

白细胞介素8和载脂蛋白E基因多态性与迟发性阿尔茨海默病的相关分析

麦以成¹, 罗有年¹, 顾 鸿¹, 么宪伟¹, 张璐璐², 郑洪波², 胡文生², 黎 艳³, 吴仲扬⁴, 林静静⁴

(1. 广东省佛山市顺德区伍仲珮纪念医院, 广东 佛山 528333; 2. 广州市脑科医院, 广东 广州 510370;

3. 广东省佛山市第三人民医院, 广东 佛山 528000; 4. 广东省佛山市顺德区颐养院, 广东 佛山 528300)

摘要:【目的】探讨白细胞介素8基因(interleukin-8, IL-8)基因 A-251T 和载脂蛋白 E(ApoE)基因多态性与迟发性阿尔茨海默病(LOAD)的相关性。【方法】采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法(PCR-RFLP)观察 185 例广东汉族人群(研究组:LOAD 患者 88 例, 正常对照组 97 例) IL-8 基因 A-251T 基因、ApoE 基因多态性的分布并进行关联分析。【结果】① IL-8 基因 A-251T 各基因型及等位基因在研究组及对照组间的差异均无统计学意义。② ApoE ϵ 4 等位基因频率在研究组中高于对照组, 差异有统计学意义, 为 LOAD 的患病危险因素($OR = 2.272$, $P = 0.003$)。③ 按是否携带 ApoE ϵ 4 等位基因将研究组和对照组均分为携带 ϵ 4 组与非携带 ϵ 4 组。无论是否携带 ApoE ϵ 4 等位基因, IL-8 基因 A-251T 各基因型频率在研究组和对照组间无统计学差异(携带 ϵ 4 组: $P = 0.965$; 非携带 ϵ 4 组: $P = 0.523$)。【结论】IL-8 基因 A-251T 多态可能与 LOAD 无关, 与 ApoE ϵ 4 可能不存在相互作用。

关键词: 白介素 8; 载脂蛋白 E; 阿尔茨海默病; 基因; 多态性

中图分类号: R74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0118-04

Association between Interleukin-8 and Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Late-onset Alzheimer's Disease

MAI Yi-cheng¹, LUO You-nian¹, GU Hong¹, YAO Xian-wei¹, ZHANG Lu-lu², ZHENG Hong-bo²,

HU Wen-sheng², LI Yan³, WU Zhong-yang⁴, LIN Jing-jing⁴

(1. Shunde Wuzhongpei Hospital of Foshan City, Foshan 528333, China; 2. Brain Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510370,

China; 3. The Third Hospital of Foshan, Foshan 528000, China; 4. Yiyang Hospital of Shunde, Foshan 528300, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the relation among the polymorphism of interleukin-8 (IL-8) gene A-251T and apolipoprotein E (ApoE) gene with late-onset Alzheimer's disease (LOAD). 【Methods】 Polymerase chain reaction and restrictive fragment length polymorphism (PCR-RFLP) were used to detect the polymorphism distribution of IL-8 gene A-251T and ApoE gene of 185 people in Han ethnicity of Guangdong province (study group: 88 LOAD patients, controlled group: 97 people). The correlation of these genes was analyzed. 【Results】 (1) The differences of genotypes and alleles of IL-8 gene A-251T between study group and controlled group had no statistical significance. (2) The frequency of ApoE ϵ 4 allele in study group was significantly higher than that in controlled group, as risk factor of LOAD ($OR = 2.272$, $P = 0.003$). (3) Study group and controlled group were both divided into two groups by carrying ApoE ϵ 4 allele or not. The differences of IL-8 genotypes were no significant whether in carrying ApoE ϵ 4 allele group or not (carrying ϵ 4 group: $P = 0.965$; no carrying ϵ 4 group: $P = 0.523$). 【Conclusion】 It is suggested that IL-8 gene A-251T polymorphism perhaps has no relation with LOAD and has no interaction with ApoE ϵ 4 allele.

Key words: interleukin-8; apolipoprotein E; Alzheimer's disease; gene; polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2010, 31(1): 118-121]

收稿日期: 2009-08-05

基金项目: 广东省佛山市医学科学技术研究基金(2005491)

作者简介: 麦以成, 副主任医师, 研究方向: 临床精神病学, E-mail: maiyicheng@126.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一类最常见的老年人神经退行性变性疾病,根据发病年龄分为:早发性阿尔茨海默病,发病年龄早于 65 岁;迟发性阿尔茨海默病(late-onset Alzheimer's disease, LOAD),发病年龄晚于 65 岁。目前,AD 病因未明,但遗传因素与炎症反应在该病的病理生理机制中发挥重要作用。研究表明老年斑中 IL-1、IL-8 等炎症标记物的表达明显增加^[1],IL-1 和 IL-6 基因多态性可能与 AD 存在关联^[2-4],至今暂未见 IL-8 基因多态性与 AD 关联的报道。故本文检测了 IL-8 基因 A-251T 多态及 ApoE 基因多态在广东地区老年人中的分布,旨探讨其与 LOAD 的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究组:共 88 例,均来自 2005 年 1 月至 12 月在广东省佛山市顺德区伍仲珮纪念医院及广东省佛山市第三人民医院住院部,符合《美国精神障碍诊断和统计手册(第四版)》(DSM-IV)中 LOAD 诊断标准,排除其他严重器质性疾病及任一精神疾病。其中男 35 例,女 53 例;平均年龄(79.6 ± 9.2)岁;MMSE 评分为 10.26 ± 7.94;ADL 评分为 60.7 ± 16.8。

正常对照组:共 97 例,均来自广东省佛山市顺德区颐养院,排除严重器质性疾病及任一精神疾病。其中男 38 例,女 59 例;平均年龄(79.7 ± 8.6)岁;MMSE 评分为 25.08 ± 3.41;ADL 评分为 27.7 ± 7.0。

所有研究对象均为汉族老年人,相互间无血缘关系,均知情同意。两组间性别、年龄及文化程度的差异均无统计学意义。

1.2 研究方法

1.2.1 基因提取 取外周静脉血 5 mL,ACD 抗凝,采用常规酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

1.2.2 IL-8 基因 A-251T 多态性检测 引物序列^[5]:上游引物:5'-CTTATCTTCACCATCATGATAGCATCTG-3';下游引物:5'-GGCTGCCAAGAGAGCCACGGCCAGC-3'。聚合酶链反应体系总体积共 25 μL,含 100 ng 基因组 DNA,0.2 mmol/L dNTPs,10 pmol/L 引物,1 × PCR 缓冲液,0.2 U *Taq* 酶。扩增反应条件:95 °C 预变性 5 min,循环条件为

95 °C 30 s,64 °C 30 s,72 °C 50 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。在 PCR 产物中加入 5 μL 酶及酶切缓冲液体系中(含 5 U *Mfe* I 内切酶),37 °C 酶切过夜,用 8% 聚丙烯酰胺电泳读取基因型。共分 3 种基因型 T/T(突变型):585 bp;A/T(杂合型):585 bp,414 bp,171 bp;A/A(野生型):414 bp,171 bp(图 1)。

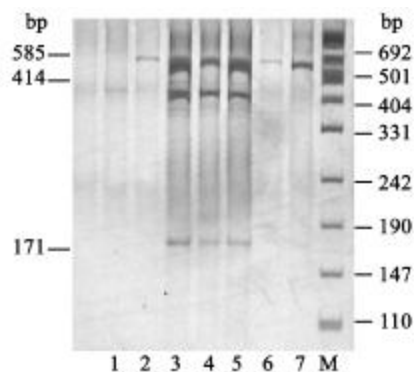


图 1 IL-8 基因 A-251T 多态性

Fig.1 IL-8 gene A-251T polymorphism

1, 3, 6: three genotypes of IL-8 gene A-251T polymorphism

1.2.3 ApoE 基因多态性检测 引物序列^[6]:上游引物:5'-AACAACTGACCCCGGTGGCG-3';下游引物:5'-ATGGCGCTGAGGCCGCGCTC-3'。聚合酶链反应体系总体积共 25 μL,含 200 ng DNA,1.5 μL 25 mmol/L MgCl₂,1 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 2.5 μL 10 × buffer, 6.4 pmol/L Primer(each), 0.5 μL 5 U/μL *Taq*E, 2.5 μL DMSO。扩增反应条件:96 °C 5 min 后进入循环,30 个循环(94 °C 1 min,63 °C 50 s,72 °C 60 S),72 °C 10 min。取 PCR 产物(292 bp) 10 μL,加 5 U *Hha* I 内切酶 5 h,12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离酶切产物,读取基因型。共分 6 种基因型,ε3/4 型:91 bp,72 bp,48 bp,38 bp,35 bp;ε3/3 型:91 bp,48 bp,38 p,35 bp;ε2/4 型:91 bp,83 bp,72 bp,48 bp,38 bp,35 bp;ε2/3 型:91 bp,83 bp,48 bp,38 bp,35 bp;ε2/2 型:91 bp,83 bp,38 bp;ε4/4 型:72 bp,48 bp,38 bp,35 bp(图 2)。

1.3 统计学方法

用直接计数法计算等位基因及基因型频率。用 HWE 软件(J.Ott,1988)对基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡估计。其他统计分析用 SPSS10.0 软件完成。两组间比较采用 *t* 检验,构成比比较采用 χ^2 检验。

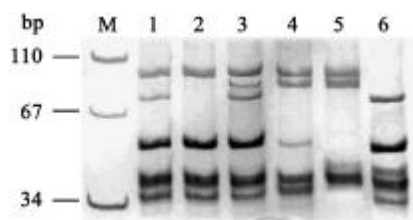


图 2 ApoE 基因多态性

Fig.2 ApoE gene polymorphism

1, 2, 3, 4, 5, 6: six genotypes of ApoE gene polymorphism

2 结 果

2.1 各基因型 Hardy-Weinberg 平衡定律吻合度检测

经吻合度检验,IL-8 基因 A-251T 及 ApoE 基

因各基因型均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 (P 均 > 0.05)。

2.2 IL-8 基因 A-251T 各基因型及等位基因分布

经 χ^2 检验,IL-8 基因 A-251T 各基因型频率在研究组和对照组间无统计学差异 ($\chi^2 = 0.762$, $P = 0.144$),各等位基因频率在两组间亦无统计学差异 ($\chi^2 = 0.039$, $P = 0.994$,表 1)。

2.3 ApoE 基因各基因型及等位基因频率分布

经 χ^2 检验, $\epsilon 4$ 等位基因频率在研究组中为 18.8%,高于对照组(8.2%),差异有统计学意义,为 LOAD 的患病危险因素 ($OR = 2.272$, $\chi^2 = 8.859$, $P = 0.003$);其余各基因型及等位基因在两组间的分布均无统计学差异 (P 均 > 0.05 ,表 2)。

表 1 各组 IL-8 基因 T-251C 多态的分布

Table 1 Distribution of IL-8 gene T-251C polymorphism in each group

n(%)

	Cases	Genotype			Allele	
		T/T	A/T	A/A	T	A
Study group	88	36(40.9)	46(52.3)	6(6.8)	118(67.0)	58(33.0)
Male	35	13(43.4)	19(54.3)	3(8.6)	45(64.3)	25(35.7)
Female	53	23(43.4)	27(50.9)	3(5.7)	73(68.9)	33(31.1)
Controlled group	97	40(41.2)	50(51.5)	7(7.2)	130(67.0)	64(33.0)
Male	38	15(39.5)	21(55.3)	2(5.3)	51(67.1)	25(32.9)
Female	59	25(42.4)	29(49.2)	5(8.5)	79(66.9)	39(33.1)

表 2 各组 ApoE 基因多态的分布

Table 2 Distribution of ApoE gene polymorphism in each group

n(%)

	Cases	Genotype						Allele		
		$\epsilon 2/2$	$\epsilon 2/3$	$\epsilon 2/4$	$\epsilon 3/3$	$\epsilon 3/4$	$\epsilon 4/4$	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Study group	88	2(2.3)	14(15.9)	3(3.4)	45(51.1)	18(20.5)	6(6.8)	21(11.9)	122(69.3)	33(18.8)
Controlled group	97	0	16(16.5)	4(4.1)	65(67.0)	12(12.4)	0	20(10.3)	158(81.4)	16(8.2)

2.4 IL-8 基因和 ApoE 基因的关系

按是否携带 ApoE $\epsilon 4$ 等位基因将研究组和对照组均分为携带 $\epsilon 4$ 组与非携带 $\epsilon 4$ 组。经 χ^2 检验,结果表明无论是否携带 ApoE $\epsilon 4$ 等位基因,IL-8 基因 A-251T 各基因型频率在研究组和对照组间无统计学差异(携带 $\epsilon 4$ 组: $\chi^2 = 0.072$, $P = 0.965$;非携带 $\epsilon 4$ 组: $\chi^2 = 1.296$, $P = 0.523$,表 3)。

3 讨 论

3.1 ApoE 基因与 LOAD

本研究表明 ApoE $\epsilon 4$ 等位基因的分布在研究

组中显著高于对照组,为 LOAD 的患病危险因素,这与国内外报道一致^[7]。自首次提出 ApoE $\epsilon 4$ 是 LOAD 的易感基因以来,国外群体研究和连锁分析均证实该等位基因是 AD 的遗传易感基因,并与其他一些 AD 易感基因存在相互作用。目前 ApoE $\epsilon 4$ 已成为 AD 分子遗传研究中的基本参量^[6],故本研究选择该基因多态对 IL-8 基因 A-251T 多态做参照。

3.2 IL-8 基因 A-251T 与 LOAD、ApoE 基因

流行病学研究表明多种环境因素与遗传因素与 AD 有关,其中氧化损伤与炎症反应越来越受到关注。IL-8 是一种作用广泛的炎症因子,IL-8 与

表 3 IL-8 基因 T-251C 多态在携带或不携带 ApoE ϵ 4 等位基因组中的分布

Table 3 Distribution of IL-8 gene T-251C polymorphism in groups carrying or no-carrying ApoE ϵ 4 allele

	Cases	IL-8 gene T-251C genotype(%)		
		T/T	A/T	A/A
Carrying ApoE ϵ 4 allele				
Study group	26	12(46.2)	12(46.2)	2(7.7)
Controlled group	16	7(43.8)	8(50.0)	1(6.3)
No-carrying ApoE ϵ 4 allele				
Study group	59	23(39.0)	34(57.6)	2(3.4)
Controlled group	80	33(41.3)	41(51.3)	6(7.5)

位于中性粒细胞表面的 IL-8 受体结合后,可激活中性粒细胞,促使其分泌大量细胞因子,进一步扩大炎症反应,释放胞内酶及其活性,产生大量氧自由基。研究表明^[1],AD 患者老年斑中 β 淀粉蛋白周围小胶质细胞较集中,且 IL-8、IL-1 等炎性标记物的表达持续增加,IL-8 可增至正常情况下的 11.7 倍,这提示 IL-8 可能在 AD 病因中起发挥一定作用。

IL-8 基因位于染色体 4q12-21,全长 5.1 kb,有 3 个内含子和 4 个外显子。其转录起始点上游-251 处存在 A/T 多态,通过转录调控影响 IL-8 的合成,且 A 等位基因与高 IL-8 水平相关^[8-9]。暂未见 IL-8 基因 A-251T 与 LOAD 的研究。

本研究表明,研究组与对照组的 T 等位基因频率均为 67%,与日本人 60.5%相近,较北爱尔兰人^[10]57%稍高,比曾至荣^[9]报道的中国陕西人群 53.4%高,提示该基因多态分布可能存在种族及地域差异。但 IL-8 基因 A-251T 各基因型及等位基因在研究组及对照组间不存在统计学差异;为进一步验证其与 LOAD 的关系,按是否携带 ApoE ϵ 4 等位基因将研究组和对照组分层,结果仍表明无论是否携带 ApoE ϵ 4 等位基因,该基因多态在两组间无统计学差异。提示该基因多态可能与 LOAD 无关,与 ApoE ϵ 4 可能不存在相互作用。其原因可能有以下方面:①IL-8 基因 A-251T 多态与 LOAD 的关联较弱,在样本量偏小的研究中难以发现;②研究对象不同的遗传背景及不同的环境与遗传的相互作用也可能导致研究结果的不同;③ApoE 基因可能在 LOAD 的病理生理过程中发挥更为重要的作用,研究时多种基因间的相互作用也可能导致不同的结果。

本研究首次探讨了 IL-8 基因 A-251T、ApoE 基因与 LOAD 的关系,但样本量偏小,研究基因数量有限,故有待在以后的研究中结合其他易感基因、环境因素及扩大样本进一步检验和探索。

参考文献:

- [1] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21(3):383-421.
- [2] Bosco P, Gueant Rodriguez RM, Anello G, et al. Association of IL-1 RN * 2 allele and methionine synthase 2756 AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease [J]. *J Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75(7):1036-1038.
- [3] Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, et al. A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease [J]. *Ann Neurol*, 1999, 45(5):666-668.
- [4] 林英堂,李龙宜. 丹参酮对阿尔茨海默病样大鼠海马内 IL-1 β 、IL-6 mRNA 以及一氧化氮合酶表达的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26 (B03): 20-23.
- [5] Shirai K, Ohmiya N, Taguchi A, et al. Interleukin-8 gene polymorphism associated with susceptibility to non-cardia gastric carcinoma with microsatellite instability [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(7): 1129-1135.
- [6] 韩彬,张生林. ApoE, A2M, ACE 基因与汉人 Alzheimer 病的相关性研究 [J]. *山西医科大学学报*, 2008, 39 (8):692-697.
- [7] Williamson J, Goldman J, Marder KS, et al. Genetic aspects of Alzheimer disease [J]. *Neurologist*, 2009, 15(2):80-86.
- [8] Diaz Cueto L, Cuica Flores A, Ziga Cordero F, et al. Genetic variation in the interleukin-8 gene promoter and vaginal concentrations of interleukin-8 are not associated with bacterial vaginosis during pregnancy [J]. *J Reprod Immunol*, 2005, 66(2):151-160.
- [9] 曾志荣,周韶璋,廖山婴,等. 白介素 8-251 位点基因多态性与我国高低发区胃癌关系 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(5):537-540.
- [10] Ross OA, O'Neill C, Rea IM, et al. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's disease in the Irish [J], 2004, 65(4):340-346.

(编辑 徐杰)