

神经疾病发病机制研究

DOI: 10.11699/cyxb20130618

载脂蛋白 E 基因启动子区多态性与蛛网膜下腔出血后
脑血管痉挛的相关研究阮 健¹, 孙晓川², 戴勤弼¹

(1. 重庆市肿瘤研究所神经外科, 重庆 400030; 2. 重庆医科大学附属第一医院神经外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨载脂蛋白 E 基因 (apolipoprotein E, APOE) 启动子区多态性与自发性蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 后脑血管痉挛 (cerebral vasospasm, CVS) 的相关性。**方法:**采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测 101 例 SAH 患者, 测定 APOE 启动子区多态性; 采用经颅多普勒超声评定 SAH 患者出血后的 CVS 程度; 对 APOE 启动子区多态性与 CVS 等临床资料分别进行 χ^2 检验和 Logistic 回归分析。**结果:**101 例 SAH 患者中, -219T 等位基因携带者的 CVS 发生率显著高于 -219G 等位基因携带者 ($P=0.024$); 单因素和多因素 Logistic 回归分析发现, -219T 是发生 CVS 的危险因素。**结论:** APOE 启动子区 -219T 等位基因是 SAH 患者发生 CVS 的危险因素。

【关键词】载脂蛋白 E; 启动子; 基因多态性; 蛛网膜下腔出血; 脑血管痉挛

【中国图书分类法分类号】R743.35

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-08-20

Correlation between apolipoprotein E gene promoter polymorphisms and
cerebral vasospasm after spontaneous subarachnoid hemorrhageRUAN Jian¹, SUN Xiaochuan², DAI Qingbi¹(1. Department of Neurosurgery, Chongqing Cancer Institute; 2. Department of Neurosurgery,
The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the correlation between apolipoprotein E gene (APOE) promoter polymorphisms and cerebral vasospasm (CVS) after spontaneous subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods:** One hundred and one patients with spontaneous SAH were selected in this study. Venous blood samples and clinical data of patients were collected. APOE promoter polymorphisms of all patients were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Degrees of CVS after SAH were determined by transcranial Doppler. APOE promoter polymorphisms and clinical data of CVS after SAH were analyzed by χ^2 test and Logistic regression. **Results:** In all patients, incidence of CVS in -219T group was significantly higher than that in -219G group ($P=0.024$). Univariate and multivariate Logistic regression analyses also showed that promoter -219T was a risk factor of CVS incidence. **Conclusion:** -219T alleles in APOE promoter region is the risk factor of CVS after spontaneous SAH.

【Key words】apolipoprotein E; promoter; polymorphism; subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm

脑血管痉挛 (cerebral vasospasm, CVS) 是自发性蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 的常见并发症, 其致死、致残率高, 对 SAH 患者病情的严重程度及预后具有重要影响。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 是中枢神经系统中重要的载脂蛋白之一, 已有研究证实 APOE ϵ 4 携带者与 SAH 预后不良有关^[1-2]。本课题组前期研究已经发现, APOE ϵ 4 是 CVS 发生的危险因素。而 APOE 启动子区域 DNA 序列的变化, 直接关系到 APOE 的转录和表达, 从而影响 ApoE 的神经生物学作用, 最终可能对 CVS 的发生产生影响。为了明确 APOE 启动子区多态性是

否为 SAH 患者发生 CVS 的影响因素, 作者进行了更深入的研究。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2010 年 12 月 1 日至 2011 年 9 月 30 日重庆医科大学附属第一医院神经外科及重庆市肿瘤医院神经外科收治的自发性 SAH 患者。所有患者入院时均行头颅 CT 检查明确诊断, 对入选的病例记录其各项临床资料, 包括性别、年龄、血脂水平、高血压病史, 发病后首次头颅 CT 的 Fisher 分级, 入院时 Hunt-Hess 分级, 入院后的经颅多普勒超声 (transcranial doppler, TCD) 结果。TCD 检查是在患者行手术或介入治疗前, 每隔 1~3 d 行常规检查, 监测前循环的平均血流速度, 取测得的最高流速为判断依据。根据患者具体情况, 血压控

作者介绍: 阮 健, Email: nesta-rj@163.com,

研究方向: 颅脑肿瘤与血管性疾病。

通信作者: 孙晓川, Email: sunxch1445@gmail.com。

制在 90~140 mmHg/50~90 mmHg 范围内。患者同时还接受解痉,止血以及对症治疗。有完整记录和 APOE 基因型确定的 101 例(男性 43 例,女性 58 例,平均年龄 58.6 岁)SAH 患者入选本研究。

1.2 CVS 判断标准

按照目前公认的 CVS 判定标准^[3],有新发局灶性神经功能缺损的迟发缺血性损害表现的患者,判定为存在临床 CVS;而 TCD CVS 被定义为前循环峰值平均血流速度(peak mean velocity, PMV) >140 cm/s。因此,有临床症状的 CVS 患者或前循环 PMV ≥ 140 cm/s 的患者被纳入 CVS 组;而 PMV <140 cm/s,并且无临床 CVS 症状患者则纳入无 CVS 组。

1.3 APOE 启动子区多态性鉴定

患者入院时即抽取静脉血 2 ml,常规提取基因组 DNA^[4]。应用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法检测 APOE 启动子区多态性。

1.3.1 APOE 基因转录调控区域 PCR 扩增 特异性扩增 APOE 基因转录调控区域-1 017 区~+406 区。PCR 产物(命名为 TrDNA)在 1%琼脂糖凝胶电泳证实大约为 1 423 bp,且无非特异性条带(图 1)。

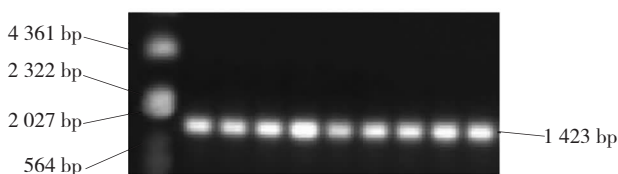


图 1 TrDNA 的扩增(约 1 423 bp)

Fig.1 Amplification production of TrDNA
(approximate 1 423 bp)

1.3.2 APOE 启动子区-219G/T 分型 特异性扩增 TrDNA 的-240~-147 区,以 4%琼脂糖凝胶电泳证实大约为 93 bp。用 *Msp* I 内切酶酶切,酶切产物电泳后在紫外灯下观察,74 bp 条带的为 G 等位基因,93 bp 条带的为 T 等位基因(图 2)。

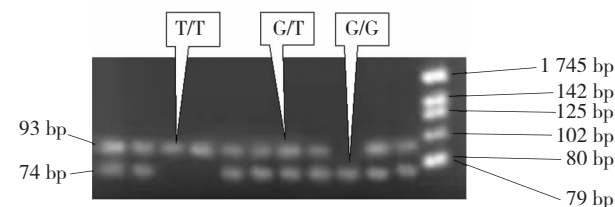


图 2 -219G/T PCR-RFLP 分型

Fig.2 Typing of -219G/T PCR-RFLP

1.3.3 APOE 启动子区-427T/C、-491A/T 分型 特异性扩增 TrDNA-512~-285 区,以 2%琼脂糖凝胶电泳证实大约为 228 bp,分别用 *Dra* I 内切酶及 *Afu* I 内切酶酶切,酶切产物电泳后在紫外灯下观察:-427T/C 分型:呈 144 bp 和 84 bp 2 条带的为 T 等位基因,仅有 228 bp 1 条带的为 C 等位基因;-491A/

T 分型:呈 200 bp 和 28 bp 2 条带的为 A 等位基因,仅有 228 bp 1 条带的为 T 等位基因(图 3,4)。

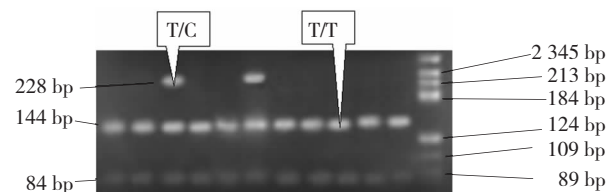


图 3 -427T/C PCR-RFLP 的分型

Fig.3 Typing of -427C/T PCR-RFLP

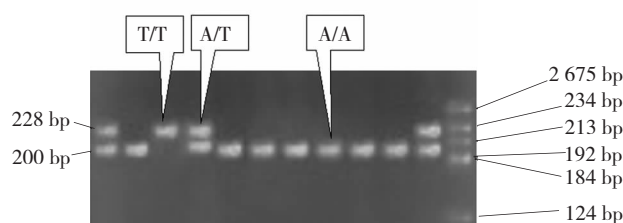


图 4 -491A/T PCR-RFLP 的分型

Fig.4 Typing of -491 A/T PCR-RFLP

1.4 统计学方法

统计软件采用 SPSS 11.5。对临床资料中的各项计数资料均采用 χ^2 检验;对各项相关临床资料、APOE 各启动子区分型与 CVS 的关系分别采用 Logistic 单因素及多因素回归分析方法进行相关性分析;变量入选标准为 $P \leq 0.05$,变量剔除标准为 $P \geq 0.10$ 。

2 结果

2.1 APOE 启动子区多态性分布

在入选的 101 例 SAH 患者中,APOE 启动子区多态性-219G/T、-427T/C、-491A/T 基因分型及等位基因频率均符合遗传学 Hardy-Weinberg 定律($P > 0.05$),研究样本证实为遗传平衡群体,见表 1。

2.2 APOE 启动子多态性与 CVS 的关系

对 SAH 患者进行启动子区多态性分型,并对其等位基因进行 χ^2 检验,如表 2 所示,54 个-219T 等位基因发生了 CVS,而只有 20 个-219G 等位基因发生 CVS,前者 CVS 发生率高于后者($P = 0.024$);而-427T/C、-491A/T 等位基因的 CVS 发生率差异无统计学意义。

将所有入选病例分为 2 组:有 CVS 组和无 CVS 组,并进行 χ^2 检验。如表 3 所示,2 组间在各相关临床资料的构成上差异并无统计学意义($P > 0.05$)。

进一步将各项相关临床资料和 APOE 启动子区多态性等因素对 CVS 作单因素 Logistic 回归分析(表 4),作者发现 Fisher 分级($OR = 9.719, P < 0.001, 95\% CI: 3.15 \sim 29.99$)和-219T

表 1 APOE 启动子分型和等位基因频率

Tab.1 Typing of APOE promoter and frequency of allele

启动子分型						等位基因频率(%)					
-219G/T			-427T/C			-491A/T					
G/G14	G/T47	T/T40	T/C16	T/T85	C/C0	T/T4	A/T28	A/A69	G(37.1)	T(62.9)	T(92.1)
									C(7.9)	A(82.2)	T(17.8)

是 CVS 的危险因素 ($OR=5.851, P=0.017, 95\%CI: 1.37\sim24.98$)。调整临床资料后作多元 Logistic 回归分析,其结果仍显示 -219T 为 CVS 的危险因素 ($OR=4.454, P=0.021, 95\%CI: 1.965\sim19.573$)。

表 2 APOE 启动子区等位基因与 CVS 相关性

Tab.2 Correlation between allele in APOE promoter region and CVS

启动子类型	等位基因	有 CVS	无 CVS	P 值
-219G/T	G	20	53	0.024
	T	54	73	
-427T/C	T	68	118	0.940
	C	6	10	
-491A/T	A	64	102	0.224
	T	10	26	

表 3 CVS 的相关临床资料

Tab.3 Related clinical data of CVS

		CVS(-)	CVS(+)	P 值
年龄(岁)	<60	35	19	0.746
	≥60	29	18	
性别	男	27	15	0.871
	女	37	22	
有无高血压	有高血压	21	14	0.609
	无高血压	43	23	
有无高血脂	有高血脂	23	13	0.935
	无高血脂	41	24	
Hunt-Hess 分级	1、2 级	57	30	0.263
	3~5 级	7	7	
CT 的 Fisher 分级	1、2 级	45	25	0.773
	3、4 级	19	12	

3 讨论

3.1 遗传因素与 CVS

以前普遍认为,SAH 后的 CVS 程度与出血量及出血部位有关。然而近年来,在临床工作中却发现

有很多出血量及出血部位基本相似的 SAH 患者,其 CVS 的严重程度却大相径庭。以上临床现象说明:SAH 患者的 CVS 程度及预后存在显著的个体差异,而个体差异往往与基因多态性有关。近年来,ApoE 作为中枢神经系统中重要的载脂蛋白已经逐渐成为神经系统疾病的研究热点之一,而且已有荟萃分析报道 APOE 的多态性与 SAH 的预后有密切关系。本课题组的前期研究也已证实,APOEε4 是 SAH 后 CVS 的危险因素。

3.2 ApoE 的神经生物学功能及 APOE 启动子区多态性

ApoE 是中枢神经系统中最重要的载脂蛋白之一,其在中枢神经系统中最重要的功能就是调节神经组织的修复、塑形,在稳定微管蛋白结构、细胞内信号传导、淀粉样蛋白沉积、糖代谢、免疫调节、氧化应激与清除脂质代谢中均发挥了重要作用^[5]。现已证实,APOE 启动子区存在多个位点的多态性,而以-219G/T、-427C/T、-491A/T 最为重要^[6]。

3.3 APOE 启动子区多态性与中枢神经系统疾病的关系

已有大量研究证实,APOE 启动子区多态性与多种中枢神经系统疾病的关系密切,其机制可能是通过调节 ApoE 的转录效能而对疾病产生不同的影响。但其具体机制比较复杂,目前尚未完全明确。

关于 APOE 启动子区多态性的研究多集中在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD),其结果并不完全一致。Lambert 等^[7]发现-219T 能够降低血浆 ApoE 水平,并且存在剂量依赖关系。在中枢神经系统中的研究^[8]也发现-219T/G 多态性能够对 ApoE mRNA 的表达产生轻度但却重要的影响。Ramos 等^[9]证实在星形细胞中,-219G 的等位基因能够增加 APOE 的转录活性。有报道称,-219T 与迟发性 AD 发病风险增高有关,但据 Tycko 等^[10]的报道,-219T

表 4 各单因素与 CVS 的 Logistic 回归分析

Tab.4 Logistic regression analysis of single factors and CVS

相关因素	P 值	OR 值	95%CI	回归系数	标准误	Wald 统计量
性别	0.347	1.642	0.585~4.610	0.495 8	0.526 7	0.886 2
年龄	0.963	0.977	0.370~2.583	-0.023 2	0.496 0	0.002 2
血脂	0.543	0.707	0.231~2.165	-0.347 2	0.571 1	0.369 6
血压	0.962	1.028	0.331~3.194	0.027 6	0.578 4	0.002 3
Fisher 分级	<0.000 1	9.719	3.150~29.985	2.274 1	0.574 8	15.651 6
Hunt-Hess	0.456	1.677	0.430~6.535	0.517 1	0.693 9	0.555 3
-219T	0.017	5.851	1.370~24.982	1.766 5	0.740 6	5.689 1
-219G	0.506	1.419	0.507~3.971	0.349 7	0.525 2	0.443 3
-427T	0.983	<0.001	<0.001~>999.999	-11.692 1	540.300 0	0.000 5
-427C	0.743	1.246	0.334~4.644	0.220 1	0.671 2	0.107 5
-491A	0.540	0.431	0.029~6.352	-0.841 5	1.372 6	0.375 8
-491T	0.265	1.939	0.605~6.213	0.661 9	0.594 2	1.240 8

的确轻度减少了 APOE 启动子的活性,但并未影响到 AD 的发病风险。关于-427T/C 与 AD 的研究相对较少,并且结论不一:在较早的研究中,西班牙的 Artiga 等^[11]发现-427C 能增加 AD 发病风险,其机制可能与-427C 上调 ApoE 的表达有关;但随后在美洲进行的 2 项研究均未证实-427T/C 与 AD 有关。澳大利亚的一个研究证实,-491A 基因明显可以升高血浆中 ApoE 水平,而且脑内额叶皮质的 ApoE 水平与-491A 等位基因存在基因剂量关系^[12]。进一步的研究表明,-491A 与 AD 风险增高有关,其原因可能是-491A 上调了 ApoE 的表达^[13]。

APOE 启动子多态性同样对其他中枢神经系统疾病有重要的影响。Lendon 等^[14]发现,-219T 与颅脑损伤不良预后相关,而-491A/T,-427T/C 与预后无关。而 Jiang 等^[15]报道-491A 与伤情,饮酒史等因素一起对 APOE ϵ 4 基因与颅脑损伤的相关性具有调节作用,可增高 APOE ϵ 4 危险系数,为颅脑损伤病情变化的危险因素。

3.4 APOE 启动子区多态性与 CVS 的关系

目前为止,尚未有对 APOE 启动子区多态性与 SAH 后 CVS 相关性的研究。本研究首次发现,APOE 启动子区-219T 等位基因是 SAH 后 CVS 的危险因素,在调整年龄、性别等相关因素后,-219T 与 CVS 的相关性仍然明显。但-219T 影响 CVS 的机制尚不明确,从目前的研究结果可以推测-219T 可能是通过降低 APOE 启动子的转录活性,从而使 ApoE 的合成量减少,从以下 4 个途径促进了 CVS:①ApoE 减少导致 SAH 后产生的大量自由基难以清除,增加了炎症反应,加重了血管内皮的损伤和平滑肌收缩。②ApoE 减少,降低了组织对神经胶质增生和肿瘤坏死因子产生的抑制免疫能力,减少了磷脂类参与抗炎免疫应答,增加炎症反应及脂质过氧化作用,导致血管内皮通透性增加,血细胞易于渗出,加重了 CVS。③ApoE 减少后细胞内兴奋性氨基酸释放增加,并且促进 Ca^{2+} 超载,参与 SAH 的病理过程,可能进一步加重 CVS。④-219T 还可能易化了淀粉样蛋白的沉积,增强了血管的收缩作用。

上述多个因素协同作用,可能导致 SAH 患者 CVS 的发生和(或)加重。由此可以认为,-219T 等位基因是 SAH 患者发生 CVS 的危险因素。

3.5 展望

CVS 作为 SAH 的重要并发症之一,一直是影响患者病情及预后的重要因素。目前临床工作中采取的主要预防及治疗措施是廓清出血及拮抗钙离子通道,从而达到缓解血管痉挛的目的,但临床效果却因人而异。随着对 CVS 发生发展机制的认识不断深入,希望将来能够对 SAH 患者基因多态性进行个

体化风险评估和管理,在基因水平对 CVS 的发生及进展进行预测,从而采取相应的干预措施。

参 考 文 献

- [1] Niskakangas T, Ohman J, Niemela M, et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a preliminary study[J]. Stroke, 2001, 32(5): 1181-1184.
- [2] Tang J, Zhao J, Zhao Y, et al. Apolipoprotein E epsilon4 and the risk of unfavorable outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Surg Neurol, 2003, 60(5): 391-396.
- [3] Krejza J, Kochanowicz J, Mariak Z, et al. Middle cerebral artery spasm after subarachnoid hemorrhage: detection with transcranial color-coded duplex US[J]. Radiology, 2005, 236(2): 621-629.
- [4] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. translated by Huang P T [M]. Beijing: Science Publishing House, 2002: 483-485.
- [5] Buttini M, Akeefe H, Lin C, et al. Dominant negative effects of apolipoprotein E4 revealed in transgenic models of neurodegenerative disease[J]. Neuroscience, 2000, 97(2): 207-210.
- [6] Laws S M, Hone E, Gandy S, et al. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription[J]. J Neurochem, 2003, 84(6): 1215-1236.
- [7] Lambert J C, Brousseau T, Defosse V, et al. Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increase risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations—the ECTIM study[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(1): 57-61.
- [8] Lambert J C, Berr C, Pasquier F, et al. Pronounced impact of Th1/E47es mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(9): 1511-1516.
- [9] Ramos M C, Matías S, Artiga M J, et al. Neuronal specific regulatory elements in apolipoprotein E gene proximal promoter[J]. Neuroreport, 2005, 16(9): 1027-1030.
- [10] Tycko B, Lee J H, Ciappa A, et al. APOE and APOC1 promoter polymorphisms and the risk of Alzheimer disease in African American and Caribbean Hispanic individuals[J]. Arch Neurol, 2004, 61(9): 1434-1439.
- [11] Artiga M J, Bullido M J, Frank A, et al. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(12): 1887-1892.
- [12] Laws S M, Hone E, Taddei K, et al. Variation at the APOE-491 promoter locus is associated with altered brain levels of apolipoprotein E[J]. Mol Psychiatry, 2002, 7(8): 886-890.
- [13] Bullido M J, Artiga M J, Recuero M, et al. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia[J]. Nat Genet, 1998, 18(1): 69-71.
- [14] 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.
- [15] Jiang Y, Sun X, Gui L, et al. Correlation between APOE-491AA Promoter in epsilon 4 carriers and clinical deterioration in early stage of traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(12): 1802-1810.

(责任编辑: 关蕴良)