

载脂蛋白 E 基因多态性对高脂血症痰瘀互阻证患者 血脂浓度及应证方药调脂疗效的影响

赵丹丹¹ 杨惠民² 宋剑南¹ 金 红¹ 牛晓红¹ 陈 冰¹

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京市东城区东直门内南小街16号, 100700; 2. 北京中医药大学东直门医院)

[摘要] **目的** 探讨中国北方汉族人群载脂蛋白 E 基因多态性对高脂血症痰瘀互阻证血脂浓度及应证方药(调脂通脉颗粒)调脂疗效的影响。**方法** 172例高脂血症痰瘀互阻证患者随机分为治疗组(调脂通脉颗粒)和对照组(血脂康胶囊), 观察症状、体征(证候积分)和血脂浓度的变化, 应用 PCR-RFLP 技术进行 ApoE 基因型测定。**结果** 调脂通脉颗粒调脂疗效与血脂康相当, 两组差异无显著性意义($P>0.05$), 但在证候积分改善上治疗组显著优于对照组($P<0.01$); 携带 ApoE E3/3和 E3/4基因型高脂血症痰瘀互阻证患者的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)浓度明显高于 E2/3基因型者($P<0.05$ 或 $P<0.01$); E3/4型患者对应证方药在 LDL-C 浓度的改善上较 E2/3和 E3/3型明显($P<0.01$)。**结论** 高脂血症痰瘀互阻证患者 ApoE 基因第4外显子不同基因型个体对应证方药调脂作用的敏感性不同, 表明遗传因素在其中发挥着重要作用。

[关键词] 载脂蛋白 E; 基因多态性; 高脂血症; 痰瘀互阻证

Effect of Apolipoprotein E Gene Polymorphism on Serum Concentration of Lipids and Lipid-Adjusting Effect of Correspond Medicine in Hyperlipidemia Patients with Phlegm and Blood Stasis Syndrome

ZHAO Dan-dan¹, YANG Hui-min², SONG Jian-nan¹, et al.

(1. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of TCM, Beijing)

ABSTRACT **Objective** To explore the effects of apolipoprotein E gene polymorphism on serum concentration of lipids and lipid-adjusting effect of correspond medicine in hyperlipidemia patients with phlegm and blood stasis syndrome in the Han nationality in north china. **Methods** Totally 172 cases of hyperlipidemia patients with phlegm and blood stasis syndrome were randomly divided into observation group($n=87$) and control group($n=85$). The observation group was treated by Tiaozhi Tongmai Granule. The control group was treated by Xuezhikang Capsule. Clinical symptom and serum concentration of lipid were observed before and after treatment. Using PCR-RFLP methods, we analyzed the forth exon genotypes of ApoE gene in 172 cases. **Results** In hyperlipidemia patients with phlegm and blood stasis syndrome, serum concentration of lipid in observation group and control group were greatly improved after treatment. The total effective rate of observation group was superior to that of control group($P<0.01$). Before treatment, serum LDL-C concentration of ApoE E3/3 and E3/4 genotype was significantly higher than that of the E2/3 ($P<0.05\sim 0.01$). The serum LDL-C concentration of E3/4 genotype was more significantly improved than that of the E2/3 and E3/3 genotype ($P<0.01$). **Conclusion** Sensitivity of lipid-adjusting effect of correspond medicine differed due to different ApoE genotype in hyperlipidemia patients with phlegm and blood stasis syndrome, indicated that heredity factor plays an important role.

Key Words Apolipoprotein E; Gene Polymorphism; Hyperlipidemia; Phlegm and Blood Stasis Syndrome

高脂血症(Hyperlipidemia)是一种多基因多因素病症,主要表现为血脂代谢异常,与多系统多种疾病密切相关^[1~3],调脂通脉颗粒具有益气活血化痰作用,能有效地治疗高脂血症痰瘀互阻证患者^[4]。载脂蛋白(Apo)是血浆脂蛋白的蛋白质成分,是决定脂蛋白结构、功能和代谢的核心组分,其基因多态性是影响脂代谢的重要遗传因素。已有报道,载脂蛋白 E 基因第四外显子多态性与血脂代谢尤其是低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)代谢密切相关^[5~7]。本研究通过检测172例高脂血症痰瘀互阻证患者 ApoE 基因型

及其治疗前后的症状、体征和血脂浓度的变化,探讨载脂蛋白 E 基因多态性对高脂血症痰瘀互阻证血脂浓度及应证方药(调脂通脉颗粒)调脂疗效的影响。

1 临床资料

1.1 诊断标准

参照卫生部2002年制定的《中药新药临床研究指导原则》^[8]中高脂血症诊断标准和《中医内科学》^[9]制订的中医痰瘀互阻证主证、次证的量化及证候诊断标准。主证:形体肥胖,头重如裹,胸闷,心前区刺痛,肢麻沉重,舌质暗有瘀斑,苔滑腻,脉滑或沉涩;次证:食少,心悸,失眠,口淡。主证按无、轻、中、重分别计为0、2、4、6分;次证按无、轻、中、重分别计为0、1、2、3分;舌脉按无、有分别计为0、1分。

1.2 纳入标准

符合高脂血症和中医痰瘀证候诊断标准的原发性高脂血症患者,均为汉族,中国北方居民,并签署知情同意书者。

1.3 排除标准

半年内曾患急性心肌梗死、脑血管意外、严重创伤或重大手术患者;继发性高脂血症者;由药物(吩噻嗪类、 β 受体阻滞剂、肾上腺皮质类固醇激素及某些避孕药等)引起的高脂血症患者;正在使用肝素、甲状腺素治疗药和其他影响血脂代谢药物的患者;近两周曾采用其他降脂措施的患者;合并肝、肾和造血系统等严重原发性疾病及精神病患者;服药期间发生严重不良反应或过敏反应,不具临床价值者。

1.4 一般资料

选择2004年4月~2006年12月在北京中医药大学东直门医院和中国中医科学院广安门医院、西苑医院就诊的高脂血症痰瘀互阻证患者,共纳入172例,其中男性78例,女性94例,平均(56.92 $\pm$ 7.84)岁。随机分为治疗组87例,男性42例,女性45例,平均(58.54 $\pm$ 6.85)岁,体重指数(25.48 $\pm$ 2.99) kg/m², TC、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、LDL-C、载脂蛋白A(ApoA)、载脂蛋白B(ApoB)浓度分别是(5.60 $\pm$ 1.01) mmol/L、(2.91 $\pm$ 1.96) mmol/L、(1.14 $\pm$ 0.28) mmol/L、(3.35 $\pm$ 0.98) mmol/L、(1.35 $\pm$ 0.23) g/L、(1.18 $\pm$ 0.26) g/L,中医证候积分(16.74 $\pm$ 5.53)分;对照组85例,男性36例,女性49例,平均(58.59 $\pm$ 6.27)岁,体重指数(25.68 $\pm$ 3.49),血中TC、TG、HDL-C、LDL-C、ApoA、ApoB浓度分别是(5.63 $\pm$ 1.00) mmol/L、(2.73 $\pm$ 2.00) mmol/L、(1.17 $\pm$ 0.27) mmol/L、(3.52 $\pm$ 0.80) mmol/L、(1.32 $\pm$ 0.23) g/L、(1.23 $\pm$ 0.21) g/L,中医证候积分(15.75 $\pm$ 5.02)分。两组具有可比性。

2 材料与方法

2.1 材料

全血DNA纯化试剂盒、dNTPs、限制性内切酶HhaI及30%丙烯酰胺(promega,美国);寡核苷酸引物(华美生物工程公司合成,北京);Taq DNA聚合酶(华美生物工程公司,北京);PBR322DNA/HaeIII分子量标准(promega,美国)。引物设计参考文献[10], ApoE上游引物为5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3',下游引物为5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3'。调脂通脉颗粒由北京中医药大学东直门医院制剂室提供[(98)京卫药制字(052)第F-1266号,12g/袋]。药物组成:半夏、陈皮、太

子参、丹参、决明子、泽泻、水蛭、大黄等。血脂康胶囊由北京北大维信生物科技有限公司生产。调脂通脉颗粒模拟剂和血脂康胶囊模拟剂均由北京中医药大学实验药厂提供。

2.2 服药方法

采用随机区组、双盲、双模拟、阳性药物平行对照原则。治疗组给予调脂通脉颗粒,每次1袋,每日2次口服,血脂康胶囊模拟剂,每次2粒,每日2次口服;对照组予血脂康胶囊,每次2粒,每日2次口服,调脂通脉颗粒模拟剂,每次1袋,每日2次口服。疗程为1个月。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 ApoE基因分型及基因序列的测定 研究对象抽血前禁食12~14小时,采集外周静脉血2ml, EDTA抗凝,使用全血DNA纯化试剂盒提取基因组DNA, -20℃保存用于基因型分析。ApoE基因目的片段的扩增:ApoE基因第四外显子(包括393T/C和4075C/T两个位点)特定片段聚合酶链式反应(PCR)总反应体系为50 μ l,含10倍缓冲液5 μ l, Mg²⁺ 3 μ l, dNTP 4 μ l (10mmol/ μ l),正、反向引物各2.5 μ l (10 pmol/ μ l),全血基因组DNA 4 μ l (50~100 ng/ μ l), TaqDNA聚合酶2U,灭菌双蒸水22 μ l。扩增条件:96℃预变性10分钟;按95℃变性40秒、61℃退火40秒、70℃延伸60秒,循环30次,末次循环后72℃延伸5分钟。取PCR扩增产物15 μ l,加10倍缓冲2 μ l, 100 $\times$ BSA 0.2 μ l, HhaI内切酶1.0 μ l,灭菌双蒸水1.8 μ l。总体积分别为20 μ l。37℃水浴过夜。15%PAGE分离酶切产物,溴化乙啶(ethidium bromide, EB)染色30~40分钟,紫外灯下照相记录并保存。随机选取各基因型的PCR产物,由北京鼎国生物技术有限公司进行基因序列测定。

2.3.2 中医高脂血症痰瘀互阻证证候积分 治疗前后各记录1次证候积分。

2.3.3 治疗前后血脂检测 包括血清TC、TG、HDL-C、LDL-C、ApoA、ApoB的浓度,测定由北京中医药大学东直门医院生化室完成。

2.4 统计学方法

采用SPSS 11.0软件包分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料两组间比较采用 t 检验,两组以上采用单因素方差分析(one-way ANOVA);方差不齐采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

3 结果

3.1 疗效判定标准

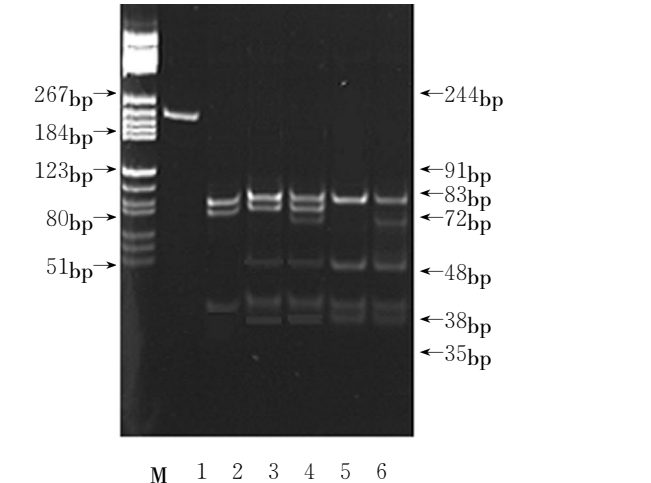
3.1.1 调脂疗效判定标准 临床控制:各项检查恢复正常;显效:血脂检测达到以下任一项者,TC下降

20%、TG 下降40%、HDL-C 上升0.26mmol/L、TC－HDL-C/HDL-C 下降20%；有效：血脂检测达到以下任一项者，TC 下降10%～20%、TG 下降20%～40%、HDL-C 上升0.104mmol/L 但小于0.26mmol/L、TC－HDL-C/HDL-C 下降10%～20%；无效：血脂检测未达到以上标准者。

3.1.2 中医临床疗效判定标准 临床控制：临床症状、体征消失或基本消失，证候积分减少≥95%；显效：临床症状、体征明显改善，证候积分减少≥70%但<95%；有效：临床症状、体征均有好转，证候积分减少≥30%但<70%；无效：临床症状、体征无明显改善，甚或加重，证候积分减少<30%。

3.2 ApoE 基因分型及基因序列测定结果

ApoE 扩增产物经 HhaI 消化后，出现6种片段长度的组合，E2/2型含有91bp、83bp 和38bp 3个片段；E2/3型含有91bp、83bp、48bp、38bp 和35bp 5个片段；E2/4型含有91bp、83bp、72bp、48bp、38bp、35bp 和19bp 7个片段；E3/3型含有91bp、48bp、38bp 和35bp 4个片段；E3/4型含有91bp、72bp、48bp、38bp、35bp 和19bp 6个片段；E4/4型含有72bp、48bp、38bp、35bp 和



附图 ApoE 基因目的片段 PCR 扩增产物及 HhaI 酶切电泳图
M：PBR322DNA/Hae III marker；
line 1:PCR 产物；line 2:E2/2基因型；line 3:E2/3基因型
line 4:E2/4基因型；line 5:E3/3基因型；line 6:E3/4基因型
19bp 5个片段，本实验未检测出 E4/4基因型。由于19bp 的核酸序列太短，电泳之后未能在凝胶上显示，但并不

影响基因型的判定(见附图) 。ApoE 基因第四外显子不同基因型的5' 端正向测序结果显示，与 GeneBank 中已知的对应部分序列进行比对，多态性位点碱基吻合，分型结果准确。

3.3 两组调脂疗效和临床疗效比较

表1示，治疗组有较好的调脂疗效，与对照组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。表2示，治疗组对中医证候积分改善方面明显优于对照组($P<0.01$)。

表1 两组调脂疗效比较[例(%)]

组别	例数	显效	有效	无效	总有效
治疗组	87	37(42.53)	32(36.78)	18(20.69)	69(79.31)
对照组	85	44(51.76)	24(28.24)	17(20.00)	68(80.00)

表2 两组中医临床疗效比较[例(%)]

组别	例数	临床控制	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	87	6(6.90)	39(44.83)	41(47.12)	1(1.15)	86(98.85) *
对照组	85	2(2.35)	8(9.42)	64(75.29)	11(12.94)	74(87.06)

与对照组比较，* $P<0.01$

3.4 ApoE 基因多态性对高脂血症痰瘀互阻证患者血脂浓度的影响

表3示，对172例高脂血症痰瘀互阻证患者 ApoE 基因第四外显子不同基因型(E2/3、E3/3和E3/4) 血脂浓度关系进行比较，(E2/2型仅1例，E2/4型仅2例，无法进行比较分析) 。结果发现，携带 E3/3和 E3/4基因型患者 LDL-C 浓度明显高于 E2/3基因型者($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，同时 E3/4基因型患者 ApoB 水平也明显高于 E2/3型者($P<0.05$)。

3.5 治疗组 ApoE 基因第四外显子不同基因型治疗前后血脂浓度及比值的比较

表4示，携带 E2/3基因型患者的 HDL-C 浓度较治疗前有明显提高($P<0.05$)；而携带 E3/3和 E3/4基因型患者的 TC、TG、LDL-C 和 ApoB 浓度较疗前均有显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。携带 E2/3基因型患者的 HDL-C 浓度较疗前明显升高，差异有显著性意义($P<0.05$)。3种不同基因型间疗效比较结果显示，应证方药对携带 E3/3和 E3/4基因型患者的 LDL-C 浓度的调脂作用显著高于 E2/3型患者($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表3 治疗前 ApoE 基因第四外显子不同基因型血脂浓度比较($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	ApoA(g/L)	ApoB(g/L)
E2/3	18	5.48±1.36	3.13±1.44	1.12±0.21	2.80±0.76	1.36±0.25	1.09±0.18
E3/3	124	5.66±0.98	2.80±2.10	1.17±0.29	3.49±0.79 *	1.33±0.23	1.15±0.21
E3/4	27	5.45±0.90	2.36±0.96	1.12±0.27	3.53±0.90 **	1.53±0.24	1.24±0.24 *

与 E2/3组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

表4 治疗组 ApoE 基因第四外显子不同基因型治疗前后血脂浓度及比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	ApoA (g/L)	ApoB (g/L)
E2/3	治疗前	10	5.08±0.64	2.69±0.75	1.11±0.21	2.64±0.73	1.35±0.28	1.02±0.11
	治疗后	10	4.89±0.82	2.25±0.71	1.21±0.21*	2.65±0.87	1.34±0.27	1.01±0.22
	比值	10	1.06±0.17	1.27±0.45	0.92±0.11	1.03±0.18△	1.01±0.12	1.04±0.17
E3/3	治疗前	60	5.75±1.05	3.08±2.22	1.16±0.29	3.45±1.02	1.37±0.24	1.23±0.27
	治疗后	60	5.05±1.04**	2.54±1.68*	1.13±0.27	3.03±0.83**	1.35±0.24	1.14±0.27**
	比值	60	1.16±0.20	1.32±0.20	1.03±0.20	1.16±0.29△	1.03±0.18	1.10±0.22
E3/4	治疗前	16	5.32±0.94	2.23±0.93	1.07±0.28	3.53±0.73	1.27±0.15	1.13±0.24
	治疗后	16	4.54±0.61**	1.79±1.23*	1.08±0.32	2.57±0.62**	1.27±0.16	0.98±0.23**
	比值	16	1.18±0.21	1.55±0.91	1.00±0.06	1.42±0.38	1.00±0.07	1.18±0.25

与本组治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与E3/4基因型组比值比较,△ $P<0.01$

4 讨论

高脂血症属于中医“痰浊”、“血瘀”范畴。本研究所用应证方药调脂通脉颗粒以补而不燥之太子参益气健脾,使血中“膏”、“脂”得以正常运化,血液运行正常则痰、瘀可除。同时方中以半夏、陈皮健脾燥湿化痰,丹参活血化瘀,决明子利水、通便,水蛭破血、逐瘀、通经,大黄除湿降浊,全方合用具有益气活血化痰、除湿祛浊之效,对高脂血症痰瘀互阻证临床疗效显著^[4]。本研究结果表明,在控制了性别、年龄、血脂浓度和中医证候积分等发病诱因的情况下,调脂通脉颗粒对高脂血症痰瘀互阻证的临床疗效显著优于对照药物血脂康,表明复方中药在整体效应上具有明显优势。

既往研究证实,高脂血症及动脉粥样硬化不同痰瘀证候的发生与脂代谢密切相关的ApoE不同基因型有一定的关联^[11,12]。本研究结果证实,载脂蛋白E不同基因型对高脂血症痰瘀互阻证患者的血脂浓度具有不同的影响,且对调脂通脉颗粒的调脂疗效的影响差异也有显著性意义,表明同一方药对同一证型血脂异常患者的药物敏感性存在明显的个体差异,提示遗传因素发挥着重要作用。因此,在同病同证条件下,使用应证方药治疗仍会出现较大个体差异的事实,给了我们一个启示,即除了“异病同治”和“同病异治”以外,尚应注意针对禀赋差异施以“同证异治”,对此有待深入研究。本研究结果为深化个体化治疗的内涵提供了较好的理论和实验证据。

参考文献

[1]Borgel J, Sanner BM, Bittlinsky A, et al. Obstructive sleep apnoea and its therapy influence high-density lipoprotein cholesterol serum levels. Eur Respir J, 2006, 27 (1) : 121~127.

[2]Siagris D, Christofidou M, Theocharis GJ. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. J Viral Hepat, 2006, 13 (1) : 56~61.

[3]Troster AI, Fields JA, Paolo AM, et al. Absence of the

apolipoprotein E epsilon⁴ allele is associated with working memory impairment in Parkinson's disease. J Neurol Sci, 2006, 248(1-2) : 62~67.

[4]杨惠民,盛彤,韩丽蓓,等.调脂通脉颗粒治疗老年高脂血症痰瘀证的临床研究.中华中医药杂志,2005,20(4) : 247~248.

[5]Nghiem NT, Ta TT, Ohmori R, et al. Apolipoprotein E polymorphism in Vietnamese children and its relationship to plasma lipid and lipoprotein levels. Metabolism, 2004, 53 (12) : 1517~1521.

[6]Yang SL, He BX, Liu HL, et al. Apolipoprotein E gene polymorphisms and risk for coronary artery disease in Chinese Xinjiang Uygur and Han population. Chin Med Sci, 2004, 19(2) : 150~154.

[7]Tan CE, Tai ES, Tan CS, et al. APOE polymorphism and lipid profile in three ethnic groups in the Singapore population. Atherosclerosis, 2003, 170(2) : 253~260.

[8]郑筱萸主编.中药新药临床研究指导原则.北京:中国医药科技出版社,2002:85~89.

[9]张伯炎主编.中医内科学.北京:科学技术文献出版社,2002:75~80.

[10]Emi M, Wu LL, Robertson MA, et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. Genomics, 1988, 3(4) : 373~379.

[11]宋剑南,陈皋.论载脂蛋白E及其基因多态性与中医痰瘀证候的关系.中国中医基础医学杂志,2002,8(12) : 13~15.

[12]李林,李晓冬,宋剑南,等.应用匹配矩阵、因子分析和聚类分析法研究冠心病痰瘀证候特征.中西医结合学报,2006,4(4) : 343~347.

(收稿日期:2007-04-09;修回日期:2007-06-08)

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的质量要求生产,符合药用各项指标,有0号、1号、2号等型号,多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎需要的单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务。价格:每万粒135元(含邮资)。

地址:浙江省新昌县一诺胶丸有限公司,电话:(0575)86081888,013706852676,邮编:312566。

联系人:潘炎锋