

## • 论 著 •

# 泛素羧基末端水解酶 L1 基因 S18Y 多态性与脑淀粉样血管病的关系

陈 婧, 吴 琴, 尹义军

(湖北省黄石市中心医院检验科 435000)

**摘要:**目的 探讨中国汉族人群泛素羧基末端水解酶 L1(UCH-L1)基因的 S18Y 多态性在脑淀粉样血管病(CAA)发病机制中的作用。方法 利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 40 例经病理学证实的 CAA 患者和 40 例健康人 UCH-L1 基因 S18Y 多态性分布后, 进行病例-对照相关分析。结果 S18Y 多态性 YY 基因型频率在 CAA 组(22.5%)和健康对照组(12.5%)差异无统计学意义( $\chi^2=1.385, P=0.205$ ); SY 基因型频率在 CAA 组(47.5%)和对照组(25.0%)差异有统计学意义( $\chi^2=4.381, P=0.033$ ); Y 等位基因频率在 CAA 组(46.2%)和对照组(25.0%)差异有统计学意义( $\chi^2=7.876, P=0.005$ ); SY 基因型频率、Y 等位基因频率与 CAA 呈正相关( $OR=1.900, 95\% CI: 1.036 \sim 4.595$ ;  $OR=1.850, 95\% CI: 1.143 \sim 2.140$ )。结论 中国汉族人群 L1(UCH-L1)基因的 S18Y 多态性的杂合子 SY 可能是 CAA 的遗传易感性基因型, Y 等位基因携带者也对 CAA 有较高的遗传易感性。

**关键词:**脑淀粉样血管病; 泛素羧基末端水解酶 L1 基因; 基因多态性分析

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.017

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2011)20-2336-03

## Association of S18Y polymorphism of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 gene with cerebral amyloid angiopathy

Chen jing, Wu qin, Yin yijun

(Department of Clinical Laboratory Medicine, Huangshi Central Hospital, Hubei 435000, China)

**Abstract: Objective** To explore the relationship between the S18Y polymorphism of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) gene and cerebral amyloid angiopathy (CAA). **Methods** The PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) method was used to determine S18Y polymorphism in UCH-L1 gene in the case group ( $n=40$ ) and healthy control group ( $n=40$ ). **Results** The YY carriers genotyping frequency of S18Y polymorphism in the case group was 22.5%, and that in healthy control group was 12.5%, there was not significant difference between two groups ( $\chi^2=1.385, P=0.205$ ); the SY carriers genotyping frequency in the case group was 47.5%, and that in healthy control group was 25.0%, there was significant difference between two groups ( $\chi^2=4.381, P=0.033$ ); Y allele carriers genotyping in the case group was 46.2%, and that in healthy control group was 25.0%, there was not significant difference between two groups ( $\chi^2=7.876, P=0.005$ ). The SY and Y allele carriers genotyping frequencies of S18Y polymorphism are the significant association between UCH-L1 gene and sporadic CAA ( $OR=1.900, 95\% CI: 1.036 \sim 4.595$ ;  $OR=1.850, 95\% CI: 1.143 \sim 2.140$ ). **Conclusion** The results indicate that the polymorphism of S18Y in UCH-L1 gene maybe the predisposing gene of CAA in Chinese Han population.

**Key words:** cerebral amyloid angiopathy; UCH-L1 gene; polymorphism

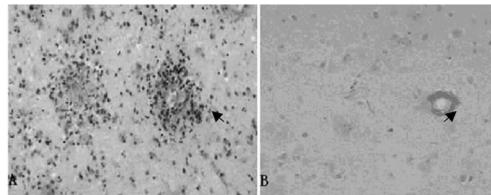
脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy, CAA)又称脑嗜刚果红物质血管病, 是一种以大脑皮质及软脑膜的中小血管壁内异常的淀粉样物质沉积为特征的颅内血管病。该病多散发于 60 岁以上的老年人, 临幊上以痴呆、精神症状、反复或多发性脑叶出血为主要特征, 且发病率随年龄增加而增高, 是老年人脑叶出血的常见原因, 日益受到临幊的重视<sup>[1]</sup>。

泛素-蛋白酶系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是体内异常蛋白的降解体系之一<sup>[2]</sup>。泛素羧基末端水解酶 L1(ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1, UCH-L1)作为 UPS 重要的去泛素化酶, 对异常蛋白的清除起着重要作用。在不同的种族人群中均已发现, UCH-L1 基因外显子 3 上第 54 位胞嘧啶突变为腺嘌呤(C54A), 相应 18 个密码子酪氨酸取代丝氨酸所产生的变异(S18Y 多态性)对神经系统有异常蛋白沉积的疾病有保护作用<sup>[3]</sup>。为探讨中国汉族人群 UCH-L1 基因多态性在 CAA 病因学中的作用, 本研究利用病例-对照相关性分析的方法, 初步研究 UCH-L1 基因 S18Y 多态性在 CAA 发病过程中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2008 年 8 月至 2011 年 2 月期间, 在黄石市中心医院神经外科行小骨窗血肿清除术或微创血肿引流术的自发性脑叶出血患者, 根据 Greenberg 等<sup>[4]</sup>制定出的“可能的 CAA 相关出血”诊断标准, 初筛出不合并有高血压、高脂血症、糖尿病等引起脑动脉硬化危险因素的病例。术中收集清出的血肿, 用生理盐水淘洗, 收集其中的脑组织碎块, 迅速投入到多聚甲醛溶液中固定, 以石蜡包埋, 进行常规 HE 染色和刚果红染色。参照改良刚果红染色法<sup>[5]</sup>, 组织病理学观察以盲法由病理医生光镜下读片。血管壁上的淀粉样物在 HE 染色下呈均一无结构的嗜伊红组织; 刚果红染色为阳性的切片可见微小血管壁内呈鲜红色, 细胞核呈蓝色(图 1), 偏振光显微镜下观察呈黄绿色双折光现象。刚果红染色为阳性的患者 40 例, 为病理学证实的 CAA 组, 其中男 24 例, 女 16 例, 年龄 60~90 岁(中位年龄 76 岁); 14 例额叶, 4 例颞叶, 12 例顶叶, 10 例枕叶出血。对照组 40 例, 其中男 23 例, 女 17 例, 年龄 59~90 岁(中位年龄 75 岁)为来自本院门诊健康体检的老人, 均排除

其他遗传性疾病及心血管和神经系统疾病。CAA 组 40 例患者中,男性占 60%,对照组 40 例健康者中,男性占 57.5%,两组间性别比较差异均无统计学意义( $\chi^2 = 0.415, P = 0.55$ )。所有受试者均为汉族,并知情同意,经黄石市中心医院伦理委员会同意。



A: 和刚果红染色(箭头所示血管壁上的淀粉样物在 HE 染色下呈均一无结构的嗜伊红组织);B: 所见(箭头所示血管壁上的淀粉样物质刚果红染色呈鲜红色,  $\times 400$ )。

图 1 脑血管壁 HE 染色

## 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多肽性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)分析参照 Silke 等<sup>[6]</sup>的文献,引物序列用 Primer 5.0 软件设计,在 UCH-L1 基因 S18Y 多态性两端设计引物,序列如下:5'-AGA CTC GGC TGC ACG GGC TTC-3'(上游);5'-TGG ACG GAT GGG CAA GAA GGC-3'(下游),片断长度为 522 bp,引物由上海生工生物有限公司合成。

**1.2.2 基因组 DNA 提取** 肘静脉血 5 mL(3.8% 枸橼酸钠抗凝),碘化钾法从白细胞中提取基因组 DNA。紫外分光光度法测定 DNA 浓度,−20 ℃保存。

**1.2.3 DNA 扩增** DNA 反应体系 PCR 体系总体积为 18  $\mu\text{L}$ ;LA Taq DNA 聚合酶(10 U/ $\mu\text{L}$ )0.1  $\mu\text{L}$ ,GC 10×缓冲液 12.5  $\mu\text{L}$ ,三磷酸脱氧核苷[dNTPs(2.5 mmol/L)]4.0  $\mu\text{L}$ ,20  $\mu\text{mol}$  的上下游引物 0.4  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:96 ℃预变性 2 min,(96 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min)共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,终止反应。PCR 扩增后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测是否有特异性的扩增产物。

**1.2.4 限制性内切酶酶切和电泳** 取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产品,5  $\mu\text{L}$  10×缓冲液,2  $\mu\text{L}$  限制性酶(10 U/ $\mu\text{L}$ )Rsa I,在 37 ℃消化 2 h。取 10  $\mu\text{L}$  酶切产物加入 3% 琼脂糖凝胶的负极端加样孔中,以溴化乙锭(EB)为染色剂,于 100 V 电泳 25 min 后取出,在 300 nm 紫外灯下观察带型。携带 S18Y 多态性野生型等位基因的 PCR 产物本身含有一个限制性内切酶 Rsa I 的酶切位点,经 Rsa I 内切酶消化后,产生 503、19 bp 两个片断,携带变异性等位基因的 PCR 产物会增加一个 Rsa I 酶的酶切位点,经 Rsa I 酶消化后会产生 270、233、19 bp 3 个片断。

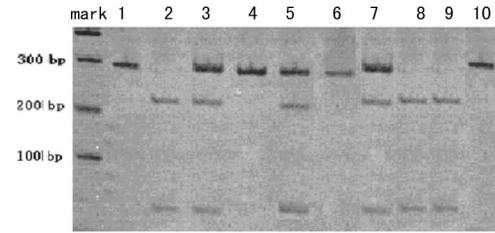
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行处理,基因型和等位基因频率采用直接计数法统计。研究对象基因型和等位基因频率的组间比较采用四格表  $\chi^2$  检验,并通过比值比(OR)的计算对帕金森病(PD)与各等位基因和基因型进行关联分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 琼脂糖凝胶电泳结果显示** 基因型 见图 2。

**2.2 UCH-L1 基因 S18Y 多态基因型频率和等位基因频率比较结果** CAA 组 YY 基因型频率(22.5%)与对照组(12.5%)

相比有增加,但差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.385, P = 0.205$ );CAA 组 SY 基因型频率(47.5%)与对照组(25.0%)相比亦有增加,差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.381, P = 0.033$ )。总体,CAA 组携带 Y 等位基因频率(46.2%)与对照组(25.0%)相比增高明显,差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.298, P = 0.003$ )。携带 SY 基因型频率与散发性 CAA 呈正相关( $OR = 1.900, 95\% CI: 1.036 \sim 4.595$ ),携带 Y 等位基因频率也与 CAA 呈正相关( $OR = 1.850, 95\% CI: 1.143 \sim 2.140$ ),见表 1。



mark: 间隔 100 bp 的标记;1、4、6、10: SS 基因型;2、8、9: YY 基因型;3、5、7: SY 基因型。

图 2 3% 琼脂糖凝胶电泳显示 UCH-L1 基因 S18Y 多态性不同的基因型

表 1 CAA 组与对照组中 UCH-L1 基因 S18Y 多态基因型频率和等位基因频率分布[n(%)]

组别	n	基因型			等位基因频率	
		YY	SY	SS	Y	S
CAA 组	40	9(22.5%)	19(47.5%)	12(30.0%)	37(46.2%)	43(53.8%)
对照组	40	5(12.5%)	10(25.0%)	25(62.5%)	20(25.0%)	60(75.0%)

## 3 讨 论

CAA 是老年人一种独立的脑血管病,其病理特征为大脑皮质及软脑膜的小血管壁内的中层和弹力层被特殊染色的透明样嗜刚果红物质所沉着,从而导致血管壁坏死、出血。CAA 患者血管壁所沉积的淀粉样物质为 39 至 43 个氨基酸组成的  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ )多肽链,与阿尔茨海默病患者的老年斑的形成成分相同。CAA 发病机制被认为血管平滑肌细胞产生的 A $\beta$  在细胞外聚集成纤维样,促使平滑肌细胞进一步变性,如果血管中层平滑肌被淀粉样物质完全代替便可造成血管破裂和血管动力学变化。A $\beta$  清除减少,可能是 A $\beta$  聚集和产生 CAA 的原因之一<sup>[7-8]</sup>。随着人口老龄化,CAA 已成为老年人原发性、非外伤性、非高血压性脑出血的重要原因之一,其发病率还会随年龄增长而有上升趋势<sup>[9]</sup>。

UCH-L1 最早是作为 UPS 的一种去泛素化酶而被发现的。它能将多聚泛素链水解成游离的泛素单体,从而使泛素进一步的再循环利用。目前,主要认为 UCH-L1 有 3 种功能:去泛素化、连接泛素单体和底物<sup>[10]</sup>、稳定泛素单体<sup>[11]</sup>。特别是 UCH-L1 的第三个功能,即增加泛素单体的稳定性,对异常蛋白的清除及重要功能蛋白的降解有着十分重要的作用。UCH-L1 的 S18Y 多态性是指 UCH-L1 的 3 号外显子上存在 S18Y 的多态性,这种多态性分布存在种族性和地域性差别。曾有 Maraganore 等<sup>[12]</sup>的研究认为 S18Y 多态可能对某些老年退行性疾病具有一定的保护作用,例如能降低 PD 发病率。

在本研究中,CAA 组 YY 基因纯合型频率与对照组相比有增加,但差异无统计学意义;而 CAA 组 SY 基因杂合型频率和携带 Y 等位基因频率与对照组相比也有增加,差异有统计学意义。且 SY 基因型频率和携带 Y 等位基因频率也与 CAA 发病相对危险度呈正相关,说明 UCH-L1 基因的 S18Y 多态性的杂合子 SY 可能是 CAA 的遗传易感性基因型,Y 等位基因携带者也对 CAA 有较高的遗传易感性。而 YY 纯合基因型频率与对照组相比虽有增加,但差异无统计学意义,说明 UCH-L1 的 S18Y 多态性与 CAA 之间的关系与 Y 等位基因的量有关,间接印证了 YY 纯合基因型 UCH-L1 对异常蛋白 A $\beta$  的清除作用增强,可能对 CAA 具有一定的保护作用,可能降低 CAA 发病率。

综上所述,本实验研究了中国汉族人群 UCH-L1 基因 S18Y 多态性与脑淀粉样血管病的关系。由于本实验样本量较小以及单一位点研究,不能全方位了解 UCH-L1 基因 S18Y 多态性对 CAA 的影响,这是本研究的不足,将来可继续扩大样本,做进一步的研究。另外,鉴于 UCH-L1 基因在 UPS 系统中的重要功能,应该对该基因的其他可能位点和外显子多态位点大样本量联合分析,以分析其单倍型及与 CAA 的相关性,将更有可能揭示 UCH-L1 基因与 CAA 关系。

## 参考文献

- [1] Smith SD, Eskey CJ. Hemorrhagic stroke[J]. Radiol Chin North Am, 2011, 49(1): 27-45.
- [2] Giorgi FS, Bandettini di Poggio A, Battaglia G, et al. A short overview on the role of alpha-synuclein and proteasome in experimental models of Parkinson's disease[J]. J Ngural Transm Suppl, 2006(70): 105-109.
- [3] Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, et al. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene[J]. Ann Neurol, 2004, 55(4):

(上接第 2335 页)

- 法与化学发光微粒子免疫分析法检测广州地区儿童 HBsAg 结果分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(1): 45.
- [2] 王金良. 实用检验医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 783.
- [3] 刘锡光. 肝炎实验诊断指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 18.
- [4] 陈李双, 杨培华, 黄伟. 乙型肝炎表面抗原确认试验的临床应用探讨[J]. 现代医院, 2008, 8(2): 13.
- [5] 郭军芳, 储小勇. ELISA 法检测 HBsAg 影响结果因素的分析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2008, 6(7): 727-729.
- [6] 陈望荣, 邱林清. 中和试验在确认 HBsAg 弱反应性样本中的意义[J]. 现代医院, 2008, 8(5): 64.
- [7] 翟艳, 王卉. 化学发光免疫分析及其进展[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(4): 619-620.
- [8] 赵秀英, 陈俊梅, 辛永梅, 等. 不同方法检测乙型肝炎病毒血清标志物的差异[J]. 肝脏, 2008, 13(4): 303-305.
- [9] 王蕾, 刘华, 王雯静, 等. 中和确认试验对低水平 HBsAg 结果的确

512-521.

- [4] Greenberg SM, Rebeck GM, Vonsttedt JIG, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy[J]. Ann Neurol, 1995, 38(2): 254-259.
- [5] 王拥军. 神经病学实验室诊断技术[M]. 北京: 北京科学技术文献出版社, 1998: 8.
- [6] Silke M, Peter B, Juergen T, et al. The S18Y polymorphism in the UCHL1 gene is a genetic modifier in Huntington's disease[J]. Neurogenetics, 2006, 7(1): 27-30.
- [7] Buqiani O, Giaccone G, Rossi G, et al. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP[J]. Arch Neurol, 2010, 67(8): 987-995.
- [8] Arvanitakis Z, Leurgans SE, Wang Z, et al. Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons[J]. Ann Neurol, 2011, 69(2): 320-327.
- [9] Zhang HL, Linn J, Bruckmann H, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy[J]. Neurology, 2010, 74(17): 1346-1350.
- [10] Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, et al. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility[J]. Cell, 2002, 111(2): 209-218.
- [11] Osaka H, Wang YL, Takada K, et al. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(16): 1945-1958.
- [12] Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, et al. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene[J]. Ann Neurol, 2004, 55(4): 512-521.

(收稿日期: 2011-08-09)

认及其应用评价[J]. 检验医学, 2010, 25(1): 28-29.

- [10] Hou J, Wang I, Cheng J, et al. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in nonimmunized surface antigen negative Chinese carriers[J]. Hepatology, 2001, 34(5): 1027-1034.
- [11] Coursaget P, Yvonne B, Bourdil C, et al. HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus[J]. Lancet, 1987, 330(8572): 1354-1358.
- [12] 骆抗先. 乙型肝炎的基础与临床[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 221-223.
- [13] 易珍, 汤春园, 徐明辉, 等. 乙型肝炎表面抗原弱阳性结果探讨[J]. 应用预防医学, 2008, 14(3): 183.
- [14] 黄伟, 杨培华, 陈健, 等. 乙型肝炎病毒表面抗原确认试验的临床应用[J]. 检验医学, 2008, 23(2): 178.

(收稿日期: 2011-08-09)