



## 对氧磷酶1基因Gln192Arg多态性与阿尔茨海默病的关联研究

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种具有遗传异质性的神经退行性变性疾病。已经证实,淀粉样前体蛋白基因、早老素1基因及早老素2基因突变可导致家族性AD [1],而载脂蛋白E(apolipoprotein E, APOE)等位基因 $\epsilon 4$ 是散发AD的主要遗传风险因子[2]。然而约50%的散发患者并不携带ApoE $\epsilon 4$ ,提示还存在其它遗传风险因子。对氧磷酶(paraoxonase-1, PON1)是一种可减少低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)过氧化的酯酶[3],亦是一种水解对硫磷的毒性代谢产物芳基酯酶,减少有机磷的神经毒性[4],而LDL的氧化作用和有机磷的神经毒性可能与衰老过程中的神经退行性变性作用有关,因此其编码基因可能是AD风险因素之一。决定酶活性的PON1基因Q192R(Gln $\rightarrow$ Arg)多态最常见[5]。我们对成都地区汉族散发AD患者和正常老年人中PON1基因Q192R多态进行了筛查,并结合ApoE基因分型结果,探讨了该PON1多态性与散发AD的关系。

### 1 对象和方法

#### 1.1 研究对象

AD组:患者来自成都地区,诊断根据简易精神状态检查表(mini mental-state examination, MMSE)和日常生活能力量表(activity of daily living scale, ADL)初筛有痴呆,再采用NINCDS-ADRDA(national institute of neurological and communicative disorders and Stroke-Alzheimer's disease and related disorders association)临床诊断标准进行诊断。165例患者均为散发性,其中男72例、女93例,年龄(78.7 $\pm$ 8.4)岁。对照组:随机选择174名成都地区正常老年人,MMSE评分 $\geq$ 27分,ADL评分 $\leq$ 20分,男84例、女90例,年龄(75.6 $\pm$ 7.5)岁。

所有研究对象均为无血缘关系的汉族个体。

#### 1.2 试剂

脱氧核糖三磷酸(dNTPs)为Gene公司产品,Hinf I和Hha I限制性内切酶、Taq DNA聚合酶试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品,pUC19/Msp I DNA Marker为上海生工产品。

#### 1.3 基因多态性检测

1.3.1 基因组DNA提取 抽取外周静脉血5 ml,枸橼酸钠抗凝,常规酚-氯仿抽提法提取DNA。

##### 1.3.2 PON1基因Q192R多态性检测

1.3.2.1 目的基因片段的扩增 PCR引物序列参照文献[6],分别为:正向5' AAACCC AAATACATCTCC CAG AAT 3',反向 5' GCTCCATCCCACATCTTGAT TTTA3'。反应总体积为20  $\mu$ l,内含1 $\times$ PCR buffer,200  $\mu$ mol/L dNTPs,引物各10 pmol,基因组DNA 100 ng,Takara Taq聚合酶0.5 U。反应在PE9600热循环仪上进行,扩增参数为:冷启动,94  $^{\circ}$ C预变性5 min,然后 94  $^{\circ}$ C变性30s,58  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s共35个循环,最后72  $^{\circ}$ C延伸5 min。

1.3.2.2 基因型检测 取PCR产物10  $\mu$ l,Hinf I 5U按厂家说明书推荐条件酶切过夜,3%琼脂糖凝胶

电泳，溴乙锭染色，紫外灯下观察并照相记录，根据带型判读基因型。

1.3.3 ApoE基因型检测 参照文献[7]。

1.4 统计学分析

所有基因型的Hardy-Weinberg平衡吻合度检验均采用 HWE软件作卡方检验。基因型和等位基因的频率差异用社会科学统计软件包(SPSS10.0版本)作卡方检验。

## 2 结果

### 2.1 PON1基因Q192R多态性分析

扩增片段长214 bp(图1)。由于该单核苷酸多态附近存在一个Hinf I 限制性酶切位点。PCR产物经酶解后，等位基因R含一个酶切位点，电泳图谱上呈现190 bp和图谱上未显示24 bp小片段，等位基因Q不含酶切位点，呈现一条214 bp带(图2)。

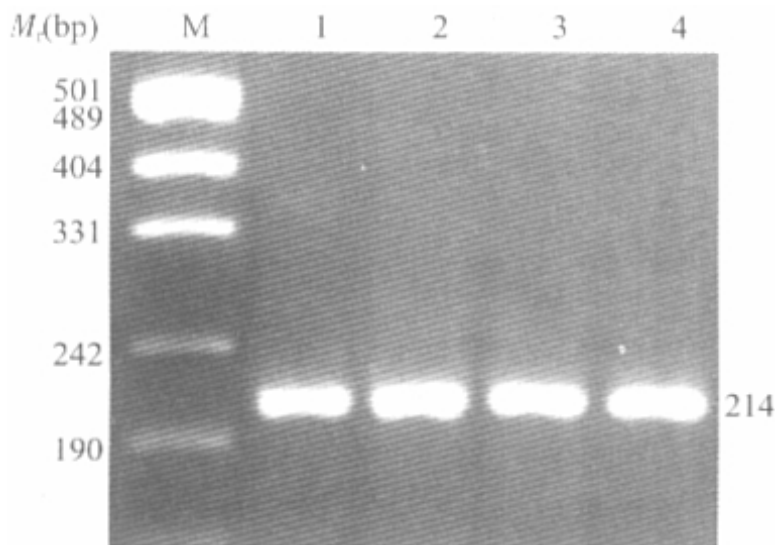


图1 PCR扩增含PON1 Q192R多态位点基因片段电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis of the PCR products containing PON1 Q192R polymorphism  
M: pUC19 DNA/Msp I marker; Lanes 1-4: PCR products (214 bp)

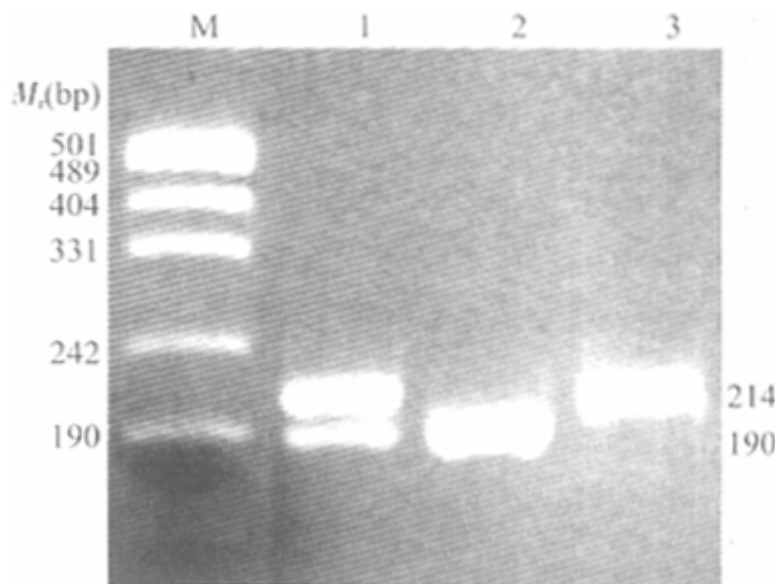


图2 PON1 Q192R多态位点PCR-RFLP电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis of PCR-RFLP analysis of PON1 Q192R polymorphism  
M: pUC19 DNA/Msp I marker; Lane 1: QR heterozygote (214, 190 bp); Lane 2: RR homozygote

## 2.2 AD组与对照组PON1基因型和等位基因频率比较

散发AD患者和正常对照PON1基因Q192R多态分布见表1。经吻合度检验，各基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡(AD组:  $\chi^2=1.75$ ,  $df=2$ ,  $P=0.19$ ; 对照组 $\chi^2=0.48$ ,  $df=2$ ,  $P=0.49$ )。卡方检验表明，患者组之间和对照组之间基因型或等位基因的频率均无显著性差异( $P>0.05$ )。

**表 1 AD 组与对照组 PON1 基因型和等位基因频率的分布**  
**Tab. 1 Genotype and allele frequencies of PON1 gene in AD patients and control subjects**

Group	n	Genotypes			Alleles	
		QQ	QR	RR	Q	R
AD cases	165	25 (0.15)	68 (0.41)	72 (0.44)	118 (0.36)	212 (0.64)
Controls	174	20 (0.12)	84 (0.48)	70 (0.40)	124 (0.36)	224 (0.64)

AD: Alzheimer's disease

## 2.3 ApoE $\epsilon$ 4对PON1基因Q192R多态分布的影响

按是否携带ApoE $\epsilon$ 4将研究对象各分为两亚组后PON1基因Q192R多态分布情况见表2。结果显示，ApoE $\epsilon$ 4携带者或非携带者中，病例组与对照组之间基因型与等位基因频率均无显著差异( $P>0.05$ )。

**表 2 伴或不伴 ApoE $\epsilon$ 4 散发 AD 患者和正常对照中 PON1 基因多态性分布**  
**Tab.2 Distribution of PON1 Q192R polymorphism in AD patients and controls according to the ApoE $\epsilon$ 4 status**

	n	Genotypes			Alleles	
		QQ	QR	RR	Q	R
<b>Non-ApoE <math>\epsilon</math>4 carriers</b>						
AD cases	103	18 (0.18)	41 (0.40)	44 (0.43)	77 (0.37)	129 (0.63)
Controls	146	17 (0.12)	68 (0.47)	61 (0.42)	102 (0.35)	190 (0.65)
<b>ApoE <math>\epsilon</math>4 carriers</b>						
AD	62	7 (0.11)	27 (0.44)	28 (0.45)	41 (0.33)	83 (0.67)
Controls	28	3 (0.11)	16 (0.57)	9 (0.32)	22 (0.39)	34 (0.61)

## 3 讨论

PON1基因与其结构同源基因PON2及PON3组成一个基因家族，定位于7q21.3[8]。血清PON1活性主要由该基因最常见多态之一Q192R决定，R等位基因携带者血清酶活性较Q等位基因携带者高[5]。研究发现PON1

Q192R多态与高胆固醇血症、1型/2型、冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)、心肌梗塞等心血管疾病的患病风险及PON1活性关联[9]，而AD患者与正常老年人比较血清PON1活性有显著差异[10]，提示该酶可能在AD的发生中起作用，而其编码基因PON1成为AD关联研究的候选基因。Scarcchi 等[11]研究发现，意大利散发性晚发AD患者R等位基因频率显著低于正常对照组，RR基因型是AD的一种保护作用因素。然而在日本人[12]、法国人[13]、另外两个意大利人群中[14][15]均未发现PON1 Q192R多态与AD关联，与本研究结果一致。样本例数偏少可能是导致阴性关联分析结果原因之一，日本、法国及其中一个意大利小组研究的患者分别为47例、45例及45例[13][12][14]。合并研究对象例数较大的两个意大利研究小组的数据[11][15]，Meta分析结果表明，192R等位基因与AD呈负关联( $P < 0.02$ )。此外，192R等位基因的频率在日本[12]、法国[13]、意大利[11][15]及中国汉族正常老年人中分别为0.52、0.25、0.31及0.64，提示该多态存在明显种族差异，从而也有可能导致与AD关联分析的结果不一致。

在年龄为(53.8±10.2)岁、无CHD健康汉族人群中，PON1 Q192R多态与该基因中启动子区多个单核苷酸多态(SNP)位点、R160G、相邻PON2基因中常见S311C及A148G多态位点存在强连锁不平衡(LD)，包括PON1 Q192R在内的多个SNP与CHD关联，单体型分析结果进一步证实了PON1基因多态与CHD存在关联。以上提示：增加样本，系统利用PON家族编码区及调控区多个SNP进行关联分析，同时测定研究对象中对氧磷酶活性，可以较全面阐明PON1与AD发生的关系。总而言之，本研究未发现PON1 Q192R多态与中国汉族散发AD存在关联，PON1在AD病理发生中的可能作用有待于进一步研究。

#### 参考文献：

- [1] St George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer's disease[J]. Biol Psychiatry, 2000, 47(3): 183-99.
- [2] Roses AD. Alzheimer diseases: a model of gene mutations and susceptibility polymorphisms for complex psychiatric diseases[J]. Am J Med Genet, 1998, 81(1): 49-57.
- [3] Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein[J]. J Clin Invest, 1995, 96(6): 2882-91.
- [4] La Du BN, Aviram M, Billecke S, et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases[J]. Chem Biol Interact, 1999, 119-120: 379-88.
- [5] Humbert R, Adler DA, Distèche CM, et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism[J]. Nat Genet, 1993, 3(1): 73-6.
- [6] Wang X, Fan Z, Huang J, et al. Extensive Association Analysis Between Polymorphisms of PON Gene Cluster With Coronary Heart Disease in Chinese Han Population [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23 (2): 328-34.
- [7] 马崔, 施佳军, 李强, 等. 晚发阿尔茨海默病与早老素1基因及载脂蛋白E的关联研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2000, 26(6): 345-7.
- Ma C, Shi JJ, Li Q, et al. Genetic association among polymorphisms in presenilin 1 gene, ApoE gene and late-onset Alzheimer's disease [J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2000, 26(6): 345-7.
- [8] Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, et al. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multi-gene family [J]. Genomics, 1996, 33(3): 498-507.
- [9] Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy AA, et al. Codon 311 (Cys→Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias[J]. Mol Psychiatry, 2002, 7(1): 110-2.
- [10] Paragh G, Balla P, Katona E, et al. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2002, 252(2): 63-7.

[11] Scacchi R, Gambina G, Martini MC, et al. Different pattern of association of paraoxonase Gln192→Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease[J]. *Neurosci Lett*, 2003, 339(1): 17-20.

[12] Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, et al. No association of paraoxonase gene polymorphism with atherosclerosis or Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 1999, 53(5): 1146-8.

[13] Dantoine TF, Drouet M, Debord J, et al. Paraoxonase 1 192/55 gene polymorphisms in Alzheimer's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 977: 239-44.

[14] Zuliani G, Ble' A, Zanca R, et al. Genetic polymorphisms in older subjects with vascular or Alzheimer's dementia [J]. *Acta Neurol Scand*, 2001, 103(5): 304-8.

[15] Pola R, Gaetani E, Flex A, et al. Lack of association between Alzheimer's disease and Gln-Arg 192 Q/R polymorphism of the PON-1 gene in an Italian population[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2003, 15(2): 88-91.

### 参考文献:

[1] St George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer's disease[J]. *Biol Psychiatry*, 2000, 47(3): 183-99.

[2] Roses AD. Alzheimer diseases: a model of gene mutations and susceptibility polymorphisms for complex psychiatric diseases[J]. *Am J Med Genet*, 1998, 81(1): 49-57.

[3] Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(6): 2882-91.

[4] La Du BN, Aviram M, Billecke S, et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases[J]. *Chem Biol Interact*, 1999, 119-120: 379-88.

[5] Humbert R, Adler DA, Distèche CM, et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism[J]. *Nat Genet*, 1993, 3(1): 73-6.

[6] Wang X, Fan Z, Huang J, et al. Extensive Association Analysis Between Polymorphisms of PON Gene Cluster With Coronary Heart Disease in Chinese Han Population [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (2): 328-34.

[7] 马崔, 施佳军, 李强, 等. 晚发阿尔茨海默病与早老素1基因及载脂蛋白E的关联研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2000, 26(6): 345-7.

Ma C, Shi JJ, Li Q, et al. Genetic association among polymorphisms in presenilin 1 gene, ApoE gene and late-onset Alzheimer's disease [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2000, 26(6): 345-7.

[8] Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, et al. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multi-gene family [J]. *Genomics*, 1996, 33(3): 498-507.

[9] Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy AA, et al. Codon 311 (Cys→Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias[J]. *Mol Psychiatry*, 2002, 7(1): 110-2.

[10] Paragh G, Balla P, Katona E, et al. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2002, 252(2):63-7.

[11] Scacchi R, Gambina G, Martini MC, et al. Different pattern of association of

paraoxonase Gln192→Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease[J]. *Neurosci Lett*, 2003, 339(1): 17-20.

[12] Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, et al. No association of paraoxonase gene polymorphism with atherosclerosis or Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 1999, 53(5): 1146-8.

[13] Dantoine TF, Drouet M, Debord J, et al. Paraoxonase 1 192/55 gene polymorphisms in Alzheimer's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 977: 239-44.

[14] Zuliani G, Ble' A, Zanca R, et al. Genetic polymorphisms in older subjects with vascular or Alzheimer's dementia [J]. *Acta Neurol Scand*, 2001, 103(5): 304-8.

[15] Pola R, Gaetani E, Flex A, et al. Lack of association between Alzheimer's disease and Gln-Arg 192 Q/R polymorphism of the PON-1 gene in an Italian population[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2003, 15(2): 88-91.

---

[回结果列表](#)