DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1999.0029

阿尔茨海默病患者载脂蛋白E等位基因的多态性①

马秋兰[1] 卢锡林[1] 刘焯霖[1] 林宏川[2]

(1 中山医科大学附属第一医院神经科;广州,510080 2 广州市老人院)

摘 要 目的:探讨载脂蛋白E(apoE)等位基因多态性在散发性阿尔茨海默病(SAD)发病机制中的作用。方法:应用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测68名SAD患者和66名正常老年人的apoE等位基因多态性分布。结果:SAD组$apoE_2$等位基因频率明显低于对照组($P<0.01$);$apoE_4$等位基因频率高于对照组,但两组比较无统计学意义($P>0.05$)。结论:$apoE_2$基因可能具有保护SAD发病的作用;不支持$apoE_4$是中国人SAD发病高危因素的结论。

主题词 阿尔茨海默病/遗传学;载脂蛋白E类/遗传学;等位基因

中图号 R 749.16

Polymorphism of Apolipoprotein E Allele with Alzheimer Disease

Ma Qiulan Lu Xilin Liu Zhuolin Lin Hongchuan

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract **Objective**: To explore the role of the polymorphism of apolipoprotein E allele with sporadic Alzheimer disease(SAD) in pathogenesis of sporadic Alzheimer disease. **Method**: The polymorphism of apolipoprotein E allele was detected by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique in 68 patients with sporadic Alzheimer disease and 66 normal controls. **Results**: The $apoE_2$ allele frequence of patients with SAD was significantly lower than that of normal controls ($P<0.01$); the $apoE_4$ allele frequence of patients with Alzheimer disease was not significant change between patients with SAD and normal subjects ($P>0.05$). **Conclusions**: The result suggest that $apoE_2$ allele might protect people from Alzheimer disease and $apoE_4$ allele might not be a high risk factor in sporadic Alzheimer disease in Chinese.

Subject headings Alzheimer disease/genetics; Apolipoprotein E/genetics; alleles

近几年研究资料表明,载脂蛋白E(apoE)基因主要与晚发的家族性阿尔茨海默病(family Alzheimer disease, FAD)和散发性阿尔茨海默病(sporadic Alzheimer disease, SAD)有关,并认为$apoE_4$等位基因以量相关的形式增加阿尔茨海默病(AD)发病风险。降低AD发病年龄,但报道不尽一致。为探讨中国人群中AD患者与$apoE_4$基因之间的关系,我们用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测了68名SAD患者、66名正常老年人的apoE等位基因多态性分布,以阐明apoE基因在SAD发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 SAD组

68例;男22例,女46例,平均年龄(80±8)岁。全部病例从广州市老人院中筛选,应用简易精神状态检查表(MMSE)、长谷川痴呆量表(HDS-R)、日常生活能力量表(ADL)。初筛有痴呆,Hachinski缺血指数<4分,采用美国国立神经病、语言机能紊乱和卒中研究所及阿尔茨海默病和相关疾病协会(ADRDA-

① "九五"国家医学科技攻关项目(96-906-05-07)和国家自然科学基金(批准号39370269)资助课题

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

NINCDS)临床诊断标准, 把诊断为'可能性 AD'的患者列为研究对象。全部病人无血缘关系。

1.2　正常对照(NC)组

66 例, 男 39 例, 女 27 例, 平均年龄(77±8)岁, 全部为正常健康老年人。

1.3　DNA 的提取及 PCR 扩增

常规酚抽提法提取外周血 DNA。参考文献设计合成引物序列, 上游为 5′－ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC－3′, 下游为 5′－TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA－3′。PCR 反应体积 30 μL, 含有模板 DNA 50～100 ng、0.2 mmol/L dNTP、上下游引物各 0.2 μmol/L、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3、1 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应条件: 95 ℃预变性 5 min。然后按 94 ℃ 45 s、62 ℃ 45 s、72 ℃ 30 s, 35 个循环, 最后在 70 ℃ 10 min。反应结束后, 取 PCR 产物 5 μL, 加 1 μL 上样缓冲液, 于 12 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 在紫外分析仪上检测 PCR 扩增产物的特异性。用 PBR322DNA/MSPI 作 marker, 测 PCR 产物片段大小, PCR 扩增产物长度为 244 bp。

1.4　PCR 扩增产物的限制性酶切

取 PCR 产物 10 μL 加 10 U *Hha*Ⅰ酶酶切, 37 ℃消化 4 h, 反应终止后酶切产物上样于 100 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺为 29∶1)电泳, 200 V 恒压, 20 mA 电流条件下电泳 7 h, 银染, 观察 apoE 基因型。apoE 不同等位基因型的判断标准为: $E_{2/2}$(91 bp, 83 bp,); $E_{3/3}$(91 bp, 48 bp, 35 bp); $E_{4/4}$(72 bp, 48 bp,); $E_{2/3}$(91 bp, 83 bp, 48 bp,); $E_{3/4}$(91 bp, 72 bp, 48 bp); $E_{2/4}$(91 bp, 83 bp, 72 bp, 48 bp)。

1.5　统计学处理

基因频率采用基因计数法, 基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验。

2　结　果

2.1　应用 PCR-RFLP 方法确定 apoE 基因型

两组共检测 134 例标本, 检出 4 种不同基因型, 未检出 $E_{4/4}$、$E_{2/2}$基因型(图 1)。

图 1　Alzheimer 病患者 apoE 基因 PCR-RFLP 结果

Fig. 1　Result of PCR-RFLP for apoE gene in patient with Alzheimer disease

M: marker, 1～4: apoE genotypes, 1: $E_{2/3}$, 2: $E_{3/3}$, 3: $E_{2/4}$, 4: $E_{3/4}$

2.2　SAD 组和 NC 组 apoE 基因型频率和频数分布

两组 apoE 基因型频率分布如表 1, SAD 组 $E_{3/3}$ 型频率最高, $E_{2/3}$、$E_{3/4}$型次之; NC 组 $E_{2/3}$型频率最高, $E_{3/3}$型、$E_{2/4}$型次之, 两组 $E_{2/2}$型、$E_{4/4}$型相似, 均最少。

表 1　SAD 组和 NC 组 apoE 基因型频率和频数分布

Table 1　Frequencies and numbers of apoE genotypes of SAD group and NC group　%(*n*)[1)]

Groups	cases	age	$E_{2/2}$	$E_{3/3}$	$E_{4/4}$	$E_{2/3}$	$E_{2/4}$	$E_{3/4}$
SAD	68	80±8	0	9.5(27)[1)]	0	32.8(22)[1)]	7.4(5)[1)]	20.6(14)[1)]
NC	66	77±8	0	21.2(14)[1)]	0	59.1(39)[1)]	13.6(9)[1)]	6.1(4)[1)]

1) Note: the figure in the () is number of cases

2.3　SAD 组和 NC 组 apoE 等位基因频率分布比较

根据表 1 两组 apoE 基因型频率分布结果, 按 Hardy-Weinbarg 平衡定律, 计算两组 apoE 等位基因频率(表 2)。两组之间比较采用 χ^2 检验, SAD 组 E_2 等位基因频率明显低于对照组($P<0.01$); SAD 组 E_3 等位基因频率高于 NC 组($P<0.05$); SAD 组 E_4 等位基因频率与 NC 组比较无统计学意义($P>0.05$)。

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 SAD 组和 NC 组 apoE 等位基因频率分布

Table 2 Frequencies of the apoE allele genes of SAD group and NC group (%)

Groups	cases	E_2	E_3	E_4
SAD	68	19.9[1)]	66.1[2)]	14.0[3)]
NC	66	36.6	53.8	9.8

Note: compared group SAD with group NC, 1) $P<0.01$; 2) $P<0.05$; 3) $P>0.05$

3 讨 论

3.1 apoE 基因与 AD 的关系及其多态性

1990 年 Duke 大学研究者对部分晚发 FAD 家系研究后发现了第 2 个与 AD 有关的基因—apoE 基因(位于 19 号染色体上)。随后日本学者发现 AD 脑组织中的老年斑和神经元纤维缠结均有 apoE 免疫活性, apoE 可积聚于老年斑和神经元纤维缠结内, 提示 apoE 直接与 AD 的病理发生有关。apoE 基因频率的流行病学研究表明, apoE 结构基因位点存在多态性。人体内 apoE 的类型主要取决于 apoE 的 3 个等位基因—$apoE_2$、E_3 和 E_4。3 种等位基因的不同组合产生 6 种表型, 即纯合子 $apoE_{2/2}$、$apoE_{3/3}$、$apoE_{4/4}$和杂合子 $apoE_{2/3}$、$apoE_{3/4}$、$apoE_{2/4}$。它们的区别在于氨基酸序列 112 位和 158 位半胱氨酸与精氨酸的互换。

3.2 $apoE_3$ 基因型在 SAD 中的分布

群体研究提示, $apoE_3$ 基因型最常见, 本组实验结果也表明 $apoE_3$ 等位基因频率最高, 与其他学者研究相一致。有趣的是本实验中, SAD 组的 $apoE_3$ 基因型纯合子频率高于对照组, 而 AD 组的 $apoE_3$ 杂合子频率明显低于对照组。有研究表明: $apoE_3$ 同 Tau 蛋白在体外可形成耐受 SDS 的复合物, 从而调节 Tau 蛋白的磷酸化, 稳定微管结构; 而 $apoE_4$ 则不能。当 $apoE_4$ 纯合子或 $apoE_{2/4}$ 杂合子存在时, 机体缺少 $apoE_3$ 等位基因, 此时因缺乏 $apoE_3$ 对 Tau 蛋白磷酸化的调节, Tau 将产生双螺旋丝状物, 进而形成神经纤维缠结。故可推测 SAD 的发生可能是 $apoE_3$ 的缺乏, 而不是 $apoE_4$ 的存在。本实验结果 SAD 组的 $apoE_3$ 杂合子频率明显低于对照组, 支持此论点。是否携带 $apoE_3$ 杂合子的人 SAD 发生率降低, 值得进一步探讨。

3.3 $apoE_4$ 基因型在 SAD 中的分布

自 1993 年以来, 国外多数研究资料显示, $apoE_4$ 与晚发 FAD 和 SAD 有极显著联系, 这些患者中该基因频率明显增高, $apoE_4$ 基因被认为是晚发 FAD 和 SAD 发病的高危因素。本实验结果表明, SAD 组 $apoE_4$ 等位基因频率也高于对照组, 但无统计学意义, 不支持 $apoE_4$ 是中国人 SAD 发病高危因素的说法。此结果可能与种族差异有关, 如在瑞典的 SAD 病人中, $apoE_4$ 等位基因频率并不增高; 在非洲裔正常美国人群中 $apoE_4$ 基因频率较高, 但 SAD 的发病率并不增高[1], 提示 $apoE_4$ 与 SAD 的联系较弱。另外, 整个东方人群 $apoE_4$ 基因频率低于西方人群。我们对照组的 $apoE_4$ 等位基因频率为 9.8%, 与国内某些学者的研究结果相似。

3.4 $apoE_2$ 基因型在 SAD 中的分布

$ApoE_2$ 基因可能对 SAD 有保护作用。现已有初步证据显示 $apoE_2$ 等位基因可以对抗 SAD[2], 不过尚未取得一致的看法。Talbot 等[3,4]学者的研究结果发现, $apoE_2$ 基因在 SAD 中明显减少, 并指出 $apoE_2$ 基因可能具有预防 SAD 发病的作用。本实验结果与之相一致。也有学者认为 $apoE_2$ 基因是人类的长寿基因。目前, apoE 基因在 SAD 中的发病机制尚未明了, 可能与调节胆固醇水平、α-抗糜蛋白酶基因和极低密度脂蛋白受体基因相互作用有关。

总之, 我们用 PCR-RFLP 技术检测了 68 名 SAD 患者和 66 名正常老年人的 apoE 基因多态性分布, 结果与以往文献报道有所不同, 尤其是 SAD 组 $apoE_4$ 等位基因频率与对照组比较无明显差异, 不支持 $apoE_4$ 等位基因是 SAD 发病高危因素的结论。而 SAD 组 $apoE_2$ 等位基因频率明显低于对照组, 提示 $apoE_2$ 可能具有防止 SAD 发病的作用, 故有必要进一步探讨 apoE 与 SAD 的关系。

参 考 文 献

1 Hendrie H C, Hall K S, Hui S, *et al*. Apolipoprotein E genetype and Alzheimer disease in a comunity study of elderly African Americans. Lancet, 1993, 342(8873): 697

2 鄢盛恺, 周 新, 哈黛文. 聚合酶反应限制性片段长度多态性检测载脂蛋白 E 基因型. 中华医学检验杂志, 1997, 20(1): 28

3 Talbot C, Lendon C, Croddock N, *et al*. Protection against Alzheimer disease with $apoE_2$. Lancet, 1994, 343(8910): 1432

4 Smith A D, Johnston C, Sim E, *et al*. Protective effect of apo epsilon 2 in Alzheimer disease. Lancet, 1994, 344(8290): 473

(1998-06-01 收稿 1998-12-18 修回)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net