

中国汉族人群 Toll 样受体 4 基因多态性与阿尔茨海默病相关性研究 *

刘晓红¹ 陈美蓉¹ 朱咏新¹ 周维智¹ 陈生弟² 王 刚² 乔金玲¹ 夏 菁¹ 陈金梅¹

(1 上海市普陀区人民医院神经内科 上海 200060 2 上海交通大学附属瑞金医院神经内科 上海 200025)

摘要 目的 探索中国汉族人群 Toll 样受体 4 基因 Asp299Gly 多态性与阿尔茨海默病(AD)相关性。方法 样本来源于 2010.01-2012.01 上海普陀区人民医院门诊及病房、瑞金医院、华山医院痴呆专科门诊就诊的 200 例 AD 患者(年龄在 45-85 岁之间)与同时期入组的患者配偶或体检中心 200 例健康对照(统计分析时有 10 例患者因故剔除),所有入组者为无血缘关系的中国汉族人。AD 诊断由神经科专科医生参照美国国立神经病学、语言交流障碍和卒中老年性痴呆和相关疾病学会工作小组(NINCDS-ADRDA)关于 AD 的诊断标准确定。所有入组者抽取随机静脉血 2 ml 血标本使用双脱氧链终止法进行 TLR4 基因 Asp299Gly 突变检测。实验前期随机抽取部分血样进行 TLR4 蛋白定量测定。因为使用双脱氧链终止法未检测到 TLR4 基因 Asp299Gly 突变型,在实验后期我们又使用连接酶检测反应法对其中 352 例样本进行 TLR4 基因 Asp299Gly 突变复测及 ApoE 等位基因型检测。结果 与对照组相比,AD 组外周血 TLR4 蛋白含量增高,其差异性具有统计学意义($P<0.05$)。基因检测结果显示 TLR4 基因 Asp299Gly 突变两组均为野生型 A,AD 组 ApoE $\epsilon 4$ 基因型频率(包含纯合子及杂合子)高达 35.90%,明显高于对照组(17.35%)。结论 AD 组外周血 TLR4 蛋白表达量增高提示 TLR4 与 AD 发病有一定相关性,但没有证据表明 TLR4 基因 Asp299Gly 突变与 AD 发病有相关性。

关键词 Toll 样受体 基因多态性 阿尔茨海默病 痴呆

中图分类号 R741.02 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)17-3244-05

Relationship between Toll-like Receptor 4 Single Nucleotide Polymorphisms and Alzheimer Disease in Chinese Han Population*

LIU Xiao-hong¹, CHEN Mei-rong¹, ZHU Yong-xin¹, ZHOU Wei-zhi¹, CHEN Sheng-di², WANG Gang²,

QIAO Jin-ling¹, XIA Jing¹, CHEN Jin-mei¹

(1 Department of Neurology, Shanghai Putuo District People's Hospital, 200060 Shanghai, China;

2 Department of Neurology, Ruijin Hospital Affiliated Shanghai Jiaotong University, 200025 Shanghai, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationship between Toll-like Receptor 4 single nucleotide polymorphisms and Alzheimer disease in the Chinese Han population. **Methods:** There were 200 AD patients (aged 45 to 85 years) and 200 health controls (aged 45 to 85 years) enrolled from January 2010 to January 2012. The patients were consecutively recruited from the outpatient and inpatient department in Shanghai Putuo District People's Hospital, Clinic for dementia in Huashan Hospital and Ruijin Hospital. The health volunteers were recruited from spouses of the patients and the general physical examination population. All the enrolled subjects had no blood relationship. AD diagnosis were verified by an experienced neurological specialist according to the NINCDS-ADRDA criteria. 2 ml peripheral blood was taken from all the subjects for TLR4-Asp299Gly mutation test by the dideoxy chain termination method. Meanwhile, TLR4 protein quantitative determination was finished for some random samples in both two groups at the early stage of the experiment. Additionally, in the later stage of experiment, 352 of the samples were retested for TLR4-Asp299Gly mutation through Polymerase Chain Reaction-Ligase Detection Reaction (PCR-LDR) method and the ApoE genotype was detected through Snapshot method since the TLR4-Asp299Gly mutation had been not detected through dideoxy chain termination method. **Results:** The content of TLR4 protein is higher in the AD group than that in the control group, and the difference is statistically significant ($P<0.05$). Asp299Gly mutation test result shows that the two groups of the samples are wild genotype A without mutation of G, and the frequency (including homozygous and heterozygous) of ApoE $\epsilon 4$ genotype is significantly higher in the AD group with 35.9%, which is much higher than that of the control group (17.35%). **Conclusions:** In contrast to the control group, the higher expression of TLR4 in peripheral blood of AD group indicates that TLR4 plays a role in AD process, but evidence on correlation between Asp299Gly mutation of TLR4 gene and the incidence of AD is not observed.

Key words: Toll-like receptor; Gene polymorphisms; Alzheimer disease; Dementia

Chinese Library Classification(CLC): R741.02 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)17-3244-05

* 基金项目:上海市普陀区卫生系统自主创新科研资助重点项(PTKW 09-B01)

作者简介:刘晓红(1971-),女,硕士研究生,副主任医师,研究方向:痴呆与脑血管疾病, E-mail: lxhhome12@hotmail.com

(收稿日期:2012-03-16 接受日期:2012-04-13)

前言

1996 年 Lamaitre 等人首次观察到与果蝇发育有关的 Toll 样受体蛋白控制了成年果蝇抗真菌感染的免疫反应^[1]。随后,在人类、小鼠分别发现了 11 和 13 种 TLRs,其中 TLR4 是 TLRs 家族最主要的成员之一,属于 I 型跨膜蛋白受体,由胞质区、跨膜区和胞外区组成,主要与外源性脂多糖(LPS)结合介导 LPS 信号转导通路,参与炎症反应^[2]。人类 TLR4 基因位于染色体 9q33.1 位置(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>),其第三外显子 Asp299Gly 突变(位于 rs4986790 位点)可改变 TLR4 的细胞外结构,从而导致 LPS 信号转导减弱,影响热休克蛋白、硫酸乙酰肝素、透明质酸片段、高迁移率蛋白 1 等多种因素参与的感染或非感染性炎症免疫应答^[3,4]。

阿尔茨海默病(AD)是以神经元缺失、A β 淀粉样沉积、神经胶质细胞活化与神经原纤维缠结为特点的一种中枢神经系统的退行性疾病,其病因目前尚无定论,但中枢神经系统免疫炎症反应在其病程中的作用已得到多数学者的认可,而 TLR4 信号转导通路介导的内在免疫炎症反应在其中发挥了重要作用^[5-10]。已有意大利学者发现 TLR4 基因 Asp299Gly 突变可致神经炎症反应减弱,减少痴呆发病率^[11,12],国内目前尚无类似报道。我们通过观察 AD 患者外周血 TLR4 表达量的差异以及使用两种基因测序方法对 TLR4 基因 Asp299Gly 突变进行检测从而比较病例组和健康对照组突变阳性率,由此探讨该基因在中国汉族人群中的 Asp299Gly 突变情况,希望能对探索 TLR4 基因 Asp299Gly 突变在 AD 中发病的作用提供线索。

1 材料与方法

1.1 研究对象

样本来源于 2010.01-2012.01 上海普陀区人民医院神经内科门诊及病房、上海交通大学附属瑞金医院、上海复旦大学附属华山医院痴呆专病门诊就诊的 AD 患者(年龄在 45-85 岁之间)与同时期入组的健康的患者配偶或体检中心体检者。入组者均为中国汉族人,无血缘关系。调查经过本人和(或者)其监护人同意。入组患者均完成个人资料填写(现病史、既往史、家族遗传病史、吸烟史、职业史),进行体格检查,完成 MMSE 等量表评估、头颅 CT/MRI 检查及临床常规血生化检查。入组者抽取随机静脉血 2 ml,其中每组随机抽取 26 例样本即刻使用流式细胞仪进行 TLR4 蛋白定量测定分析,余血样本放入 4℃ 冰箱保存备用,再进行 DNA 抽提及扩增。

1.1.1 入组标准 (1)AD 组入组标准:年龄 45-85 岁之间,男性或绝经后的女性,Hachinski 缺血指数(HIS)<4 分;符合美国国立神经病学、语言交流障碍和卒中老年性痴呆和相关疾病学会工作小组(NINCDS-ADRDA)关于 AD 的诊断标准。(2)对照组入组标准:年龄 45-85 岁之间,男性或绝经后的女性,认知功能正常的健康者,无神经精神科疾病史,无卒中史及痴呆家族史。

1.1.2 排除标准 局限性脑病、脑外伤(伴有意识丧失);严重精神病、酒精或药物滥用者;有严重心、肝、肾、肺功能不全者,或伴有血液系统疾病者、慢性结缔组织疾病、缺乏理解、依从性差者,已经确诊为癌症的患者。

1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂 DNA 提取主要试剂 通用基因组小量抽提试剂盒“Cell Lysis Solution, Precipitation Solution, 1.2 mol/L NaCl, RNaseA, ProteinaseK, TE Buffer(PH8.0)”(上海生工生物工程有限公司);无水乙醇(上海彤晟化工科技有限公司),氯仿(上海化学试剂公司)。

PCR 主要试剂(均为上海生工生物工程有限公司):石蜡油、Taq DNA Polymerase(5 U/ μ l) 高温聚合酶、10 \times PCR Buffer、10 mM dNTP、上、下游引物、MgCl₂(25 mM)。

电泳主要试剂 琼脂糖(上海生工生物工程有限公司),Ultra Low Range DNA Ladder (Fermentas) 6 \times Loading Buffer (宝生物工程(大连)有限公司)。

1.2.2 实验设备及方法 流式细胞仪 (Becton Dickinson FACS Calibur USA) 测定外周血 TLR4 含量 (2)Bio-Ran 公司 PCR 扩增仪进行 DNA 扩增 (3)上海博尚生物技术有限公司提供 TLR4 基因双脱氧链终止法测序服务。上海捷瑞生物有限公司提供 TLR4 连接酶检测反应法检测 Asp299Gly 突变(rs4986790 位点)及使用 Snapshot 法进行 ApoE 等位基因型分析服务,测序仪型号为 ABI 3730XL。

1.3 统计方法

利用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析。等位基因和基因型频率估计计数,并用卡方检验进行 Hardy-Weinberg 平衡。病例组和对照组基线资料、Asp299Gly 突变阳性率、ApoE 等位基因型分布用卡方检验进行了比较,其结果进行了 Bonferroni 校正,以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

2 结果

2.1 基线资料情况

AD 组样本 194 例,其中男 87 例,女 107 例,年龄平均 72.44 ± 8.23 岁(52~85 岁),MMSE 平均 16.93 ± 6.06 分。对照组 196 例,其中男 85 例,女 89 例。年龄 50~85 岁,平均年龄 70.48 ± 8.94 岁,平均 MMSE 总分 26.60 ± 3.19 。AD 组与对照组之间性别、年龄差异显著性无统计学意义(P 值分别为 0.443, 0.086)。AD 组的平均 MMSE 分数明显低于对照组,差异显著性有统计学意义(P 值 0.000),提示 AD 患者的总体认知功能较正常健康对照下降(见表 1)。

2.2 外周血 TLR4 蛋白定量测定结果

与对照组相比较,AD 组外周血单核细胞膜表达 TLR4 蛋白的平均荧光强度增高($87.58 \pm 7.89\%$ VS $79.318 \pm 9.54\%$),且这种差异显著性有统计学意义($P < 0.05$),这提示 AD 组患者外周血的 TLR4 含量较正常对照组高,外周血中 TLR4 蛋白含量与 AD 有一定的相关性。

2.3 基因检测结果

2.3.1 TLR4-Asp299Gly 突变结果 AD 组与对照组共 400 例 DNA 样本使用双脱氧链终止法(dideoxy chain termination),采用下游引物完成 DNA 测序,结果提示两组样本 TLR4-Asp299Gly 位点均为野生型 A,未见突变型 G,即突变的阳性率为 0%(随机摘录其中一份目的基因片段序列及图谱如图 1 所示,两组突变阳性率比较见表 2)。两组共有 10 例标本因故在分析时予剔除(见表 1 注释)。实验后期抽取 352 份样本使用连接酶检测反应法(PCR-LDR)复测仍未检出

TLR4-Asp299Gly 突变型,均为野生型 A(见图 2)(见表 2)。

表 1 两组基础人口学资料情况对比

Table 1 Comparison of the basic demography data of the two groups

| 组别 Group | 总数 Total | 性别(男 / 女) Sex(male/female) | 年龄(岁) Age(Mean± SD) | MMSE 得分 MMSE score(Mean± SD) |
|------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| AD 组 (AD group) | 194 ^a | 87/107 | 72.44± 8.230 | 16.93± 6.061* |
| 对照组 (Control group) | 196 ^b | 96/100 | 70.48± 8.936 | 26.60± 3.186 |

注 a、b 随访有 6 例患者各查出肝癌、膀胱癌、前列腺癌、甲状腺瘤、血小板增多症(原因不明) ,肺内占位(肺癌可能) ,4 例对照组转化为轻度认知功能减退(MCI) ,在统计分析时予剔除。* AD 与对照组比较 P<0.01。

Note: a, b means that 10 cases were excluded when statistic analysis because of 6 AD patients identified with liver cancer, bladder cancer, prostate cancer, thyroid tumor, platelet increasing disease (for reasons unknown), and neoplasm in the lungs (cancer probably) separately, and 4 cases of the control group defined as Mild Cognitive Impairment at follow-up. *AD group compares to control group P<0.01.

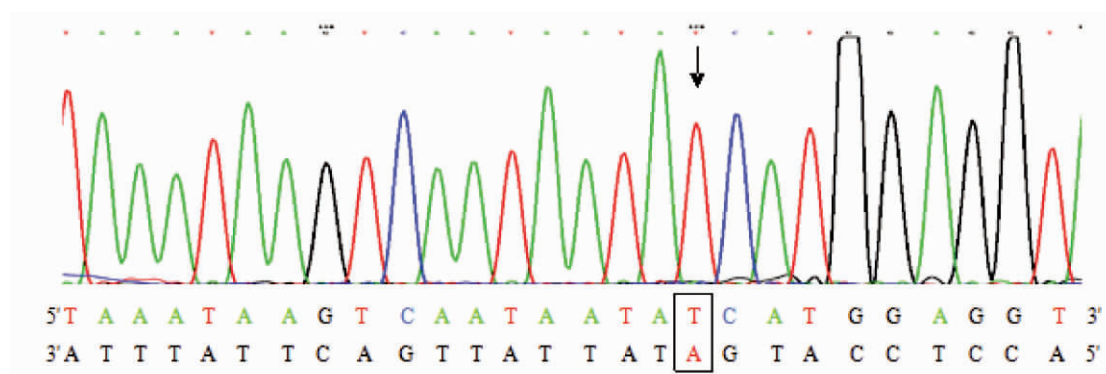


图 1 TLR4-Asp299Gly 检测结果图谱(双脱氧链终止法)

Fig.1 Spectrum of TLR4-Asp299Gly mutation test by dideoxy chain termination method

注 箭头所指为 ASP299GIY 基因突变位点

Note: The position arrow symbol pointed out means the mutation position

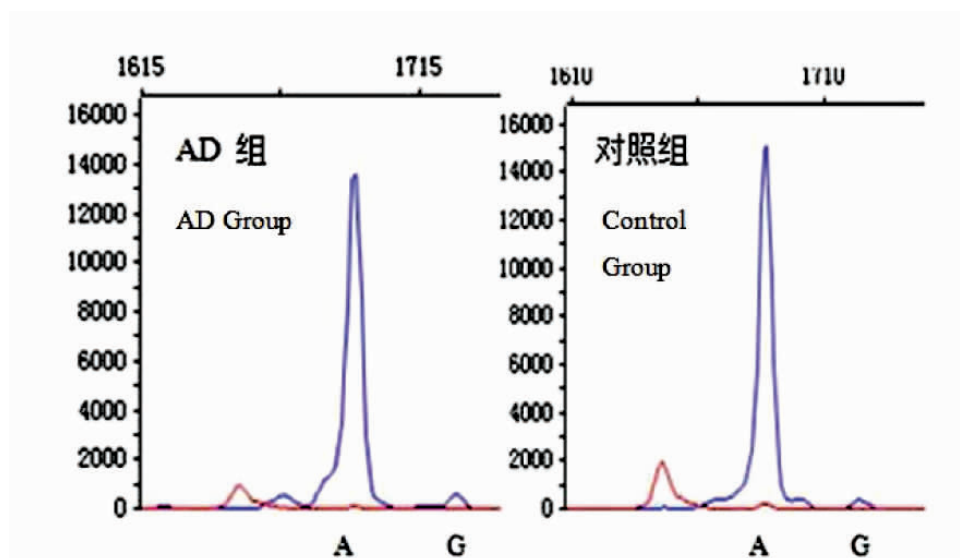


图 2 TLR4-Asp299Gly 检测结果图谱(PCR-LDR 法)

Fig.2 Spectrum of TLR4-Asp299Gly mutation test by PCR-LDR method

注 :只有 A 的位置有峰为 A 纯合 A 和 G 的位置都有峰为 AG 杂合 ,只有 G 的位置有峰为 G 纯合。

Note :The genotype would be defined as A homozygote if the peak only appears at the A position and G homozygote if the peak only appears at the A position. A/G heterozygote would be defined if the peak only appears at both of A and G positions

表 2 两种方法测定 AD 和对照组 DNA 标本 TLR4 基因 Asp299Gly 突变阳性率比较

Table 2 Comparisons of positive rate of TLR4 Asp299Gly mutation between AD and control group tested by two methods

| 检测方法 Test method | 总例数 Total cases(n) | AD 组阳性率(%) Positive rate in AD(%) | 对照组阳性率(%) Positive rate in control(%) |
|----------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|
| 双脱氧链终止法 (Dideoxy chain termination) | 390 | 0 | 0 |
| 连接酶检测反应法 (PCR-LDR) | 352 | 0 | 0 |

2.3.2 ApoE 等位基因型分析结果 352 例 DNA 样本使用 Snapshot 法检测 ApoE 等位基因多态性, 结果提示 AD 组 ApoE ϵ 4 频率高达 56 % (包含 ϵ 4 杂合子及纯合子: ϵ 2 ϵ 4, ϵ 3 ϵ 4, ϵ 4 ϵ 4) 较对照组 (17.35 %) 明显升高, 差异显著性具有统计

学意义 ($P=0.000$)。AD 组 ApoE ϵ 3 分布频率 (91.03 %) 较对照组低 (96.94 %), 差异显著性有统计学意义 ($P=0.017$)。ApoE 等位基因检测结果与文献类似, 健康人群中以携带 ApoE ϵ 3 为常见, 同时也提示本实验方法的准确性 (见表 3)。

表 3 AD 组与对照组 ApoE 等位基因型分布比较

Table 3 Comparisons of the genotype frequency of the AD group and control group

| 基因型 Genotype | 组别 Group | |
|-------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| | AD 组 频数(频率%) Frequency of genotype in AD Cases n(%) | 对照组 频数(频率%) Frequency of genotype in control Cases n(%) |
| ApoE ϵ 4(+)** | 56(35.90) | 34(17.35) |
| ApoE ϵ 4(-) | 100(64.10) | 162(82.65) |
| ApoE ϵ 3(+)*** | 142(91.03) | 190(96.94) |
| ApoE ϵ 3(-) | 14(8.97) | 6(3.06) |

注: ** 包含 ϵ 4 杂合型及纯合型, *** 包含 ϵ 3 杂合型及纯合型。

Note: ** Including ϵ 4 homozygous and heterozygous genotype. *** Including ϵ 3 homozygous and heterozygous genotype.

3 讨论

通过该研究, 我们发现 TLR4 蛋白在 AD 患者外周血中表达增多, 这提示 TLR4 与 AD 发病有一定相关性, 但 TLR4-Asp299Gly 基因多态性在中国汉族人群中阳性率极低, 该研究所检测样本均为野生型, 它是否影响 AD 的发病率及如何参与 AD 发病机制, 还需要进一步探讨。

TLR4 最突出的生物学功能是促进细胞因子合成和释放, 介导细胞炎症反应, 在体内多个组织、器官表达, 基因突变可影响其结构功能及表达。有学者对已故 AD 患者进行尸解发现患者大脑中受损的神经元及淀粉样斑块沉积周围含有大量神经小胶质细胞, 另有研究发现 AD 模型小鼠的大脑神经细胞膜表面呈 TLR4 高表达状态, 这都提示神经小胶质细胞在 AD 发病中发挥了作用。神经小胶质细胞主要是通过 TLR4 信号转导通路介导的内在免疫炎症反应参与 AD 的疾病进程。众所周知, A β 沉积是 AD 特征性病理改变之一, 它可以激活小胶质细胞从而影响 AD 病程^[13]。一方面, 少量激活的小胶质细胞可通过 TLR4 介导清除 A β 沉积从而保护受损的神经元。另一方面, 过度小胶质细胞激活可通过分泌各种炎症因子及细胞毒性物质直接导致神经元受损、凋亡^[12]。有研究发现 TLR4 基因敲除鼠其脑组织中呈现大量 A β 沉积, TLR4 基因 Asp299Gly 突变亦可导致 TLR4 信号转导通路介导的炎症反应受抑制或减弱^[14], 有可能因此干预 AD 发生发展。若能从基因病因学上有所突破,

那么被戴上“绝症之帽”的 AD 患者有可能从基因诊断治疗上获益。当然, 也不是所有的研究均提示 TLR4 基因突变可以减弱炎症反应^[15]。本研究实验早期随机抽取的病例与对照进行 TLR4 蛋白定量测定提示 AD 组外周血 TLR4 含量明显高于对照组, 这提示 TLR4 表达增多与 AD 发病有一定相关性 (另有发表文章)。但由于本实验排除试验方法误差以后, 发现 AD 组与对照组 TLR4 基因均为 Asp299Gly 野生型, 并不能解释该基因位点突变如何影响 TLR4 蛋白结构功能改变及表达。

目前已发现有些基因 (A β PP、PSEN1、PSEN2) 对于家族性 AD 发病起显著作用, 对于散发性 AD 患者, 仅 ApoE- ϵ 4 被认为是独立危险因素, 并得到较多研究者的认可^[16], 且其遗传性也可高达 60-80 %^[17]。本研究的结果亦提示 ApoE- ϵ 4 在 AD 组阳性率显著高于对照组, 与国内其他研究结果一致^[18]。Minor-etti P 首先报道了 TLR4 基因单核苷酸多态性 (Asp299Gly) 影响了迟发型 AD (LOAD) 的发病率, LOAD 组 Asp299Gly 突变的频率明显低于对照组 (5.4 % VS 13.0 %, $P=0.002$), 提示该突变对 AD 发病的可能起保护作用。随后 Balistreri CR 等人的研究亦得出类似结果^[11,12]。但是我们的研究中无论是 AD 组还是对照组均未发现 TLR4 基因 Asp299Gly 突变型, 提示在中国汉族人群中 TLR4 基因 Asp299Gly 突变阳性率可能极低, 且 AD 的发病不一定受 TLR4 基因 Asp299Gly 突变的影响, 而可能是受其他位点的单核苷酸多态性影响。最近国内有研究报道 TLR4 基因多个单核苷酸多态性 (rs10759930, rs1927914, rs1927911,

rs12377632, rs2149356, rs7037117, rs7045953)降低 LOAD 的发病率,但并没有提及 rs4986790 位点多态性情况^[19]。在此之前,有多个研究显示亚洲人未见突变型阳性报道,与本研究实验结果一致。此外,我们将中国汉族与其他种族的 TLR4 基因 Asp299Gly 突变情况做比较,发现在不同人群中,该等位基因频率及基因型频率的分布有差异,我国研究的人群^[20,21]与新加坡、韩国、日本人等东亚人群相似^[22,23],均未检测到 TLR4 基因 Asp299Gly 突变,德国人 TLR4 基因 Asp299Gly 突变频率为 5.6%,意大利健康人群突变频率为 7.2 %^[11],印度尼西亚研究提示 5/201(2.5 %)病例(登革热患者)与 4/179(2.2 %)健康对照的突变率无显著差异^[24]。由此可以看出 TLR4 基因 Asp299Gly 突变频率的差异性主要与种族相关。

4 结论

在中国汉族人群中,外周血 TLR4 蛋白表达量与 AD 发病有一定的相关性,但没有证据表明 TLR4 基因 Asp299Gly 突变与中国汉族人群 AD 发病率有相关性。不同种族人群 TLR4 基因 Asp299Gly 突变频率存在差异,中国汉族人群 TLR4 基因可能通过其他位点突变影响 AD 的发病率。

参考文献(References)

- [1] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults[J]. *Cell*, 1996, 86(6): 973-983
- [2] 何晓霞,白海. Toll 样受体的研究进展[J]. 西北国防医学杂志, 2010, 31(6): 445-446
He Xiao-xia, Bai Hai. Advances on research of Toll-like receptors[J]. *Medical Journal of National Defending Forces In Northwest China*, 2010, 31(6): 445-446
- [3] 陈亚巍, 谢晓华. 与免疫相关的 Toll 样受体 4 识别内源性配体的研究进展[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(12): 1291-1293
Chen Ya-wei, Xie Xiao-hua. Advances in research of immune-related Toll-like receptor 4 recognizing endogenous ligands [J]. *Chinese PLA Postgrad Med Sch*, 2011, 32(12): 1291-1293
- [4] Mucha R, Bhide MR, Chakurkar EB, et al. Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* sub sp. paratuberculosis infection in cattle[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 128(4): 381-388
- [5] McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies [J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(5): 639-647
- [6] Braak H, de Vos RA, Jansen EN, et al. Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. *Prog Brain Res*, 1998, 117: 267-285
- [7] Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, et al. The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain[J]. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2006, 8(6): re1
- [8] Solito E, Sastre M. Microglia function in Alzheimer's disease[J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 14. doi: 10.3389/fphar.2012.00014
- [9] Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS[J]. *J Neurosci*, 2008, 28 (10): 2320-2331
- [10] Walter S, Letiembre M, Liu Y, et al. Role of the Toll-Like Receptor 4 in Neuroinflammation in Alzheimer's Disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2007, 20(6): 947-956
- [11] Minoretti P, Gazzaruso C, Vito CD, et al. Effect of functional toll like receptor 4 Asp299Gly polymorphism on susceptibility to late-onset Alzheimer's disease[J]. *Neuroscience Letters*, 2006, 391(3): 147-149
- [12] Balistreri CR, Grimaldi MP, Chiappelli M, et al. Association between the polymorphisms of TLR4 and CD14 genes and Alzheimer's disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(26): 2672-2677
- [13] Lee CY, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain[J]. *Neural Transm*, 2010, 117(8): 949-960
- [14] Reismann P, Lichy C, Rudofsky G, et al. Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia [J]. *Neurol*, 2004, 251(7): 853-858
- [15] Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms [J]. *Mol Med*, 2008, 14(5-6): 346-352
- [16] Farrer LA, Cupple LA, Haines JL, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease. A meta-analysis. ApoE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium[J]. *Am Med Assoc*, 1997, 278(16): 1349-1356
- [17] Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer's disease [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2006, 63(2): 168-174
- [18] 吴平, 郭起浩, 陈芙蓉, 等. 载脂蛋白 E 基因多态性与早发性阿尔茨海默病的相关性[J]. 中国临床神经科学, 2009, 17(3): 261-266
Wu Ping, Guo Qi-hao, Chen Mei-rong, et al. Relationship Between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Early-onset Alzheimer's Disease [J]. *Chinese Journal of Clinical Neurosciences*, 2009, 17(3): 261-266
- [19] Yu JT, Miao D, Cui WZ, et al. Common variants in toll-like receptor 4 confer susceptibility to Alzheimer's disease in a Han Chinese population[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2012, 9(4): 458-466
- [20] Yuan M, Xia J, Ma L, et al. Lack of the Toll-Like Receptor 4 Gene Polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in a Chinese Population [J]. *Int J Neurosci*, 2010, 120(6): 415-420
- [21] Hang J, Zhou W, Zhang H, et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms are very rare in the Chinese population[J]. *Endotoxin Res*, 2004, 10(4): 238-240
- [22] Kim YS, Hwang YJ, Kim SY, et al. Rarity of TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in the Korean population [J]. *Yonsei Med*, 2008, 49(1): 58-62
- [23] Liang XH, Cheung W, Heng CK, et al. Absence of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in Singaporean Chinese[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2005, 1(3): 243-246
- [24] Djamiatun K, Ferwerda B, Netea MG, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms in dengue virus-infected children[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 85(2): 352-354