品) 20 mg, 每晚 1 次, 连续服用 12 周, 服药期间仍维持低脂饮食。于服药前、服药后第 12 周末分别空腹 8~12 h 采血测定血脂。

1.4 方法

1.4.1 DNA 提取 采用改良碘化钾法从外周血 (乙二胺四乙酸二钾抗凝) 提取基因组 DNA 作为模板。

1.4.2 ApoE 基因型检测 采用等位基因特异性多重 PCR 技术对 ApoE 基因进行分型, 引物设计及基因型判定参见本文作者前期研究^[5], 由上海生工生物工程公司合成。序列为 P1: 5'-ATG CCG ATG ACC TGC AGA ATT-3', P2: 5'-ATG CCG ATG ACC TGC AGA ATC-3', 分别检测 158 位的 Cys 和 Arg; P3: 5'-CGC GGA CAT GGA GGA CGT TT-3', P4: 5'-CGC GGA CAT GGA GGA CGT TC-3', 分别检测 112 位的 Cys 和 Arg; P5: 5'-GTT CAG TGA TTG TCG CTG GGC A-3', 为公共引物。P1、P2 与 P5 间扩增片段大小为 451 bp, P3、P4 与 P5 间扩增片段大小为 588 bp。反应体系: 总体积为 25 mL, 每个样本分为 A 管和 B 管, 每管均含 2 × PCR Master Mix 12.5 mL 和 20 pmol P5, 其中 A 管加入 P1 15 pmol, P3 10 pmol; B 管加入 P2 15 pmol, P4 10 pmol。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 然后按 95 °C 45 s, 62 °C 45 s, 72 °C 45 s, 循环 35

次,末次循环后 72 °C 延伸 5 min,产物经含溴化乙锭的 1%琼脂糖电泳。

1.4.3 血脂检测 酶法测定总胆固醇(TC),选择遮蔽法直接测定高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。以上测定均在 Olympus AU5400 全自动生化分析仪上进行,每次测定用高、低质控样品进行质控。TC、三酰甘油(TG)、HDL-C、LDL-C 测定采用 Olympus 原装试剂。

1.5 统计学处理 组间血脂水平比较采用两两比较 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氟伐他汀治疗前不同 ApoE 基因型血脂水平比较 本研究高脂血症人群中,不同 ApoE 基因型(未见 $\epsilon 2/2$ 、 $\epsilon 4/2$ 、 $\epsilon 4/4$ 型)TC、LDL-C 差异有统计学意义($P < 0.05$): $4/3 > \epsilon 3/3 > \epsilon 3/2$ (单侧),结果见表 1。其他血脂项目差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 氟伐他汀治疗前不同 ApoE 基因型血脂水平比较($\bar{x} \pm s$)

血脂指标 (mmol/L)	全体 (n=93)	$\epsilon 3/2$ (n=11)	$\epsilon 3/3$ (n=59)	$\epsilon 4/3$ (n=23)
TC	6.37±0.88	5.77±0.79*	6.35±0.87	6.93±0.79**
TG	2.87±0.89	2.72±0.68	2.83±0.92	3.04±0.82
HDL-C	1.03±0.32	1.02±0.30	1.04±0.30	1.00±0.36
LDL-C	4.93±0.83	4.32±0.61*	4.90±0.81	5.37±0.83**

注:与 $\epsilon 3/3$ 基因型比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

2.2 ApoE 基因多态性与氟伐他汀药物疗效的关系 见表 2。氟伐他汀治疗 12 周后,比较不同 ApoE 基因型个体血脂水平的变化(未见 $\epsilon 2/2$ 、 $\epsilon 4/2$ 、 $\epsilon 4/4$ 型), $\epsilon 3/2$ 基因型较 $\epsilon 3/3$ 基因型个体 TC、LDL-C 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 $\epsilon 4/3$ 基因型较 $\epsilon 3/3$ 基因型血脂水平变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 氟伐他汀治疗后不同 ApoE 基因型血脂水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

血脂指标 (mmol/L)	全体 (n=93)	$\epsilon 3/2$ (n=11)	$\epsilon 3/3$ (n=59)	$\epsilon 4/3$ (n=23)
TC	-1.68±0.59	-2.07±0.56*	-1.67±0.64	-1.73±0.69
TG	-0.36±0.24	-0.29±0.12	-0.37±0.21	-0.27±0.18
HDL-C	0.17±0.13	0.10±0.14	0.18±0.13	0.17±0.23
LDL-C	-1.42±0.39	-1.69±0.47*	-1.39±0.49	-1.41±0.51

注:与 $\epsilon 3/3$ 基因型比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

HMG-CoA 还原酶是内源性胆固醇合成的限速酶,它在调控胆固醇代谢中起着重要作用,他汀类药物通过抑制 HMG-CoA 还原酶的活性来降低 TC、LDL-C 水平^[6]。近年来研究表明,参与他汀类代谢的酶、转运蛋白、受体、他汀类作用的靶蛋白和参与脂代谢的蛋白由于基因变异,可能引起其表达的蛋白

功能改变,最终导致机体对相同浓度药物的反应性改变。

本研究选取具有明显遗传多态性,且对血脂代谢起重要调节作用的配体和结构功能蛋白 ApoE 进行研究,探讨其基因多态性是否与氟伐他汀降脂疗效存在相关性。研究结果表明,不同 ApoE 基因型 TC、LDL-C 差异具有统计学意义($\epsilon 4/3 > \epsilon 3/3 > \epsilon 3/2$, $P < 0.05$);氟伐他汀治疗 12 周后,ApoE 的 $\epsilon 3/2$ 基因型患者 TC、LDL-C 下降幅度明显大于 $\epsilon 3/3$ 基因型患者($P < 0.05$),而 ApoE 的 $\epsilon 4/3$ 基因型患者与 $\epsilon 3/3$ 基因型患者的 TC、LDL-C 水平下降差异无统计学意义($P > 0.05$)。其可能机制是由于 ApoE2 与脂蛋白受体结合的能力低下,引起乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)残粒分解代谢延缓,造成这些残粒在体内蓄积;同时也因中间密度脂蛋白(IDL)向 LDL 转化减少,造成血浆中 IDL 浓度增加和 LDL 浓度低下。这些改变使 CM 和 VLDL 残粒进入肝细胞内代谢减少,肝细胞内游离胆固醇含量减少,反馈调节性地引起肝细胞表面的 LDL 受体上调(数目增加)及 HMG-CoA 还原酶活性升高^[7],故而对 he 汀类药物表现出更好的疗效。但在 ApoE 的 $\epsilon 4/3$ 基因型患者中并未发现与 $\epsilon 3/2$ 基因型相反的结论,可能是由于在 $\epsilon 4$ 等位基因与 $\epsilon 2$ 等位基因比较有相对较弱的效能和复杂的脂质代谢过程中,其他环境因素或基因位点影响所致。

ApoE 基因多态性可导致 TC、LDL-C 水平产生差异,并对氟伐他汀的降脂疗效产生影响,推测 ApoE 基因多态性可能是高脂血症患者中 he 汀类药物降脂效应个体化差异的标记物之一。

参考文献

- [1] 熊富权. 他汀类药物对冠心病的治疗和预防研究进展[J]. 吉林医学,2011,21(7):1375-1378.
- [2] 孟锐,靳维华. 他汀类药物临床研究进展[J]. 中国现代医药杂志,2011,13(1):130-132.
- [3] Schmitz G, Langmann T. Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy[J]. Vascul Pharmacol, 2006, 44(2): 75-89.
- [4] 方圻,王钟林,宁田海,等. 血脂异常防治建议[J]. 中华心血管病杂志,1997,25(3):169-175.
- [5] 夏勇,周新,郑芳,等. 等位基因特异性多重聚合酶链反应技术对载脂蛋白 E 基因多态性检测的评价[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(7):447-448.
- [6] 王雅琼,高平进. 他汀类药物的血管保护作用[J]. 临床合理用药杂志,2011,28(1):18-20.
- [7] Boerwinkle E, Utermann G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism[J]. Am J Hum Genet. 1988,42(1):104-112.

(收稿日期:2011-03-17)

(上接第 2180 页)

- [3] 李胜发,程大林. 血小板可逆聚集在全血细胞分析中的影响[J]. 临床检验杂志,2003,21(1):37-38.
- [4] Tablinf F, Wolkers WF, Walker NJ, et al. Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets[J]. Cyobiology, 2001, 43(2): 114-123.

- [5] 汪亚凤. 血细胞计数时血液标本的放置时间对血小板结果的影响[J]. 中国保健,2008,16(6):261.
- [6] 俞胜琴. 血液标本采集后放置时间对血常规测定的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2003,12(24):2699.
- [7] 吴鹏,陈进,李艳. 异常血常规标本存放时间对检测结果的影响[J]. 四川医学,2004,15,25(6): 625-626.

(收稿日期:2011-03-16)