论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0846-04

颅脑创伤在载脂蛋白E基因影响脑电活动中的诱发作用

印晓鸿[1],张晓冬[1],孙晓川[1],但 炜[1],刘 科[2],吴海涛[1],刘福英[1],蒋 理[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[1];400014 重庆,重庆市急救医疗中心神经外科[2])

[摘要] **目的** 探讨颅脑创伤是否在载脂蛋白E基因(apolipoprotein E,APOE)对脑电活动的影响当中起诱发作用。**方法** 收集118例轻-中型创伤性脑损伤患者的临床资料和40例正常成人的相关信息,采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)检测APOE基因型。在伤后1~3 d,对所有创伤性脑损伤患者进行脑电图检测;在清醒、安静、闭目、血糖正常状态下对所有正常成人进行脑电图检测;采集所有研究对象的定量脑电数据。**结果** 40例正常成人中,APOEε2、APOEε3、APOEε4基因型之间定量数据差异均无统计学意义($P=0.097$);118例创伤性脑损伤患者中,脑电活动在APOEε2、APOEε3、APOEε4基因型之间差异有统计学意义($P=0.008$);与APOEε3携带者比较,APOEε4携带者的慢活动明显增多,而APOEε2携带者的慢活动相对减少。**结论** 携带不同APOE基因的正常成人脑电活动无差异;在颅脑创伤的诱发下,APOE对脑电活动的影响则表现出亚型特异性;APOEε4对颅脑创伤后的脑电活动带来负面影响,APOEε2则对创伤后的脑功能具有保护作用。

[关键词] 载脂蛋白E;创伤性脑损伤;脑电活动;定量脑电图;诱发作用
[中图法分类号] R338.8;R394.1;R651.1 **[文献标志码]** A

Isoform-specific influence of APOE induced by traumatic brain injury on the electrical activity of brain

Yin Xiaohong[1], Zhang Xiaodong[1], Sun Xiaochuan[1], Dan Wei[1], Liu Ke[2], Wu Haitao[1], Liu Fuying[1], Jiang Li[1] (First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether the isoform-specific influence of apolipoprotein E gene (APOE) on the electrical activity of brain is induced by traumatic brain injury (TBI). **Methods** The clinical data of 118 patients with mild/moderate traumatic brain injury and 40 normal subjects for control were collected, and the APOE genotyping was performed by means of PCR-RFLP. The electrical activity of brain in every patient was recorded by electroencephalogramy within 3 d after injury and all the subjects for control were examined by electroencephalogramy under conscious, calm, eyes-closed and normoglycemic condition. Quantitative data of every electroencephalogram were collected. **Results** The quantitative data among APOEε2, APOEε3 and APOEε4 groups of normal subjects had no statistic difference ($P=0.097$). In 118 patients with mild/moderate TBI, the quantitative data among APOEε2, APOEε3 and APOEε4 groups had significant difference ($P=0.008$). Compared with APOEε3 group, the energy value of slow waves was more in the APOEε4 group and less in APOEε2 group. **Conclusion** In normal adults, the electrical activity of brain is not significantly different among the three APOE groups. However, under the provocation of traumatic brain injury, the electrical activity of brain in the three groups shows different. After traumatic brain injury, APOEε4 is bad for the electrical activity of brain but APOEε2 protects brain function.

[Key words] apolipoprotein E; traumatic brain injury; electrical activity of brain; quantitative electroencephalogram

Corresponding author: Dan Wei, E-mail: dan-wei@sina.com.cn

载脂蛋白E(apolipoprotein E,apoE)是体内重要的载脂蛋白,在中枢神经系统,apoE是胆固醇、磷脂及硫脂运输的调节剂和突触发生的促进剂;它参与调节神经组织的修复、塑形和保护并且具有亚型特异性[1-3]。apoE还通过各种途径影响机体的神经电活动,并存在亚型特异性,然而这种亚型特异性的产生存在某种诱发因素[4-7]。本研究通过对正常对照组和创伤性脑损伤组脑电图变化的观察,了解颅脑创伤是否也诱发了

[通信作者] 但 炜,E-mail: dan-wei@sina.com.cn

载脂蛋白E影响脑电活动的亚型特异性的产生。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 正常对照组 纳入标准:①无颅脑损伤、颅内占位病变、精神病、脑炎或痴呆等疾病史;②年龄为15~65岁;③均未使用镇静剂等影响脑电活动的药物。按照纳入标准共收集本科室收治的脊髓病变患者及本科室工作人员共40例作为正常对照组,其中女性17例,男性23例,平均年龄32.13岁。

1.1.2 创伤性脑损伤组 纳入标准:①有明确的头部外伤史;②入院时格拉斯哥昏迷评分(glasgow coma score, GCS)≥9分;③均在伤后1~3 d入院;④年龄为15~65岁。排除标准:①既往有颅脑损伤、颅内占位病变、精神病、脑炎或痴呆等中枢神经系统疾病史;②低温及使用镇静剂等药物影响脑电活动;③严重的多发伤,并发其他器官或系统严重的功能障碍影响脑功能(如严重呼吸循环功能障碍、电解质紊乱等);④头皮损伤影响脑电图检查。按照以上标准收集2007年6月至2009年4月就诊于我科的创伤性脑损伤患者118例为创伤性脑损伤组,其中男性65例,女性53例,平均年龄36.57岁。

1.2 APOE基因型鉴定

按照江涌等[8]的方法抽取所有入选者的静脉血,采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)检测APOE基因型。

1.2.1 引物的设计和合成 抽取每一对象静脉血2 ml(EDTA抗凝),按常规快速法提取基因组DNA。特异性扩增APOE基因第4外显子区含编码112位与158位氨基酸的基因序列:P1 5′-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3′,P2 5′-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3′。

1.2.2 PCR扩增 反应体系为25 μl,TaKaRa PCR Amplification Kit 12.5 μl(大连宝生物工程公司),P1(1 μl),P2(1 μl),模板(2 μl),H_2O(8.5 μl)。最佳循环温度及时间:95 ℃预变性4 min,95 ℃变性30 s,63 ℃复性30 s,72 ℃延伸40 s,35个循环,最后72 ℃延伸8 min。以1%琼脂糖凝胶电泳证实DNA大约为250 bp,且无非特异性条带。

1.2.3 限制性内切酶反应 吸取已鉴定的PCR扩增产物移入另一0.5 ml eppendorf管中,加入*Hha* Ⅰ酶(10 U/L)0.5 μl充分摇匀,待离心片刻后,置入37 ℃水浴箱恒浴3 h以上。酶切产物10 μl于4%琼脂糖凝胶上电泳1 h(80 V),电泳毕于紫外灯下观察,并于成像系统成像。参照Richard方法加以简化,将电泳照片结果与表1加以对照,得出分型结果。

表1 APOE基因电泳图判断标准

碱基对	APOEε2/2	APOEε3/3	APOEε4/4	APOEε2/3	APOEε2/4	APOEε3/4
91 bp	–	–		–	–	–
83 bp	–			–	–	
72 bp			–		–	–
48 bp		–	–	–	–	–

1.3 脑电图检测

纳入者均按照国际10/20系统安放电极,作16导单极导联采样,耳电极为参考电极。正常对照组在清醒、安静、闭目、血糖正常状态下进行脑电图检测,创伤性脑损伤组的脑电图检测在伤后1~3 d进行,检测时间为10~15 min,确保能采集到足够安静闭目无伪迹的图形。全部脑电图由工作10年以上的脑电图专业技师检测。

1.4 脑电图的判读和定量脑电数据的采集

脑电图结果均由同一名专门从事脑电图专业工作的副教授分析。选取能代表脑电背景活动而又无肉眼所见伪迹的片段30 s为1个采样单元,利用功率谱分析技术进行处理,每次脑电图均选取3个采样单元,取其平均值为所得数据。分别计算创伤性脑损伤组及正常对照组脑电图δ(1.5~3.9 Hz)、θ(4~7.9 Hz)、α(8~13.9 Hz)、β(14~30 Hz)各种频段脑电波在整个脑区的总功率值M;为了排除眼动伪差的影响,去除双额极电极(Fp_1和Fp_2)的数据,计算慢波与快波总功率的比值A。

$$A = (M_\theta + M_\delta)/(M_\alpha + M_\beta)$$

1.5 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件,计数资料行χ^2检验,2组计量资料比较行t检验,多组比较行方差分析。

2 结果

2.1 基因型分布

118例创伤性脑损伤患者中包含APOEε2携带者18例,APOEε3携带者112例,APOEε4携带者21例;正常对照组中APOEε2、APOEε3和APOEε4携带者分别为7、38、9例。2组APOE分布和等位基因频率具体见表2。

表2 创伤性脑损伤组和正常对照组APOE分布和等位基因频率

组别	基因型(例)						等位基因频率(%)		
	APOEε2/2	APOEε2/3	APOEε2/4	APOEε3/3	APOEε3/4	APOEε4/4	APOEε2	APOEε3	APOEε4
创伤性脑损伤组	1	15	2	81	16	3	8.05	81.78	10.17
正常对照组	0	6	1	25	7	1	8.75	80.00	11.25

2.2 基因型之间临床资料比较

正常对照组中携带APOEε2、APOEε3、APOEε4等位基因之间性别、烟酒嗜好相关因素的构成差异无统计学意义($P>0.05$,表3),且3个基因型之间年龄[APOEε2、APOEε3、APOEε4分别为(32.7±10.5)、(31.5±9.7)、(33.1±10.4)岁]差异也无统计学意义($P=0.86$)。

表3 正常对照组基因型的临床资料构成(例)

相关因素	APOEε2	APOEε3	APOEε4	P值
性别				
男性	4	24	5	0.634
女性	3	14	4	
饮酒				
饮酒	5	30	6	0.493
不饮酒	2	8	3	
吸烟				
吸烟	4	26	6	0.673
不吸烟	3	12	3	

创伤性脑损伤组中携带APOEε2、ε3、ε4等位基因之间在性别、烟酒嗜好、CT表现、治疗方法及受伤原因等相关因素的构成上差异没有统计学意义($P>0.05$,表4)。3个基因型之间年龄和入院时GCS差异也无统计学意义($P>0.05$,表5)。

表4 创伤性脑损伤组基因型临床资料构成(例)

相关因素	APOEε2	APOEε3	APOEε4	*P* 值
性别				
男性	10	61	12	0.973
女性	8	51	9	
受伤原因				
车祸	9	54	9	
重物击伤	3	14	4	0.884
坠落及其他	6	44	8	
CT表现				
弥漫性	5	38	8	0.792
局灶性	13	74	13	
治疗方法				
手术	2	10	5	0.152
非手术	16	102	17	
饮酒				
饮酒	14	88	15	0.588
不饮酒	4	24	6	
吸烟				
吸烟	10	61	12	0.983
不吸烟	8	51	9	

表5 创伤性脑损伤组年龄和入院时GSC情况比较($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	年龄(岁)	GCS
APOEε2	18	36.46 ± 12.12	12.27 ± 1.52
APOEε3	112	37.43 ± 12.01	13.15 ± 1.76
APOEε4	21	36.15 ± 11.90	12.54 ± 2.15
P 值		0.061	0.790

2.3 脑电图的改变

正常对照组脑电图均表现为双侧大脑后区对称出现的8~13 Hz的α节律,波幅以30~50 μV为主,各导联可见少许低幅β活动,双侧大脑前区可见少许4~7 Hz的θ波,未见明显δ活动。进一步定量分析发现,APOEε2、APOEε3、APOEε4基因型之间脑电图的A值分别为(0.177 ± 0.052)、(0.169 ± 0.065)、(0.158 ± 0.048),差异无统计学意义(P = 0.097)。

118例轻-中型脑损伤患者脑电图均有异常,主要表现为局部或普遍性α指数减少,频率减慢和慢波增多。进一步定量分析发现,携带APOEε2、APOEε3、APOEε4的患者之间的A值分别为(2.358 ± 0.921)、(2.835 ± 1.102)、(3.452 ± 1.325),差异有统计学意义(P = 0.008)。

3 讨论

本研究中正常对照组的3个APOE基因型之间的脑电活动无明显差异;而在轻-中型外伤性脑损伤患者中,3个APOE基因型之间的脑电活动存在明显差异,表现为在局部或普遍性α指数减少,频率减慢和慢波增多的情况下,APOEε4携带者脑电活动更慢,而APOEε2携带者的脑电慢活动较野生型的APOEε3携带者少。提示APOE对脑电活动的影响具有亚型特异性,而这种亚型特异性能被颅脑创伤诱发;与野生型的APOEε3比较,APOEε4对创伤性脑损伤后脑功能的负面影响在伤后早期就表现出来,而APOEε2可能在创伤性脑损伤早期即对脑损伤后脑功能具有保护作用。

3.1 APOE与创伤性脑损伤后神经电活动

编码载脂蛋白E的基因(APOE)具有多态性,有3个等位基因(APOEε2、APOEε3和APOEε4),表达出3种不同的蛋白亚型,即apoE2、apoE3和apoE4[9],在人群中产生6种表型,包括3种纯合子(ε2/ε2、ε3/ε3、ε4/ε4)和3种杂合子(ε3/ε2、ε4/ε3、ε4/ε2)[10]。APOE及其启动子区多态性是影响TBI急性期伤情及转归的重要因素[8,11-16]。随着研究深入,人们发现apoE不仅参与神经生物代谢,而且也影响着机体的神经电活动[4-7]。本课题组前期研究也发现APOE多态性与创伤性脑损伤后的脑电活动相关[17]:84例轻-中型外伤性脑损伤患者急性期(7 d内)脑电图改变,APOEε4携带者脑电图加重比率明显高于非APOEε4携带者;单因素和多因素Logistic回归分析均提示,APOEε4是脑电图加重的危险因素。本研究通过定量脑电图进一步证实,在创伤性脑损伤早期(3 d内)APOE多态性也与创伤性脑损伤的神经电活动相关,表现为脑损伤后不同APOE基因型携带者之间整个脑区的慢波所占比例具有明显差异。

3.2 APOE影响神经电活动的诱发因素

Ponomareva等[4]研究了阿尔茨海默病(alzheimer's disease,AD)患者的亲属,发现安静闭目状态下,在携带不同APOE等位基因的AD患者的亲属之间脑电图参数没有差别,并且与普通人群的脑电图类型相似;但过度通气状态下,携带APOEε4等位基因的AD患者的亲属表现出α活动的显著减少,同步高幅δ、θ活动,尖波出现以及δ、θ相对能量增加等现象。提示过度通气诱发了APOEε4对AD患者正常亲属脑电活动慢化作用。

Yu等[5]将134例年轻女性分成带有和不带APOEε4基因的2组,发现APOEε4携带组的行为智力商数(performance intelligence quotient,PIQ)及事件相关电位的N100幅度较APOEε4阴性组都有轻度的增加,认为APOEε4相关的认知障碍与年龄有关,这种认知障碍不太可能在年轻女性中发生,但到老年后APOEε4对认知功能的负面影响就表现出来了。这一发现与Kitamura等[6]的动物实验结果相似。他们发现能反应突触可塑性的长时程增强(long-term potentiation,LTP)电位在年轻APOEε4转基因小鼠中增强,而在成年的APOEε4转基因小鼠中这种增强作用消失。这两项研究均提示年龄可能是APOEε4影响认知功能的一个诱发因素。

本研究发现颅脑创伤也是APOE影响神经电活动的一个诱发因素。正常成人不同APOE基因型之间的

脑电活动无明显差异,而在创伤性脑损伤后,APOE对脑电活动的影响即表现出差异来。国外及我们的研究都发现APOE对脑电活动存在调节作用,而这种调节作用在缺氧、衰老、创伤等病理状态的诱发作用下会产生差异。那么,在病理状态下APOE基因所调控的相应蛋白的表达发生了怎样的变化,又通过什么样的路径导致不同基因型患者产生不同的电生理变化,目前尚不清楚,还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Han X. The role of apolipoprotein E in lipid metabolism in the central nervous system[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(15): 1896-1906.
[2] Mauch D H, Nagler K, Schumacher S, *et al*. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol[J]. Science, 2001, 294(5545): 1354-1357.
[3] Han X, Cheng H, Fryer J D, *et al*. Novel role for apolipoprotein E in the central nervous system. Modulation of sulfatide content[J]. J Biol Chem, 2003, 278(10): 8043-8051.
[4] Ponomareva N V, Korovaitseva G I, Rogaev E I. EEG alterations in non-demented individuals related to apolipoprotein E genotype and to risk of Alzheimer disease[J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(6): 819-827.
[5] Yu Y W, Lin C H, Chen S P, *et al*. Intelligence and event-related potentials for young female human volunteer apolipoprotein E epsilon4 and non-epsilon4 carriers[J]. Neurosci Lett, 2000, 294(3): 179-181.
[6] Kitamura H W, Hamanaka H, Watanabe M, *et al*. Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation in knock-in mice expressing human apolipoprotein E4 instead of mouse apolipoprotein E[J]. Neurosci Lett, 2004, 369(3): 173-178.
[7] 林斌, 孙晓川, 张晓冬, 等. ApoE基因多态性与动脉瘤性蛛网膜下腔出血后早期脑功能改变的相关性[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(7): 700-703.
[8] 江涌,孙晓川,夏玉先,等. 载脂蛋白E基因多态性与颅脑损伤的相关性[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(7): 520-523.
[9] Weisgraber K H, Rall S C Jr, Mahley R W. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms[J]. J Biol Chem, 1981, 256(17): 9077-9083.
[10] Davignon J, Gregg R E, Sing C F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, 1988, 8(1): 1-21.
[11] Sun X C, Jiang Y. Traumatic brain injury: prognostic factors and genetic influence[M]//Zhang J H. Advancements in Neurological Research. Kerala: Research Signpost, 2008: 121-140.
[12] McCarron M O, Weir C J, Muir K W, *et al*. Effect of apolipoprotein E genotype on in-hospital mortality following intracerebral haemorrhage[J]. Acta Neural Scand, 2003, 107(2): 106-109.
[13] Lendon C L, Harris J M, Pritchard A L, *et al*. Genetic variation of the APOE promoter and outcome after head injury[J]. Neurology, 2003, 61(5): 683-685.
[14] Millar K, Nicoll J A, Thornhill S, *et al*. Long term neuropsychological outcome after head injury: relation to APOE genotype[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003, 74(8): 1047-1052.
[15] 江涌, 孙晓川, 夏玉先,等. 载脂蛋白E基因型及启动子区多态性与颅脑损伤病情发展的相关性研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2006, 32(5): 431-435.
[16] Jiang Y, Sun X C, Xia Y, *et al*. Effect of APOE polymorphisms on early responses to traumatic brain injury[J]. Neurosci Lett, 2006, 408(2): 155-158.
[17] 贺绪智,孙晓川,但炜,等. 载脂蛋白E基因多态性与轻-中型脑损伤急性期脑电图改变的相关性[J]. 中华创伤杂志,2008,24(8): 619-623.

(收稿:2009-11-02;修回:2009-11-26)
(编辑 龙 亮)

(上接845页)

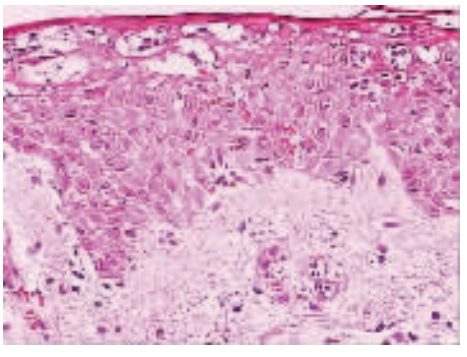


图2 胰高血糖素瘤综合征皮肤组织病理变化 (HE ×400)

2 讨论

胰高血糖素瘤是胰岛A细胞肿瘤,肿瘤细胞可分泌过量的胰高血糖素,是一种罕见性疾病,本病患病率为0.01/100万~0.1/100万[2]。有学者[3]将胰高血糖素瘤产生的一系列典型症状群(如轻度糖尿病、迁移性坏死性皮炎、舌炎、口角炎、贫血和体质量减轻)命名为胰高血糖素瘤综合征,并将其分为3种类型:①有皮肤综合征的胰高血糖素瘤,有典型的坏死性红斑;②无皮肤综合征的胰高血糖素瘤,仅有轻度糖尿病,血浆胰高血糖素浓度升高;③有多种综合征的胰高血糖素瘤。坏死游走性红斑是胰高血糖素瘤特征性表现,发生率68%~90%,特征性病理表现是表皮上部突然坏死松解,形成裂隙或水疱。一旦出现皮疹,多数已伴肿瘤转移。诊断需除外其他升高胰高血糖素的疾病如肢端肥大症、慢性肾炎、肝硬化等。胰高血糖素瘤增长很慢,手术切除是最有效方法。

参考文献:

[1] Chastain M A. The glucagonoma syndrome: a review of its features and discussion of new perspectives[J]. Am J Med Sci, 2001, 321(5): 306-320.
[2] Ruttman E, Kloppel G, Bommer G, *et al*. Pancreatic glucagonoma with and without syndrome. Immunocytochemical study of 5 tumour cases and review of the literature[J]. Virchows Arch A Pathol Anat Histol, 1980, 388(1): 51-67.
[3] McGavran M H, Unger R H, Recant L, *et al*. A glucagon-secreting alpha-cell carcinoma of the pancreas[J]. N Engl J Med, 1966, 274(25): 1408-1413.

(收稿:2009-12-29;修回:2010-01-27)
(编辑 王 红)