

· 临床研究 ·

CD33 基因单核苷酸多态性与中国汉族人群散发性阿尔茨海默病相关性研究

冯晓棠^{1,2}, 吉爱峰³, 肖利斌², 陆 蓉¹, 张向荣^{1*}¹南京医科大学附属脑科医院老年精神科, 江苏 南京 210029; ²南京市青龙山精神病院精神科, 江苏 南京 211123; ³南京市祖堂山社会福利院老年一区, 江苏 南京 211153

[摘要] 目的:探讨CD33基因多态性与中国汉族人群散发性阿尔茨海默病(sporadic Alzheimer's disease, SAD)的相关性。方法:选取166例SAD患者和167例正常对照,利用连接酶检测-聚合酶链反应(LDR-PCR)技术对CD33基因rs3865444位点进行基因分型,运用病例对照研究方法比较不同等位基因及基因型与SAD发病风险的关系。结果:SAD组CD33基因rs3865444等位基因G的频率显著低于正常对照组($P=0.010$, $OR=0.63$, $95\%CI:0.45\sim 0.90$);SAD组GG基因型频率显著低于正常对照组($P=0.013$, $OR=0.57$, $95\%CI:0.38\sim 0.89$)。结论:CD33基因rs3865444位点可能与中国汉族人群AD发病有关,等位基因G可能在AD发病中具有保护作用。

[关键词] CD33;阿尔茨海默病;单核苷酸多态性**[中图分类号]** R749.16**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)02-264-03**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190224

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是慢性进行性中枢神经系统变性导致的痴呆,AD以渐进性记忆障碍、认知功能障碍、人格改变以及语言障碍等神经精神症状为特征。常起病于老年或老年前期、多缓慢发病,逐渐进展,以痴呆为主要表现^[1]。分为家族性(familial Alzheimer's disease, FAD)和散发性(sporadic Alzheimer's disease, SAD)两种,其中绝大部分是SAD。AD最典型病理改变是大脑皮层和皮层下结构细胞神经原纤维缠结和老年斑。研究发现SAD与遗传因素和环境因素密切相关,早前广泛认为载脂蛋白E(ApoE)ε4是SAD的风险因子,近年来通过全基因组关联分析已经发现了多个AD易感基因如:CLU、PICALM、CR1、CD33、SORL1、EPHA1、MS4A4 / MS4A6E、CD2uAP、ABCA7等基因^[1-3]。既往研究发现CD33基因多态性可能与中国AD人群患病风险相关^[4-5]。Bertram等^[6]于2008年首先利用全基因组关联分析技术发现CD33基因SNP rs3826656与AD风险相关;其后 Holling-

worth^[2]和Naj等^[3]同时报道CD33 rs3865444单核苷酸多态性与AD的发病相关联。Griciuc等^[7]进行了CD33 rs3865444单核苷酸多态性与AD发病风险的相关生物学功能试验,发现唾液酸-结合免疫球蛋白样凝集素(sialic acid binding Ig-like lectins, Siglecs)在小胶质细胞表面的表达受CD33基因rs3865444单核苷酸多态性的影响,T等位基因与Siglecs低表达有关,G等位则导致Siglecs高表达。本研究采用病例对照研究方法探讨CD33基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点rs3865444与中国江苏地区汉族人群SAD的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究AD患者均为中国江苏省汉族人,收集于2012—2014年,分别来自南京市青龙山精神病院、南京市祖堂山社会福利院、扬州五台山精神病院住院患者,患者间无亲缘关系,共166例,男77例,女89例,平均年龄(74.0 ± 10.4)岁,平均简易智能状态检查(MMSE)评分(16.3 ± 5.02)分,经由2名具有精神科主治以上资质医师诊断,诊断符合美国

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(YKK16291, YKK16290, YKK15108)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: drxrz@hotmail.com

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)制定的“可能性大的AD”的标准。排除标准:①其他痴呆相关的神经系统疾病,如帕金森病、癫痫、亨廷顿病等;②既往脑血管病、脑积水、脑炎或脑膜炎病史;③严重的心脏、肾脏、肝脏等疾病;④有不易控制的精神疾病或精神障碍;⑤神经影像学检查(CT或MRI)除外颅脑占位,脑内梗死灶<3个且病灶直径≤1.0 cm,均位于半卵圆中心或基底节区,无脑白质疏松。

正常对照组选自相对应城市,性别、年龄与AD相匹配的健康人,共167例,其中男79例,女88例,平均年龄(75.0 ± 11.3)岁,无精神神经系统疾病、无高血压、无糖尿病,平均MMSE评分(28.80 ± 0.89)分。

病例组和对照组人群性别、年龄无统计学差异。样本收集已通过医院和(或)样本人群知情同意。

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提

用EDTA真空采血管采集晨空腹静脉血液5 mL,轻轻颠倒混匀,2 h内分装-80 °C低温保存,按Axy-gene全基因组DNA抽提试剂盒说明书抽提基因组DNA,用紫外分光光度计检测DNA浓度和纯度,DNA样本-40 °C保存。

1.2.2 基因分型

委托上海翼和应用生物技术有限公司采用连接酶检测-聚合酶链反应(LDR-PCR)方法对CD33基因rs3865444位点进行基因分型^[8]。rs3865444位点PCR引物序列(上游引物:5'-TCCTTCCACTCTGAG-GTGCT-3',下游引物:5'-TTTGTTCCTCTGCC-CCAGAC-3'),PCR扩增片段长度为166 bp。LDR探针序列(rs3865444-G:5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-TATCCTGCTGGACTAAACACCCC-3',产物长度为77 bp;rs3865444-T:5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-TATCCTGCTGGACTAAACACCCA-3',产物长度为79 bp;荧光探针:P-ATGGATCTAGGTGAGGCT-GCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM)。多重LDR产物经琼脂糖电泳后,根据LDR产物的长度不同用ABI公司3730型核酸测序仪测序,进行G/T等位基因分型。

1.3 统计学方法

使用SPSS17.0统计软件对病例组与正常对照组样本进行Hardy-Weinberg平衡吻合度检验,比较两组样本基因型及等位基因频率分布差异,计算比值比(odds ratio, OR)及其95%置信区间(confidence interval, CI), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检出率及重复性

rs3865444位点基因分型检出率达到100%,研究者选取10%的样本,在检测人员不知情的情况下进行rs3865444位点基因分型的重复性检测,结果其重复率达到100%。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

病例组($\chi^2=0.538, P=0.463$)和对照组($\chi^2=1.581, P=0.209$)的样本 P 值均>0.05,表明研究样本具有群体代表性。

2.3 CD33 基因 rs3865444 位点分型结果

SNP rs3865444等位基因及基因型频率分布结果如表1所示。统计结果显示病例组中等位基因G的频率显著低于对照组($P=0.010, OR=0.63, 95\% CI: 0.45\sim 0.90$);两组中GG型与TT+TG型比较,病例组GG型携带者比例显著低于对照组,差异有统计学意义($P=0.013, OR=0.57, 95\% CI=0.38\sim 0.89$),GG型与TT型、GG+TG型与TT型比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表2)。

表1 两组等位基因及基因型频率分布 [n(%)]

等位基因/基因型	对照组	病例组
G	260(77.8)	229(69.0)
T	74(22.2)	103(31.0)
GG	104(62.3)	81(48.8)
GT	52(31.1)	67(40.4)
TT	11(6.6)	18(10.8)

表2 两组遗传模型的关联分析

遗传模型	P 值	OR(95%CI)
G vs. T	0.010	0.63(0.45~0.90)
GG vs. TT	0.066	0.48(0.21~1.06)
GG vs. TT+TG	0.013	0.57(0.38~0.89)
TG+GG vs. TT	0.168	0.58(0.26~1.27)

3 讨论

CD33基因位于19q13.3,编码Siglecs,是具有不同数量免疫球蛋白结构域的I型膜蛋白家族的一员,常表达于血液细胞、免疫细胞及神经细胞。Li等^[9]通过Meta分析表明,在东亚人群中CD33 rs3865444存在显著异质性,但在中国汉族人群中该位点与AD的发病风险显著相关。Hu等^[10]观察到AD患者外周血单核细胞CD33 mRNA水平及CD33阳性细胞百分率均低于正常人。Siglecs蛋白C端有

一个与唾液酸特异结合的酪氨酸依赖信号转导基序,通过识别唾液酸激发胞内信号转导,使膜受体抑制细胞因子的产生。CD33的低表达可使脑内促炎细胞因子TNF- α 、IL-6、IL-8水平增加,通过脑内炎症反应加剧了AD的基本病理过程。这些研究提示CD33基因很可能是一个与中国人群AD发生密切相关的易感基因。

本研究发现,CD33基因rs3865444位点G等位基因的频率SAD低于正常对照组,两组间存在显著差异,等位基因G很可能是AD发病过程中的保护因素。欧美人群研究显示CD33基因rs3865444位点T等位基因是AD的保护因素,而两个中国汉族人群研究显示rs3865444位点T等位基因是AD的风险因素。本研究与中国汉族人群研究^[4-5,9]结果一致,进一步验证了rs3865444位点G等位基因是中国汉族人群AD发病的保护因素,这些差异性结果可能与不同地域人群间的遗传异质性有关。文献显示CD33基因最小等位基因(MAF)在不同的种族间相差很大,中国汉族人群为17%,欧美白种人群为30%^[5]。本研究样本较少可能影响统计学效率,今后研究应进一步增加结果可重复性。

综上所述,CD33 rs3865444多态性能影响CD33的表达,通过识别唾液酸介导的细胞间相互作用、信号转导及内吞作用,从而影响AD的发生发展。因此,进一步准确认识Siglecs如何介导小胶质细胞的信号传递、内吞作用,可能成为AD防治的新方向。

[参考文献]

- [1] Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis[J]. *Biol Psychiatry*, 2015, 77(1):43-51
- [2] Hollingworth P, Harold D, Sims R, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(5):429-435
- [3] Naj AC, Jun G, Beecham GW, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(5):436-441
- [4] Deng YL, Liu LH, Wang Y, et al. The prevalence of CD33 and MS4A6A variant in Chinese Han population with Alzheimer's disease[J]. *Hum Genet*, 2012, 131(7):1245-1249
- [5] Tan L, Yu JT, Zhang W, et al. Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population [J]. *Alzheimers Dement*, 2013, 9(5):546-553
- [6] Bertram L, Lange C, Mullin K, et al. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 83(5):623-632
- [7] Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, et al. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta[J]. *Neuron*, 2013, 78(4):631-643
- [8] Jin C, Zhang L, Xian Y, et al. The SORL1 polymorphism rs985421 may confer the risk for amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease in the Han Chinese population[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 563(1):80-84
- [9] Li X, Shen N, Zhang S, et al. CD33 rs3865444 polymorphism contributes to Alzheimer's disease susceptibility in Chinese, European, and North American populations [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(1):414-421
- [10] Hu N, Tan MS, Sun L, et al. Decreased expression of CD33 in peripheral mononuclear cells of Alzheimer's disease patients[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 563(1):51-54

[收稿日期] 2017-12-23