

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002796

载脂蛋白 E 基因多态性与面肌痉挛发病率的相关性研究

袁三贵, 羊江山, 周建鑫, 邓 博, 蒋 理, 詹 彦, 但 炜, 谢廷凤, 石全红

(重庆医科大学附属第一医院神经外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究载脂蛋白 E 基因 (apolipoprotein E gene, APOE) 多态性与面肌痉挛发病率是否存在关联。**方法:**收集重庆医科大学附属第一医院 94 例面肌痉挛患者 (面肌组) 和 73 例正常人 (对照组) 的临床资料, 采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (cleaved amplification polymorphism sequence-tagged sites, CAPs) 检测所有人员的 APOE 基因型, 分别计算出面肌组和对照组 3 种 APOE 等位基因, 即 APOE ϵ 2、APOE ϵ 3 和 APOE ϵ 4 的分布情况, 进行统计学分析其分布是否存在差异。**结果:**面肌组 APOE ϵ 4 等位基因频率为 15.43%, 明显高于对照组的 6.85%; 同时, 面肌组的 APOE ϵ 4 等位基因携带者所占比例为 29.79%, 也明显高于对照组的 13.70%, 2 组之间差异具有统计学意义 ($P=0.014$)。**结论:** APOE 基因多态性可能与面肌痉挛的发病率有关, 其中 APOE ϵ 4 等位基因携带者可能更容易罹患面肌痉挛。

【关键词】 APOE 基因多态性; 面肌痉挛; 相关性**【中图分类号】** R651.1⁹**【文献标志码】** A**【收稿日期】** 2020-09-27

Correlation between apolipoprotein E gene polymorphisms and incidence of hemifacial spasm

Yuan Sangui, Yang Jiangshan, Zhou Jianxin, Deng Bo, Jiang Li, Zhan Yan, Dan Wei, Xie Yanfeng, Shi Quanhong
(Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the correlation between the apolipoprotein E (APOE) gene polymorphisms and the incidence of hemifacial spasm. **Methods:** The information of 94 hemifacial spasm cases (hemifacial spasm group) diagnosed in The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University and 73 normal subjects (control group) was collected for this research. And the APOE genotype was determined by means of cleaved amplification polymorphism sequence-tagged sites (CAPs). Then we obtained the gene frequency of APOE ϵ 2, APOE ϵ 3 and APOE ϵ 4, and compared the distribution of allele between the hemifacial spasm group and the control group. **Results:** The rate of APOE ϵ 4 allele gene in hemifacial spasm group was 15.43%, which was significantly higher than that in control group (6.85%). And the carriers of APOE ϵ 4 allele gene accounted for 29.79% in the hemifacial spasm group, which was also significantly greater than that in control group (13.70%). There were significant differences between the two groups ($P=0.014$). **Conclusion:** The morbidity of hemifacial spasm is associated with the APOE gene polymorphisms, and the carriers of APOE ϵ 4 allele gene may be more likely to suffer from the hemifacial spasm.

【Key words】 apolipoprotein E gene polymorphisms; hemifacial spasm; correlation

面肌痉挛为神经系统常见疾病^[1]。其主要表现为面部肌肉不自主抽动, 解剖上的病因已被公认, 但其生物学机制仍不明, 故诊断主要依靠临床表现和影像学。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 是人体内重要的载脂蛋白, 由载脂蛋白 E 基因 (apolipoprotein E gene, APOE) 编码, 具有 3 个等位基因: APOE ϵ 2、

APOE ϵ 3 和 APOE ϵ 4, 共组合成 6 种表型, 在脂类代谢、突触传递、神经形成和修复等方面均发挥重要作用。不同 apoE 在功能上具有亚型特异性, 与神经系统多种疾病, 如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 等相关。本课题组长期进行 APOE 相关研究, 在临床工作中偶然发现在面肌痉挛患者中, 携带 APOE ϵ 4 基因亚型的患者所占比例较大。为进一步探究面肌痉挛和 APOE 多态性之间的关系, 本研究收集了面肌痉挛患者的相关资料, 测定患者的 APOE 基因型, 研究 APOE 多态性是否与面肌痉挛发病率有关。

作者介绍: 袁三贵, Email: 1245130511@qq.com,

研究方向: 功能神经外科。

通信作者: 石全红, Email: 417149803@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 8170051808)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210419.1408.006.html>

(2021-04-20)

1 资料与方法

本研究收集 2019 年 3 至 12 月就诊于重庆医科大学附属第一医院神经外科并诊断为面肌痉挛的患者;同时纳入正常人作为对照组。

1.1 临床资料

正常对照组纳入标准:正常成年人;年龄为 30~75 岁。排除标准:既往有颅神经疾病、颅脑外伤、颅内占位、脑血管疾病、颅内感染、精神疾病或痴呆等神经系统疾病相关病史。最终共纳入 73 名正常成年人作为正常对照组,其中女性 38 例,男性 35 例,平均年龄 44.70 岁。

实验组纳入标准:符合典型面肌痉挛临床表现典型诊断^[2];病史长于 1 年;经 CT、MRI 等排除颅内面神经相关的继发性病变;年龄 30~75 岁。排除标准:既往有面瘫、精神疾病、脑血管性疾病如脑梗死、脑炎或痴呆等神经系统疾病史。本次研究共收集 96 例面肌痉挛患者的临床资料,按照排除标准排除 2 人,纳入 94 例面肌痉挛患者作为实验组,其中男性 34 例,女性 60 例,平均年龄 50.38 岁。

本研究的实验程序符合重庆医科大学附属第一医院伦理委员会所制定的伦理学标准并获审批[2019 年科研伦理(2019-258)]。

1.2 APOE 基因型鉴定

抽取所有入选者的静脉血 2 mL,使用新百基核酸提取试剂在奥盛全自动核酸提取仪(Auto-Pure32A)提取受试者 DNA;将待测样本的基因组 DNA、弱阳性对照组、空白对照分别加入已装有人 APOE 基因检测试剂(武汉友芝友医疗科技股份有限公司)的反应管中;将准备好的反应管放入实时 PCR 扩增仪(7500 Real-time PCR System),按程序(第一阶段:37℃、10 min,1 个循环;第二阶段:95℃、5 min,1 个循环;第三阶段:95℃、15 s,60℃、60 s,40 个循环;信号采集:第三阶段 60℃收集 FAM、VIC、ROX 信号,执行实时 PCR)进行扩增;分别根据样本 FAM 通道、VIC 通道的 C_t 值进行结果判定,按表 1 确定基因型。

表 1 APOE 基因型判定表

APOE 基因型	APOE 监测位点	
	E2	E4
$\epsilon 2/\epsilon 2$	526T/T	388T/T
$\epsilon 2/\epsilon 3$	526C/T	388T/T
$\epsilon 2/\epsilon 4$	526C/T	388T/C
$\epsilon 3/\epsilon 3$	526C/C	388T/T
$\epsilon 3/\epsilon 4$	526C/C	388T/C
$\epsilon 4/\epsilon 4$	526C/C	388C/C

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料采用率(%)表示,采用卡方检验,使用 $R \times C$ 列联表法($n \geq 40$ 且所有的 $T \geq 5$ 时采用 Pearson 卡方检验,当 $n \geq 40$ 但有 $1 \leq T < 5$ 时采用校正卡方检验,当 $n < 40$ 或 $T < 1$ 时采用 Fisher 卡

方检验);最后将各因素与目标变量导入 logistic 回归模型进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 临床数据

本次研究共纳入面肌痉挛患者 94 例作为实验组(面肌组),73 例正常人作为对照组,收集入选者的性别、年龄、烟酒嗜好、高血压、糖尿病的相关临床资料(表 2),采用卡方检验分析 2 组数据在性别、烟酒嗜好、高血压、糖尿病构成上无统计学差异($P>0.05$),采用独立样本 t 检验分析 2 组数据在年龄构成上无统计学差异($P>0.05$)。

表 2 面肌组与对照组临床资料构成对比分析表($n, \%; \bar{x} \pm s$)

临床资料	对照组 ($n=73$)	面肌组 ($n=94$)	t/χ^2 值	P 值
性别 男	35 (47.9)	34 (36.2)	2.350	0.125
女	38 (52.1)	60 (63.8)		
年龄/岁	44.7 $\pm$ 9.4	50.4 $\pm$ 9.4	3.876	0.723
吸烟	20 (27.4)	19 (20.2)	1.185	0.276
喝酒	15 (20.5)	13 (13.8)	1.329	0.249
高血压	17 (23.3)	24 (25.5)	0.112	0.738
糖尿病	8 (11.0)	7 (7.4)	0.620	0.431

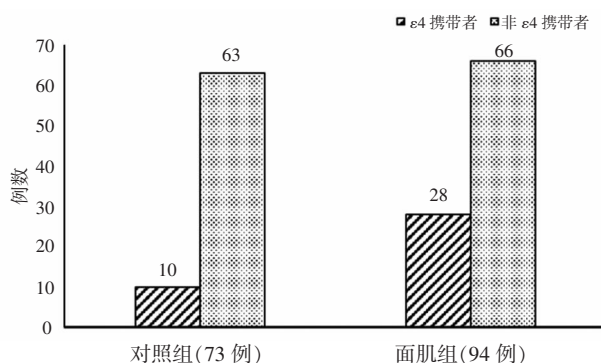
2.2 基因型分布

APOE 有 3 个等位基因,共产生 6 种表型,包括 3 种纯合子($\epsilon 2/\epsilon 2, \epsilon 3/\epsilon 3, \epsilon 4/\epsilon 4$)和 3 种杂合子($\epsilon 2/\epsilon 3, \epsilon 2/\epsilon 4, \epsilon 3/\epsilon 4$)。课题组分别计算了面肌组和对对照组各基因型及等位基因频率,并做了卡方检验分析(表 3)。在面肌组中共有 28 例 APOE $\epsilon 4$ 等位基因携带者,其中包括 4 例 $\epsilon 2/\epsilon 4$ 、23 例 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 和 1 例 $\epsilon 4/\epsilon 4$,明显多于对照组中 10 例 APOE $\epsilon 4$ 等位基因携带者(图 1),差异具有统计学意义($P=0.014$)。面肌组 APOE $\epsilon 4$ 等位基因携带者中所占比例最大的是 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 基因型,有 23 例,远多于对照组中的 9 例,同样具有统计学意义($P=0.048$)。面肌组中 APOE $\epsilon 4$ 等位基因频率为 15.43%,对照组中 APOE $\epsilon 4$ 等位基因频率为 6.85%,两者的差异同样具有统计学意义。

表 3 面肌组与对照组基因型统计分析表($n, \%$)

基因型	对照组 ($n=73$)	面肌组 ($n=94$)	χ^2 值	P 值
基因型				
$\epsilon 2/\epsilon 2$	1 (1.37)	0 (0.00)	1.663	0.197
$\epsilon 2/\epsilon 3$	10 (13.70)	11 (11.70)	0.149	0.700
$\epsilon 3/\epsilon 3$	52 (71.23)	55 (58.51)	2.889	0.089
$\epsilon 2/\epsilon 4$	1 (1.37)	4 (4.26)	0.394	0.530
$\epsilon 3/\epsilon 4$	9 (12.33)	23 (24.47)	3.909	0.048
$\epsilon 4/\epsilon 4$	0 (0.00)	1 (1.06)	1.154	0.283
$\epsilon 4$ 携带者	10 (13.70)	28 (29.79)	6.051	0.014
等位基因				
$\epsilon 2$	13 (8.90)	15 (7.98)	0.092	0.762
$\epsilon 3$	123 (84.25)	144 (76.59)	3.000	0.083
$\epsilon 4$	10 (6.85)	29 (15.43)	5.861	0.015

注: $\epsilon 2/\epsilon 2, \epsilon 4/\epsilon 4$ 采用 Fisher 卡方检验, $\epsilon 2/\epsilon 4$ 采用校正卡方检验,其余数据采用 Pearson 卡方检验



注:面肌组中共有 28 例 APOE ϵ 4 等位基因携带者,明显多于对照组中 10 例 APOE ϵ 4 等位基因携带者,差异具有统计学意义 ($P=0.014$)

图 1 ϵ 4 分布直方图

2.3 面肌痉挛患者中各因素对 APOE ϵ 4 等位基因分布的影响

面肌组中 APOE ϵ 4 等位基因携带者明显高于对照组,为了探究面肌组各因素对 APOE ϵ 4 等位基因携带者的分布是否有影响,课题组将是否携带 APOE ϵ 4 等位基因 (携带 APOE ϵ 4=1,不携带 APOE ϵ 4=0)作为因变量(Y),分别将性别 (女=1,男=0)、年龄 (年龄大于等于 50 =1,年龄小于 50 =0)、烟酒嗜好 (是=1,否=0)、高血压 (有=1,无=0)、糖尿病 (有=1,无=0)、冠心病 (有=1,无=0)、超重 (体质指数 ≥ 25 kg/m 2 =1, <25 kg/m 2 =0)作为自变量(X)带入 logistic 回归模型中进行分析 (表 4),得出各个因素与是否携带 APOE ϵ 4 等位基因没有显著性关系 ($P>0.05$)。

3 讨论

人 APOE 基因由 3 597 个核苷酸组成,含有 4 个外显子和 3 个内含子,共有 3 个等位基因,即 APOE ϵ 2、APOE ϵ 3 和 APOE ϵ 4;其基因型包括 3 个纯合子,即 APOE ϵ 2/APOE ϵ 2、APOE ϵ 3/APOE ϵ 3、APOE ϵ 4/APOE ϵ 4 和 3 个杂合子,即 APOE ϵ 2/APOE ϵ 3、APOE ϵ 2/APOE ϵ 4、APOE ϵ 3/APOE ϵ 4。其中, ϵ 3 是野生型,功能正常,人群中占比最高^[3-4],而 ϵ 2 和 ϵ 4 是突变型,而 ϵ 4 被认为在多种疾病中扮演负向调控因子的作用。研究表明 ϵ 4 能够提高晚发和散发型 AD 的发病风险^[5-7]。而在其他一些疾病中, ϵ 4 也可能发挥重要

作用。研究表明,APOE 基因多态性可能影响 TBI 患者预后,其中 ϵ 4 携带者的预后可能更差^[8-9]。本课题组的前期研究也发现,APOE ϵ 4 可能通过影响兴奋性氨基酸的释放和细胞内钙离子浓度,增加神经元凋亡;同时,可能通过影响血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性导致脑水肿情况加重^[10-13]。其他研究也显示 APOE ϵ 4 在脑血管疾病和脱髓鞘疾病的病理发生过程中也起着一定促进作用^[14-17]。

本研究结果显示,面肌痉挛患者中基因型为 APOE ϵ 3/ ϵ 4 的患者所占比例为 24.47%,明显高于对照组 (12.33%) ($P=0.048$),但其他基因型患者的比例则与对照组则无统计学差异。在等位基因分布方面,面肌痉挛患者的 APOE ϵ 4 等位基因频率为 15.43%,而对照组的 APOE ϵ 4 等位基因频率为 6.85%,明显低于面肌组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。同时,面肌痉挛患者中 APOE ϵ 4 携带者的比例为 29.79%,明显高于对照组 (13.70%) ($P<0.05$)。因此推断,APOE 基因多态性可能与面肌痉挛有关,与 APOE ϵ 3 和 APOE ϵ 2 相比,APOE ϵ 4 携带者可能更容易发生面肌痉挛。然而,APOE ϵ 4 通过哪些途径影响面肌痉挛的发生,与哪些因素相关,目前仍不清楚。

面肌痉挛的发病机制目前尚无定论,主要包括以下 3 种假说。周围学说认为,出脑干区域(root exit zone, REZ)的面神经由于较少有 Schwann 细胞包裹^[18],长期受邻近血管压迫而受损,导致脱髓鞘化等病理改变^[19],轴突裸露的神经纤维之间产生跨突触传递的异位冲动,最终导致面部肌肉不自主抽动。中枢学说^[20-21]则认为,面神经 REZ 段受血管压迫,产生逆行冲动传导,使面神经运动核兴奋性增高,并发生功能和结构变化,形成爆发式下传冲动,引起临床症状发生。我国研究者提出的交感学说^[22-24]认为,责任血管长期压迫面神经根,波动造成彼此摩擦,导致血管壁破损及面神经的脱髓鞘改变,血管壁暴露的交感神经纤维与裸露的面神经直接接触,成为联系不同面神经纤维之间的桥梁,交感兴奋时释放神经递质,作用于受损的面神经并使之产生动作电位,

表 4 面肌组中各因素与是否携带 ϵ 4 等位基因的逻辑回归分析

因素	b	S_b	Wald χ^2	P	OR (95%CI)
性别	0.840	0.641	1.717	0.190	2.317 (0.659~8.143)
年龄	-0.582	0.514	1.283	0.257	0.559 (0.204~1.530)
吸烟	-0.186	0.765	0.059	0.808	0.830 (0.185~3.723)
喝酒	-0.086	0.749	0.013	0.908	0.917 (0.211~3.979)
高血压	-0.294	0.661	0.197	0.657	0.745 (0.204~2.725)
糖尿病	1.134	0.964	1.385	0.239	3.108 (0.470~20.543)
冠心病	-0.018	1.327	0.000	0.989	0.982 (0.073~13.241)
超重	-0.999	0.672	2.211	0.137	0.368 (0.099~1.374)

进而通过交感神经桥梁扩散至其他面神经分支,导致临床症状发生。因此,面肌痉挛可能与神经脱髓鞘变化、电活动的产生和传导、神经递质释放等有关。根据既往研究,APOE ϵ 4 被认为可能通过参与多个重要的信号通路,影响数种疾病的病理生理过程。有研究者发现,APOE ϵ 4 可以通过干扰神经元及髓鞘再生,促进脱髓鞘疾病的病理进展^[25-26]。国内也有研究发现 APOE 多态性可能影响 TBI 后患者的脑电活动,其中 APOE ϵ 4 可能与 TBI 后患者脑电情况恶化有关^[9]。同时,APOE ϵ 4 可能与兴奋性氨基酸过度释放导致的神经兴奋性毒性有关^[12,27]。此外,研究发现,APOE ϵ 4 可能促进促炎细胞因子的分泌,加重神经炎症反应。因此推测,APOE ϵ 4 可能通过参与上述机制,导致其携带者比 APOE ϵ 3 和 APOE ϵ 2 携带者更容易发生面肌痉挛。然而,这些假设是否成立,需要进行更加深入的基础和临床研究。

本研究为小样本、单中心临床研究,因参与人数所限,在统计分析和结果方面可能存在一定的局限性。需要样本量更大的多中心研究进一步验证,并进行更加深入的 APOE ϵ 4 相关基础研究,以探讨其可能机制。本研究发现面肌痉挛患者中 APOE ϵ 4 的携带者比例更高,这可能为临床医师为患者制定个体化精准治疗方案提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Mercier P, Sindou M. Introduction to primary hemifacial spasm: a neurosurgical disease[J]. Neurochirurgie, 2018, 64(2): 79-81.
- [2] Lefaucheur JP, Daamer NB, Sangla S, et al. Diagnosis of primary hemifacial spasm[J]. Neurochirurgie, 2018, 64(2): 82-86.
- [3] Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS[J]. J Lipid Res, 2009, 50(S): S183-S188.
- [4] Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E(APOE) allele distribution in the world. Is APOE ϵ 4 a 'thrifty' allele?[J]. Ann Hum Genet, 1999, 63(Pt 4): 301-310.
- [5] van der Kant R, Goldstein LSB, Ossenkoppele R. Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2020, 21(1): 21-35.
- [6] Davis AA, Inman CE, Wargel ZM, et al. APOE genotype regulates pathology and disease progression in synucleinopathy[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(529): eaay3069.
- [7] Kanekiyo T, Xu H, Bu G. ApoE and A β in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners?[J]. Neuron, 2014, 81(4): 740-754.
- [8] Yin C, Zhou S, Jiang L, et al. Mechanical injured neurons stimulate astrocytes to express apolipoprotein E through ERK pathway[J]. Neurosci Lett, 2012, 515(1): 77-81.
- [9] Jiang L, Yin X, Yin C, et al. Different quantitative EEG alterations induced by TBI among patients with different APOE genotypes[J]. Neurosci Lett, 2011, 505(2): 160-164.
- [10] Teng ZP, Guo ZD, Zhong JJ, et al. ApoE influences the blood-brain barrier through the NF- κ B/MMP-9 pathway after traumatic brain injury[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6649.
- [11] Jiang L, Zhong J, Dou X, et al. Effects of ApoE on intracellular calcium levels and apoptosis of neurons after mechanical injury[J]. Neuroscience, 2015, 301: 375-383.
- [12] 武明明, 孙晓川, 吴海涛, 等. 载脂蛋白 E 基因多态性与星形胶质细胞损伤后兴奋性氨基酸变化的关系[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(9): 928-931.
- [13] Cheng CJ, Jiang L, Yang YH, et al. Effect of APOE gene polymorphism on early cerebral perfusion after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2015, 6(6): 446-450.
- [14] Jin ZQ, Fan YS, Ding J, et al. Association of apolipoprotein E4 polymorphism with cerebral infarction in Chinese Han population[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(3): 352-356.
- [15] Fazekas F, Strasser-Fuchs S, Kollegger H, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis[J]. Neurology, 2001, 57(5): 853-857.
- [16] Lin B, Dan W, Jiang L, et al. Association of APOE polymorphism with the change of brain function in the early stage of aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 110(Pt1): 39-42.
- [17] Pinholt M, Frederiksen JL, Christiansen M. The association between apolipoprotein E and multiple sclerosis[J]. Eur J Neurol, 2006, 13(6): 573-580.
- [18] Ziyat I M, Ozgen T. Microanatomy of the central myelin-peripheral myelin transition zone of the trigeminal nerve[J]. Neurosurgery, 2007, 60(3): E582.
- [19] Kuroki A, Moller AR. Chronic vascular irritation of the facial nerve causes facial spasm in rats[J]. Neurol Res, 1994, 16(4): 284-288.
- [20] Møller AR, Jannetta PJ. On the origin of synkinesis in hemifacial spasm: results of intracranial recordings[J]. J Neurosurg, 1984, 61(3): 569-576.
- [21] Yamakami I, Oka N, Higuchi Y. Hyperactivity of the facial nucleus produced by chronic electrical stimulation in rats[J]. J Clin Neurosci, 2007, 14(5): 459-463.
- [22] Zheng XS, Hong WY, Tang YD, et al. Discovery of a new waveform for intraoperative monitoring of hemifacial spasms[J]. Acta Neurochir (Wien), 2012, 154(5): 799-805.
- [23] Zhou QM, Zhong J, Jiao W, et al. The role of autonomic nervous system in the pathophysiology of hemifacial spasm[J]. Neurol Res, 2012, 34(7): 643-648.
- [24] Zheng XS, Hong WY, Tang YD, et al. Sympathetic nerves bridge the cross-transmission in hemifacial spasm[J]. Neurosci Lett, 2012, 517(1): 52-55.
- [25] Pinholt M, Frederiksen JL, Andersen PS, et al. Apo E in multiple sclerosis and optic neuritis: the apo E-epsilon4 allele is associated with progression of multiple sclerosis[J]. Mult Scler, 2005, 11(5): 511-515.
- [26] Shin S, Walz KA, Archambault AS, et al. Apolipoprotein E mediation of neuro-inflammation in a murine model of multiple sclerosis[J]. J Neuroimmunol, 2014, 271(1-2): 8-17.
- [27] Lynch JR, Tang W, Wang H, et al. APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response[J]. J Biol Chem, 2003, 278(49): 48529-48533.

(责任编辑:冉明会)