

MTHFR 基因多态性与脊髓亚急性联合变性的相关性分析

陈静非, 徐志昊, 高媛雪, 李建刚, 鱼海, 张建军, 侯瑞华

(宝鸡市中心医院神经内科, 陕西宝鸡 721000)

摘要: 目的 探讨 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 基因 C677T 位点和 A1298C 位点多态性与脊髓亚急性联合变性 (SCD) 的关系。方法 选择 2017 年 1 月~2020 年 7 月于宝鸡市中心医院神经内科诊治的 85 例 SCD 患者作为病例组, 另外募集 100 例健康体检者作为对照组。采用荧光定量 PCR 法检测 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 位点多态性, 比较各组两位点基因型和等位基因频率, 分析两位点多态性与 SCD 发病的相关性。结果 病例组 C677T 位点 TT 基因型和 T 等位基因频率均高于对照组 ($\chi^2=10.527$, 11.144, 均 $P < 0.05$), A1298C 位点 CC 基因型和 C 等位基因频率均高于对照组 ($\chi^2=6.575$, 6.076, 均 $P < 0.05$), 差异均有统计学意义。C677T 位点和 A1298C 位点基因多态性均与同型半胱氨酸水平增高密切相关 ($\chi^2=19.625$, 10.786, 均 $P < 0.05$); 与血清 VitB12 和叶酸水平均无明确相关性 ($\chi^2=1.827\sim 5.549$, 均 $P > 0.05$)。多因素分析示携带 C677T 位点 TT 基因型是 SCD 发病的独立危险因素 (OR=2.768, 95% CI: 1.487~5.516, $P=0.005$), A1298C 位点基因多态性与 SCD 发病无明确相关性 (OR=2.190, 95% CI: 0.958~5.004, $P=0.067$)。结论 MTHFR 基因 C677T 位点突变与 SCD 发病密切相关。

关键词: 脊髓亚急性联合变性; 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性

中图分类号: R744.6; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 04-064-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.014

Correlation between 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism and Subacute Combined Degeneration

CHEN Jing-fei, XU Zhi-hao, GAO Yuan-xue, LI Jian-gang, YU Hai, ZHANG Jian-jun, HOU Rui-hua

(Department of Neurology, Baoji Central Hospital, Shaanxi Baoji 721000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genetic association between the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T and A1298C polymorphism and subacute combined degeneration (SCD) in the Han descent population in the Shaanxi Province. **Methods** 85 patients with SCD treated in the Department of Neurology of Baoji Central Hospital from January 2017 to July 2020 were included in the study as the case group, and another 100 healthy subjects were recruited as the control group. The genotype was determined by fluorogenic quantitative PCR for the MTHFR gene C677T and A1298C polymorphism. The genotype and allele frequencies of the two loci in each group were compared to analyze the correlation between the polymorphism of MTHFR gene polymorphism and the incidence of SCD. **Results** The TT genotype and T allele frequencies of C677T in the case group were higher than those of the control group ($\chi^2=10.527$, 11.144, all $P < 0.05$), A1298C CC genotype and C allele frequency were higher than those of the control group ($\chi^2=6.575$, 6.076, all $P < 0.05$), the differences were statistic significant, respectively. Polymorphisms at both C677T and A1298C were closely associated with increased homocysteine levels ($\chi^2=19.625$, 10.786, all $P < 0.05$). There was no clear correlation with serum VitB12 and folic acid levels ($\chi^2=1.827\sim 5.549$, all $P > 0.05$). Multivariate analysis showed that C677T TT genotype was risk factor of SCD (OR=2.768, 95% CI: 1.487~5.516, $P=0.005$). There was no association between the A1298C gene polymorphism and susceptibility of SCD (OR=2.190, 95% CI: 0.958~5.004, $P=0.067$). **Conclusion** Polymorphism of MTHFR (C677T) associate with the susceptibility of SCD.

Keywords: subacute combined degeneration; 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; gene polymorphism

脊髓亚急性联合变性 (subacute combined degeneration, SCD) 是一种主要累及脊髓侧索和锥体束的神经系统变性疾病, 临床上多表现为双下肢深感觉缺失、感觉性共济失调、痉挛性瘫痪

作者简介: 陈静非 (1987-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 脑血管病, E-mail: baijichenjf87@163.com。

通讯作者: 徐志昊 (1988-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 神经病学, E-mail: baojixuzhihao88@163.com。

及周围性神经病变。长期以来,维生素 B12 (vitamin B12, VitB12) 缺乏被认为是本病最主要的致病原因,其机制在于 VitB12 参与神经系统甲基化过程,可影响髓磷脂合成,长期缺乏会导致神经脱髓鞘及轴索变性改变^[1-2]。但是,临床工作中常发现部分 SCD 患者无确切 VitB12 缺乏证据,提示可能还存在其他潜在致病原因。有研究发现 SCD 患者血清同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平显著升高^[3],而 Hcy 水平过高可反馈性抑制甲基化过程^[4]。5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 是叶酸代谢通路的关键酶之一,为 Hcy 提供甲基形成甲硫氨酸。近年来,相继有研究发现 MTHFR 基因存在多个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点可影响 MTHFR 正常生理功能,进而影响机体 Hcy 表达和代谢^[5-8]。本研究将观察 SCD 患者血清 VitB12、叶酸、Hcy 和 MTHFR 基因多态性的关系,旨在探讨 MTHFR 基因多态性与 SCD 发病的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 连续性选择 2017 年 1 月 ~ 2020 年 7 月于宝鸡市中心医院神经内科诊治的 85 例 SCD 患者作为病例组,其中男性 49 例,女性 36 例,平均年龄 56.77 ± 10.82 岁。纳入标准:①年龄 ≥ 18 岁;② SCD 诊断参考 HEMMER 等^[9]提出的诊断标准。排除标准:①血清检测前 3 月内应用过 VitB12 和 (或) 叶酸治疗;②并发严重肝肾功能障碍、恶性肿瘤等;③妊娠期妇女。选择同期于我院体检的健康志愿者 100 例作为对照组,其中男性 55 例,女性 45 例,平均年龄 57.03 ± 9.66 岁,对照组成员均接受详细问诊排除脊髓疾病可能。病例组和对照组性别、年龄差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 7900 HT 型荧光定量 PCR 仪 (美

国 ABI 公司), UniceL Dx1 800 Access 免疫分析系统 (美国 Beckman Coulter 有限公司), 日立 7170A 分析仪 (日本日立有限公司), VitB12 及叶酸检测试剂盒 (美国贝克曼库尔特有限公司), Hcy 检测试剂盒 (北京康思润业生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因多态性检测: 本研究采用荧光定量 PCR 法检测 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 位点多态性。引物均购至生工生物工程 (上海) 股份有限公司, C677T 位点上游引物: 5'-GAA AAGCTGCGTGATGATG-3'; 下游引物: 5'-TTGA AGGAGAAGGTGTC-3'。A1298C 位点上游引物: 5'-AAGAACGAAGACTTCAAA-3'; 下游引物: 5'-TGGGGGGAGGAGCTGAC-3'。将 PCR 扩增产物移至荧光定量 PCR 仪上读取样品孔中的终点荧光, 利用分析软件确定各样本的基因型结果。

1.3.2 血清 VitB12、叶酸和 Hcy 水平检测: 所有研究对象在接受 VitB12 治疗之前空腹采集 5ml 静脉血, 3 000 r/min, 离心 5 min。血清 VitB12 和叶酸均按化学发光免疫法进行检测; 血清 Hcy 则按循环酶法进行检测。本研究定义血清 VitB12 浓度 $< 180 \text{ pg/ml}$ 为 VitB12 缺乏、血清叶酸浓度 $< 3.1 \text{ ng/ml}$ 为叶酸缺乏、血清 Hcy 浓度 $> 15 \mu \text{ mol/L}$ 为高 Hcy。

1.4 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计软件分析处理, 计数资料结果以构成百分比表示, 组间比较采用 χ^2 检验。基因型分布采用 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。多因素分析采用二元 Logistic 回归分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般临床资料比较 见表 1。病例组贫血、VitB12 缺乏和高 Hcy 发生率均高于对照组, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。

表 1 两组基线资料比较 [n(%)]

项目	病例组 (n=85)	对照组 (n=100)	χ^2	P
贫血	43(50.59)	7(7.00)	44.261	0.000
萎缩性胃炎	35(41.18)	33(33.00)	1.321	0.250
VitB12 缺乏	60(70.59)	24(24.00)	40.229	0.000
叶酸缺乏	6(7.06)	5(5.00)	0.348	0.555
高 Hcy	68(80.00)	22(22.00)	61.870	0.000

2.2 两组 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 位点基因型和等位基因分布频率比较 见表 2。研究对象 C677T 和 A1298C 位点上的基因型和等位基因分布

频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 (均 $P > 0.05$), 具有群体代表性。两组 C677T 和 A1298C 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)。

表2 两组 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 位点基因型分布和等位基因频率比较 [n(%)]

SNPs	病例组 (n=85)	对照组 (n=100)	χ^2	P
C677T CC	8(9.41)	23(23.00)	10.527	0.000
CT	35(41.18)	48(48.00)		
TT	42(49.41)	29(29.00)		
C	51(30.00)	94(47.00)	11.144	0.001
T	119(70.00)	106(53.00)		
A1298C AA	43(50.59)	65(65.00)	6.575	0.037
AC	31(36.47)	31(31.00)		
CC	11(12.94)	4(4.00)		
A	117(68.82)	161(80.50)	6.706	0.010
C	53(31.18)	39(19.50)		

2.3 两位点不同基因型与血清 VitB12, 叶酸和 Hcy 水平的关系 见表3, 表4。MTHFR 基因 C677T 位点和 A1298C 位点不同基因型人群

VitB12 缺乏和叶酸缺乏发生率差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) ; 两位点不同基因型人群高 Hcy 发生率差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$) 。

表3 C677T 位点不同基因型与血清 VitB12, 叶酸和 Hcy 水平的关系 [n(%)]

项目	CC(n=31)	CT(n=83)	TT(n=71)	χ^2	P
VitB12 缺乏	11(35.48)	34(40.96)	39(54.93)	4.490	0.106
叶酸缺乏	0	5(6.02)	6(8.45)	2.757	0.252
高 Hcy	4(12.90)	44(53.01)	42(59.15)	19.625	0.000

表4 A1298C 位点不同基因型与血清 VitB12, 叶酸和 Hcy 水平的关系 [n(%)]

项目	AA(n=108)	AC(n=62)	CC(n=15)	χ^2	P
VitB12 缺乏	42(38.89)	32(51.61)	10(66.67)	5.549	0.062
叶酸缺乏	5(4.63)	4(6.45)	2(13.33)	1.827	0.401
高 Hcy	43(39.81)	35(56.45)	12(80.00)	10.786	0.000

2.4 多因素分析 见表4。采用二元 Logistics 回归法分析 SCD 发病的独立危险因素, 以单因素分析 $P < 0.05$ 的参数为自变量, 包括贫血、VitB12 缺乏、高 Hcy, C677T 位点 TT 基因型和 A1298C 位点 CC 基因型, 但由于 Hcy 升高是 MTHFR 基因突变的直接结果, 故从自变量中剔除; 以 SCD 发病为因变量,

结果显示携带 C677T 位点 TT 基因型是 SCD 发病的独立危险因素 (OR=2.768, 95% CI: 1.487~5.516, $P=0.005$) , A1298C 位点基因多态性与 SCD 发病无明确相关性 (OR=2.190, 95% CI: 0.958~5.004, $P=0.067$) 。

表4 SCD 易感性的多因素分析

变量	B	S.E	Wals	OR	95%CI	P
贫血	0.354	0.332	1.138	1.425	0.73~32.729	0.157
VitB12 缺乏	1.117	0.329	11.571	3.005	1.604~5.820	0.001
C677T TT 基因型	1.018	0.317	10.302	2.768	1.487~5.156	0.005
A1298C CC 基因型	0.784	0.422	3.454	2.190	0.958~5.004	0.067

3 讨论

目前, 多数研究一致认为早期诊断和及时治疗是改善 SCD 预后的关键因素, 一般在发病的前三

个月内经积极治疗和康复锻炼, SCD 患者预后相对较好, 部分患者甚至可达到完全恢复, 而当进展到病程后期时, 即使给予相应治疗, 仍然疗效欠

佳,多数患者可能遗留的部分神经功能障碍不能恢复^[10]。因此,对可疑SCD患者在发病早期及时筛查和治疗对患者预后具有重要临床意义。长期以来,VitB12缺乏仍是SCD最为公认的假说之一,本研究结果同样显示病例组患者血清VitB12平均水平显著低于对照组。但临床中经常出现部分SCD患者无确切VitB12缺乏证据,甚至因此贻误诊治时机,影响患者预后。因此,继续深入探讨该病发病机制和分子遗传学背景具有重要的临床价值。

近年来,多个研究结果表明高Hcy可能与SCD发病相关,其机制尚未明确,可能在于Hcy过多蓄积会反馈性抑制机体甲基化反应,继而导致核酸代谢和髓鞘合成受损^[3-4,10]。MTHFR是参与Hcy转化为蛋氨酸的关键酶,其在DNA合成和甲基化过程中也起着重要作用^[13]。C677T(rs1801133)和A1298C(rs1801131)是MTHFR基因最常见的SNP位点,研究显示携带突变基因个体的MTHFR酶活性可明显降低。因此,研究认为C677T T等位基因和A1298C C等位基因与DNA甲基化减少和Hcy浓度增加有关^[5]。目前已有多项研究发现C677T和A1298C基因多态性与各类疾病有关,如出生缺陷、阿尔茨海默病、卒中、恶性肿瘤等^[5,13-14]。近期一项研究以中国北方汉人为研究对象,结果显示携带C677T TT基因型可增加SCD患病风险,但该研究仅纳入31例SCD患者,且仅观察C677T一个SNP位点^[15]。此外,既往研究表明不同地区、种族人群MTHFR基因多态性位点基因型分布频率存在明显差异,如欧洲和北美人群C677T位点TT纯合子频率为5%~15%,远低于中国人20%~25%^[16-17]。在国内不同地域不同民族之间,两位点基因型分布和等位基因频率也不一致,有荟萃分析结果显示以秦岭-淮河为界,中国北方人群C677T TT基因型和T等位基因频率均高于南方人群,而A1298C CC基因型和C等位基因分布频率均低于南方人群^[18]。因此,有必要继续开展相关研究以验证和进一步探讨MTHFR基因多态性与SCD的相关性。

本研究结果显示携带C677T位点TT基因型可显著增加SCD发病风险(OR=2.768, 95% CI: 1.487~5.516, $P=0.005$),与ZHANG等^[15]研究结果相符。同时,本研究还发现C677T位点不同基因型之间高Hcy发生率存在显著差异,尤其携带TT基因型人群显著高Hcy发生率高于CC基因型人群,验证了本研究的前期推测,即MTHFR基因突变可导致MTHFR酶活性下降,进而降低5-亚甲基四氢叶酸浓度,抑制Hcy-甲硫氨酸再甲基化,导致Hcy在体内不断蓄积,使核酸代谢和髓鞘合成受损,导致SCD发病。此外,本研究结果还显示A1298C

位点不同基因型之间高Hcy发生率也存在显著差异,但本研究未发现该位点基因多态性与SCD明显相关,一方面可能与该位点突变基因频率偏低,样本量相对较少,检验效能不足有关,另一方面也表明了SCD发病机制的复杂性。

综上所述,本研究发现在陕西地区汉族人群中,MTHFR C677T多态性与SCD易感性密切相关。本研究还有一定的局限性:首先,由于SCD患病率相对较低,本研究纳入的样本量偏少。其次,如前所诉,不同地域不同民族患者该基因两位点多态性分布频率均存在一定差异,因此有必要继续在多区域开展研究。第三,SCD的其他潜在危险因素,包括其他MTHFR多态性,需要进一步研究。最后,本研究未就MTHFR基因多态性与神经功能障碍严重程度和预后进行观察,也需要进一步阐明。

参考文献:

- [1] LEE W J, POON Y C, CHUAH J H, et al. Subacute combined degeneration of the spinal cord[J]. The American Journal of Medicine, 2020, 133(12): 1421-1423.
- [2] XIAO Cuiping, REN Cuiping, CHENG Jingliang, et al. et al. Conventional MRI for diagnosis of subacute combined degeneration (SCD) of the spinal cord due to vitamin B-12 deficiency[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2016, 25(1): 34-38.
- [3] WEI Lihua, CHAO Naixia, GAO Si, et al. Homocysteine induces vascular inflammatory response via SMAD7 hypermethylation in human umbilical vein smooth muscle cells[J]. Microvascular Research, 2018, 120: 8-12.
- [4] 余银, 陈成芳, 宗惠花, 等. 血维生素B12及同型半胱氨酸联合测定在脊髓亚急性联合变性中的诊断价值[J]. 中国当代医药, 2016, 23(24): 31-33.
- [5] YU Yin, CHEN Chengfang, ZONG Huihua, et al. Diagnostic value of combined detection of Vitamin B12 and Homocysteine in subacute combined degeneration of spinal cord [J]. China Modern Medicine, 2016, 23(24): 31-33.
- [6] RUTTEN JACOBS L C A, TRAYLOR M, ADIB SAMII P, et al. Association of MTHFR C677T genotype with ischemic stroke is confined to cerebral small vessel disease subtype[J]. Stroke, 2016, 47(3): 646-651.
- [7] LIU Fang, SILVA D, MALONE M V, et al. MTHFR A1298C and C677T polymorphisms are associated with increased risk of venous thromboembolism: a retrospective chart review study[J]. Acta Haematologica, 2017, 138(4): 208-215.
- [8] AL-ACHKAR W, WAFAT A, AMMAR S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in syrian women[J]. Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.), 2017, 24(9): 1275-1279.

(下转第73页)