DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.029
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
160 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jua. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0160-04

重庆市某区316例老年人中载脂蛋白E基因型频率分布及与痴呆发病的关系

黄 文,陈曼娥,周华东,张映琦 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 了解重庆地区老年人中载脂蛋白E(Apolipoprotein E, ApoE)基因型的分布情况,分析ApoE基因型与老年性痴呆病发生的相关性。方法 随机选择316例重庆地区60岁以上老龄人作为研究对象,根据美国神经病学、语言障碍和卒中-老年性痴呆和相关疾病学会标准诊断,将研究对象分为老年性痴呆组和对照组,分离其白血细胞基因组DNA,用聚合酶链反应(Ploymerase chain reaction, PCR)技术扩增ApoE带有多态性位点的第4外显子片段,根据限制性酶切片段长度多态性分析(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法检测其基因型。结果 两组人群中ApoE$\varepsilon_{3/3}$基因型分布的百分比最大,其次为ApoE$\varepsilon_{3/4}$基因型,而ApoE$\varepsilon_{2/2}$基因型最小;ε_2、ε_3、ε_4等位基因频率在老年性痴呆组和对照组分别为:0.095、0.560、0.345和0.146、0.699、0.155。老年性痴呆组ε_4携带者百分比大于对照组($P<0.01$),ApoE$\varepsilon_{3/4}$基因型百分比也较对照组大($P<0.01$)。结论 在重庆地区老年人群中,ApoE$\varepsilon_{3/3}$为最常见的基因型,而$\varepsilon_{2/2}$最少见;ApoEε_4为老年痴呆发病的危险因子。

关键词:载脂蛋白E基因型;老年人;老年性痴呆
中图法分类号:R181;R363.25;R749.1 文献标识码:A

The frequency distribution of apolipoprotein E genotypes in elderly people in Chongqing area and its relationship with senile dementia onset

HUANG Wen, CHEN Man-e, ZHOU Hua-dong, ZHANG Ying-qi (Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the status of the distribution for Apo E genetypes frequency in older people and to clarify the relationship between Apo E genetype and senile dementia onset. Methods A total of 316 residents aged 60 years and over were collected and classified into the senile dementia group and the control group according to National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria for Senile Dementia. The exon 4 of ApoE gene with polymorphism sites was amplified by using PCR technique to isolate the genomic DNA from the peripheral blood leukocytes. The ApoE genotypes were determined by RFLP method. Results The most frequent genotype was Apo E$\varepsilon_{3/3}$, the next was ApoE$\varepsilon_{3/4}$ and the least frequent genotype was Apo E$\varepsilon_{2/2}$ in the two groups. The estimated ApoE allele frequencies in the sample of senile dementia subjects were 0.095, 0.560 and 0.345 forε_2, ε_3 and ε_4, respectively, and in the sample of the control group, 0.146, 0.699 and 0.155, respectively. The percentage of ε_4 allele carriers in the senile dementia group was higher than that in the control group ($P<0.01$). The senile dementia group had distinctly higher percentage of $\varepsilon_{3/4}$ genotype than the control group. Conclusions In Chongqing area, Apo E$\varepsilon_{3/3}$ was the most common genotype for elderly people, but the Apo E$\varepsilon_{2/2}$ was the lowest, and Apo Eε_4 has strong relation to development of senile dementia. Therefore, Apo Eε_4 may be a risk factor for senile dementia onset.

Key words: apolipoprotein E(ApoE) genetype; elderly people; senile dementia

老年性痴呆是老年人中常见的中枢神经系统退行性疾病,多发于60岁以上的老年人,是导致老年人智力严重障碍的主要原因之一。随着我国人口老龄化趋势出现,该病对老年人健康的危害和由此带来的社会、经济负担已成为严重的社会问题。老年性痴呆属于一种复杂的异质性神经失调,发病原因至今不清楚,但已证明与多种因素相关,许多研究已经表明遗传性因素在老年性痴呆发病中起重要作用。在宏观影响因素不确定性的情况下,随着生物工程技术的发展及人类基

作者简介:黄 文(1972—),男,重庆市垫江县人,博士研究生,主治医师,主要从事老年性痴呆方面的研究。电话:(023)68757444

收稿日期:2002-01-31;修回日期:2002-03-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因组计划的实施, 从分子流行病学的角度寻找包括老年性痴呆在内的许多疾病的分子机制及遗传易感性, 必将成为未来医学的发展方向之一。本研究在这方面做了有益的探索。

1　材料与方法

1.1　研究对象

1.1.1　重庆地区无血缘关系汉族健康老年人, 来源于本科室组织的对重庆市高新区石桥铺街道进行的"老年人认知功能障碍"流行病学调查资料。入选样本标准: 年龄大于或等于 60 岁, 意识清楚, 能配合检查, 排除失语、听力障碍、昏迷以及其他不能配合检查的患者, 排除患精神病、脑外伤、中毒、有重大精神创伤等已经明确对智能有明显影响的患者。共收集 316 例, 年龄在 60～89 岁, 平均年龄为(68.14±6.90)岁, 其中男性 171 例, 年龄为 60～88 岁, 平均年龄为(69.46±7.14)岁; 女性为 145 例, 年龄为 60～89 岁, 平均年龄为(66.58±6.32)岁。

1.1.2　老年性痴呆的诊断　　入选样本用简易智能量表检测病人的认知功能。判定标准为上海精神卫生中心制定: 满分为 30, 文盲得分≤17 分为有认知功能障碍, 小学文化得分≤20 分为有认知功能障碍, 中学及以上文化≤24 分为有认知功能障碍。认知功能障碍程度判断标准为, 13～23 分为轻度认知功能障碍, 5～12 分为中度认知功能障碍, ＜5 分为重度认知功能障碍。在 MMSE 检查的基础上, 确认为有认知功能障碍的 58 例样本进一步做"成人韦氏智力量表"检测, 判断标准为, 总量表得分≥81 分为正常, 得分≤80 分为痴呆。结合既往史, 老年性痴呆患者的诊断均符合美国神经病学、语言障碍和卒中-老年性痴呆和相关疾病学会的可能 AD 诊断标准, Hachinski 缺血指数＜4 分, 排除其他可导致痴呆的神经系统疾病, 无严重躯体疾病和烟酒等物质滥用情况, 排除抑郁症(17 项版本汉密尔顿抑郁量表＜17 分)。

1.1.3　研究分组　　入选样本根据诊断分为老年性痴呆组和对照组。

1.2　研究方法

聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测载脂蛋白 E 基因型。

1.2.1　主要试剂及来源　　*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 片段长度标准物(pBR322 DNA/*Hae*Ⅲ markers)、*Hha*Ⅰ酶均为上海生工公司产品, 蛋白酶 K(德国罗氏公司)、饱和酚(pH8.0, 北京华美公司)。其余试剂均为分析纯, 在第三军医大学野战外科研究所第七研究室配制。引物的设计与合成: 引物参考文献[1]设计, 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, 由上海生物工程有限公司合成。序列为:

P1: 5′-GGCACGGCTGTCCAAGGA-3′;

P2: 5′-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3′

台式低温高速离心机(Beckman, USA); PCR 扩增仪(PTC-200, MJ Research Inc, USA); 紫外分光光度仪(Beckman, USA); 水平凝胶电泳仪(上海生物化学研究所西巴斯生物技术开发公司); 垂直凝胶电泳仪(Beckman, USA); 紫外透射反射分析仪(浙江永嘉)。

1.2.2　实验方法

模板 DNA 提取: 经典法并作改进提取 DNA: ①取保存的冷冻血, 室温下解冻。②取两只 10 ml 灭菌塑料管, 加入冷冻血 2 ml, 另加入等体积的 PBS 缓冲液稀释。室温下 3 500× *g* 离心 15 min, 弃去上清液, 用 2 ml 抽提缓冲液重悬沉淀物, 于 37℃, 孵育 1 h。③加蛋白酶 K 至终浓度 100 μg/ml。④将裂解细胞的悬液置于 50 ℃水浴 3 h, 不时旋动该粘滞液体。⑤将溶液冷却至室温, 加等体积饱和酚, 缓慢地来回颠倒离心管 10 min, 小心地混合两相。然后, 5 000× *g*, 离心 15 min, 取上清液, 加入另一试管。⑥重复步骤⑤。⑦重复步骤⑤。⑧加等体积氯仿∶异戊醇(24∶1)混匀, 5 000× *g*, 离心 15 min, 去上清液, 加入另一试管。取上清, 加入 0.2 倍体积的 3 mmol/L 乙酸钠(pH5.2)轻轻混匀, 后加入 0.6 倍体积的－20℃预冷的异丙醇, 轻轻混匀, －20℃冰箱中过夜, 沉淀 DNA。⑨取出试管, 5 000× *g* 离心 15 min, 可见离心管底部有白色沉淀, 用 70% 预冷的乙醇洗涤 2 次。如果沉淀物漂浮, 需再次离心, 10 000× *g*, 5 min。⑩弃上清, 室温晾干。⑪TE(pH: 8.0)600 μl 溶解 DNA。⑫以 0.3% 琼脂糖凝胶电泳证实 DNA 为 40 000 bp 或在紫外分光光度仪上检测。

PCR 扩增: 反应体系为 50 μl PCR 反应体系加样量及顺序: 10× buffer 5 μl; *Taq* 酶 2.5 U; $MycI_2$(4 μl); dNTPs (1 μl); 引物 1 (2 μl); 引物 2(2 μl); 模板 2 μl; 无菌双蒸水 32.5 μl; 无菌石蜡油 20 μl。最佳循环温度及时间: 95 ℃预变性 12 min, 94℃变性 1 min, 62 ℃复性 1 min, 72℃延伸 2 min, 35 个循环, 最后 72℃延伸 5 min。以 2% 琼脂糖凝胶电泳证实 DNA 为 292 bp 或在紫外分光光度仪上检测。扩增产物的限制性酶切: 取 PCR 反应产物加限制性核酸内切酶, 在 PTC-100™型 PCR 反应仪中 37℃恒浴 4 h。反应体系如下: 每 30 μl 反应体系中加: PCR 扩增产物 18 μl; *Hin*6Ⅰ 酶 1 μl; 10× buffer 3 μl; 无菌双蒸水 8 μl; 无菌石蜡油 20 μl; 在 10% 的聚丙烯酰胺中垂直电泳, 100 V 电压 1 h; 将凝胶放入浓度为 0.5 μg/ml 溴化乙锭电泳缓冲液, 染色 2 h; 在紫外灯下观察分型。基因多态性分析: 以 DNA 片段长度标准物为参考, 紫外灯下观察结果, PCR 扩增产物位于 ApoE 基因第 4 外显子内, 涵盖 2 个突变位点, 产物长度 292 bp。ApoE 基因型判定参照 Richard 方法并加以简化, 即纯合子 $\varepsilon_{2/2}$ 在 91、83 bp 出现荧光条带; $\varepsilon_{3/3}$ 在 91、48 bp 出现荧光条带; $\varepsilon_{4/4}$ 在 72、48 bp 出现荧光条带, 杂合子 $\varepsilon_{4/2}$ 出现 91、83、72、48 bp 条带; $\varepsilon_{3/2}$ 出现 91、83、48 bp 条带; $\varepsilon_{4/3}$ 出现 91、72、48 bp 条带。

1.3　统计学方法

使用美国 SPSS 统计软件包(Window10.0)。基因频率采用基因计数法计算。计算各等位基因和基因型频率的分布, 吻合度检验确定是否符合 Hardy-Weinberg 平衡, 基因型或等位基因频率比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　ApoE 基因型和等位基因频率分布

316 例重庆地区老年人中 ApoE 基因型及等位基因频率分

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

布见表1。

表1 重庆地区316例老年人 apoE 基因型和等位基因频率分布(%)

Tab 1 Frequency distribution of ApoE genotypes and allele in elderly people in Chongqing area(%)

Group	n	Frequency of ApoE genotypes						Frequency of ApoE allele		
		ε2/2	ε3/3	ε4/4	ε2/3	ε2/4	ε3/4	ε2	ε3	ε4
ADG	42	2.4	38.1	14.3	4.8	9.5	30.9 *	9.5	56.0	34.5 *
Control	274	1.1	55.5	6.6	19.0	8.0	9.8	14.6	69.9	15.5
Total	316	1.3	53.2	7.6	17.1	8.2	12.7	13.9	68.0	18.1

ADG: senile dementia group; *: $P<0.01$ *vs* Control

2.2 ApoE 等位基因与痴呆症状的相关性分析

应用相对危险度(RR)分析计算 ApoEε4 等位基因与痴呆症状表现的关系,证明 ApoEε4 等位基因与痴呆症状发生有关联,结果如表2。而同样计算证明 ε2 和 ε3 基因与痴呆症发生无关联($P>0.05$)。

表2 ApoE 等位基因与痴呆发病的相关性分析

Tab 2 Relativity analysis of relationship between Apolipoprotein E Genotypes and Senile Dementia Onset

Group	n	n(contain ApoEε4)	r	P
ADG	42	23	0.288	<0.01
Control	274	67		

3 讨论

对 ApoE 基因多态性的研究,不管是在临床诊断治疗还在相关疾病的致病机制及预防对策的研究中都有着非常重要的意义。

3.1 PCR-RELP 方法对ApoE 基因进行分型的评估

早期通过等电聚焦电泳法、Southern Blot 法和 DNA 序列分析(Sequencing)法等对 ApoE 基因分型,但上述方法存在操作麻烦,花费时间较长、测定价格昂贵等缺点,难以在普通实验室开展,不适合于大规模人群检测的需要。多聚酶链式反应-限制性内切酶片段长度多态分析(PCR-RFLP)方法只需将基因组 DNA 中的 ApoE 的特定序列扩增出来,经酶切后凝胶分离溴化乙锭染色后紫外灯下可以直接观察,从而使 ApoE 基因分型。此法因应用 PCR 扩增技术,所需的样本量较少,时间快,可以几十个样本同时操作,避免了一个样本与多个探针杂交的麻烦,同时也消除了放射性物质污染的可能,所以此法方便快速,又能在基因水平上准确地测定 ApoE 的基因型,适合于面向人群的调查研究,将成为分子流行病学调查的主要工具。此外,在该方法的操作中,作者体会到血液样本抗凝方法的选择非常重要,作者比较了 ACD、枸橼酸钠和肝素抗凝样本的结果,发现 ACD 抗凝的样本实验结果最理想。

3.2 ApoE 等位基因频率

等位基因频率分布存在明显的种族差异,ε3 等位基因的相对频率高加索人种一般低于 0.79,亚洲(蒙古人种)多高于 0.82,而 ε4 等位基因的相对频率高加索人种则高于亚洲蒙古人种[2]。国内的研究发现,我国汉族人群中4等位基因的相对频率为7.5%[3],明显低于非洲黑人及高加索人种[2]。白种人 ApoE 等位基因频率相似,芬兰人和瑞典人 AopEε4 等位基因频率较高[4]。不同地区及不同年龄组的中国人 ApoE 等位基因频率无差异,但通过不同地理环境及人种比较发现中国人和日本人 ApoEε4 等位基因频率低于白种人[5]。

3.3 ApoE 与老年性痴呆的关系及研究现状

业已证实,在 Alzheimer 病(AD)的病理学变化如老年斑(SP)、神经元纤维缠结(NFT)、脑血管淀粉样变性中也都有 ApoE[6],说明 ApoE 对神经系统的生理和病理都有着广泛的影响。而且 ApoE 基因型也与 AD 的发生、发展相关,有人对139个临床拟诊为 AD 的病人做了 ApoE 基因的相关分析,发现83%的病人具有 ApoEε4 等位基因[7]。有关报告已达数百篇之多,均表明 AD 病人的 ApoEε4 等位基因出现频度远大于同龄老人和其他神经系统疾病的病人,且对家庭性和散晚发型 AD 病人均有意义,因此认为具有 ApoEε4 等位基因人有较高的 AD 发病率,提出以此作为筛查 AD 高危人群的一个指标。但另一研究对1 899位65岁以上老年人的 ApoE 基因多态性进行了普查,并做了4~7年的跟踪随访后发现,其中的 AD 病人 ApoE4 基因频度增加,但同时也发现一些正常老年人也携带有 ApoEε4 等位基因,但在随访期间一直未发生 AD[8]。因此,现在多数人认为,ApoEε4 等位基因是 AD 的一个危险因素,但并非所有 ApoEε4 的携带者都人患 AD。

此外,对 ApoE 的另一个等位基因 ApoEε2 人们也给予了关注,曾有人提出 ApoEε2 是早发型 AD 的危险因素[9],但也有人通过对209个 AD 病人 ApoE 基因表达频度的检测证明 ApoEε2 并不增加早发型 AD 病人的危险性[10]。还有人对500个80~90岁不含老年斑的非痴呆老人的 ApoE 等位基因类型进行分析后发现,这组老人的 ApoEε2 基因表达频度增高,ApoEε2 基因到达频度增高,ApoEε4 降低,因而认为 ApoEε2 为保护性因素[11]。ApoE 只是多种(至少是四种)AD 相关基因中的一种,难以说明 AD 所有的遗传危险因素。在家庭性 AD 病人的染色体上不断有新的 AD 相关位点发现(如迟发型家族性 AD 病人的第12号染色体),势必推

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

动这方面研究的深入开展。本研究表明:AD 组 ApoEε_4 等位基因频率显著增高, 而 ε_2、ε_3 频率虽比对照组降低但无显著意义, 应用相对危险度(RR)分析, 结果说明 ApoEε_4 等位基因与痴呆症状发生相关性, 而 ε_2、ε_3 等位基因却无这种相关, 这与文献[12]报道的结果基本一致。本研究随机选入 316 例样本, 其中 AD 患者为 42 人, AD 的患病率为 13.29%, 远高于国内其他地区的调查结果, 作者认为这可能与本研究样本量少, 入选样本中文化程度低者比例较大有关。此外, 研究表明 ApoE 还与高脂血症、冠心病、胆石症、肝炎、肝硬化、胆汁淤积性肝病等有密切的关系。目前, ApoE 已成为医学研究新的热点。

3.4　正确评估 ApoEε_4 等位基因的检出

研究虽表明 ApoEε_4 等位基因与老年性痴呆的发病密切相关, 但如前所述, 由于多种因素影响老年性痴呆的发病, 且相关基因还受诸如种族、环境因素的影响, ApoE 基因型对老年性痴呆进行诊断, 还没有充分的敏感性和特异性, 个体检出 ApoE 等位基因, 尚不能作为老年性痴呆症早期诊断的特异性生物学指标, 但对老龄人进行 ApoE 基因型分析可作为临床医师估计老龄人群痴呆发病危险性的辅助手段。当然, 为了得到更明确的资料, 需要研究更多的样本。

参考文献:

[1] Hixson J E, Vernier D T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI[J]. J Lipid Res, 1990, 31(3): 545－548

[2] Hallman D M, Boerwinkle E, Saha N, *et al*. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations [J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(2): 338－349.

[3] 鄢盛恺, 周　新, 哈黛文. 聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测载脂蛋白 E 基因型[J]. 中华医学检验杂志, 1997, 20(1): 28－31.

[4] Pericak-Vance M A, Johnson C C, Rimmler J B, *et al*. Alzheimer disease and apolipoprotein E-4 allele in an Amish population[J]. Ann Neurol, 1996, 39(6): 700－704

[5] 郑以漫, 李小英, 朱宏达　等. PCR-RFLP 法检测上海地区汉人载脂蛋白 E 基因型[J]. 上海第二医科大学学报, 1998, 18(2): 123－125

[6] Evans K C, Berger E P, Cho C G, *et al*. Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(3): 763－767.

[7] Feany M B, Dickson D W. Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review[J]. Ann Neurol, 1996, 40(2): 139－148

[8] Hyman B T, Gomez Isla T, Rebeck G W, *et al*. Epidemiological, clinical, andneuropathological study of apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease[J]. Ann N Y Acad Sci, 1996, 802(12): 1－5.

[9] Farrer L A, Cupples L A, Duijn C M, *et al*. Apolipoprotein E genotype in patients with Alzheimer's disease: implications for the risk of dementia among relatives[J]. Ann Neurol, 1995, 38(5): 797－808.

[10] Scott W K, Saunders A M, Gaskell P C, *et al*. Apolipoprotein E epsilon2 does not increase risk of early-onset sporadic Alzheimer's disease[J]. Ann Neurol, 1997, 42(3): 376－378

[11] Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, *et al*. Apolipoprotein E genotype in elderly nondemented subjects without senile changes in the brain[J]. Ann Neurol, 1996, 40(2): 243－245.

[12] Muller U, Bodeker R H, Gerundt I, *et al*. Lack of association between alpha 1-antichymotrypsin polymorphism, Alzheimer's disease, and allele epsilon 4 of apolipoprotein E[J]. Neurology, 1996, 47(6): 1575－1577.

(编辑　陈聪连)

(上接 159 页)

及特异性均高于尿淀粉酶。

3　讨论

胰蛋白酶原主要有胰蛋白酶原-1 和胰蛋白原酶-2 两种形式。正常情况仅有一小部分出现在外周血中[2,3], 急性胰腺炎时, 胰蛋白酶原大量释放入血, 易于从肾小球滤出, 而肾小管对胰蛋白酶原-2 的重吸收率比胰蛋白酶原-1 低, 因此尿液中胰蛋白酶原-2 的浓度较高, 检测胰蛋白酶原, 可看做是诊断和评估急性胰腺炎病情程度的一项有效方法。

实验结果表明, 尿胰蛋白酶原-2 试条检测急性胰腺炎比尿淀粉酶检测更精确, 出现假阳性的腹痛病人中, 有些病例反应的是胰腺受刺激而引起的亚临床症状或是肿瘤源性胰蛋白酶原-2 所致, 在假阴性患者中, 可能是由于重症胰腺炎使胰蛋白酶原-2 过剩而导致抗原抗体反应比例不合的"Hook 效应"。

我们认为尿胰蛋白酶原-2 作为诊断急性胰腺炎的指标, 具有快速、简便、准确等优点, 明显优于尿淀粉酶, 尿胰蛋白酶原-2 阴性结果很大程度上排除了急性胰腺炎, 而阳性结果需进一步检查。

关键词: 急性胰腺炎; 胰蛋白酶原-2; 淀粉酶
中图法分类号: R446.1; R576.04　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 中华医学会外科学会胰腺学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准(1996 年第二次方案)[J]. 中华外科杂志, 1997, 35(2): 773－775.

[2] Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis[J]. N Eng J Med, 1994, 330(17): 1198－1210.

[3] Petersson V, Appelros S, Borgstrom H. Different patterns in immunoreactive anionic and cationic trypsinogen in urine and serum in human acute pancreatitis[J]. Int J Pancreatol, 1999, 25(3): 165－170.

(编辑　谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net