

·老年心理卫生·

# 广西巴马地区长寿老人 ApoE 基因多态性与认知功能的关系

胡才友<sup>①</sup> 杨 泽<sup>2</sup> 郑陈光<sup>1</sup> 吕泽平<sup>1</sup> 梁积英<sup>1</sup> 庞国防<sup>1</sup> 陈进超<sup>4</sup> 韦俊兴<sup>5</sup> 韦 勇<sup>1</sup>  
王 辰<sup>2</sup> 屈彦纯<sup>3</sup> 孙 亮<sup>3</sup> 杨斯雷<sup>2</sup> 史晓红<sup>2</sup> 唐 雷<sup>2</sup> 郑卫东<sup>2</sup> 王 沥<sup>6</sup> 金 锋<sup>6</sup>  
韩布新<sup>6</sup> 吴 森<sup>1</sup> 梁永锡<sup>5</sup>

**【摘要】**目的:研究广西巴马地区长寿老人载脂蛋白 E(ApoE)基因多态性的分布及其与认知功能改变的关系。方法:采用简易精神状态量表(MMSE)对 112 例 90 岁以上广西巴马地区长寿老人进行认知功能检查,并用限制性酶切片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法进行 ApoE 基因分型。根据 MMSE 得分将研究对象分为认知功能正常组和认知功能障碍组,比较两组人群的基因型、基因频率的分布特征。结果:巴马长寿老人中发生认知功能障碍者占 14.29%。长寿老人中 ApoE $\epsilon$ 3/3 基因型分布的百分比最大,其次是  $\epsilon$ 2/3,而  $\epsilon$ 4/4 最少。ApoE 各基因型和等位基因频率认知功能正常组和认知功能障碍组相比较, $\epsilon$ 4 等位基因频率认知障碍组明显高于认知正常组( $P<0.01$ ), $\epsilon$ 4 基因携带者认知功能障碍发生率明显高于其他基因携带者。结论:巴马地区长寿人群中,ApoE $\epsilon$ 3/3 为最常见的基因型,而  $\epsilon$ 4/4 最少;ApoE 基因多态性与巴马长寿老人认知功能改变有关联;ApoE $\epsilon$ 4 基因仍然是长寿老人认知功能障碍发病的危险因子,较低的 ApoE $\epsilon$ 4 等位基因频率可能是巴马地区长寿老人认知功能保存较好的原因之一。

**【关键词】** 认知功能; 横断面研究; 载脂蛋白 E 基因型; 巴马地区; 长寿; 老人

中图分类号: B395.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-6729(2005)06-0383-04

## Cognitive Ability and Apolipoprotein E Genotypes in Long Lived Elderly in Bama area of Guangxi

HU Cai-You YANG Ze,ZHENG Chen-Guang, et al. Guangxi Jiangbin Hospital,Nanning 530021

**【Abstract】** Objective: To study the relation between the distribution of apolipoprotein E (apoE) genotypes and cognitive impairment onset in long lived elderly in Bama area in Guangxi in china. Methods: A total of 112 long lived elderly aged 90 years old and over were collected and tested with MMSE to inspect their cognitive function, and they were classified into cognition impaired group and non-impaired group according to MMSE scores. We determined the ApoE genotypes by way of PCR-RFLP technique, and compared the differences of ApoE allele and genotype of the two groups. Result: The cognitive disfunction was found to be 14.29% in long lived elderly in Bama area. The ApoE  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3 genotypes have highest frequency in long-lived elderly, next is  $\epsilon$ 2/3, and  $\epsilon$ 4/4 is lowest frequency. There were significant differences of  $\epsilon$ 4 allele frequencies between cognition impaired group and non-impaired group ( $P<0.01$ ), the long lived elderly who have ApoE  $\epsilon$ 4 genotype showed higher prevalence of cognitive impairment than others. Conclusion: The correlation between ApoE genotypes and cognitive ability in the longeval elders in the population in Bama area in Guangxi in China, ApoE  $\epsilon$ 4 allele gene could be regarded as a risk factor to longeval elders cognitive decline. The lower ApoE  $\epsilon$ 4 allele frequencies are perhaps one of the major reasons that the cognitive function of the longeval elders are better than other senile group.

**【Key words】** cognitive function; cross-sectional study; longevity; gene associated

广西巴马地区是世界著名的长寿之乡。从 60 年代开始的多次长寿现场调查发现巴马长寿者总体健康状况良好,疾病调查显示长寿者高血压、冠心病的发病率颇低(各占 10%)<sup>[1]</sup>。我们研究组自 1997 年以来在此地

连续纵向跟踪研究也证实<sup>[2]</sup>:巴马长寿老人总体认知功能较其他老年人群保持好,老年性痴呆发病率低;据报道载脂蛋白 E(Apolipoprotein, ApoE)基因与老年人的认知功能改变密切相关,ApoE  $\epsilon$ 4 等位基因作为老

\*基金项目:广西区卫生厅课题(G200033),广西自然科学基金项目(桂科自 0447022),国家 863 计划资助项目(2002223031);国家 973 计划资助项目(G2000057009)

1.广西壮族自治区江滨医院,南宁 530021 2.卫生部北京医院,卫生部老年医学研究所 3.中国科学院遗传与发育生物学研究所 4.广西巴马长寿研究所 5.广西都安县人民医院 6.中国科学院心理研究所 @通讯作者:电话:0771-5318033-2023,Email: cyhu.hua@163.com

年性痴呆发病的危险因子已得到公认,并且有报道认为其对无痴呆老人认知功能也产生有害影响<sup>[2]</sup>。为了了解巴马长寿老人 ApoE 基因多态性与认知功能改变的相关关系,探寻其总体认知功能保持较好的分子生物学机制,我们对 112 例巴马长寿老人进行简易精神状态量表(MMSE)检查,并进行 ApoE 基因型检测分析。现将结果报告如下。

### 对象与方法

1.1 研究对象 世居广西巴马地区(巴马、都安 2 县)的长寿老人。入选标准:年龄 $\geq 90$ 岁,意识清楚,能配合检查,排除失语、听力障碍、失明以及其他不能配合检查患者。共收集 112 例(其中 100 岁以上 16 人),年龄 90~113 岁,平均 96 $\pm$ 6 岁;其中男 26 例,女 86 例;半文盲 2 人,文盲 102 人,小学 8 人;110 人为农民,2 人为小商店职员;已婚 110 人,2 人未婚;吸烟 8 人;壮族 101 人,瑶族 8 人,毛南族 1 人,汉族 2 人。调查者记录所有受试者的基本信息及家系长寿信息,同时每人采集 EDTA Na<sub>2</sub> 抗凝血 5ml。所有研究对象均由本人或亲属签署知情同意。

1.2 认知功能障碍的诊断及分组 所有受试者以 MMSE 检测其认知功能<sup>[2]</sup>。MMSE 总分为 30 分,根据既往调查结果,本次我们采用上海精神卫生中心制定的标准,选择文盲组 MMSE 得分 $\leq 17$ 分、小学文化得分 $\leq 20$ 分为有认知功能障碍。根据 MMSE 得分,将受试者分为认知功能正常组和认知功能障碍组。认知功能障碍程度判断标准为:13~20 分为轻度,5~12 分为中度, $< 5$  分为重度。

1.3 ApoE 基因检测 采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 ApoE 基因型

1.3.1 实验仪器及试剂 9700 型 PCR 仪 (ABI PE 公司)。垂直电泳仪(北京六一仪器厂)。凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)。蛋白酶 E 与 Taq DNA 聚合酶(欣经科生物技术公司)。dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 为 Pharmacia 公司产品。限制性内切酶 HhaI 和 RsaI 均为 Promega 公司产品。HpaI 购自 Takara 公司。

1.3.2 基因组 DNA 的提取 无菌收集静脉血 5ml, EDTANA<sub>2</sub> 抗凝。按常规方法提取外周血白细胞基因组后,标定 DNA 浓度。

1.3.3 ApoE 基因目的片段的 PCR 扩增 扩增引物序列前引物为:5'-acagaattcgccccggcctgtacac-3'; 后引物为:5'-taagcttggcagcggctgtccaagga-3'; 热循环参数为:95 $^{\circ}$ C, 预变性 10min; 然后以 95 $^{\circ}$ C, 1min, 64 $^{\circ}$ C, 1min, 72 $^{\circ}$ C, 1min 循环 34 次; 再在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。反应体系

为 20 $\mu$ l(ApoE 目的片段扩增需要加入 10%DMSO), 其中含 4 种 dNTP 各 200 $\mu$ mol/L, 引物各 5 $\mu$ mol, 10 $\times$ buffer 2.0 $\mu$ l, 模板 DNA 50ng, Taq DNA 聚合酶 1U。加去离子水至 20 $\mu$ l, 混匀。

1.3.4 PCR 产物的鉴定: 取 5 $\mu$ l ApoE 基因的扩增产物, 用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 150V 电压, 电泳 20~30min, EB(0.5 $\mu$ g/ml) 染色 10min。

1.3.5 ApoE 基因扩增产物的限制性酶消化及电泳检测: 20 $\mu$ l 限制性内切酶反应体系, 含有 5U HhaI, 10 $\times$ C buffer 2 $\mu$ l, BSA 0.2 $\mu$ l, 加无菌去离子水至终体积 20 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C, 酶切 4 小时。然后用 15% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。经过电泳分离的酶切片段均用 0.5 $\mu$ g/ml 的 EB 染色鉴定分析。

1.4 统计学处理 基因型频率与等位基因频率以百分率(%)表示, 组间比较用  $\chi^2$  检验; Hardy-Weinberg 遗传平衡定律吻合度判断, 用  $\chi^2$  检验。

### 结果

#### 2.1 长寿老人认知功能检测结果(见表 1)

表 1 112 例长寿老人认知功能障碍异常率及分层分析(%)

组别	例数	性别		年龄(岁)		
		男	女	90-94	95-99	$\geq 100$
检查人数	112	26	86	68	28	16
认知障碍人数	16	4	12	7	4	5
异常率%	14.29	15.38	13.95	10.29	14.29	16.67

长寿老人认知功能 MMSE 总分平均为 22.1 $\pm$ 2.7, 符合认知功能障碍诊断者为 16 人(14.29%)。其中中度认知功能障碍者 4 人, 其余均为轻度认知功能障碍。符合认知功能障碍诊断者按性别和年龄分层分析可见, 随增龄长寿老人认知功能障碍呈增多趋势, 但各组间均未见统计学差异( $P > 0.05$ )。

2.2 ApoE 基因分型 ApoE 基因的扩增片段分别为 244bp、226bp、121bp。其例图显示在图 1 中。ApoE 基因多态性源于其一级结构中 3937 位和 4075 位单核苷酸的替代造成。其中  $\epsilon 2$  和  $\epsilon 3$  的 3937 处均为 T,  $\epsilon 4$  的 3937 处为 C;  $\epsilon 3$  和  $\epsilon 4$  的 4075 位均为 C, 而  $\epsilon 2$  的 4075 位是 T。包含上述两个 SNP 位点的 PCR 扩增片段(244bp)经 HhaI 酶切后的 ApoE 基因扩增产物的酶切片段产物分布如下:  $\epsilon 2$  等位基因的主要片段为 91bp 和 83bp;  $\epsilon 3$  则为 91bp、48bp 和 35bp;  $\epsilon 4$  则出现 72bp、46bp 和 35bp。ApoE 基因扩增产物的酶切片段的电泳分析结果如图 2 所示。

表2 112例长寿老人 ApoE 基因频率分布与认知功能改变对比分析

组别	例数	ApoE 基因型频率(%)						ε2	ε3	ε4
		ε4/4	ε4/3	ε2/4	ε3/3	ε2/3	ε2/2			
认知正常组	96	0(0)	4(4.16)	1(1.04)	79(82.29)	7(7.29)	5(5.20)	18(9.38)	169(88.02)	5(5.20)
认知障碍组	16	1(6.25)	3(18.75)	1(6.25)	10(62.50)	1(6.25)	0(0)	2(6.25)	24(75.00)	6(18.75)**
合计	112	1(0.89)	7(6.25)	2(1.78)	89(79.46)	8(7.14)	5(4.46)	20(8.93)	193(86.16)	11(4.91)

注:组间比较,χ<sup>2</sup>检验或精确检验,\*P<0.05,\*\*P<0.01

2.3 长寿老人 ApoE 基因型和等位基因频率分布与认知功能改变对比分析 见表2

表2显示:长寿老人 ApoE 基因型频率中以 ε3/3 最高,其次是 ε2/3 和 ε3/4;而 ε4/4 最少仅为 0.89%。等位基因频率中以 ε3 最高平均为 86.16%,ε4 最少。ApoE 各基因型和等位基因频率认知正常组和认知障碍组相比较,ε4 等位基因频率认知障碍组均明显高于认知正常组,差异有统计学意义(χ<sup>2</sup>=15.31,P<0.01);ε4 等位基因及 ε4 基因携带者(包括 ε4/4、ε4/3 及 ε2/4) 认知功能障碍发生率均明显高于 ε2 和 ε3 基因携带者(χ<sup>2</sup>值分别为 5.21, 11.55;P<0.05 和 P<0.01)。

2.4 ApoE 等位基因与长寿老人认知功能障碍发病的相关性分析 见表3

应用相对危险度(RR)分析计算 ApoE ε4 等位基因与认知功能障碍发病的关系,证明 ApoE ε4 等位基因与认知功能障碍发生有关联,结果如表3。而同样计算证明 ε2 和 ε3 基因与认知功能障碍发生无关联(P>0.05)。

表3 ApoE 等位基因与认知障碍发病的相关性分析

组别	例数	含 ApoEε4 例数	RR 值	P 值
认知障碍组	16	6	8.63	<0.01
认知正常组	98	5		

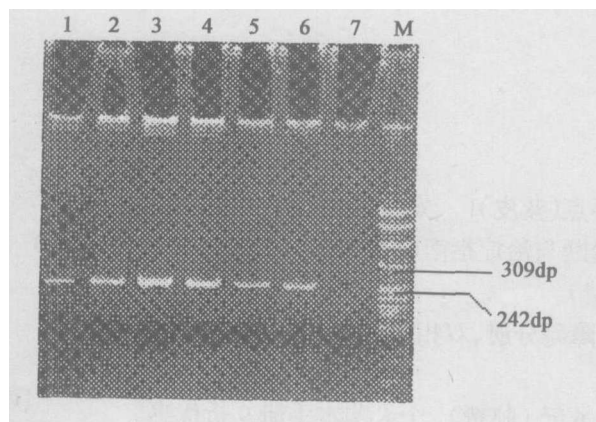


图1 巴马地区长寿老人 ApoE 基因扩增片段例图

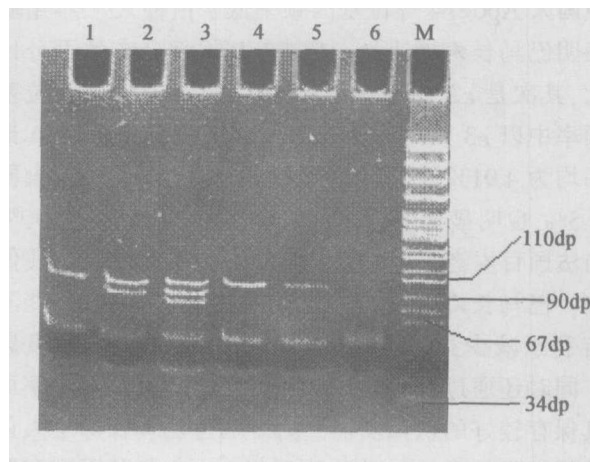


图2 巴马地区长寿老人 ApoE 基因扩增产物酶切片段的电泳图

讨论

流行病学结果表明在我国 60 岁以上老年人群中痴呆患病率约占老年人 8%~10%,其中 80 岁以上人群中患病率约高达 40%以上<sup>[4]</sup>。另据国内一些调查资料报告 85 岁以上老人有 74.19%有认知功能下降<sup>[5]</sup>。巴马长寿老人作为一个特殊的老年群体,具有痴呆发病的多个高危因素如高龄、绝大多数为文盲、农民,属于痴呆高发人群之一,但他们总体认知功能较其他老年人群保持好,痴呆发生率低。这一结果与一般老年人群既往的研究结果不尽一致。尽管影响老年人认知功能减退的因素很多如年龄、受教育程度、地区及环境因素等,但除此之外是否还存在使巴马长寿老人总体认知功能保持良好的生物学因素?这是本课题研究的主要目的之一。

ApoE 基因位于 19 号染色体,在编码 112 和 158 位氨基酸的突变产生了三种等位基因 ε2、ε3、ε4。ApoE 基因多态性与长寿、心血管疾病、老年痴呆等均有相关性<sup>[6]</sup>。已广泛证实 ApoE ε4 是老年性痴呆(AD)发病高危因素,ApoE ε4 体质在认知功能衰退中起了重要的作用。ApoE ε4 不仅是多种心血管病变的风险因子,而且可能通过增加心血管事件和微血管改变而影响认知功能的衰退<sup>[7]</sup>。ε4 等位基因在整体上对老年人,包括那些无痴呆老年人的记忆、学习能力等认知功

能产生有害的影响<sup>[9]</sup>。ε 4 等位基因的剂量对神经元功能及修复的不良影响可使老年性痴呆有关的认知功能障碍出现得更早或加重。据报道 ApoE 各等位基因频率分布存在种族差异, 中国和日本人的 ε2、ε4 均较低, 各约为 10~20%; 不同地区及不同年龄组的中国人等位基因频率无差异; 通过不同地理环境及人种比较发现中国人 ApoEε4 等位基因频率低于白种人<sup>[9]</sup>。本组研究表明巴马长寿老人 ApoEε3/3 基因型分布的百分比最大, 其次是 ε2/3, 而 ε4/4 最少仅为 0.89%。等位基因频率中以 ε3 最高, 为长寿人群中的主要基因, ε4 最少平均为 4.91%, 不仅低于国内报道的我国汉族人群的 7.5%, 也明显低于非洲黑人及高加索人种的比例<sup>[9]</sup>, 而与法国百岁老人中 5.8% 的比例相接近<sup>[10]</sup>。由此我们推测: 巴马长寿老人较低的 ApoEε4 基因频率可能不仅有利于减少其本身对神经元功能及修复的不良影响, 同时还通过降低长寿老人心脑血管疾病患病率而使其保存较好的认知功能。另外通过巴马长寿老人认知功能正常组和认知功能障碍组 ApoE 各基因型和等位基因频率相比较表明, ε3/4 基因型和 ε 4 等位基因频率认知障碍组明显高于认知正常组, 而且 ε 4 等位基因及 ε 4 基因携带者 (包括 ε 4/4、ε 4/3 及 ε 2/4) 认知功能障碍发生率明显高于 ε 2 和 ε 3 基因携带者。应用相对危险度(RR)分析计算表明 ApoE ε 4 等位基因与认知功能障碍发生有关联。

综上所述, 除增龄是影响巴马长寿老人认知功能改变的因素之外, ApoE 基因多态性与长寿老人认知功能改变有关联; ApoE ε 4 基因仍然是长寿老人认知功能障碍发病的危险因子。较低的 ApoE ε 4 等位基因频率可能是巴马长寿老人认知功能保存较好的原因之

一。

### 参考文献

- 1 曾育生, 朱高章, 吕维善, 等. 广西巴马县 50 例九十岁以上长寿老人的综合考察报告. 中华老年医学杂志, 1982, 1(1): 2-8.
- 2 吕泽平, 郑陈光, 杨泽, 等. 巴马县壮族长寿老人认知功能及日常生活能力调查. 中国心理卫生杂志, 2003, 17(2): 98-100.
- 3 Seuteri A, Bcs AT, Zonderman AB. et al. Is the apoE4 allele an independent predictor of coronary events? Am J Med, 2001, 110(1): 28-32.
- 4 Checler F, da-Costa CA, Ancolio K, et al. Role of the proteasome in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta, 2000, 1502(1): 133-8.
- 5 唐根富, 王勇, 赵宜生, 等. 安徽省两城市老年人生活自理能力及其相关因素分析. 中华老年医学杂志, 2001, 20(3): 213-215.
- 6 史晓红, 杨泽, 载脂蛋白 E 遗传多态性与疾病的关系. 世界医学, 2002, 6(11): 57-62.
- 7 Altstiel LD, Greenberg DA, Marin D, et al. Apolipoprotein E genotype and cognition in the very old. LANCET, 1997, 349(9063): 1451-4.
- 8 郑以漫, 李小英, 朱宏达, 等. PCR-RFLP 法检测上海地区汉人载脂蛋白 E 基因型. 上海第二医科大学学报, 1998, 18(2): 123-125.
- 9 鄢盛恺, 周新, 哈黛文, 等. 聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测载脂蛋白 E 基因型. 中华医学检验杂志, 1997, 20(1): 28-31.
- 10 Schachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, et al. Genetic association with human longevity at the ApoE and ACE loci. Nat Genet 1994, 6(1): 29-32

责任编辑: 唐宏宇

04-09-14 收稿, 04-12-13 修回

## 征 订

本刊编辑部现有部分资料, 包括:

- 《ICD-10 精神与行为障碍分类》[临床描述与诊断要点(蓝皮)] 定价: 20 元 + 4 元(邮费)
- [初级保健中精神障碍诊断与治疗指南(粉皮)] 定价: 20 元 + 4 元(邮费)
- 《精神病学英汉双解词典》 定价: 48 元 + 5 元(邮费)
- 《中国精神障碍防止指南》(精神分裂症分册、抑郁障碍分册、双相障碍分册)。
- 三册定价: 50 元 + 5 元
- 《心理卫生评定量表手册》(1999 年增刊): 50 元 + 6 元(邮费), 个人购本手册 9 折优惠。

邮购地址: 北京市海淀区花园北路 51 号, 中国心理卫生杂志社 仇芙华 收 邮政编码: 100083