

[文章编号] 1007- 3949(2001)- 03- 0223- 04

• 临床研究 •

老年 2 型糖尿病患者血清脂蛋白(a) 水平 与载脂蛋白(a) 基因多态性分析

侯泽, 崔玉鲜¹, 沃兴德², 刘德文³(大同市二轻专科医院内分泌科, 山西省大同市 037006; 1. 大同市第五人民医院;
2. 浙江中医学院分子医学研究所, 浙江省 杭州市; 3. 山西医科大学, 山西省太原市)

[关键词] 糖尿病, 2 型; 脂蛋白(a); 载脂蛋白(a); 多态性; 基因型

[摘要] 本文对老年 2 型糖尿病患者血清脂蛋白(a) 水平及载脂蛋白(a) 多态性进行了分析, 以探讨老年糖尿病与高脂蛋白(a) 血症的关系及其载脂蛋白(a) 遗传表型的分布特点, 同时分析脂蛋白(a) 与糖尿病并发症的相关性。用酶联免疫吸附法测定脂蛋白(a) 水平, 用十二烷基磺酸钠- 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 技术测定脂蛋白(a) 遗传表型。结果发现: ① 3 组(老年 2 型糖尿病、非老年 2 型糖尿病与老年健康对照组) 脂蛋白(a) 浓度差异无统计学意义($P > 0.05$), 脂蛋白(a) 与血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇及其亚型、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 A 和 B 水平无相关性($P > 0.1$); ② 老年 2 型糖尿病组合并高血压、糖尿病性视网膜病变和糖尿病肾病患者的血清脂蛋白(a) 浓度明显高于无合并相应疾病者($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$); ③ 3 组共检出 13 种载脂蛋白(a) 基因型, 在老年 2 型糖尿病合并症患者中, 低分子质量的 S1 和 S2 基因型明显多于其它组及无合并症者。

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

Studies on Sera Lipoprotein (a) Levels and Apolipoprotein (a) Phenotype in Type 2 Diabetic Mellitus

HOU Ze, CUI Yu-Xian, WO Xing-De, and LIU De-Wen

(Department of Endocrinology, the Second Light Industry Hospital, Datong 037006, China)

MeSH Diabetes Mellitus, Non-Insulin-Dependent; Lipoprotein (a); Apolipoprotein (a); Polymorphism (Genetics); Phenotype

ABSTRACT **Aim** This report presents the studies of sera levels of lipoprotein (Lp) (a) and phenotypes of apolipoprotein (a) in type 2 diabetes mellitus. The aims of this study were to explore the relationship between aged patients with type 2 diabetes mellitus and sera levels of Lp (a) and the distributive characteristics of genetic phenotypes of apo (a). Moreover the report present the studies the relationship sera levels of Lp (a) and the complications of the aged type 2 diabetic patients with hypertension or retinopathy or nephropathy. **Methods** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure sera levels of Lp (a). The phenotypes of apo (a) were determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis. **Results and Conclusion** 1. There was no significant difference in serum Lp (a) concentration among the three groups ($P > 0.05$, respectively). Serum Lp (a) concentration did not significantly correlate with the levels of serum TC, TG, LDLC, HDLC, apo A, apo B ($P > 0.1$, respectively). 2. In the aged type 2 diabetic patients with hypertension or retinopathy or nephropathy, the level of serum Lp (a) concentration was higher than that in patients without these complications ($P < 0.05$ and $P < 0.001$). 3. A total of 7 different phenotypes of apo (a) were determined among the three groups. The aged type 2 diabetic patient with complications mostly had S1 and S2 phenotypes than other groups and the aged type 2 diabetics without the complications.

血清脂蛋白(a) 浓度升高是冠心病及脑血管病

[作者简介] 侯泽, 男, 1965 年 2 月出生, 山西省朔州市人, 山西医科大学毕业, 生物化学硕士, 主治医师, 大同市二轻专科医院院长, 内分泌科主任。沃兴德, 男, 上海市人, 生物化学教授, 浙江中医学院分子医学研究所所长, 硕士研究生导师。刘德文, 男, 山东省烟台市人, 生物化学教授, 山西医科大学生物化学教研室主任, 硕士研究生导师。

的独立危险因素^[1,2]。关于糖尿病患者血清脂蛋白(a) 浓度变化及载脂蛋白(a) 遗传表型的报道^[3,4] 不一, 对糖尿病合并慢性并发症者与血清脂蛋白(a) 浓度关系的报道^[5] 也不相同。文献[6]报道, 脂蛋白(a) 颗粒内载脂蛋白(a) 多态性表型中, S1、S2 表型常伴有高脂蛋白(a) 血症, 与诱发心脑血管疾病相关。关

于老年糖尿病与脂蛋白(a)浓度的关系,及糖尿病合并症与载脂蛋白(a)表型的报道较少。为此,我们对1999~2000年211例老年糖尿病患者及对照者进行了分析。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 老年2型糖尿病组 选择符合WHO诊断标准的老年2型糖尿病患者90例,平均年龄 66 ± 5 岁,平均病程 8.2 ± 5.3 年。

1.1.2 非老年2型糖尿病组 门诊选择经糖耐量及胰岛素释放试验确诊的2型糖尿病患者61例,平均年龄 45 ± 3 岁;平均病程 4.8 ± 3.9 年。

1.1.3 老年对照组 从健康体检中选择非糖尿病(空腹和餐后血糖正常,无糖尿病史)者,同时无高血压(无高血压史,测量二次血压中收缩压均小于140 mm Hg, 1 mm Hg = 0.133 kPa;舒张压小于90 mm Hg)、脑血管病(无脑血管病史,脑CT正常)及冠心病(无冠心病及心绞痛病史,心电图正常)的老年人60例,平均年龄 66 ± 7 岁。

1.2 血清脂质、脂蛋白及载脂蛋白的测定

取空腹12 h静脉晨血,1 h内分离血清(2 500 r/min,离心25 min)。采用酶法测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和极低密度脂蛋白胆固醇(very LDLC, VLDLC)。高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、载脂蛋白AI和B用免疫比浊法测定,血清脂蛋白(a)含量用酶联免疫吸附法(ELISA)测定。

1.3 载脂蛋白(a)遗传表型测定

1.3.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳 取样品血清20 μ L按常规方法进行垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳缓冲液pH 8.6,电压100 V,电泳12 h。

1.3.2 Western blot 从垂直板中取出凝胶置于转移电泳槽(Bio-Rad产,硝酸纤维素膜为Amershan产品),8 $^{\circ}$ C,150 mA,通电5 h后,则将载脂蛋白(a)转移到硝酸纤维素膜上,剪下前面含有高分子标准品(Amershan产品)及载脂蛋白B100纯品标记(Sigma产品)的部分;用0.01%氨基黑染色,另一部分进行免疫印迹分析。

转移电泳后的硝酸纤维素膜用10%小牛血清封闭,加入人抗兔脂蛋白(a)抗体(浙江中医学院分子医学研究所),与膜反应8 h后常规洗涤,加酶标二抗(1

:1 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG),反应2 h,洗涤后用4-氯-1-萘酚(加过氧化氢3.5 mmol/L)显色^[7]。采用Uterman等^[8]推荐的方法,按载脂蛋白(a)与载脂蛋白B100在凝胶中迁移率快慢分为:F(较载脂蛋白B100迁移快)、B(与载脂蛋白B100位置相似)、S1、S2、S3、S4(依次较载脂蛋白B100慢),共6种载脂蛋白(a)异构体(即多态性),F分子质量最小,S4分子质量最大。

1.4 糖尿病慢性并发症诊断标准

高血压按WHO建议的判断标准。脑血管病为患过脑梗塞,经头颅CT证实。冠心病为患过心肌梗死或有典型心绞痛发作伴心电图提示冠状动脉供血不足。糖尿病性视网膜病变经眼底检查和眼底荧光造影证实。糖尿病肾病,在排除泌尿系感染和肾小球肾炎后,尿微量白蛋白排泄率大于25 mg/min(正常范围0.1~18.0 mg/min,采用RIA方法测定),尿蛋白定性阳性,肾图检查有排泄功能障碍。92例老年2型糖尿病患者中,有57例合并高血压,41例合并冠心病,20例合并脑血管疾病,56例合并视网膜病变,60例合并糖尿病肾病。

2 结果

2.1 3组血清脂蛋白(a)及其它脂质水平

3组血清脂蛋白(a)与其它血脂浓度见表1(Table 1)。可见3组血清脂蛋白(a)的浓度差异无统计学上的显著性意义。

表1. 三组血清脂质水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Serum lipid levels of the three groups

Index	AC group	A2DM group	Non A2DM group
n	60	90	61
TG (mmol/L)	1.27 \pm 0.7	1.64 \pm 0.8 ^e	1.90 \pm 1.1 ^{ce}
TC (mmol/L)	5.07 \pm 0.8	5.21 \pm 0.9 ^b	5.10 \pm 0.7
LDLC (mmol/L)	3.04 \pm 0.9	3.27 \pm 0.8 ^b	3.4 \pm 1.2
HDLC (mmol/L)	1.40 \pm 0.3	1.22 \pm 0.3 ^b	1.3 \pm 0.2
Apo A1 (g/L)	1.30 \pm 0.2	1.20 \pm 0.1 ^b	1.3 \pm 0.2
Apo B (g/L)	1.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2 ^b	0.9 \pm 0.1 ^b
Lp(a) (mg/L)	199 \pm 171	210 \pm 184	187 \pm 176

AC: aged control; A2DM: aged type 2 DM; Non A2DM: Nonaged type 2 DM. b: $P < 0.05$, c: $P < 0.001$, compared with aged control group; e: $P < 0.001$, compared with aged type 2 DM group.

2.2 老年2型糖尿病患者合并并发症时血清脂蛋白(a)水平

老年2型糖尿病患者患血管并发症时血清脂蛋

白(a)浓度会普遍升高,尤其是并发高血压和视网膜血管病变时(表2, Table 2)。

表 2. 老年 2 型糖尿病各种并发症时血清脂蛋白(a)水平($\bar{x} \pm s$, mg/L)

Table 2. Serum levels of Lp (a) in aged type 2 DM with various complications

Complications name	With		Without	
	n	Lp	n	Lp
Hypertension	57	184 ± 36 ^b	33	107 ± 40
CHD	41	173 ± 30	49	120 ± 27
CA	20	207 ± 37	70	149 ± 20
Retinopathy	56	169 ± 3.3 ^b	34	103 ± 39
Nephropathy	60	185 ± 21 ^c	30	97 ± 30

CHD: coronary heart disease; CA: cerebral angilopathy. b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, compared with without complications

2.3 三组血清载脂蛋白(a)基因型分布

在 111 名患者中共检出 13 种载脂蛋白(a)表型,其中单载脂蛋白(a)异构体表型有 6 种,双载脂蛋白(a)异构体表型有 7 种(表 3, Table 3)。其中 43 名老年 2 型糖尿病组与 37 名非老年 2 型糖尿病和 31 名老年对照组比较, F、B、S1、S2 表型分布没有明显差异,分别占 16.3%、16.0%、16.3%。而糖尿病合并血管病变的患者, F、B、S1、S2 表型所占比例明显多见,占 60%。在图 1(Figure 1)中有 10 种载脂蛋白(a)异构体的图谱,其中 B、F 单体异构体及 S1/S4、

S2/S3 双体异构体未显示,除表中列举类型,理论上应有的其它表型均未发现。

表 3. 载脂蛋白(a)基因型的分布频率

Table 3. The distribution frequencies of apo (a) phenotypes in the three groups and in the aged type 2 DM with various complications

Phenotype	A2DM		Noor A2DM		2DMC		AC	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ull	8	18.1	5	13.5	4	20	8	25.8
F	-	-	-	-	1	5	-	-
B	2	4.7	-	-	1	5	-	-
S1	1	2.3	1	2.6	4	20	3	9.7
S2	2	4.7	2	5.3	5	25	2	6.6
S3	9	20.9	8	22.3	1	5	5	16.1
S4	10	23.3	12	32.5	2	10	8	25.8
F/S2	1	2.3	-	-	-	-	-	-
B/S3	2	4.7	1	2.6	-	-	-	-
S1/S2	1	2.3	3	8.1	1	5	-	-
S1/S3	2	4.7	-	-	1	5	1	3.2
S1/S4	-	-	-	-	-	-	2	6.6
S2/S3	2	4.7	2	5.3	-	-	2	6.6
S2/S4	3	7.0	3	8.1	-	-	-	-
Sum	43	100	37	100	20	100	35	100

2DMC is aged type 2DM with complications. Dthers is the same as Table 1

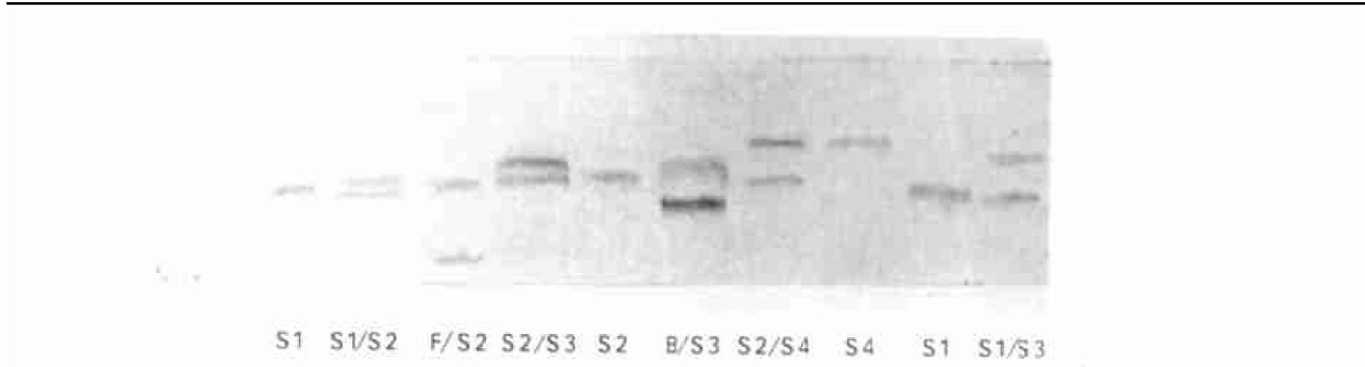


图 1. 2 型糖尿病患者载脂蛋白(a)的基因型

Figure 1. Phenotypes of apo (a) in type 2 diabetic subjects

3 讨论

糖尿病患者常伴有高脂血症,近年来研究表明也有载脂蛋白的异常^[9]。本文研究结果显示,糖尿病患者的血清 TC、TG、LDLC、载脂蛋白 B100 均高于对照组;载脂蛋白 AI 低于对照组。非老年 2 型糖尿病组 TG 水平高于老年 2 型糖尿病组,与文献报道不

一致。脂蛋白(a)的含量及载脂蛋白(a)的异构体在各组中分布没有明显差异。各组平均脂蛋白(a)与全部 6 项血脂浓度无相关,说明脂蛋白(a)在血脂中的变化是一个独立因子。

血管并发症是糖尿病患者的主要死因。脂蛋白(a)在冠心病及糖尿病中起重要作用,有过很多报

道^[3,4]。普遍认为糖尿病合并症时血清脂蛋白(a)水平升高。本研究表明糖尿病在有血管合并症时脂蛋白(a)水平明显高于没有合并症组;同时表现载脂蛋白(a)异构体中F、B、S1、S2的比率明显高于没有合并症组。

现已证实,载脂蛋白(a)分子内蛋白质部分由载脂蛋白B100和特异的载脂蛋白(a)组成,二者以二硫键相联。Apo(a)是一个结构复杂的糖蛋白,因其分子中三环结构4(Kringle 4)的拷贝数目不同而呈现分子量大小不等(300 000~700 000)的多态性。载脂蛋白(a)的遗传表型受第6号染色体长臂上的等位基因(脂蛋白F、脂蛋白B、脂蛋白S1、脂蛋白S2、脂蛋白S3、脂蛋白S4、脂蛋白O)控制,载脂蛋白(a)的结构基因控制血清脂蛋白(a)的含量。通常血清载脂蛋白(a)的F及B表型常伴有高脂蛋白(a)含量,S1及S2表型伴中等度脂蛋白(a)含量,而S3与S4表型者血清脂蛋白(a)含量处于低水平^[8]。本组结果表明老年糖尿病血管并发症的发生与载脂蛋白(a)的遗传表型相关。

参考文献

[1] Jauhiainen M, Ksokinen P, Ehnholm C, et al. Lipoprotein (a) and coronary heart disease risk a nested case-control study of Helsinki heart study participants [J]. *Atherosclerosis*, 1991, **89**: 59-

63

- [2] Seed M, Hoppicheer F, Reavcey D, et al. Relation of serum lipoprotein (a) concentration and apolipoprotein (a) phenotype to coronary heart disease in patients with family hypercholesterolemia [J]. *N Engl J Med*, 1990, **322**: 1 494- 499
- [3] 史虹莉,方京冲,杨秀芳,等. 2型糖尿病患者的脂蛋白(a)浓度和载脂蛋白(a)分型[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1999, **15** (2): 77- 81
- [4] Rainwater DL, Macclae JW, Stem MP, et al. Effects of NIDDM on lipoprotein (a) concentration and apolipoprotein (a) size [J]. *Diabetes*, 1994, **43**: 942- 946
- [5] Verges BL. Dyslipidaemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis [J]. *Diab Metab*, 1999, **25** (Supp 13): 32- 40
- [6] Bvscaglia P, Gazzaruso C, Garzaniti A, et al. Lipoprotein (a), apolipoprotein (a) polymorphism, and insulin treatment in type 2 diabetic patients [J]. *Diabetes Care*, 1995, **18**: 1 202- 203
- [7] 侯泽,刘德文,沃兴德,等. 脂蛋白脂肪酶单克隆抗体的制备及特性. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (2): 116- 120
- [8] Uterman G, Kraft HG, Menzel HJ, et al. Genetics of the quantitative Lp (a) Lipoprotein trait iv: relation of Lp (a) glycoprotein phenotypes to Lp (a) lipoprotein concentration in plasma [J]. *Hum Genet*, 1998, **18**: 41- 49
- [9] Froguel P. What have we learned thanks to genetics in type 2 diabetes and its complications (editorial) [J]? *Nephrologie*, 1999, **20** (2): 59- 63

(此文 2001- 03- 08 收到, 2001- 07- 18 修回)

(此文编辑 胡必利)

•读者•作者•编者•

欢迎订阅! 欢迎引用! 欢迎投稿! 欢迎刊登广告!

《中国动脉硬化杂志》是中国科学技术协会主管、中国病理生理学会主办、南华大学承办的全国性高级学术性期刊, 1993年12月创刊, 国内外公开发刊, 邮发代号42- 165。

《中国动脉硬化杂志》设有多个栏目, 主要报道防治动脉硬化性疾病中的新理论、新观点、新疗法、新药物。凡中医药学、预防医学、基础医学、临床医学、护理学、药学和特种医学中有关防治动脉硬化性疾病的研究论文、诊治经验和方法技术的文稿都可向她投稿。现是国家科技部中国自然科学核心期刊和中国科学院《中国科学引文数据库》来源期刊, 被国内外多家数据库收录。1999年的影响因子(IF)为0.387, 位居1372家统计源期刊中的第178位。

《中国动脉硬化杂志》为双月刊, 每逢单月30日出版, A4

开本, 内芯96页, 全铜版纸印刷。每期定价11.00元, 全年66.00元。由湖南省报刊发行局发行, 全国各级各地邮局均可订阅。若错过邮局征订日期, 可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。编辑部设湖南省衡阳市常胜西路南华大学内, 邮政编码为421001, 电话号码为(0734) 8281289, E-mail 为 dmzzbjb@163.net。

中国动脉硬化杂志编辑部热情欢迎并采取下述措施激励广大同仁引用发表在《中国动脉硬化杂志》上的文章: 凡在中国科技论文统计源期刊和中国科学引文数据库来源期刊上发表的文章中引用了《中国动脉硬化杂志》的文章者, 凭当期刊封面、目次页和文章的复印件可获赠第二年全年的《中国动脉硬化杂志》一份。