

对氧磷酶 1 基因 *Gln192Arg* 多态性与阿尔茨海默病的关联研究

施佳军^{1,2}, 张思仲¹, 马 崔², 唐牟尼², 刘协和³, 王英成³, 韩海英², 郭扬波², 冯容妹², 苗国栋² (1 四川大学华西医院医学遗传室, 教育部人类疾病生物治疗重点实验室人类疾病基因组学研究室, 四川 成都 610041; 2 广州市精神病医院, 广东 广州 510370; 3 四川大学华西医院心理卫生中心, 四川 成都 610041)

摘要:目的 探讨对氧磷酶 1(paraoxonase-1, PON1)基因 *Gln192Arg* 多态性与汉族散发阿尔茨海默病(AD)的关系。方法 以 165 例散发 AD 患者和 174 例年龄匹配老年人为对象进行病例-对照研究。用 PCR-RFLP 法检测 PON1 及载脂蛋白 E(ApoE)基因多态并进行关联分析。结果 AD 组与对照组 PON1 基因 *Gln192Arg* 多态性分布没有显著性差异。研究对象按 ApoE ϵ 4 携带状况分层后, 各亚组之间基因多态性分布亦无显著性差异。结论 PON1 基因 *Gln192Arg* 多态性与中国汉族人群 AD 不存在关联。

关键词:对氧磷酶 1; 载脂蛋白 E; 阿尔茨海默病; 限制性片段长度多态性

中图分类号: R596; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)04-0371-04

Gln192Arg polymorphism of the paraoxonase-1 gene is not associated with Alzheimer's disease in Chinese

SHI Jia-jun^{1, 2}, ZHANG Si-zhong¹, MA Cui², TANG Mou-ni², LIU Xie-he³, WANG Ying-cheng³, HAN Hai-ying², GUO Yang-bo², FENG Rong-mei², MIAO Guo-dong²

¹Department of Medical Genetics and Division of Human Morbid Genomics, Key Laboratory of Biotherapy of Human Diseases of the Ministry of Education, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; ²Guangzhou Psychiatry Hospital, Guangzhou 510370, China; ³Center of Mental Health, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To explore the relationship between paraoxonase-1 (PON1) gene *Gln192Arg* polymorphism and sporadic Alzheimer's disease (AD) in Chinese. **Methods** A total of 165 AD patients and 174 age-matched control subjects were enrolled in this study for examination of PON1 *Gln192Arg* and apolipoprotein E gene polymorphisms using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The distribution of PON1 allelic and genotypic frequencies did not significantly differ between AD patients and the control subjects, even after the stratification by ApoE-epsilon4 status. **Conclusion** *Gln192Arg* polymorphism of the PON1 gene is not associated with sporadic AD in Chinese.

Key words: paraoxonase-1; apolipoprotein E; Alzheimer's disease; restriction fragment length polymorphism

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 ϵ 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 ϵ 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

收稿日期: 2003-12-08

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(39993420); 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2001AA224021-03); 广州市科技攻关重大项目(JB(02)2000-2-026-01)

A key project supported by National Natural Science Foundation of China (39993420), National 863 Program for Promoting High-tech Research (2001AA224021-03), and by Guangzhou Municipal Science and Technology Research Program (JB(02)2000-2-026-01)

作者简介: 施佳军(1969-), 男, 1993 年毕业于湖南师范大学, 医学遗传学博士生, 电话: 028-85422749, E-mail: shiand98@21cn.com

日常生活力量表(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±8.4)岁。对照组: 随机选择 174 名成都地区正常老年人, MMSE 评分≥27 分, ADL 评分≤20 分, 男 84 例、女 90 例, 年龄(75.6±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 μl, 内含 1×PCR buffer, 200 μmol/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 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 30s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。

1.3.2.2 基因型检测 取 PCR 产物 10 μl, *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)。

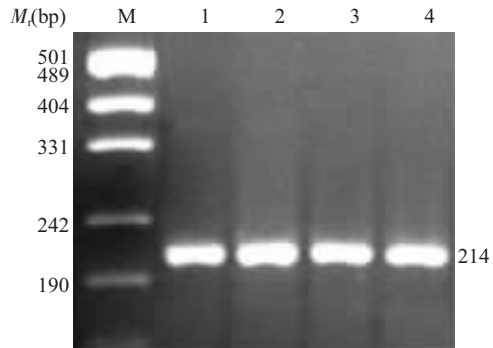


图 1 PCR 扩增含 PON1 Q192R 多态位点基因片段电泳图谱
Fig.1 Electrophoresis of the PCR products containing PON1 Q192R polymorphism

M: pUC19 DNA/*Msp* I marker; Lanes 1-4: PCR products (214 bp)

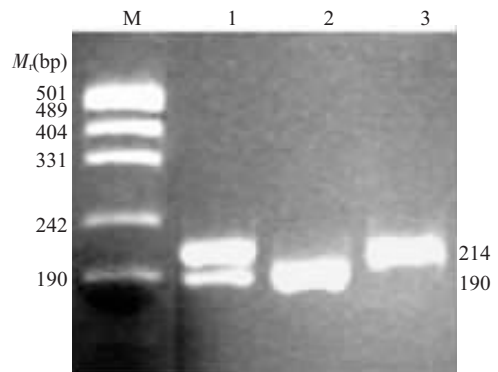


图 2 PON1 Q192R 多态位点 PCR-RFLP 电泳图谱

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 (190 bp); Lane 3: QR homozygote (214 bp)

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 ϵ 4 对 PON1 基因 Q192R 多态分布的影响

按是否携带 ApoE ϵ 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 ϵ 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 ϵ 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 ϵ 4 status

	<i>n</i>	Genotypes			Alleles	
		QQ	QR	RR	Q	R
Non-ApoE ϵ 4 carriers						
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)
ApoE ϵ 4 carriers						
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^[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 \pm 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, Distche 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.
- [8] 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-Parro 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 \rightarrow 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.

急性胰腺炎 72 例误诊分析

Analysis of 72 misdiagnosed cases of acute pancreatitis

陆 婷,程兴利(解放军第 451 医院门诊部,陕西 西安 710054)

关键词:急性胰腺炎

中图分类号:R657.51 文献标识码:B 文章编号:1000-2588(2004)04-0374-01

急性胰腺炎是急诊科常见的急腹症。病死率为 6%~23%，若病情发展为重症坏死性胰腺炎，其病死率更高达 20%~50%，亦系猝死的病因之一。由于其症状、体征无特异性，病程早期 B 超及 CT 影像等检查不能准确反映病情，故临床误诊率较高。早期诊断对患者的生存，预后有很大影响。2000 年 1 月至 2003 年 6 月来我院急诊的急性胰腺炎误诊 72 例分析如下。

1 临床资料

本组 72 例，男 43 例，女 29 例。年龄 24~80(平均 52)岁。来院时已误诊为结石性胆囊炎者 52 例，胆总管结石者 6 例，急性胃肠炎 2 例，胃肠神经症 6 例，结核性腹膜炎 2 例，腰肌劳损 1 例，胆囊切除术后综合症者 3 例。本组除 1 例明显表现为胸痛、咳嗽、高热伴上腹不适外，其余均表现为明显上腹痛。病史最长者 32 d，最短 3 d。伴明显皮肤巩膜黄染者 38 例。在外院就诊，行腹部 B 超检查，确诊为结石性胆囊炎 23 例。经消炎，对症治疗腹痛无明显缓解，来院要求腹腔镜手术治疗。患者入科后详细询问病史，耐心细致查体，即行腹部 B 超，检测血常规，血、尿淀粉酶，及时确诊为急性胰腺炎，减少了误诊率。

2 讨论

2.1 误诊原因分析

①患者因剧烈腹痛不能详细叙述病史，查体不配合，医生满足原有诊断。如大部分患者原有胆结石病史，上腹痛即认为胆结石发作。其中约 60%患者入科后因腹痛难忍，既拒绝查体，又拒绝相关辅诊检查，若接诊医生姑息迁就患者，按其惯性思维维持原有诊断，使大部分患者漏诊、误诊。②查体不仔细，基层医院条件有限，本组 72 例患者中 71 例表现为明显上腹痛，上腹正中或偏左压痛，明显皮肤、巩膜黄染者 38 例，且全部在外院消炎对症治疗，时间约 2~6 d，症状无明显缓解，此时应想到胆源性胰腺炎的可能。由于基层医院设备不完善，或医护人员问诊及查体不细致致使部分患者误诊。③接诊医生责任心不强，对腹痛减轻者仅满足于已有诊断，对病情变化不重视造成误诊。

2.2 减少误诊措施

最重要的是临床医师提高对本病的警惕性，详细询问病史，仔细查体，当有以下情况时应怀疑本病：消炎解痉，治疗后腹痛无缓解反而加重，伴皮肤巩膜有黄染者；腹痛部位发生转移，由右上腹移至上腹或由上腹、右上腹移至左上腹；经消炎治疗后白细胞数较前升高，或总数降低但中性细胞数增高者；患者进食后腹痛加重，伴频繁恶心呕吐，且神志改变，意识模糊，血压降低者。总之出现以上情况时应及时复查腹部 B 超及血、尿淀粉酶，是避免漏诊、误诊的重要措施。

收稿日期:2004-01-11

作者简介:陆 婷(1971-),女,1990年毕业于吉林空军医学专科学校护理师,电话:029-82257085