

## 证的研究

## 肾精亏虚型老年痴呆与 APOE 基因多态性的相关性研究

周 岚<sup>1</sup> 胡永年<sup>1</sup> 王 平<sup>1</sup> 曹 俊<sup>2</sup>

**摘要** 目的:从分子生物学角度探讨 APOE 基因多态性与肾精亏虚型老年痴呆发病的相关性。方法:将 41 例老年痴呆患者及 85 例健康对照老年人分别按中医辨证分为肾精亏虚证、痰浊蒙窍证、瘀血阻络证。用 NaI 分离白细胞中的 DNA, multi-ARMs PCR 检测 APOE 基因型,并作出相关性分析。结果:(1)痴呆组基因型  $\epsilon 3/\epsilon 3$  与对照组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ),痴呆组  $\epsilon 4/\epsilon 4$  和等位基因  $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$  与对照组比较也有显著性差异( $P < 0.01$ )。(2) $\epsilon 4$  等位基因与老年痴呆发病的相对危险度(OR 值)为  $3.92 > 1$ 。(3)肾精亏虚证与  $\epsilon 4$  等位基因有显著的相关性( $P < 0.01$ )。结论:(1) $\epsilon 4$  等位基因为老年痴呆的危险因子,而  $\epsilon 3$  等位基因为老年痴呆的保护因子。(2)肾精亏虚证与  $\epsilon 4$  等位基因密切相关。

**主题词** 阿尔茨海默病/遗传学 肾虚/遗传学

**Study on Correlativity of Senile Dementia of Type of Deficiency of Kidney Essence with Polymorphophism of APOE Gene**

Zhou Lan, Hu Yongnian, Wang Ping, et al.

(Experimental Center of TCM, Hubei College of TCM, Wuhan 430061)

**Objective:** To explore correlativity of senile dementia of deficiency of kidney essence with polymorphophism of APOE gene.

**Methods:** 41 cases of senile dementia and 85 healthy aging persons were divided into 3 TCM syndrome types: syndrome of deficiency of kidney essence, syndrome of orifices confused by phlegm, and syndrome of obstruction of blood stasis in collaterals. DNA in white blood cells was isolated by NaI, and APOE gene was detected by multi-ARMs PCR, and then correlative analysis was made. **Results:** (1) There was a significant difference between the dementia group and the control group in the gene type  $\epsilon 3/\epsilon 3$  ( $P < 0.05$ ), and  $\epsilon 4/\epsilon 4$  and allelic genes  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$  ( $P < 0.01$ ). (2) The relative risk (OR) of  $\epsilon 4$  allelic gene with senile dementia attack was  $3.92 > 1$ . (3) There was significant correlativity between syndrome of deficiency of kidney essence and APOE  $\epsilon 4$  allelic gene ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** (1) APOE  $\epsilon 4$  allelic gene is risk factor and APOE  $\epsilon 3$  allelic gene is protective factor for senile dementia. (2) There is close correlation between syndrome of deficiency of kidney essence and APOE  $\epsilon 4$  allelic gene.

**Key Words** Alzheimer's disease/genetics; deficiency of kidney/genetics

随着生活水平的提高,老龄化日益严重,老年痴呆的发病率也随之逐渐增高并已成为一个严重的社会问题,因而防治老年痴呆也成为医学领域中的重要课题。近年研究发现, APOE 基因多态性与老年痴呆的发生、发展及预后直接关系。我们从分子生物学角度探讨 APOE 基因多态性与肾精亏虚型老年痴呆发病的相关性,为全面探析老年痴呆的病因打下基础,并为防治老年痴呆提供可靠的理论依据。

## 1 临床资料

1.1 一般资料:41 例老年痴呆患者[包括阿尔茨海默型痴呆(AD)、血管性痴呆(VD)]均来自武汉市第一医院神经内科病房,其中男性 18 例,女性 23 例,年龄 60

~85 岁,平均  $(71.5 \pm 7.1)$  岁。其中 60~70 岁 21 例, 71~80 岁 18 例, >80 岁 2 例。中学以上文化程度 9 例,小学文化程度 19 例,文盲 13 例;高血压 32 例,糖尿病 12 例,高血脂 18 例,脑萎缩 23 例,白质损害 17 例;卒中史 28 例,心肌梗死史 15 例。年龄匹配的对照组均为湖北中医学院附属医院门诊体检的健康人,共 85 人,男性 45 人,女性 40 人,年龄 60~83 岁,平均  $(68.2 \pm 6.1)$  岁。60~70 岁 49 人,71~80 岁 32 人, >80 岁 4 人。中学以上文化程度 37 人,小学文化程度 36 人,文盲 12 人。经过临床、心电图(ECG)和实验室检查,无精神异常及认知障碍,无神经系统体征。无心脑血管疾病及肝、肾、内分泌等影响脂质代谢的疾病。

1.2 诊断标准及辨证标准:先用 MMSE 量表筛选出有认知功能障碍的患者。标准为: $<24$  分(中学以上文化程度), $<20$  分(小学文化程度), $<17$  分(文盲)。再根据 1994 年美国精神病学会的《精神障碍诊断与统计

基金项目:湖北省教育厅资助项目(2000A06019)

1 湖北中医学院中药实验中心,武汉市武昌区昙华林特 1 号(430061)

2 武汉大学医学院 2004 级博士研究生

收稿日期:2004-11-08;修回日期:2005-01-10

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

手册》(DSM-IV)作出痴呆的诊断。中医证型诊断标准根据第六版《中医内科学》中痴呆的辨证分型标准和田金洲等的《血管性痴呆的中医辨证量表》<sup>[1]</sup>及《中药新药治疗老年期痴呆的临床研究指导原则》,本课题组制定出老年痴呆肾精亏虚证、痰浊蒙窍证、瘀血阻络证中医证型的诊断标准。(1)肾精亏虚证:主症:智能减退,腰膝酸软,倦怠思卧,齿枯发焦。次症:表情呆板,思维迟钝,善惊易怒,脑转耳鸣,步履沉重,行走艰难,夜尿多,性功能减退,偏肾阴虚者,舌红苔少,脉细数;偏肾阳虚者,舌淡苔薄,脉沉细。(2)痰浊蒙窍证:主症:智能减退,头重如裹,纳呆脘胀,口多涎沫。次症:神情呆板,或哭笑无常,喃喃自语;或终日无语,呆若木鸡;形体肥胖,动作迟缓,肢体困重,脘闷不饥,泛恶欲呕。痰浊化热者,或见昏睡,或见狂躁不安,行为不轨,舌体胖大,舌质淡,苔白腻,脉滑或苔黄腻,脉滑数。(3)瘀血阻络证:主症:智能减退,头痛如刺,痛处不移,口唇爪甲青紫。次症:神情淡漠,少欢寡言,或躁动不安,语言错乱,口齿不清,言语不利,面色晦暗,肌肤干燥,口干不欲饮,午后夜间低热,心悸,不寐,舌质紫暗或有瘀斑瘀点,舌下脉络紫暗,脉沉迟或涩。主症具备两项(智能减退必备),次症至少具备两项者该证型诊断成立。

1.3 纳入及排除标准:年龄 $\geq 60$ 岁,意识清楚。排除失语、听力障碍、昏迷以及其他不能配合检查的患者;排除患有精神病、脑外伤、中毒、有重大精神创伤等已经明确对智能有明显影响的患者;排除患有导致记忆和认知功能障碍的系统性疾病的患者。

## 2 实验方法

### 2.1 DNA 模板的制备

2.1.1 实验仪器与试剂:NaI,氯仿/异戊醇混合液,纯异丙醇,7%异丙醇,羟甲基氨基甲烷,TE 缓冲液均购于武汉天源生物技术有限公司。

2.1.2 实验步骤:取新鲜抗凝血 100 $\mu$ l 置于 EP 管中,离心。弃上清,加双蒸水摇匀,加 NaI 缓慢倒置摇匀,管内加氯仿/异戊醇 400 $\mu$ l,摇匀 20 秒后离心,取上层水相 360 $\mu$ l 置于一新的 EP 管中加纯异丙醇,放置 15 分钟,离心。弃上清,再加异丙醇 1ml,离心。小心弃异丙

醇,晾干。50 $\mu$ l TE 缓冲液溶解 DNA,以琼脂糖凝胶电泳鉴定或 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 2.2 APOE 基因 multi-ARMs 法快速分型<sup>[2]</sup>

2.2.1 实验材料:DNA 模板, TaqDNA 聚合酶, dNTPs,  $10\times$  Buffer, DNA 片段长度标准物(PBR322DNA/Hae III markers), PCR 试管均为大连宝生生物公司产品。五条引物均为上海博亚生物技术有限公司产品。DMSO、琼脂糖、EB 均购于武汉天源生物技术有限公司。

2.2.2 multi-ARMs PCR 扩增体系:总反应体积为 25 $\mu$ l。A、B 两管内均加入  $10\times$  Buffer: 2.5 $\mu$ l (含 15mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ); DMSO: 2.5 $\mu$ l; 2.0mmol/L dNTPs: 2.5 $\mu$ l; p5: 20pmol; TaqDNA 聚合酶: 2U (0.5U/ $\mu$ l); DNA: 3 $\mu$ l; A 管 P1: 15pmol; P3: 60pmol; B 管 P2: 15pmol; P4: 10pmol。经  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 分钟,然后  $96^{\circ}\text{C}$  45 秒,  $66^{\circ}\text{C}$  45 秒,  $72^{\circ}\text{C}$  1 分钟,循环 35 次,末次循环后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 分钟。产物经 2% 琼脂糖电泳, EB 染色,紫外光观察结果摄影。再根据电泳结果(图谱)进行 APOE 基因分型。

2.3 统计学方法:基因频率用基因计数法计算,痴呆组与对照组的 APOE 基因频率及等位基因频率之间的比较用  $\chi^2$  检验。中医证型与 APOE 基因多态性之间比较也用  $\chi^2$  检验。

## 3 结果

用 multi-ARMs 快速分型法检测出痴呆组和对照组的 APOE 基因型,其分布具体见附表。实验中我们还发现,痴呆组含有  $\epsilon 4$  等位基因 17 例,对照组含有  $\epsilon 4$  等位基因 13 例,含有的  $\epsilon 4$  基因与老年痴呆发病的相对危险度(OR 值)为  $3.92>1$ 。因此,含有的  $\epsilon 4$  等位基因是老年痴呆发病的一个危险因素。

我们进一步研究了中医各证型与  $\epsilon 4$  基因的关系。在 41 例痴呆患者中肾精亏虚型有 15 例,痰浊蒙窍型有 7 例,瘀血阻络型有 8 例,其中对应含有  $\epsilon 4$  基因的例数分别为 9 例、3 例和 1 例。经过  $\chi^2$  检验分别得  $\chi^2=6.81>6.63(P<0.01)$ ,  $\chi^2=0.041<3.84(P>0.05)$  和  $\chi^2=0.45<3.84(P>0.05)$ 。从而说明只有肾精亏

附表 健康痴呆组及对照组基因型及基因频率的分布[%(例)]

| 组别       | APOE 基因型                |                         |                         |                         |                         |                         | 等位基因         |              |              |
|----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
|          | $\epsilon 2/\epsilon 2$ | $\epsilon 2/\epsilon 3$ | $\epsilon 2/\epsilon 4$ | $\epsilon 3/\epsilon 3$ | $\epsilon 3/\epsilon 4$ | $\epsilon 4/\epsilon 4$ | $\epsilon 2$ | $\epsilon 3$ | $\epsilon 4$ |
| 痴呆组(41)  | 2.44(1)                 | 17.07(7)                | 7.32(3)                 | 48.78(20)               | 14.63(6)                | 9.76(4)                 | 14.63(6)     | 64.63(26.5)  | 20.74(8.5)   |
| 对照组(85)  | 0                       | 11.76(10)               | 4.70(4)                 | 70.76(62)               | 10.58(9)                | 0                       | 8.24(7)      | 81.12(71.5)  | 7.61(6.5)    |
| $\chi^2$ | 2.06                    | 0.39                    | 0.99                    | 6.36                    | 0.207                   | 8.58                    | 2.44         | 12.15        | 9.03         |
| P        | $>0.05$                 | $>0.05$                 | $>0.05$                 | $<0.05$                 | $>0.05$                 | $<0.01$                 | $>0.05$      | $<0.01$      | $<0.01$      |

注:痴呆组基因型  $\epsilon 3/\epsilon 3$  与对照组比较差异有显著性( $P<0.05$ ),痴呆组  $\epsilon 4/\epsilon 4$  和等位基因  $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$  与对照组比较差异也有显著性( $P<0.01$ );括号内为例数,括号内非整数者为杂合子

虚型与  $\epsilon 4$  基因之间有显著相关性,而痰浊蒙窍型和瘀血阻络型与  $\epsilon 4$  基因之间无相关性。

#### 4 讨论

老年痴呆是发生在早老期和老年期的以进行性痴呆为特征的脑功能障碍而产生的智能损害综合征,主要包括血管性痴呆(VD)和阿尔茨海默型痴呆(AD)。该组疾病在老年疾病谱和死亡谱中占有重要的地位,严重威胁着老年人的健康和生活质量。在发病机制和治疗方面国内外虽作了大量研究,但至今尚未取得满意结果。中医认为,痴呆的病位在脑,病性为本虚标实。肾精亏虚为本,痰浊瘀血阻络为标,故肾精亏虚,痰浊瘀血阻络是老年痴呆发病的主要病理机制。

我们在本实验中发现,痴呆组基因型  $\epsilon 3/\epsilon 3$  与对照组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ),痴呆组  $\epsilon 4/\epsilon 4$  和等位基因  $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$  与对照组比较差异也有显著性( $P < 0.01$ ),表明  $\epsilon 4$  等位基因可能为老年痴呆的危险因子, $\epsilon 3$  等位基因可能为老年痴呆的保护因子,与国外有关学者的研究结果基本一致。而对于有作者认为  $\epsilon 2$  为老年痴呆的保护因子,本研究未有证据支持,研究结果显示,痴呆患者与对照组的等位基因  $\epsilon 2$  差异无显著性( $P > 0.05$ )。同时我们在实验中发现,含有的  $\epsilon 4$  等位基因与老年痴呆发病具有显著相关性,说明含有的  $\epsilon 4$  等位基因是老年痴呆发病的一个危险因素。

实验结果表明,肾精亏虚证与含有的  $\epsilon 4$  基因之间有显著相关性( $P < 0.01$ ),因此,肾精亏虚证的发生与  $\epsilon 4$  基因的存在有关。分子遗传学认为本病根本在于基因,中医学则认为根本在于肾。虽然肾精亏虚证和  $\epsilon 4$  基因之间的内在联系尚未彻底清楚,但绝不会与此相左。中医认为“肾为先天之本”,也应隐含基因学的思想和认识。本实验也初步证实了这一关系。即中医辨证为肾精亏虚的患者很可能携带有  $\epsilon 4$  等位基因,换句话说,若某一患者携带有  $\epsilon 4$  等位基因,则发生肾精亏虚

证的可能性很大。

《素问·金匱真言论》曰:“夫精者,身之本也。”袁进宏等指出<sup>[3]</sup>,《内经》认为,精是遗传的基素,在精这个遗传基素上包含了新个体的全部遗传潜能。精是后天个体发育成长的根本,一个新个体产生和发育的一切遗传信息以及在此遗传信息指导下推动生命个体发展的全部原始能量都蕴含在这个“精”中。遗传基素“精”藏纳在肾中,“肾者,主蛰;封藏之本,精之处也。”(《素问·六节藏象论》)因此,我们一般又称“肾精”。肾精作为新个体的根本基素,来自母体和父体,是在新个体产生之前就先出现的。正如《灵枢·决气》篇所说:“两神相搏,合而成形,常先身生,是谓精。”而包含遗传信息的基因也是在出生之前就存在的。

肾之为脏,合水火二气,为五脏六腑之根。肾中水火阴阳,以肾中精气的充养为根本,并不断保持平衡,从而成为五脏六腑之根,全身生命活动之本;只有肾精充足,肾中阴阳水火平衡,才能维持正常的发育,反之则必生病变。同样在 APOE 基因及其表达产物的功能之间也须保持平衡,而使生化正常。APOE $\epsilon 4$  是老年痴呆的危险因子,而 APOE $\epsilon 3$  可减少危险,是老年痴呆的保护因子,在脑中存在着 APOE $\epsilon 4$  和 APOE $\epsilon 3$  的平衡,一旦 APOE $\epsilon 4$  升高,则可导致发病。

实验还发现,痰浊蒙窍证和瘀血阻络证与含有的  $\epsilon 4$  基因之间没有显著相关性( $P > 0.05$ ),当然可能与本实验样本的例数太少有关,此结果尚需今后进一步扩大样本例数继续研究验证。

#### 参考文献

- 1 田金洲,韩明向,涂晋文. 血管性痴呆的诊断、辨证及疗效判定标准. 北京中医药大学学报,2000,23(5):16~24.
- 2 郑芳,周新,叶光明,等. APOE 基因 MULTI ARMS 快速分型法. 基础医学与临床,2000,20(6):88~90.
- 3 袁进宏,冯华.《黄帝内经》的遗传学思想初探. 北京中医学院学报,1991,14(3):20~23.

(上接第 838 页)

药海螵蛸的碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )含量在 90%以上<sup>[4,5]</sup>,可作为良好的补钙药材。另外,在《中医药治疗骨质疏松症研究进展》一文中列举的诸多的治疗骨质疏松症的验方或制剂中,大都含有海螵蛸等中药。海螵蛸中碳酸钙含量高,来源丰富,价格便宜。近年来研究证明海螵蛸还含有大量的钾、钠、钙、镁、铜、铁、锰、锌等对人体有益的微量元素<sup>[5]</sup>。

#### 参考文献

- 1 Denda M, Finch J, Slatopolsky E. Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in

rats with renal failure. Am J Kidney Dis, 1996, 28(4):596~602.

- 2 Sanders C, Frank MS, Rostand SG, et al. Metastatic calcification of the heart and lungs in end-stage renal disease: detection and quantification by dual-energy digital chest radiography. Am J Roentgenol, 1987, 149(5):881~887.
- 3 Rufino M, de Bonis E, Martin M, et al. Is it possible to control hyperphosphataemia with diet, without inducing protein malnutrition? Nephrol Dial Transplant, 1998, 13(Suppl 3):65~67.
- 4 张毅贞. 中药材牡蛎、海螵蛸中碳酸钙含量的测定. 基层中药杂志, 1998, 12(1):28~29.
- 5 赵云涛,李琨,黄燕,等. 海螵蛸入药部分和废弃部分 8 种无机元素分析. 广东微量元素科学, 2002, 9(12):35~37.