

## 成纤维细胞生长因子 1 基因启动子多态性与 晚发型阿尔茨海默病的相关性研究

陈煜森<sup>1</sup>, 赵斌<sup>1</sup>, 许志恩<sup>1</sup>, 山泉英久<sup>2</sup>, 三木哲郎<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 探讨成纤维细胞生长因子 1 (FGF-1) 基因启动子多态性是否与晚发型阿尔茨海默病 (LOAD) 相关。方法 收集 206 例尸体检查的样本, 包括 100 例 LOAD 和年龄匹配的对照组 106 例。PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法分析 FGF-1 基因启动子 (-1385 A/G) 的基因型。结果 FGF-1 基因启动子 (-1385 A/G) 的基因型频率分布是: AA 型 20 例 (10%), GA 型 89 例 (43%), GG 型 97 例 (47%), 在 LOAD 组和对照组之间, 不同基因型频率分布有显著性差异 ( $P=0.027$ ); GG 基因型与 LOAD 呈正相关 (odds ratio = 2.02, 95% CI: 1.16 ~ 3.52)。结论 FGF-1 基因启动子 (-1385 A/G) 多态性与 LOAD 显著相关。

**[关键词]** 晚发型阿尔茨海默病 (LOAD); 成纤维细胞生长因子 1 (FGF-1) 基因; 启动子多态性; 相关性

**Correlation between the Promoter Polymorphism of Fibroblast Growth Factor 1 gene and Late onset Alzheimer's Disease** CHEN Yusen, ZHAO Bin, XU Zhi-en, et al. Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the correlation between the promoter polymorphism of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1) and late-onset Alzheimer's disease (LOAD). **Methods** Clinic pathological data from 206 autopsies were analyzed, including 100 autopsy-confirmed LOAD patients and 106 age-matched non-demented controls. PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) approach was used to determine the genotype of the promoter polymorphism of FGF-1 gene. **Results** The genotyping frequencies of the promoter polymorphism (-1385 A/G) were AA 20 (10%), GA 89 (43%), GG 97 (47%), respectively. There was significant ( $P=0.027$ ) difference of genotyping frequencies between the cases and controls; GG genotype was positively associated with LOAD (odds ratio = 2.02, 95% CI: 1.16 ~ 3.52). **Conclusion** The promoter polymorphism (-1385 A/G) of FGF-1 gene was associated with LOAD.

**[Key words]** late-onset Alzheimer's disease; fibroblast growth factor 1 (FGF-1) gene; promoter polymorphism; correlation

中图分类号: R742 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)05-0394-02

**[本文著录格式]** 陈煜森, 赵斌, 许志恩, 等. 成纤维细胞生长因子 1 基因启动子多态性与晚发型阿尔茨海默病的相关性研究 [J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(5): 394-395.

在老年人中, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是引起痴呆的最常见原因, 晚发型阿尔茨海默病 (late-onset AD, LOAD) 一般是指 65 岁以上发病的 AD。研究表明, 环境因素和遗传因素都对 AD 的发病有影响。但至今 AD 的确切的病因还不清楚, 亦没有理想的治疗方法<sup>[1]</sup>。因此, 对 AD 的病因进行深入研究对制定预防或干预 AD 的策略具有重要的意义。成纤维细胞生长因子 1 (Fibroblast growth factor 1, FGF-1) 亦称为酸性成纤维细胞生长因子, 它是成纤维细胞生长因子家族成员之一, 具有促进有丝分裂和细胞生存的活性, 并参与胚胎发生和器官形成等多种生物学过程<sup>[2]</sup>。研究表明, 在 AD 或人体免疫缺损病毒 (HIV) 脑炎的过程中, FGF-1 对神经元有选择性保护作用<sup>[3-5]</sup>。在 AD 尸体脑组织的免疫组织化学检查中发现, FGF-1 特异性地表达在老年斑周围的反应性星形胶质细胞亚群中。FGF-1 的表达上调可能与反应性星形细胞的出现有关, 而不是  $\beta$ -淀粉样蛋白的沉积<sup>[6-7]</sup>。最近的研究提示, 在反应性星形细胞中, FGF-1 上调载脂蛋白 E (ApoE) 的合成, 随后使高密度

脂蛋白 (HDL) 的生成增加; 在中枢神经系统受损后, 通过 ApoE 的分泌来发挥其效应<sup>[8-9]</sup>。FGF-1 在海马中的表达比在运动神经元中的表达低, 提示在 AD 中, 内嗅皮质神经元容易受损与 FGF-1 有关, 并且 FGF-1 免疫活性改变的方式可能在 AD 的患病过程中起重要的作用<sup>[4, 10]</sup>。

### 1 资料和方法

**1.1 研究对象** 本研究经日本爱媛大学医学部伦理委员会同意, 脑或血样来自于日本关西地区, 并有书面同意书。LOAD 病例选择符合美国国立神经病、语言机能紊乱和卒中研究所及阿尔茨海默病和相关疾病协会 (NINCDS-ADRDA) 诊断标准 (确诊标准) 100 例, 对照组选择年龄及性别匹配的门诊健康老年人或健康自愿者 106 人, 并经简易智力检查 (Mini Mental State Examination, MMSE) 评分对智能进行严格的评估<sup>[12-13]</sup>。LOAD 平均发病年龄为 (75.2 ± 7.0) 岁, 入组时的平均年龄 (85.3 ± 6.0) 岁; 对照组平均年龄 (83.0 ± 4.9) 岁。病例组和对组的其他资料参见我们先前的报道<sup>[13-14]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 按酚-氯仿法提取脑组织或外周血白细胞基因组 DNA<sup>[15]</sup>。

**1.2.2 FGF-1 基因的 PCR-RFLP 分析** FGF-1 基因

作者单位: 1. 广东医学院附属医院神经内科, 广东湛江市 524001; 2. 爱媛大学医学部老年医学, 日本爱媛县 791-0295。作者简介: 陈煜森 (1966-), 男, 广东廉江市人, 博士, 副教授, 主要研究方向: 脑血管病、痴呆。

引物序列如下:上游为 5'-TCAAGCAATTCTCCTGCCTT-3', 下游为引物 5'-CCACTTCAAGGGATTATGGTG-3'。PCR 反应体积 25  $\mu$ l, 含有模板 DNA 50 ~ 100 ng, dNTP 0.2 mmol/L, 上下游引物各 5 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH=8.3, TaqDNA 聚合酶 0.5 U。PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后按 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环。PCR 扩增产物长度为 355 bp。PCR 产物 HhaI 酶切后, 于 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色观察结果。G 等位基因酶切后产物为 53 + 141 + 161 bp, A 等位基因酶切产物为 53 + 302 bp。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行  $\chi^2$  检验 (Chi-square test); 相对危险度 (relative risk ratio, RR) 和相对应的 95% 可信度 (confidence interval, CI) 采用 Mantel Haenszel 统计方法计算。

## 2 结果

FGF-1 基因启动子 (-1385 A/G) 的基因型频率分布是: AA 型 20 例 (10%), GA 型 89 例 (43%), GG 型 97 例 (47%), 经 Pearson  $\chi^2$  检验, 符合 Hardy-Weinberg 平衡规律 ( $P > 0.05$ )。3 种基因型 (AA, GA, GG) 在病例组和对照组中的频率分布有显著性差异 ( $P = 0.027$ ); 基因型 GG 与 AA + GA 在两组之间频率分布有显著性差异 ( $P = 0.013$ ), G 等位基因在病例组和对照组中的频率分别是 75% 和 63%, 有显著性差异 ( $P = 0.0073$ )。见表 1。GG 基因型与 LOAD 呈正相关 (odds ratio = 2.02, 95% CI: 1.16 ~ 3.52)。

表 1 FGF-1 基因启动子 (-1385 A/G) 基因型和等位基因频率分布

组别	n	AA	GA	GG	AA+GA	G	A
病例组	100	6	38	56 <sup>a</sup>	44 <sup>b</sup>	150	50 <sup>c</sup>
对照组	106	14	51	41	65	133	79

注: a:  $P = 0.027$ ; b:  $P = 0.013$ ; c:  $P = 0.0073$ 。

## 3 讨论

最近的研究提示, FGF-1 基因多态性与颅内动脉瘤相关<sup>[16]</sup>, 但是其在病理生理学上的功能还不清楚。FGF-1 基因 5'-端包含有选择性非翻译性外显子, 至少有 4 种启动子组织特异性的方式调控其转录<sup>[17-19]</sup>。Payson 等报道, 从 -1614 至 FGF-1 基因起始位置的序列就足以刺激启动子的活性<sup>[18]</sup>。因此, 我们有理由认为, FGF-1 基因启动子 -1385 G/A 多态性与启动子的活性有关。我们的初步研究提示, FGF-1 基因或其附近的基因是 LOAD 的危险因子。相关性研究通常出现相互矛盾的结果, 其可能原因有 3 种: ① I 类统计学误差, 这种情况可出现基因多态性与疾病呈弱相关。② 遗传背景不同, 如美国、法国、亚洲人等人群之间的差异。在一些研究中, AD 组是由家族性和散发性 AD 所组成, 本研究为了尽量做到研究对象的均一性, 选择的 LOAD 组是经脑的病理检查证实的。③ 致病多态

性呈连锁不平衡状态。

本研究的结果是 GG 基因型比 A 等位基因患病风险高, 提示启动子 GG 基因型可能对 FGF-1 的表达有影响, 并且可能与 AD 神经元选择性的脆弱性有关。研究结果支持这样假设: FGF-1 基因使 AD 患者内嗅皮质神经元选择性产生脆弱性, FGF-1 免疫反应性发生改变, 这种改变可能在 AD 的病理生理的过程中产生重要的作用<sup>[10-12]</sup>。这种假设需要进一步研究证实, 如 FGF-1 基因的功能分析等。

## [参考文献]

- [1] Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 741 - 766.
- [2] Eckenstein FP. Fibroblast growth factors in the nervous system [J]. *J Neurobiol*, 1994, 25: 1467 - 1480.
- [3] Guo Z, Mattson M. Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function [J]. *Cereb Cortex*, 2000, 10: 50 - 57.
- [4] Thorns V, Masliah E. Evidence for neuroprotective effects of acidic fibroblast growth factor in Alzheimer disease [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58: 296 - 306.
- [5] Everall IP, Trillo-Pazos G, Bell C, et al. Amelioration of neurotoxic effects of HIV envelope protein gp120 by fibroblast growth factor: a strategy for neuroprotection [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001, 60: 293 - 301.
- [6] Tooyama I, Akiyama H, McGeer PL, et al. Acidic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in brain of Alzheimer patients [J]. *Neurosci Lett*, 1991, 121: 155 - 158.
- [7] Kimura H, Tooyama I, McGeer PL, et al. Acidic FGF expression in the surroundings of senile plaques [J]. *Tohoku J Exp Med*, 1994, 174: 279 - 293.
- [8] Ueno S, Ito J, Nagayasu Y, et al. An acidic fibroblast growth factor-like factor secreted into the brain cell culture medium upregulates APOE synthesis, HDL secretion and cholesterol metabolism in rat astrocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1589: 261 - 272.
- [9] Tada T, Ito J, Asai M, et al. Fibroblast growth factor 1 is produced prior to apolipoprotein E in the astrocytes after cryo-injury of mouse brain [J]. *Neurochem Int*, 2004, 45: 23 - 30.
- [10] Thorns V, Licastro F, Masliah E, et al. Locally reduced levels of acidic FGF lead to decreased expression of 28-kDa calbindin and contribute to the selective vulnerability of the neurons in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease [J]. *Neuropathology*, 2001, 21: 203 - 211.
- [11] McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease [J]. *Neurology*, 1984, 34: 939 - 944.
- [12] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR, et al. Mini-mental state, a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician [J]. *J Psychiatr Res*, 1975, 12: 189 - 198.
- [13] Akatsu H, Takahashi M, Matsukawa N, et al. Subtype analysis of neuropathologically diagnosed patients in a Japanese geriatric hospital [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 196: 63 - 69.
- [14] Matsubara M, Yamagata H, Kamino K, et al. Genetic association between Alzheimer disease and the alpha-synuclein gene [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2001, 12: 106 - 109.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 9 - 14.
- [16] Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, et al. Association of positional and functional candidate genes FGF-1, FBN2, and LOX on 5q31 with intracranial aneurysms [J]. *J Hum Genet*, 2003, 48: 309 - 314.
- [17] Myers RL, Payson RA, Chotani MA, et al. Gene structure and differential expression of acidic fibroblast growth factor mRNA: identification and distribution of four different transcripts [J]. *Oncogene*, 1993, 8: 341 - 349.
- [18] Payson RA, Chotani MA, Chiu IM, et al. Regulation of a promoter of the fibroblast growth factor 1 gene in prostate and breast cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998, 66: 93 - 103.
- [19] Chiu IM, Touhalisky K, Baran C, et al. Multiple controlling mechanisms of FGF-1 gene expression through multiple tissue-specific promoters [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001, 70: 155 - 174.

(收稿日期: 2005-12-15)