

Nrf2 基因启动子 rs35652124, rs6706649 和 rs6721961 位点单核苷酸多态性与阿尔茨海默病的相关性研究*

张宝华^a, 武 琪^b (安康市中医医院 a. 质控科; b. 急诊科, 陕西安康 725000)

摘要:目的 探讨陕西地区汉族人群中,核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)基因多态性与阿尔茨海默病(AD)的相关性。方法 收集 2015 年 1 月~2016 年 12 月于安康市中医医院治疗的 382 例 AD 患者,按照患者发病年龄分为早发性阿尔茨海默病(EOAD)患者 116 例和晚发性阿尔茨海默病(LOAD)患者 266 例,另选择 120 例认知功能正常志愿者作为对照组,收集所有入组成员的临床资料,并采用聚合酶链反应(PCR)联合 DNA 直接测序法检测 Nrf2 基因启动子 rs35652124, rs6706649 和 rs6721961 位点单核苷酸多态性。结果 EOAD 组与对照组比较,rs35652124 和 rs6721961 位点基因型和等位基因分布频率差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。LOAD 组与对照组比较,三个 SNP 位点基因型和等位基因分布频率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。对于 EOAD 组,rs35652124 和 rs6721961 位点不同基因型患者,发病年龄差异具有统计学意义($P < 0.05$)。对于 LOAD 组,三个 SNP 位点不同基因型患者发病年龄差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论 Nrf2 基因多态性可能与 EOAD 遗传易感性相关,且影响 EOAD 患者发病年龄。

关键词:阿尔茨海默病;核因子 E2 相关因子 2;基因多态性

中图分类号:RR749.1;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)05-062-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.017

Association between Nrf2 Gene rs35652124, rs6706649 and rs6721961 Polymorphism and Alzheimer's Disease

ZHANG Bao-hua^a, WU Qi^b (a. Department of Medicine Quality Control; b. Department of Emergency, Ankang Traditional Chinese Hospital, Shaanxi Ankang 725000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genetic association between NF-E2-related factor 2 (Nrf2) gene polymorphism and Alzheimer's disease (AD) in the Han descent population of Shaanxi province. **Methods** 382 AD patients from January 2015 to December 2016 were recruited to participate in the study. According to age of onset, they were divided into the early-onset Alzheimer's disease (EOAD) group (116 cases) and the late-onset Alzheimer's disease (LOAD) group (266 cases). 120 healthy volunteers without AD were recruited to participate in the study. Genotype was determined by polymerase chain reaction combined with DNA direct sequencing technique for the polymorphism of the Nrf2 gene. **Results** The genotype and allele distribution of rs35652124 and rs6721961 polymorphism were significantly different between the EOAD group and control group ($P < 0.05$). There was no significant difference of genotype and allele distribution of three Nrf2 gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) between the LOAD group and control group ($P > 0.05$). For EOAD patients, age of onset was significantly different between different genotype of rs35652124 and rs6721961 ($P < 0.05$). However, there was no significant difference of age of onset in LOAD group ($P > 0.05$). **Conclusion** Polymorphism of the Nrf2 gene may associate with the risk of AD, and affect disease progression.

Keywords: alzheimer's disease; NF-E2-related factor 2; gene polymorphism

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见于老年人的进行性神经系统退行性疾病,是最常见的痴呆类型之一^[1]。目前研究结果显示 AD 发病机制十分复杂,可能是由环境和遗传多因素交互作用所致,且一般认为遗传因素对早发性阿尔茨海默病(early-onset Alzheimer's disease, EOAD)发病的贡献大于迟发性阿尔茨海默病(late-onset Alzheimer's disease, LOAD)^[2]。近年来,越来越多证据显示氧化应激与 AD 发病及进展均密切相关^[3,4]。核因子 E2 相关因子 2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)是细胞氧化应激损伤的重要保护性

因子,有研究发现 Nrf2-抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)通路可能参与 AD 发病过程^[5,6],但关于 Nrf2 基因多态性与 AD 易感性的研究鲜有报道。本研究以我国陕西汉族人群为研究对象,观察 Nrf2 基因多态性与 EOAD 易感性,及 Nrf2 基因多态性与 EOAD 患者发病年龄的关系,为临床工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2015 年 1 月~2016 年 12 月于我科门诊和(或)住院治疗的 382 例 AD 患者,采用简易精神状态量表(Mini-Mental State Exam-

* 作者简介:张宝华(1977—),男,本科,主治医师,研究方向:神经内科常见病诊治, E-mail: zhangbh1977bh@163.com。

通讯作者:武 琪, E-mail: wuqi197510@126.com。

ination, MMSE)及第4版美国精神医学协会精神疾病诊断与统计手册诊断(The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM)^[7]。纳入标准:①符合2011年美国神经病学、语言障碍和卒中老年性痴呆和相关疾病学会(NINCDS-ADRDA)^[8]很可能AD诊断标准;②临床资料完备。排除标准:①由脑血管病或其他严重疾病,包括中枢神经系统感染、颅内肿瘤、精神分裂症、焦虑抑郁症、头部外伤等引起的痴呆和假性痴呆,②精神发育迟滞及老年人良性健忘症。按照患者发病年龄,将发病年龄 ≤ 65 岁的患者归为EOAD组,发病年龄 > 65 岁归为LOAD组,其中EOAD组共116例,其中男性52例,女性64例,平均年龄 63.6 ± 4.8 岁,平均发病年龄 59.7 ± 5.1 岁,MMSE平均得分为 13.5 ± 6.4 分;LOAD组共266例,男性109例,女性157例,平均年龄 72.3 ± 4.9 岁,平均发病年龄 70.7 ± 4.5 岁,MMSE平均得分为 14.8 ± 5.7 分。从同期在我科接受神经心理学检查且确认无认知功能障碍的人员中随机选择120例作为正常对照组,其中男性52例,女性68例,平均年龄 65.6 ± 5.5 岁。所有入组人员均为汉族,彼此无血缘关系。本研究通过本院伦理委员会审核批准,

所有入组成员均充分知情同意。

1.2 试剂与仪器 基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。PCR引物由上海生工生物公司合成。PCR仪及高速低温离心机均购自德国Eppendorf公司,垂直电泳槽购自北京六一仪器厂,DNA测序仪为美国ABI 3730XL型。

1.3 方法

1.3.1 基因组DNA提取:采集清晨空腹时外周静脉血5 ml,应用DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取基因组DNA。

1.3.2 基因多态性检测:采用聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)联合DNA直接测序法检测Nrf2基因启动子rs35652124, rs6706649和rs6721961位点单核苷酸多态性。PCR反应体系($25 \mu\text{l}$)包括: $10\times$ Buffer $2.5 \mu\text{l}$,上、下游引物各 $1 \mu\text{l}$ (见表1),dNTP混合物 $2 \mu\text{l}$,TaqDNA聚合酶 $0.25 \mu\text{l}$,模板DNA $1 \mu\text{l}$,不足部分由灭菌蒸馏水补足。反应条件为 95°C 预变性4 min,然后按照变性、退火、延长的顺序循环30周期(具体条件见表1),最后 72°C 延长3 min。取 $0.5 \mu\text{l}$ 延伸产物,经 1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳确定,对PCR产物直接测序。

表1 各SNP位点PCR引物、退火温度及延长时间

SNPs	引物	退火温度($^\circ\text{C}$)	延长时间(S)
rs35652124	上游:5'-GGGTTCCCGTTTTCTCCAGCTCTGGGTG-3'	65	50
	下游:5'-TGTTTGCGAAGGTCGCTGGAGTTCGACGC-3'		
rs6706649	上游:5'-ATCTGTGGCGTGGTGGCTGCGCTTTGG-3'	65	45
	下游:5'-AGCTCGTGTTCGAGTCACCCGTGAGCG-3'		
rs6721961	上游:5'-GGGTTCCCGTTTTCTCCAGCTCTGGGTG-3'	65	50
	下游:5'-TGTTTGCGAAGGTCGCTGGAGTTCGACGC-3'		

1.4 统计学分析 采用SPSS19.0统计软件分析处理,本研究计量资料均服从正态分布,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,三组间均数比较采用方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验;两组均数比较采用 t 检验。基因型分布采用Hardy-Weinberg平衡定律检验。采用比值比(odd ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI)表示相对风险度。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg遗传平衡检验结果 本研究EOAD组、LOAD组和对照组的Nrf2基因rs35652124, rs6706649和rs6721961三个位点基因型分布经检验均符合Hardy-Weinberg遗传平衡,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有群体代表性。

2.2 各组Nrf2基因型和等位基因分布 见表2。EOAD组与对照组比较,rs35652124和rs6721961位点基因型和等位基因分布频率差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);EOAD组与LOAD组比较,rs6721961位点基因型和等位基因分布频率差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。LOAD组与对照组比较,三个SNP位点基因型和等位基因分布频率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 Nrf2基因型与AD发病年龄的相关性分析 见表3。对于EOAD组患者,rs35652124和rs6721961位点不同基因型患者发病年龄差异具有统计学意义($P = 0.000, 0.030$)。对于LOAD组患者,3个SNPs位点不同基因型发病年龄差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 2 各组 Nrf2 基因型和等位基因分布[n(%)]

基因型/ 等位基因		对照组 (n=120)	EOAD 组 (n=116)	LOAD 组 (n=266)	对照组 vs EOAD 组		对照组 vs LOAD 组		EOAD 组 vs LOAD 组	
					OR(95% CI)	P	OR(95% CI)	P	OR(95% CI)	P
rs35652124	GG	30(25.0)	21(18.1)	66(24.8)	1.0		1.0		1.0	
	GA	65(54.2)	57(49.1)	136(51.1)	1.173(0.733~1.877)	0.504	0.967(0.677~1.380)	0.851	0.824(0.544~1.249)	0.351
	AA	25(20.8)	38(32.8)	64(24.1)	1.532(1.007~2.331)	0.042	1.074(0.800~1.443)	0.638	0.701(0.478~1.028)	0.052
	G	125(52.1)	99(42.7)	268(50.4)	1.0		1.0		1.0	
	A	115(47.9)	133(57.3)	264(49.6)	1.221(1.007~1.479)	0.041	1.034(0.892~1.199)	0.660	0.847(0.714~1.005)	0.050
rs6706649	GG	109(90.8)	102(87.9)	238(89.5)	1.0		1.0		1.0	
	GA	9(7.5)	13(11.2)	27(10.2)	1.041(0.958~1.132)	0.337	1.029(0.963~1.098)	0.428	0.988(0.915~1.066)	0.745
	AA	2(1.7)	1(0.9)	1(0.4)	0.992(0.961~1.023)	0.605	0.986(0.960~1.013)	0.191	0.994(0.974~1.015)	0.539
	G	227(94.6)	217(93.5)	503(94.5)	1.0		1.0		1.0	
	A	13(5.4)	15(6.5)	29(5.5)	1.011(0.966~1.058)	0.630	1.000(0.965~1.038)	0.984	0.989(0.951~1.029)	0.580
rs6721961	CC	64(53.3)	48(41.4)	144(54.1)	1.0		1.0		1.0	
	CA	43(35.8)	45(38.8)	98(36.8)	1.159(0.902~1.489)	0.244	1.005(0.834~1.212)	0.957	0.867(0.694~1.084)	0.191
	AA	13(10.8)	23(19.8)	24(9.0)	1.229(1.017~1.487)	0.028	0.970(0.862~1.091)	0.598	0.789(0.664~0.937)	0.001
	C	171(71.3)	141(60.8)	386(72.6)	1.0		1.0		1.0	
	A	69(28.8)	91(39.2)	146(27.4)	1.172(1.028~1.336)	0.016	0.982(0.892~1.081)	0.708	0.838(0.746~0.941)	0.001

表 3 不同基因型发病年龄比较

基因型		EOAD				LOAD			
		例数	发病年龄	F	P	例数	发病年龄	F	P
rs35652124	GG	21	63.0±5.4	16.130	0.000	66	71.2±4.8	0.663	0.521
	GA	57	60.8±4.9			136	70.7±4.3		
	AA	38	56.3±4.2 ^{ab}			64	70.3±4.6		
rs6706649	GG	102	60.3±5.3	0.324	0.747	238	70.9±4.5	1.880	0.063
	GA	13	59.8±4.7			27	69.2±4.4		
rs6721961	CC	48	61.1±5.4	3.612	0.030	144	71.0±4.4	1.175	0.311
	CA	45	59.3±5.1			98	70.6±4.6		
	AA	23	57.7±4.8 ^c			24	69.5±5.1		

注:rs6706649 位点 AA 基因型患者例数极少,未进行比较。^a P<0.05,AA vs GG;^b P<0.05,AA vs GA;^c P<0.05,AA vs CC。

3 讨论 神经纤维缠结和 β-淀粉样蛋白沉积形成老年斑是 AD 的两大病理特征,目前研究显示氧化应激参与这两种病理改变。Tau 蛋白磷酸化是神经纤维缠结的基础,机体产生过多的活性氧可通过影响钙平衡及抑制能量代谢等方式促进 Tau 蛋白磷酸化^[9]。此外,还有研究发现血红素加氧酶可能也参与 Tau 蛋白在机体内累积过程^[10]。目前,β-淀粉样蛋白可诱导神经元细胞凋亡已被证实,有学者认为诱导氧化应激可能是 β-淀粉样蛋白诱导神经元细胞凋亡的重要步骤,体内及体外试验均发现 β-淀粉样蛋白可促进活性氧、一氧化氮等氧自由基释放,且抗氧化剂可一定程度阻断 β-淀粉样蛋白对细胞损伤^[11]。以上证据均表明氧化应激与 AD 发病过程密切相关。

Nrf2 是体内介导抗氧化应激反应最主要的细胞防御机制之一,氧化应激刺激可激活胞浆中的 Nrf2 分子,促使 Nrf2 立即转位至细胞核内,与抗

氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合,调节下游基因表达,包括多种与机体抗氧化相关基因,发挥稳定抗氧化作用^[12]。近年来,不断有研究发现 Nrf2 与 AD 发病密切相关,Nrf2 对预防 AD 发生具有重要保护作用,Nrf2 表达减少可能是 AD 发病的重要原因之一。另外,除抗氧化应激外,有研究发现 Nrf2 在 AD 病理生理过程中的具体作用还包括:①抗炎,有观点认为 β-淀粉样蛋白沉积所引起的慢性炎症是 AD 发病的重要因素之一,核转录因子(NF-κB)作为介导众多炎症反应的中心物质,在神经退行性改变部位也可检测到 NF-κB 表达异常,已有研究发现 Nrf2 可通过抑制 NF-κB 表达发挥抗炎作用^[13]。②抗凋亡,有研究发现 Nrf2-ARE 通路可激活的下游基因中还包括多种抗凋亡蛋白基因,Nrf2 激活可促进 Bcl-2 的表达,抑制凋亡蛋白 caspase-3 和 Bax 的表达^[14]。

目前,Nrf2 基因多态性与 AD 易感性的相关研究较为少见,Otter 等^[15]以欧洲人群为研究对象,共纳入 725 例 AD 患者,观察包括 rs35652124, rs6706649 和 rs6721961 在内的 8 个 SNP 位点多态性与 AD 易感性的相关性,结果显示所有 SNP 位点基因多态性均与 AD 易感性无明显相关性,但一定的单体型可能延迟发病年龄,影响 AD 进展过程。与既往 Nrf2 其他相关研究结果相比,基因多态性研究结果并未发现与 AD 易感性的强联系,笔者分析可能原因在于该研究入选患者平均年龄多超过 60 岁,且未按照 EOAD 和 LOAD 进行分组,表示可能纳入患者多以 LOAD 为主,而一般认为遗传因素对 EOPD 发病贡献较大。因此,本研究将 AD 患者分为 EOAD 和 LOAD 两个亚组,比较不同组别 Nrf2 基因多态性。研究结果显示,EOAD 组与对照组,rs35652124 和 rs6721961 位点基因型和等位基因分布频率差异均具有统计学意义,而 LOPD 组和对照组比较,三个 SNP 位点基因多态性差异均无统计学意义。本研究进一步比较不同基因型患者发病年龄的差异,结果显示 EOAD 组患者不同 rs35652124 和 rs6721961 位点基因型,发病年龄差异具有统计学意义,LOAD 组 3 个 SNPs 位点不同基因型发病年龄差异无统计学意义。

综上所述,Nrf2 基因多态性可能与 EOAD 易感性密切相关,且可能影响 EOAD 患者发病年龄。但由于相关研究,尤其以中国或其他东亚地区人群为研究对象的相关研究较少,需要更多研究结果加以验证。而且,除了本研究观察的 3 个启动子 SNP 位点外,Nrf2 基因还包括多个 SNP 位点,对于其他位点多态性与 AD 易感性的关系,以及多个位点之间的相互关系尚不明确,也需要后续进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐向红,郭天康,苏海翔,等. 中国汉族人群 MAPT 基因 SNPs 等位基因及单体型频率与阿尔茨海默病相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(2):34-37.
- [2] Xu XH,Guo TK,Su HX,et al. Correlation study on SNPs of allele and haplotype frequencies of MAPT gene with Alzheimers disease in han population of China[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014,29(2):34-37.
- [3] Pereira AC,Gray JD,Kogan JF,et al. Age and Alzheimer's disease gene expression profiles reversed by the glutamate modulator riluzole [J]. Mol Psychiatry, 2017,22(2):296-305.
- [4] Greenough MA,Camakaris J,Bush AI. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. Neurochem Int,2013,62(5):540-555.
- [5] Zhang R,Zhang Q,Niu J,et al. Screening of microRNAs associated with Alzheimer's disease using oxidative stress cell model and different strains of senescence accelerated mice[J]. J Neurol Sci,2014,338(1/2):57-64.
- [6] Joshi G,Gan KA,Johnson DA,et al. Increased Alzheimer's disease-like pathology in the APP/PS1ΔE9 mouse model lacking Nrf2 through modulation of autophagy[J]. Neurobiol Aging,2015,36(2):664-679.
- [7] Sandberg M,Patil J,D'Angelo B,et al. NRF2-regulation in brain health and disease:implication of cerebral inflammation[J]. Neuropharmacology, 2014,79(4):298-306.
- [8] Cooper J. Diagnostic and statistical manual of mental disorders(4th Edition):DSM-IV[J]. Br J Psychiatry, 2001,179(1):97-98.
- [9] 郝建华,王田园,张然蓉,等. 阿尔茨海默病患者 AD7C-NTP 和 Aβ42 检测的价值探讨[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(1):44-47.
- [10] Hao JH,Wang TY,Zhang RR,et al. Significance of detecting urine AD7C-NTP and blood Aβ42 protein level of Alzheimer patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2014,29(1):44-47.
- [11] Chakrabarti S,Sinha M,Thakurta IG,et al. Oxidative stress and amyloid beta toxicity in Alzheimer's disease:intervention in a complex relationship by antioxidants[J]. Curr Med Chem,2013,20(37):4648-4664.
- [12] Bonet-Costa V,Pomatto LC,Davies KJ. The proteasome and oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. Antioxid Redox Signal,2016,25(16):886-901.
- [13] Soodi M,Saeidnia S,Sharifzadeh M,et al. Satureja bachtiarica ameliorate beta-amyloid induced memory impairment,oxidative stress and cholinergic deficit in animal model of Alzheimer's disease [J]. Metab Brain Dis,2016,31(2):395-404.
- [14] Ruiz S,Pergola PE,Zager RA,et al. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease [J]. Kidney Int,2013,83(6):1029-1041.
- [15] Terazawa R,Akimoto N,Kato T,et al. A kavalactone derivative inhibits lipopolysaccharide-stimulated iNOS induction and NO production through activation of Nrf2 signaling in BV2 microglial cells[J]. Pharmacol Res,2013,71(5):34-43.
- [16] Ashabi G,Alamdary SZ,Ramin M,et al. Reduction of hippocampal apoptosis by intracerebroventricular administration of extracellular signal-regulated protein kinase and/or p38 inhibitors in amyloid β rat model of Alzheimer's disease;involvement of nuclear related factor and nuclear factor[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol,2013,112(3):145-155.
- [17] Von Otter M,Landgren S,Nilsson S,et al. Nrf2-encoding NFE2L2, haplotypes influence disease progression but not risk in Alzheimer's disease and age-related cataract [J]. Mech Ageing Dev, 2010,131(2):105-110.

收稿日期:2017-06-02

修回日期:2017-07-03