

载脂蛋白 E 基因多态性与芪参益气滴丸治疗 气虚血瘀型冠心病的关系

赵广荣¹ 肖敏¹ 李欲来² 张军平²

(1. 天津大学化工学院制药工程系, 天津市南开区卫津路 92 号, 300072; 2. 天津中医药大学)

[摘要] 目的 探讨载脂蛋白 E(ApoE)基因多态性与芪参益气滴丸治疗气虚血瘀型冠心病疗效的关系。方法 符合诊断标准的冠心病患者 49 例,服用芪参益气滴丸 1 个月。提取白细胞 DNA,扩增 ApoE 基因第 4 外显子,测序检测多态性位点。结果 发现 2 个有义突变位点,第 2888 位突变与气短、神疲乏力的治疗效果有关;第 2903 位突变对胸痛、自汗的治疗效果有显著影响。

结论 ApoE 基因多态性与芪参益气滴丸治疗气虚血瘀型冠心病证候的疗效有相关性。

[关键词] 载脂蛋白 E;基因多态性;芪参益气滴丸;气虚血瘀型冠心病

Relation of Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Qishen Yiqi Droplet in Treatment of Coronary Heart Disease of Qi Deficiency with Blood Stasis Syndrome

ZHAO Guang-rong¹, XIAO Min¹, LI Yu-lai², et al.

(1. School of Chemical Engineering and Technology of Tianjin University, Tianjin 300072; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the relation between apolipoprotein E (ApoE) gene polymorphism and the effect of Qishen Yiqi Droplet (Droplet mainly containing Huangqi and Danshen for Reinforcing Qi) for qi deficiency with blood stasis syndrome of coronary heart disease. **Methods** The 49 patients conformed to the diagnosis standard of coronary heart disease were treated with Qishen Yiqi Droplet for one month. The white blood cell DNA was extracted from the blood sample and the 4th exon of ApoE gene was tested for finding its polymorphism locus with sequencing. **Results** Two significant mutable sites were noticed: the mutation of the 2888th site was remarkably related to the therapeutic effect of shortness of breath and general lassitude while that of the 2903rd site to the therapeutic effect of chest pain and spontaneous sweating. **Conclusion** ApoE gene polymorphism was related to the effect of qi deficiency with blood stasis syndrome of coronary heart disease treated by, Qishen Yiqi Droplet.

Key Words Apolipoprotein E (ApoE); Gene polymorphism; Qishen Yiqi Droplet; Qi deficiency with blood stasis syndrome of coronary heart disease

冠心病是严重危害人类健康的重大复杂性疾病,在中医药学中,气虚血瘀证是冠心病的常见类型,而活血化瘀是常用的治疗策略,血液理化特性变化与中医证型关系密切^[1]。载脂蛋白 E(ApoE)基因是冠心病研究的重要候选功能基因。芪参益气滴丸是用于治疗气虚血瘀证冠心病的中药复方制剂,其疗效与基因多态性之间的关系目前还未见广泛报道。为此,本文基于病证结合、方证相应的理念,以芪参益气滴丸为模型药物,从基因的多态性角度探讨与中医证候治疗的关系。

1 临床资料

1.1 一般资料

病例为 2005 年 1~5 月天津中医药大学第一附属医院经冠脉造影确诊的冠心病患者,并经中医辨证符合气虚血瘀型的 49 例纳入本研究,其中男性 15 例,女性 34 例,男女比例为 1:2.26;年龄 41~80 岁,平均(59.24±8.63)岁。1 个月后复查患者 42 例,脱失率为 14%。

1.2 诊断标准

西医诊断符合 1979 年世界卫生组织《缺血性心脏病的命名及诊断标准》^[2]中稳定性心绞痛临床诊断标准,特征为由于运动或其他增加心肌需氧量的情况所诱发的短暂胸痛发作,休息或舌下含服硝酸甘油后,疼痛常可迅速消失,病情稳定 1 个月以上。中医证候诊断符合《中药新药临床研究指导原则》中冠心病气虚血瘀证诊断标准^[3]。

1.3 纳入标准

符合中西医诊断标准,年龄在 40~80 岁之间,并签署知情同意书的患者。

1.4 排除标准

经检查证实为冠心病劳累性心绞痛 IV 级;合并重度高血压,心肺功能不全,心律失常,肝、肾、造血系统等严重原发性疾病者;精神病患者;妊娠或哺乳期妇女;过敏体质及对多种药物过敏者。

2 方法

2.1 临床方案

2.1.1 治疗方案 维持患者原有基础治疗方案,无降

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371712)

通讯作者:赵广荣,grzhao@tju.edu.cn, (022)87401546

脂药物。

同时服用由天津天士力制药股份有限公司生产的芪参益气滴丸(由黄芪、三七、降香、丹参组成,国药准字 Z20030139),每次 0.5g,每日 3 次。

自检查中医证候开始治疗 1 个月。

2.1.2 观察指标 胸痛、胸闷、气短、神疲乏力、心悸、自汗、面色暗紫。依照 2002 年《中药新药临床研究指导原则》中症状分级量化表^[3],制作中医临床症状问卷调查,用药前后中医症状评分。所调查症状分为 4 级:(1)完全没有;(2)轻度;(3)中度;(4)重度。以上项目均于治疗前后各检测 1 次。

2.1.3 质量控制方案 由专人进行相关知识培训后进行问卷调查,确保真实性、一致性、准确性、完整性;所有相关实验室检验由专业人员检测;实验前对患者充分解释进行相关宣传,提高其依从性;将化验结果在实验结束后统一将复印件交给患者,避免患者加服其他药物(仅 1 例患者由于血糖为 27mmol/L,为防止意外通知其结果,后成为脱失病例)。

2.2 主要仪器和试剂

2.2.1 仪器 PCR 扩增仪,英国 HYBAID PCR EXPRESS;台式高速离心机 SEGMA 2K15,美国 SEGMA 公司;凝胶成像系统,上海华美科技仪器公司;ECP3000 三恒电泳仪,北京市六一仪器厂;ND-1000 紫外可见分光光度计,美国 Nano Drop Technologies。

2.2.2 试剂 全血基因组 DNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker(大连宝生物工程公司),PCR 引物合成,基因测序(上海生工生物工程公司)。

2.3 ApoE 基因多态性的检测

2.3.1 模板 DNA 的提取 提取人静脉血白细胞 DNA,经琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度(260nm 吸光度 > 0.1, A260/A280 在 1.6~1.8)。

2.3.2 引物的设计与合成 根据人类基因组数据库中的序列设计引物,序列为 P1(上游引物)为:5'-GGACGAGACCATGAAGGAGTTGA-3';P2(下游引物)为:5'-GCTGCCCATCTCCTCCATCC-3'。由上海生工生物工程公司在 DNA 合成仪上合成,PCR 产物长度:478bp。

2.3.3 PCR 反应体系 总体系 50μl,10X PCR 缓冲液 5μl,Taq DNA 聚合酶 0.5μl,dNTP 混合物 4μl,引物各(20μmol/L)1μl,模板 DNA 200ng,加双蒸馏水(ddH₂O)补齐至 50μl。

2.3.4 PCR 反应条件 95℃预变性 3 分钟,1 个循环;95℃变性 60 秒,55℃退火 50 秒,72℃延伸 50 秒,

共 35 个循环;最后于 72℃延伸 10 分钟。

2.3.5 测序测定与比对 PCR 产物由上海生工生物工程公司在 DNA 测序仪上进行全测序。通过 ClustalW 对基因的测序结果进行比较找出突变位点。

2.4 统计学方法

根据治疗前后患者的各个证候症状的分值,计算其差值。采用 SPSS11.0 软件处理,各证候差值用非参数统计的秩和检验。

3 结果

3.1 基因的 PCR 扩增

以白细胞 DNA 作为模板,对 ApoE 基因的第 4 外显子的部分序列进行 PCR 扩增,然后用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物可以发现 PCR 扩增是特异性的,产物是唯一的。与 DNA 标准分子比对,可知 PCR 产物大小符合预期大小。

3.2 ApoE 基因测序结果

为了进一步确证 PCR 产物,对其进行 DNA 测序。将该序列搜索 GeneBank 数据库,与 ApoE 基因第 4 外显子的相似性为 99%,表明 PCR 产物是 ApoE 基因的第 4 外显子。进一步进行 ClustalW 序列比对,发现了突变 5 个,其中 2 个有义突变位点。第 2888 位 G→A 的突变,NCBI 数据库中并没有记录,使氨基酸由天冬氨酸变为天冬酰胺;第 2903 位碱基 T→C 的突变,NCBI 数据库有记录,使氨基酸由半胱氨酸变为精氨酸。

3.3 ApoE 基因第 2888 位碱基突变对疗效的影响

通过对纳入有效患者目的基因的比较,得出 ApoE 基因第 2888 位碱基 G→A 的突变率为 13.16%。对突变与未突变分组样本的中医证候变化比较结果见表 1。尽管对证候总积分的影响不明显,但该位点的突变与气短、神疲乏力的治疗效果有关($P \leq 0.05$),对其胸痛、胸闷、心悸和自汗无显著影响($P > 0.05$)。

表 1 第 2888 位碱基突变对疗效的影响

项 目	突变组平均秩 (n=5)	未突变组平均秩 (n=33)	P 值
症候总积分差	21.50	19.20	0.665
胸痛差	17.80	19.76	0.680
胸闷差	17.00	19.88	0.570
气短差	28.00	18.21	0.050
神疲乏力差	28.40	18.15	0.044
心悸差	22.60	19.03	0.484
自汗差	24.60	18.73	0.241
面色紫暗差	16.00	20.03	0.365

3.4 ApoE 基因第 2903 位碱基突变对疗效的影响

纳入有效患者目的基因第 2903 位碱基 T→C 的突变率为 7.9%。该位点突变对中医证候治疗影响的结果见表 2。第 2903 位碱基突变对胸痛、自汗的治疗

效果有显著影响($P<0.05$),并且对症候总积分有显著影响($P<0.05$),但对气短、神疲乏力、胸闷、心悸、面色暗紫的治疗效果不明显。

表 2 第 2903 位碱基突变对疗效的影响

项 目	突变组平均秩 (n=3)	未突变组平均秩 (n=35)	P 值
症候总积分差	37.00	18.00	0.004
胸痛差	36.67	18.03	0.003
胸闷差	9.50	20.36	0.085
气短差	25.83	18.96	0.272
神疲乏力差	26.67	18.89	0.224
心悸差	26.50	18.90	0.235
自汗差	31.67	18.46	0.039
面色紫暗差	11.67	20.17	0.119

4 讨论

芪参益气滴丸中黄芪性味甘微温,《神农本草经》谓其可以“补虚”。丹参性味苦微寒,《神农本草经》:“主心腹邪气,肠鸣幽幽如走水,寒热积聚,破癥除瘕,止烦满,益气”,《本草纲目》:“活血,通心包络”。三七性味甘微苦温,《本草纲目》:“止血、散血、定痛”,《玉楸药解》:“合营止血,通脉行瘀,行瘀血而敛新血”。降香功能为行气止痛,活血止血^[4]。研究表明,黄芪^[5]、丹参^[6]、三七^[7,8]具有降脂作用。

临床前动物实验表明,芪参益气滴丸可缩小心肌梗死犬的梗死范围,降低血浆及全血黏度;扩张冠脉血管,增加冠脉流量。我们的临床实验表明,芪参益气滴丸降低血脂,同时提高了载脂蛋白 ApoA1 的含量,对气虚血瘀型冠心病患者血脂代谢紊乱具有良好的调节作用,从而缓解气虚血瘀型冠心病患者自觉症状,减轻中医证候表现^[9]。可见,调节血脂可能是芪参益气滴丸治疗冠心病的作用途径之一。ApoE 对血脂代谢起着重要作用,它主要由肝脏合成,是由 299 个氨基酸组成的多肽。其羧基末端的稳定区(主要由第 4 外显子编码的氨基酸组成)可能是脂类结合区^[10,11]。该区域中氨基酸的变化将对 ApoE 的结构和功能产生很大的影响。本

研究中检测出的 2 个有义 SNP 位点位于该区域,对中医临床症状的胸痛、气短、神疲乏力等有显著影响。这表明,基因多态性与中药对证治疗之间存在相关关系。

参考文献

[1]丘瑞香,罗致强,朱雅宜,等.冠心病血瘀证血液理化特性与中医证型相关性研究.中医杂志,2002,43(5):378~379.
[2]国际心脏病学会和协会及世界卫生组织临床命名标准化联合专题组.缺血性心脏病的命名及诊断标准.中华心血管杂志,1981,9(1):75.
[3]郑筱萸主编.中药新药临床研究指导原则(试行).北京:中国医药科技出版社,2002:68~77.
[4]国家药典委员会编.中华人民共和国药典.北京:化学工业出版社,2000:184.
[5]付华,陈焕春,王东升.黄芪注射液对冠心病患者血液流变学及血脂的影响.现代中西医结合杂志,2006,15(2):165~166.
[6]张梅,温进坤,孙辉臣,等.丹参注射液对动脉粥样硬化大鼠血脂及细胞间粘附分子-1 表达的影响.中国病理生理杂志,2004,20(10):1871~1873.
[7]黄泽华.三七总甙降血脂作用临床观察.医师进修杂志,1997,20(2):84.
[8]严学维.三七总甙片对高血粘度、高脂血症的疗效观察.上海中医药杂志,1999,33(5):19.
[9]李欲来,张军平,赵广荣,等.芪参益气滴丸对气虚血瘀型冠心病患者血脂影响观察研究.中华实用中西医杂志,2005,10(18):1421~1423.
[10]Zaiou M, Arnold KS, Newhouse YM, et al. Apolipoprotein E-low density lipoprotein receptor interaction: Influences of basic residue and amphipathic α -helix organization in the ligand. J Lipid Res, 2000, 41(7):1087~1095.
[11]Saito H, Dhanasekaran P, Baldwin F, et al. Lipid binding induced conformational change in human apolipoprotein E: evidence for two lipid-bound states on spherical particles. J Biol Chem, 2001, 276(44):40949~40954.

(收稿日期:2006-10-17;修回日期:2007-01-15)

[编辑:叶 晨]

(上接第 63 页)

参考文献

[1]廖晓星,马虹.慢性稳定型心绞痛诊疗指南(1999 年).岭南心血管病杂志,2000,6(3~4):215~216,253~256.
[2]Gibbons RJ, Chatterjee K, Daley J, et al. ACC/AHA/ACP-ASIM guidelines for the management of patients with chronic stable angina: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients with Chronic Stable Angina). J AM Coll Cardiol, 1999, 33(7):

2092~2197.

[3]中华医学会心血管病学分会.不稳定性心绞痛诊断和治疗建议.中华心血管病杂志,2000,28(6):409~410.
[4]中华医学会心血管病学分会.急性心肌梗死诊断和治疗指南.中华心血管病杂志,2001,29(12):710~712.
[5]中国中西医结合学会心血管分会.冠心病中医辨证标准.中西医结合杂志,1991,11(5):257.

(收稿日期:2006-09-06;修回日期:2006-11-01)

[编辑:叶 晨]