

阿尔茨海默病与 EB 病毒及 ApoE 基因多态性关系*

龙燕^{1,3}, 左丽¹, 李光荣², 裴华¹, 赵明祥²

摘要:目的 探讨 EB 病毒感染和 ApoE 基因多态性对阿尔茨海默病发病的影响。方法 用间接 ELISA 法测定 18 例阿尔茨海默病(AD)病人和 20 例正常对照者血浆中抗 EB 病毒特异性 IgG、IgM 类抗体;PCR 法检测样本有核细胞和血浆中 EB 病毒 DNA;通过直接测序法检测载脂蛋白 E 基因的基因型并分析其单核苷酸多态性。结果 AD 病人血浆中抗 EB 病毒核心抗原(VCA)特异性 IgG 类抗体阳性率较正常对照明显升高($P < 0.05$)。AD 组患者有核细胞和血浆中 EBV DNA 检出率高(分别为 66.7%和 50%),含 $\epsilon 4$ 等位基因的基因型频率在 AD 和对照组之间差异有统计学意义($P < 0.05$);阿尔茨海默病的发病与 EBV 感染和携带外周载脂蛋白 $\epsilon 4$ (ApoE4)呈明显相关($P = 0.017$)。结论 EB 病毒潜伏感染和携带 ApoE4 对 AD 发病起到一定作用,2 种因素同时存在可能是 AD 发病的危险因素。

关键词: 阿尔茨海默病; EB 病毒; IgG; 载脂蛋白 E 基因

Influences of EBV infection and single nucleotide polymorphism of apolipoprotein E gene on Alzheimer's disease LONG Yan, ZUO Li, LI Guang-rong, et al. Department of Immunology, The Center of Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guiyang Medical College(Guiyang 550004, China)

Abstract Objective To explore the interaction between EBV infection and the single nucleotide polymorphism of apolipoprotein E gene and the development of Alzheimer's disease(AD). **Methods** DNA and serum was extracted from samples of peripheral blood cells from 18 AD patients and 20 normal elderly people. PCR amplification was used to detect the host ApoE gene, and then screened for genetic polymorphisms or mutations in ApoE gene by DNA direct sequencing. The serum was used to determine anti-EBV VCA IgG, IgM antibodies by ELISA. **Results** The HSV1 IgG-positivity rate is far higher in AD patients than that of normals ($P < 0.05$); The $\epsilon 4/4$ and $\epsilon 3/4$ genotype in AD group were significantly higher than that in the controls ($P < 0.05$). The association of ApoE4 with AD is significant in the HSV1 IgG-positive patients ($P = 0.001$, $OR = 1.809, 4.976$). **Conclusion** The finding suggested that the combination of anti-HSV1-positive in brain and carriage of an APOE-epsilon 4 allele is a strong risk factor for AD.

Key words: Alzheimer's disease; herpes simplex virus; immunoglobulin G antibody; apolipoprotein E

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性痴呆为主要临床表现的神经退行性疾病,主要病理变化为大脑皮质和海马出现神经炎性斑(NP)、神经纤维缠结(NFT)及神经元死亡,其发病机制至今未明。有研究表明,其发病与病毒感染和遗传背景有关^[1]。我们用间接 ELISA 法测定 18 例阿尔茨海默病(AD)病人和 20 名正常对照者血浆中抗 EB 病毒 VCA IgG、IgM 类抗体;PCR 法检测样本血浆和有核细胞中 EB 病毒 DNA;通过直接测序法检测其外周血载脂蛋白 E(ApoE)基因的基因型、分析单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),旨在探讨 EB 病毒感染和遗传基因对 AD 发病的影响。

1 对象与方法

1.1 对象 病人来源于贵阳医学院附属医院或贵阳中医学院第二附属医院。痴呆诊断标准参照美国精神疾病诊断统计手册修订版(DSM-IV)^[2],全部应用简易精神状态量表(MMSE)、认知能力鉴别量表、日常生活能力量表(ADL)和 Hachinski 缺血指数评分量表,进行痴呆评价和鉴别诊断,血管性痴呆(SAD)组 Hachinski 缺血指数 < 4 分;AD 病诊断标准参照美国国立神经病学、语言障碍和阿尔茨海默病及相关疾病协会(NINCDS-ADRDA)标准^[3],根据细微精神状态检

查(MMSE)量表测试均为中、重度认知障碍,积分在 6~16 分之间^[3]。经断层扫描或核磁共振排除脑卒中、脑肿瘤、梗阻性脑积水、硬膜下血肿等相关疾病。AD 组 18 例,其中男 14 例,女 4 例,年龄 57~86 岁,平均(65±11.6)岁。对照组为 20 名正常健康老年人,男 12 名,女 8 名,年龄 60~78 岁,平均(64±10.5)岁,经体检和神经心理测试无记忆和智能障碍。上述研究对象均未应用精神抑制药物,无明确感染史。病例为随机选择,各组受试者的年龄、性别等差异无统计学意义。

1.2 主要试剂及仪器 抗 EBV VCA IgG、IgM 类抗体试剂盒(德国 Virion/Serion 公司);自动酶标检测仪(美国 BIO-TEK 公司)。PCR 检测仪(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 标本 采集受检者清晨空腹静脉抗凝血 3ml,常规方法分离血浆和有核细胞,血浆置-85℃保存备用,有核细胞用于提取 DNA 备用。

1.4 抗病毒抗体检测 利用常规间接 ELISA 法,按试剂盒说明书操作。

1.5 模板制备 经典酚/氯仿抽提法提取有核细胞 DNA,TE 溶解,-20℃保存备用;血浆中病毒 DNA 用 Ready PCRTM 血清-病毒 DNA 纯化系统^[4](华美生物工程公司)。

1.6 引物设计 按照参考文献^[5]发表的序列,扩增位于疱疹病毒科病毒 DNA 多聚酶基因区靶序列,上海生物工程有限责任公司合成引物。

1.7 PCR 扩增及酶切

1.7.1 疱疹病毒扩增体系为 50 μ L。扩增条件:94℃预变性 7 min;92℃ 60 s,58℃ 60 s,72℃ 90 s,30 个循环;72℃延伸 7 min。再用 SmaI 和 BamHI 对产物进行酶切。EBV 片断: SmaI 酶切后为 424 bp 与 100 bp, BamHI 酶切后为 277 bp

*基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(1209)

作者单位:1. 贵阳医学院免疫学教研室,贵阳 550004;2. 贵阳医学院附属医院神经内科;3. 现工作单位广东省东莞市人民医院检验科

作者简介:龙燕(1978-),女,湖南衡阳人,讲师,硕士,主要从事抗病毒感染分子免疫学研究。

通讯作者:左丽

与 247 bp。

1.7.2 ApoE 基因扩增体系为 50 μ l。E2 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。E4-1 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。E3、E4-2 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。E-2、E-3、E4-1、E4-2 扩增片段长度分别为 246、300、560、398bp。

1.8 DNA 测序 将经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后出现较亮目的条带, 且无干扰条带的 E2、E3、E4-1、E4-2 标本应用 ABB77 型自动测序仪进行 DNA 测序。根据电泳条带和测序结果确定每个标本的等位基因型, 直接计数法计算基因型频率。

1.9 统计分析 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理。组间基因型频率和等位基因频率差异比较用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法检验。抗体阳性率差异用 Fisher 确切概率法检验。

2 结果

2.1 抗 EBV VCA 抗体的检测 AD 组、老年对照组中抗 EBV VCA IgG 类抗体阳性的例数分别为 72.2% (13/18) 和 30.0% (6/20)。显示 AD 病人血浆抗 EBV VCA IgG 类抗体阳性率较正常对照明显升高 ($P < 0.05$); 而且 EBV VCA IgG 类抗体的 A 值也明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 样本 EBV 核酸和抗 EBV VCA IgG 抗体检测 AD (18 例) 中, 12 例 (66.7%) 有核细胞检出 EBV DNA, 此 12 例中有 9 例 (50.0%) 血浆亦检出; 对照组 (20 例) 中, 4 名 (20.0%) 有核细胞检出 EBV DNA, 其中 3 名 (15.0%) AD 组与对照组比较, 有核细胞中 EBV 核酸检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.464, P = 0.004$)。

2.3 载脂蛋白 E 基因的基因型分布和等位基因频率 (表 1)

表 1 载脂蛋白 E 基因的基因型和等位基因频率的分布

组别	例数	基因型						等位基因		
		2/2	2/3	2/4	3/3	4/4*	3/4**	2	3	4**
AD	18	0	1	0	8	2	7	1	24	11
正常对照	20	0	1	1	15	0	3	2	34	4

注: 与正常对照组比较, * $P = 0.0204$, ** $P < 0.05$ ($\chi^2 = 5.04$)。

AD 组 4/4 与 3/4 并为一组后与正常对照组相比有统计学意义 ($P < 0.05$); 4 等位基因的频率与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其他基因型及 2, 3 等位基因频率与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 ApoE 基因多态性分析 ApoE 基因外显子 4 多态性是 ApoE 基因分型的依据, 本实验在检测样本中仅检测到 ApoE 基因外显子 4 第 112 和 158 位密码子上发生碱基替换, 即单个核苷酸由 T 替换为 C。

2.5 AD 发病相关性分析 (表 2) AD 发病与载脂蛋白 E 基因的基因型分布和 EB 病毒感染情况, 对 EBV 感染、携带

ApoE ϵ 4 两者与阿尔茨海默病发病进行相关性分析 $P = 0.017$, $OR95\%CI = 1.925 \sim 5.134$, 表明两者同时存在为 AD 危险因子。

表 2 EBV 感染情况和载脂蛋白 E 基因的基因型分布

组别	例数	EBV IgG(+)		基因型*						等位基因		
		例数	%	2/2	2/3	2/4	3/3	4/4	3/4	2	3	4
AD	18	13	72.2	0	0	0	5	2	6	0	16	10
正常对照	20	6	30.0	0	0	1	5	0	0	1	10	1

注: AD 组与对照组比较, * $P = 0.017$, $OR95\%CI = 1.925 \sim 5.134$ 。

3 讨论

在 EBV 活化状态下, 机体 EBV VCA IgG 类抗体水平增高^[5], 成年后高滴度的 EBV VCA 抗体除了出现于传染性单核细胞增多症, 亦可出现于霍奇金病、慢性淋巴细胞白血病、结节病、系统性红斑狼疮和可能由于免疫状况改变致使潜伏的病毒活化而发生的其他疾病中。本研究中 AD 组抗 EBV VCA IgG 类抗体阳性率明显高于对照组, 且其 A 值较对照组明显升高, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 AD 发病与 EBV 的既往感染及其活化有一定相关性。本研究还发现, AD 病人外周血有核细胞和血浆中 EBV DNA 检出率 (分别为 66.7% 和 50%) 明显高于对照组 ($P < 0.05$), 说明 EBV DNA 与 AD 患者 DNA 的整合率高于正常组。提示 AD 病人发生 EBV 近期感染的可能性较小, 而与潜伏 EBV 的再激活关系密切。上述结果支持 EBV 核酸可整合到宿主细胞染色体内并能长期传代, 推测体内的 EBV 潜伏或许就是 AD 患者所谓的“易病素质”, 有利于 AD 发生。

迄今为止, EBV 在 AD 发生发展中的作用还不清楚, 但本研究结果提示, EBV 感染与 AD 的发生有一定关系。病毒和 ApoE 两者存在于同一个体可能是阿尔茨海默病的危险因子, EBV 出现在 ApoE ϵ 4 携带者脑内可能为导致 AD 原因, 而 ApoE 也可能在病毒的潜伏和激活中均起到重要作用, 提示对 AD 患者进行抗病毒治疗是可行之策。

参考文献

- [1] Grant WB, Campbell A, Itzhaki RF, et al. The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2002, 4(3): 179-189.
- [2] 张明园. 精神评定量表手册 [M]. 长沙: 湖南科学出版社, 1993: 165-167.
- [3] 许贤豪. 神经免疫学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2000: 327-333.
- [4] Erica Golemis. 蛋白质-蛋白质相互作用 [M] // 分子克隆手册. 北京: 中国农业出版社, 2006: 19.
- [5] Flove R, Pierre L. Amplification and characterization of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid from patients with acute encephalitis [M]. J Clin Microbiol, 1991, 29: 2412.
- [6] 闻玉梅. 现代医学微生物学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 911-923.

收稿日期: 2007-08-19

(蔡天德编校)