

· 临床研究 ·

载脂蛋白 E 基因多态性与脑性瘫痪相关性的初步研究

李晓捷 王立革 孙奇峰

【摘要】目的 探讨中国汉族儿童脑性瘫痪与载脂蛋白 E 基因多态性的关系。方法 选取中国汉族儿童,其中 120 名为脑性瘫痪患儿,设为脑瘫组,120 例为正常儿童,设为对照组。应用聚合酶链反应与限制性片断长度多态性分析方法测定脑瘫组和对照组的载脂蛋白 E 基因型和等位基因,并探讨载脂蛋白 E 基因多态性与脑性瘫痪的关系。结果 对照组和脑瘫组载脂蛋白 E 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 定律($P > 0.05$),对照组与脑瘫组的载脂蛋白 E 基因型和等位基因频率分布差异有统计学意义($P < 0.01$),携带 $\epsilon 4$ 等位基因在对照组、脑瘫组间差异有统计学意义($P < 0.01$),携带 $\epsilon 4$ 等位基因的儿童患脑性瘫痪的风险性提高 5.455 倍($OR = 5.455, 95\% CI: 2.059 \sim 14.455$)。结论 载脂蛋白 E 的 $\epsilon 4$ 等位基因与脑性瘫痪的发病相关,是脑性瘫痪发病的遗传易感因子。

【关键词】 脑性瘫痪; 载脂蛋白 E; 基因多态性

Apolipoprotein E genotype polymorphism and cerebral palsy in children LI Xiao-jie, WANG Li-ping, SUN Qi-feng. Children's Neural Rehabilitation Laboratory, Rehabilitation Medicine College of Jiamusi University, Jiamusi 154002, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the association between apolipoprotein E (apoE) genotype polymorphism and cerebral palsy (CP) in Han Chinese children. **Methods** Two hundred and forty Han Chinese children were selected, including 120 children with cerebral palsy (CP group) and 120 normal children (control group). Polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism analysis was used to determine the genotype and alleles of apoE genotype in the two groups. **Results** The genotype distributions of apoE in the two groups were consistent with the existence of a Hardy-Weinberg equilibrium. There were significant differences in the distributions of allelic frequency and apoE genotype between the two groups. Carrying the $\epsilon 4$ allele was related to cerebral palsy, and the overall risk for cerebral palsy was elevated about 5.5-fold among children carrying the $\epsilon 4$ allele. **Conclusions** There is an association between apoE genotype and cerebral palsy, and apoE's $\epsilon 4$ allele is the associated risk factor.

【Key words】 Cerebral palsy; Apolipoprotein E; Genotypes

脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)简称脑瘫,是造成儿童残疾的主要疾病之一,表现以运动功能障碍为主,可伴有智力低下、癫痫、行为异常、感知觉障碍等。国外研究发现,载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 基因多态性与认知、记忆关系密切^[1-2],亦与中枢神经系统疾病相关^[3-4],也有关于 apoE 动物实验的报道^[5-6]。目前有报道 apoE 多态性与脑瘫的发病密切相关,但国内尚无相关报道^[7-8]。本研究应用聚合酶链反应与限制性片断长度多态性(polymerase chain reaction-restricted

fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分析方法对 apoE 基因多态性进行检测,对脑瘫与 apoE 基因多态性进行相关分析,探讨 apoE 基因多态性与脑瘫发病的关系。

资料与方法

一、临床资料

选取 2008 年 3 月至 2009 年 1 月在佳木斯大学附属第三医院门诊或住院的脑瘫患者 120 例为脑瘫组(CP 组),其中男 65 例,女 55 例;年龄为 1.14 ~ 12.37 岁,平均(3.27 ± 2.14)岁,均为汉族。诊断均符合 2006 年长沙第二届全国儿童康复学术会议标准^[9],同时除外单纯精神发育迟滞、中枢神经系统感染性疾病、注意缺陷多动障碍、癫痫、已确诊有染色体异常或其它神经系统器质性疾病者。选择佳木斯市幼儿园和小学

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.01.013

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11541351);黑龙江省卫生厅科研课题(2009-340);佳木斯大学科学技术研究项目(S2008-034);黑龙江省 2009 年研究生创新科研资金项目(YJSCX2009-113HLJ)

作者单位:154002 佳木斯,佳木斯大学康复医学院,佳木斯大学儿童神经康复实验室

的汉族健康儿童 120 名为对照组,其中男 68 名,女 52 名;年龄 1.48 ~ 12.59 岁,平均 (4.58 ± 2.39) 岁。所有受试者均由其父母签署知情同意书。

二、主要材料与设备

脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 提取试剂盒 (大连宝生物公司生产,批号: D9081), 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒 (大连宝生物公司生产,批号: DDR350), 丙烯酰胺 (大连宝生物公司生产,批号: D753); DNA marker (大连宝生物公司生产,批号: D512A), 限制性内切酶: Hha I (大连宝生物公司生产,批号: D1056A), 琼脂糖 (大连宝生物公司生产,批号: D601)。PCR 仪 (西安天隆科技有限公司); 电泳仪 (北京军仪东风电泳仪公司); 凝胶成像分析系统 (北京亚力恩机电技术研究所); 其它试剂均为进口分装或国产分析纯。

三、方法

1. 标本采集: 采集静脉血 2 ml, 加乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝剂后保存于 -80°C 冰箱中, 用于基因组 DNA 分离、PCR 扩增以及 apoE 多态性分析。

2. DNA 提取: 用大连宝生物公司的全血 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 将提取的 DNA 置 -80°C 冰箱保存待用。

3. PCR 扩增: 采用 PCR-RFLP 法, 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, 产物片段为 292 bp。引物序列如下: P_1 -5'-AACAACCTGACCCCGGTGGCG-3', P_2 -5'-ATGGCGCTGAGGCCGCGCTC-3', 由 Invitrogen 公司合成。PCR 反应体系: 总体积 20 μl , 其中模板 DNA 0.5 ng、引物 (10 pM) 各 0.4 μl 、dNTP (各 2.5 mM) 1.6 μl 、10 $\times$ PCR buffer 2 μl , 金牌 Taq 酶 0.5 u, 加入双蒸水至 20 μl , PCR 扩增仪扩增, 反应条件为 95°C 预变性 10 min, 95°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 30 s, 共 30 个循环, 最后 72°C 延伸 8 min, 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测是否有特异性的 PCR 扩增产物。

4. 酶切及电泳: 取 PCR 产物 8 μl , Hha I 1 μl 、酶解反应缓冲液 2 μl , 蒸馏水 9 μl , 总反应体系 20 μl , 于 37°C 水浴 4 h, 取酶切产物 20 μl 进行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 500 V, 电泳 1 h, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果。

四、检测指标

检测对照组正常儿童及 CP 组患儿 apoE 基因型及等位基因型, apoE 共有 6 种基因型^[10]: ①E2/2 基因型有 3 条带 (91 bp, 83 bp, 61 bp); ②E2/3 基因型有 5 条带 (91 bp, 83 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp); ③E2/4 基因型有 6 条带 (91 bp, 83 bp, 72 bp, 61 bp, 48 bp,

35 bp); ④E3/3 基因型有 4 条带 (91 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp); ⑤E3/4 基因型有 5 条带 (91 bp, 72 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp); ⑥E4/4 基因型有 4 条带 (72 bp, 61 bp, 48 bp, 35 bp)。

五、统计学分析

资料的统计分析采用 SPSS 16.0 版本进行分析, 基因型频率比较采用 Fisher 确切概率法, 等位基因频率比较采用 χ^2 检验, 采用比值比 (Odds ratio, OR) 评价基因型和等位基因对疾病的影响, 并计算其 95% 的可信区间 (95% CI), 按照遗传统计学中 Hardy-Weinberg 平衡定律统计学分析, 进行群体平衡验证^[11]。

结 果

一、apoE 基因多态性的检测结果

通过与分子 Marker 比较读出基因型, 共检测出 6 种基因型, 见图 1。

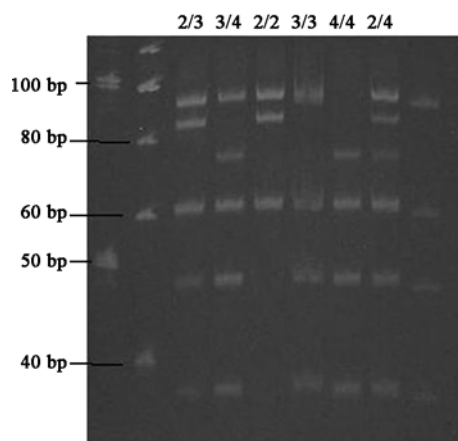


图 1 apoE 基因型 PCR-RFLP 电泳检测结果

二、对照组、CP 组 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验结果

对照组、CP 组经过 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验, 均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则 ($P > 0.05$), 见表 1。

三、对照组、CP 组 apoE 基因型频率及其等位基因频率分布

本研究 apoE 基因 6 种基因型中 E3/3 基因型频率在对照组、CP 组中均高于其他基因型, 分别是 85%、68.4%, 而 E3/4 基因型在 CP 组频率高, 为 16.7%。经 Fisher 确切概率法检验, apoE 基因型频率分布在 2 组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 详见表 2。

apoE 基因有 3 种不同的等位基因, 分别是 ϵ_2 、 ϵ_3 、 ϵ_4 。 ϵ_3 等位基因频率在对照组、CP 组均高于 ϵ_2 、 ϵ_4 等位基因, 分别是 92.1%、81.7%, ϵ_4 等位基因在 CP 组频率高, 为 10.8%。经卡方检验, ϵ_2 、 ϵ_3 、 ϵ_4 等位基

表 1 对照组、CP 组 apoE 基因 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

组 别	基因型						合计
	E2/2	E2/3	E2/4	E3/3	E3/4	E4/4	
对照组							
基因型实得数(例)	0	13	1	102	4	0	120
基因型预期数	0.4083	12.8915	0.2916	101.7513	4.6034	0.0520	119.9981
CP 组							
基因型实得数(例)	1	12	4	82	20	1	120
基因型预期数	0.675	14.7006	1.9494	80.0398	21.2277	1.4075	120

注:对照组 $\chi^2 = 2.2613, P > 0.05$; CP 组 $\chi^2 = 2.9465, P > 0.05$

因频率分布在两组之间差异有非常显著性意义($\chi^2 = 16.225, P < 0.01$)。根据 apoE 基因分为 $\epsilon 4$ 等位基因携带者(包括 $\epsilon 2/4$ 、 $\epsilon 3/4$ 、 $\epsilon 4/4$)和非 $\epsilon 4$ 等位基因携带者(包括 $\epsilon 2/2$ 、 $\epsilon 2/3$ 、 $\epsilon 3/3$)进行比较分析,显示 $\epsilon 4$ 等位基因携带者比率在对照组、CP 组间差异有非常显著性意义($\chi^2 = 15.238, P < 0.01$),详见表 3。

表 2 对照组、CP 组 apoE 基因型频率的分布

组 别	例数	基因型频率[例(%)]					
		E2/2	E2/3	E2/4	E3/3	E3/4	E4/4
对照组	120	0	13(10.8)	1(0.8)	102(85)	4(3.3)	0
CP 组	120	1(0.8)	12(10)	4(3.3)	82(68.4)	20(16.7)	1(0.8)

注:基因型比较,Fisher 确切概率 $P < 0.01$

表 3 对照组、CP 组 apoE 等位基因频率的分布

组 别	例数	等位基因频率[例(%)]				
		$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$	$\epsilon 4 -$	$\epsilon 4 +$
对照组	120	14(5.8)	221(92.1)	5(2.1)	115(95.8)	5(4.2)
CP 组	120	18(7.5)	196(81.7)	26(10.8)	95(79.2)	25(20.8)

注:等位基因比较, $\chi^2 = 16.225, P < 0.01$; $\epsilon 4$ 等位基因携带者比较, $\chi^2 = 15.238, P < 0.01$

四、apoE 基因多态性与脑瘫风险性分析

与非 E3/4 基因型(含 E2/2、E2/3、E3/3、E2/4 和 E4/4)比较,E3/4 基因型患脑瘫的风险性为 5.800 倍(OR = 5.800, 95% CI: 1.918 ~ 17.535, $P = 0.001$),与非 E4/4 基因型(含 E2/2、E2/3、E3/3、E2/4 和 E3/4)比较,E4/4 基因型患脑瘫的风险性为 2.008 倍(OR = 2.008, 95% CI: 1.768 ~ 2.281, $P = 1.000$)。与非 $\epsilon 4$ 等位基因(含 $\epsilon 2$ 和 $\epsilon 3$)比较, $\epsilon 4$ 等位基因患脑瘫的风险性为 5.455 倍(OR = 5.455, 95% CI: 2.059 ~ 14.455, $P = 0.000$),见表 4。

讨 论

脑瘫是由于发育中胎儿或婴儿脑的非进行性损伤或发育障碍所致持续性运动和姿势发育异常、活动受限的一组综合征^[12]。其发病机制至今尚不清楚。近年来研究显示遗传因素在脑瘫中影响越来越重要。遗传因素可能决定神经损伤后的严重程度、预后及临床表现^[13]。

本研究从 apoE 基因多态性与脑瘫发病的关系出发,选取第 4 外显子区含编码 112 位与 158 位氨基酸的基因序列进行扩增并分析基因型,以了解它们之间的关系,探讨 apoE 基因型与脑瘫的相关性。为进一步探讨脑瘫的发病机制,在基因水平上揭示脑瘫的病因,为脑瘫的有效预防、早期诊断、早期干预提供有力依据及方法。本研究发现,对照组与 CP 组的基因型频率及等位基因频率存在显著差异。携带 $\epsilon 4$ 等位基因患者患脑瘫的风险性提高 5.455 倍,提示 apoE 的 $\epsilon 4$ 等位基因与脑瘫的发病相关,是脑瘫发病的遗传易感因子。本研究结果与国外研究结果基本一致^[9-10],均支持 apoE 的 $\epsilon 4$ 等位基因与脑瘫有关。

脑瘫的病理改变很广泛,主要为脑干神经核、皮质、灰质团块的神经元结构改变以及白质中神经纤维变化及髓鞘分离等。低氧、缺血或低血糖引起的细胞 ATP 减少,可使细胞死亡;高胆红素血症致脑瘫兔海马、基底节区神经元数量减少,脑干、海马、基底节区神经髓鞘脱失;宫内感染致大鼠脑损伤可导致内源性神经干细胞损伤,数量减少,迁移能力降低^[12]。各种病理改变的共同特征是由损伤所致伴有炎症反应的神经

表 4 apoE 基因多态性与脑瘫风险性分析

	基因型					等位基因		
	E2/2	E2/3	E3/3	E3/4	E4/4	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
脑瘫 OR 值	2.008	0.915	0.381	5.800	2.008	1.309	0.383	5.455
(95% CI)	1.768 ~ 2.281	0.399 ~ 2.095	0.202 ~ 0.716	1.918 ~ 17.535	1.768 ~ 2.281	0.635 ~ 2.696	0.216 ~ 0.78	2.059 ~ 14.455
P 值	1.000	0.833	0.002	0.001	1.000	0.464	0.001	0.000

注:E2/4 含有 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 4$ 两种不同作用的等位基因,所以未作风险性分析

细胞数目减少,进而导致发育异常。

人类 apoE 基因位于第 19 号染色体长臂(19q13.2)上,有 4 个外显子及 3 个内含子,其结构基因位点具有明显的遗传多态性;3 个共显性等位基因为:ε2、ε3 和 ε4,分别编码 3 种主要的 apoE 异构体:E2、E3、E4;在人群中这 3 种等位基因中任何 2 种表达可产生 6 种不同的表型,即 3 种杂合体(E2/3, E3/4, E2/4)和 3 种纯合体(E2/2, E3/3, E4/4)。除 apoE4 外,其余的蛋白亚型在脑损伤过程中通过参与脑损伤后脂类细胞碎片的清除工作、细胞膜修复、再生与维持及突触发生^[14],而对中枢神经系统起保护作用,降低脑损伤严重程度。在动物实验中,脑损伤后在脑脊液中注入 apoE2、apoE3 可以减少神经细胞损伤的数量,而脑脊液中 apoE2、apoE3 浓度降低可导致急性脑损伤,并影响细胞膜和突触的维持和修复^[15]。ε4 等位基因所表达的 apoE4 对神经胶质细胞(星形胶质细胞和小胶质细胞)具有激活作用,降低脑损伤炎症应答反应作用较 apoE2 和 apoE3 弱^[16],导致神经细胞数目减少,携带 ε4 等位基因会导致 apoE 亚型对脑损伤后炎症反应的保护作用降低。

apoE4 可增加脑瘫的发病风险。目前认为 apoE4 的作用主要通过神经细胞损伤后保护作用的缺失,或参与信号转导过程导致神经细胞凋亡和中枢神经系统的过度免疫反应而增加脑瘫的发病风险。但是,若无致病因素,apoE4 则无法成为单独的脑瘫致病因素。对 apoE 的结构和功能及其基因多态性,尚需进一步研究,以确定其在脑瘫发病中的作用机制,以便于早期预防、早期发现。

虽然 apoE4 蛋白的直接调控作用无法直接导致脑瘫,但 apoE4 降低任何潜在的对大脑损伤后修复的保护作用,故携带 ε4 等位基因更易患脑瘫。本研究在脑瘫的预防与治疗中具有重要的临床意义。

本研究是在我国初次进行脑瘫遗传因素的探索性研究,在设计上可能有不足之处,虽然未对同样环境因素的儿童进行对比研究,但正常儿童中也未排除各种不利因素的存在。因本研究为回顾性调查,故结果可能出现假阳性,应在大样本前瞻性调查基础上作进一步研究,以确定 apoE 基因型与脑瘫之间的关系。

目前研究证明,60% ~ 70% 的脑瘫是由于在出生前即发生脑损伤或脑发育障碍而导致。本研究结果证明携带 ε4 等位基因者具有较高发生脑瘫的可能性,这种脑瘫的发生应以胎内脑发育阶段为主。在本研究基

础上,将进一步研究在同样环境中脑瘫的发生与 apoE 基因的关系。

参 考 文 献

- [1] Ghaffar O, Reis M, Pennell N, O'Connor P, et al. APOE epsilon4 and the cognitive genetics of multiple sclerosis. *Neurology*, 2010, 20: 1611-8.
- [2] Korwek KM, Trotter JH, Ladu MJ, et al. ApoE isoform-dependent changes in hippocampal synaptic function. *Mol Neurodegener*, 2009, 4:21.
- [3] Gutiérrez-Galve L, Lehmann M, Hobbs NZ, et al. Patterns of cortical thickness according to APOE genotype in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2009, 5:476-485.
- [4] Martínez MF, Martín XE, Alcelay LG, et al. The COMT Val158 Met polymorphism as an associated risk factor for Alzheimer disease and mild cognitive impairment in APOE 4 carriers. *BMC Neurosci*, 2009, 10:125.
- [5] Kus K, Gajda M, Pyka-Fosciak G, et al. The effect of nebivolol on atherogenesis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 4: 163-165.
- [6] Erbel C, Chen L, Bea F, et al. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol*, 2009, 12:8167-8175.
- [7] Meirelles Kalil Pessoa de Barr, Rodrigues CJ, de Barros TE, Bevilacqua RG. Presence of apolipoprotein E epsilon4 allele in cerebral palsy. *Pediatric Orthop*, 2000, 6:786-789.
- [8] Kuroda MM, Weck ME, Sarwark JF, Hamidullah A et al. Apolipoprotein E Genotype and Cerebral Palsy in Children. *Pediatrics*, 2007, 2:306-313.
- [9] 陈秀洁, 李树春. 小儿脑性瘫痪的定义、分型和诊断条件. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 5:309.
- [10] Hixson J, Vernier F. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990, 31:545-548.
- [11] Balding DJ, Bish M, Cannings C. *Handbook of Statistical Genetics*. Third Edition. England: Wiley press, 2007:1011.
- [12] 李晓捷. 实用小儿脑性瘫痪康复治疗技术. 北京:人民卫生出版社, 2009:2-5.
- [13] Wright A. Neurogenetics II: complex disorders. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005, 5:623-631.
- [14] White F, Nicoll JA, Horsburgh K. Impaired neuronal plasticity in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 compared to E3 in a model of entorhinal cortex lesion. *Neurobiol Dis*, 2001, 4:611-625.
- [15] Kay AD, Day SP, Kerr M, et al. Remodeling of cerebrospinal fluid lipoprotein particles after human traumatic brain injury. *Neurotrauma*, 2003, 8:717-723.
- [16] Cacabelos R. Pharmacogenomics in Alzheimer's disease. *Methods Mol Biol*, 2008, 448:213-357.

(修回日期:2010-10-20)

(本文编辑:阮仕衡)