论著

文章编号:1000-5404(2010)24-2640-04

唐氏综合征患儿 MTHFR C677T 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平研究

宋 萃*,朱 岷*,熊 丰 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院内分泌科)

【摘要】 **目的** 了解唐氏综合征(down syndrome,DS)患儿5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylenetetrahydrofolate reductase,MTHFR)基因多态性及血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平的关系,探索DS患儿精神发育迟滞的可能机制。**方法** 采用病例-对照研究,收集经外周血染色体核型分析确诊为标准型DS的患儿20例作为病例组,同时收集健康儿童33例作为对照组。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测MTHFR 677位点基因多态性,以直接测序法验证。ELISA法测Hcy水平。对比DS组和对照组MTHFR 677位点基因突变频率;对比C/T及T/T基因型与C/C基因型儿童Hcy水平;对比DS组和对照组Hcy水平。**结果** ①53例中国汉族儿童MTHFR 677位点纯合突变率为11.3%。DS组MTHFR 677位点突变频率较对照组显著升高($P<0.05$)。DS组T等位基因频率显著高于对照组($P<0.05$)。②C/T及T/T基因型儿童Hcy较C/C基因型儿童显著升高($P<0.05$)。③DS组Hcy较对照组显著升高($P<0.05$)。DS组高同型半胱氨酸血症发生率显著高于对照组($P<0.05$)。**结论** 中国汉族儿童中存在MTHFR 677位点基因多态现象。DS患儿MTHFR 677位点基因多态现象较普遍,该位点基因突变可能导致叶酸代谢关键酶活性降低,引起高同型半胱氨酸血症,导致DS患儿精神发育迟滞。

【关键词】 唐氏综合征;5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶;同型半胱氨酸;基因多态性

【中图法分类号】 R596.102;R394.5;R446.19 【文献标志码】 A

MTHFR C677T polymorphism and plasma homocysteine level in children with Down syndrome

Song Cui, Xiong Feng, Zhu Min (Department of Endocrinology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the relationship between the polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and the plasma level of homocysteine (Hcy) in Down syndrome (DS) children, and explore the possible mechanisms of mental retardation in DS. **Methods** A case-control study was conducted on 20 G-banded karyotype analysis identified DS patients and 33 matched healthy children from September 2008 to December 2009. The polymorphism in MTHFR C677T was genotyped by PCR-RFLP, then verified by sequence analysis. The plasma level of Hcy was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The frequency of MTHFR C677T mutation was compared between DS group and control group. Plasma level of Hcy between children with C/T, T/T genotypes and children with C/C genotype, and between DS group and control group were compared. **Results** The homozygous mutation rate was 11.3% among those 53 Chinese Han children. DS group got remarkable higher mutation rate of MTHFR C677T than control group ($P<0.05$). DS group had significantly higher T allele frequency ($P<0.05$). The plasma level of Hcy was remarkable higher in children with C/T and T/T genotypes than in children with C/C genotype ($P<0.05$). DS group had significantly higher plasma level of Hcy than control group ($P<0.05$). DS group had remarkable higher incidence of hyperhomocysteinemia than control group ($P<0.05$). **Conclusion** There is genetic polymorphism in MTHFR C677T among Chinese Han children. The genetic polymorphism in MTHFR C677T is more common in DS group. The mutation of this gene site may lead to lower activity of the key enzyme which takes part in the folic acid metabolism, and cause hyperhomocysteinemia, resulting in mental retardation appeared in DS patients finally.

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5231);重庆市卫生局医学科学技术研究项目(2008-2-161)

*: 同等贡献者

【通信作者】 宋 萃,E-mail:songcui19801106@yahoo.com.cn

[Key words] down syndrome;5,10-methylenetetrahydrofolate reductase;homocysteine;gene polymorphisms

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5231) and the Program of Medical Science and Technology of of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-2-161). Song Cui and Zhu Min are the first author who contributed equally to the article. Corresponding author: Song Cui, E-mail: songcui19801106@yahoo.com.cn

唐氏综合征(down syndrome,DS)是小儿最常见导致精神发育迟滞的染色体疾病,但是 DS 患儿精神发育迟滞的发生机制尚不完全明确。5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylenetetrahydrofolate reductase,MTHFR)是叶酸代谢的关键酶,其基因突变可能引起叶酸代谢障碍、甲基转移障碍及高同型半胱氨酸血症[1]。MTHFR 基因 677 位点为常见的突变位点之一。国外研究表明 DS 患者存在 MTHFR C677T 基因多态现象[2]。还有研究表明高同型半胱氨酸血症可导致不可逆性认知障碍[3-4],而 DS 患儿 MTHFR C677T 基因多态现象与血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平关系的研究国内尚少见报道。本研究拟对 DS 患儿和对照儿童进行 MTHFR C677T 基因多态性检测及 Hcy 测定,了解 DS 患儿 MTHFR C677T 基因多态性及 Hcy 水平的关系,探索 DS 患儿精神发育迟滞的可能机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2008 年 9 月至 2009 年 12 月间于本院就诊,并经常规 G 显带染色体核型分析确诊为标准型 DS 的患儿 20 例作为病例组,其中男性 11 例,女性 9 例,平均年龄 2 岁 9 个月(1 个月至 9 岁 2 个月)。同时收集进行健康体检,经染色体检查确定为正常核型的儿童 33 例作为对照组,其中男性 19 例,女性 14 例,平均 3 岁 1 个月(4 个月至 12 岁 4 个月)。所纳入的 53 例儿童均为中国汉族儿童。该研究由重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准,且所有受试患儿经过家长知情同意。

1.2 标本采集

对所纳入的 DS 患儿和对照儿童采集外周血 5 ml,标本采集后无菌分离全血 2 ml 进行常规 G 显带染色体核型分析;取全血 200 μl 提取 DNA 置于 -80 ℃保存用于 MTHFR C677T 多态性检测。余血于 1 000 × *g* 离心 15 min,取上清置于 -80 ℃保存用于测定血浆同型半胱氨酸。

1.3 常规 G 显带染色体核型分析

无菌分离受试对象静脉血 2 ml,进行外周血淋巴细胞培养,常规方法收获细胞,低渗、固定、胰酶消化、制片经 G 显带处理,镜检。每例均分析 30 个分裂像,并进行显微摄像。按照 ISCN 描述染色体数目及结构变化。

1.4 MTHFR C677T 多态性检测

1.4.1 聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法分析 MTHFR C677T 多态性 取受试儿童新鲜全血 200 μl,采用天根 DP318-2 DNA 抽提试剂盒提取患儿外周血 DNA,操作按试剂盒说明书进行。参照文献[5]设计引物如下:正义链 5′-CATCCCTATTGGCAGGTTAC-3′,反义链 5′-GACGGTGCGGTGAGAGTG-3′,引物由 Invitrogen 生物技术有限公司合成,采用 PCR 方法进行基因扩增,扩增片段为 265 bp。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,扩增 35 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 反应体系为 25 μl,包含引物正义链 0.5 μl,反义链 0.5 μl,PCR master mix(北京天根)12.5 μl,ddH_2O 10.5 μl,DNA 1 μl。PCR 产物用 *Hinf* Ⅰ限制性内切酶(Promega 公司)酶切。酶切体系为 20.5 μl,包含 BSA 0.2 μl,ddH_2O 7.8 μl,10 × 缓冲液 2 μl,PCR 产物 10 μl,*Hinf* Ⅰ 0.5 μl。充分混匀后置于 37 ℃水浴 4 h,酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.4.2 直接测序法验证 MTHFR C677T 多态性 随机抽取 15 例样本,其中 DS 患儿 5 例,正常对照 10 例将其 MTHFR C677T 基因扩增后酶切产物送重庆医科大学感染性疾病分子生物学实验室完成序列测定(ABI 3100 测序仪),测序引物采用原 PCR 引物。

1.5 血浆同型半胱氨酸测定

使用 ELISA 法检测血浆同型半胱氨酸,试剂盒购自武汉中美科技有限公司。按试剂盒说明书操作。

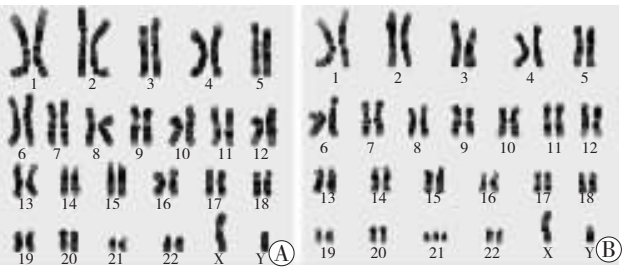
1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用 *t* 检验,组间率的比较采用 χ^2 检验。用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 外周血染色体核型分析

所有受试对象进行外周血染色体核型分析,结果显示所纳入的 20 例 DS 患儿均为标准型核型。见图 1。

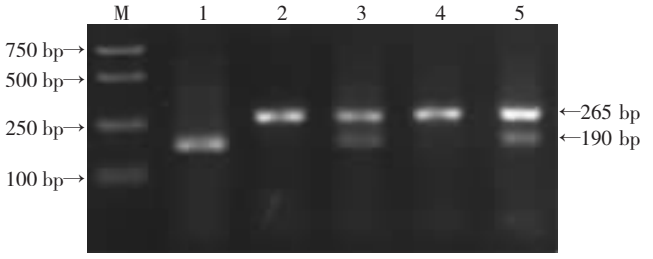


A:正常核型;B:标准型 DS 核型

图 1 受试对象外周血染色体核型分析

2.2 PCR-RFLP 分析基因型

所有标本进行 MTHFR C677T 基因序列 PCR 扩增。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳中显示产物长度为 265 bp,在扩增片段上存在 C677T 多态位点,PCR 产物酶切后出现 3 种情况:仅 265 bp1 条带,说明扩增产物不含 *Hinf* Ⅰ酶切位点,基因型为 C/C;仅 190 bp 1 条带,说明 2 条染色体上都存在 *Hinf* Ⅰ酶切位点,基因型为 T/T;同时出现 265 bp 和 190 bp 2 条带,说明为杂合子,基因型为 C/T。见图 2。



M:DNA 标准;1:T/T 型;2、4:C/C 型;3、5:C/T 型

图2 MTHFR C677T PCR 产物酶切后2%琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 直接测序验证基因型

抽取 DS 患儿 5 例,正常对照儿童 10 例将其 MTHFR C677T 基因进行 PCR 扩增,扩增产物用 *Hinf* Ⅰ酶切,酶切产物直接进行测序分析。测序结果显示受试对象在扩增片段上存在 C677T 多态位点,即存在 C/C、C/T 及 T/T 3 种基因型。将测序结果与 PCR-RFLP 分析结果进行对比,符合率为 95%。

2.4 DS 患儿与对照儿童 MTHFR C677T 基因型分布频率比较

纳入的 53 例中国汉族儿童 MTHFR C677T 纯合突变率为 11.3%。DS 组与对照组 MTHFR 677 位点 C/C、C/T 及 T/T 基因分布频率见表 1。DS 组与对照组 MTHFR 677 位点基因分布比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。DS 组突变型的比例显著高于对照组。DS 组与对照组 T 等位基因频率分别为 55.0% 和 33.3%。DS 组 T 等位基因频率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表1 DS 组与对照组 MTHFR 677 位点基因型分布频率比较 [例数(%)]

组别	例数(例)	MTHFR 677 位点			P 值
		C/C	C/T	T/T	
DS 组	20	1(5.0)	16(80.0)	3(15.0)	0.003
对照组	33	14(42.4)	16(48.5)	3(9.1)	

2.5 C/T 及 T/T 基因型儿童和 C/C 基因型儿童血浆同型半胱氨酸水平比较

C/T 及 T/T 基因型儿童血浆同型半胱氨酸水平为(9.75 ± 3.43),C/C 基因型儿童血浆同型半胱氨酸水平为(6.04 ± 1.46),C/T 及 T/T 基因型患儿血浆同型半胱氨酸较 C/C 基因型患儿显著升高($P<0.05$)。

2.6 DS 患儿与正常儿童血浆同型半胱氨酸水平比较

DS 组血浆同型半胱氨酸水平为(11.40 ± 3.85),对照组血浆同型半胱氨酸水平为(7.07 ± 1.75),DS 组血浆同型半胱氨酸较对照组显著升高($P<0.05$)。DS 组高同型半胱氨酸血症发生率为 15%,显著高于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

DS 是导致儿童智力低下的常见原因,认知障碍存在于所有 DS 患者,并造成大约 30% 中到重度智力发育迟滞。据报道 DS 患者的平均智商为 40 ~ 70,并随年龄增长而降低。众多的研究结果显示 DS 患者存在一碳单位代谢异常,而 Hcy、叶酸等营养因素直接与一碳单位代谢相关[6]。目前众多临床研究证实,Hcy 是痴呆的独立危险因素[7]。Hcy 是一种含硫基的氨基酸,为蛋氨酸的中间代谢产物。蛋氨酸在三磷酸腺苷(ATP)的参与下形成 s-腺苷蛋氨酸,后者是一个活泼的甲基供体,并在甲基转移酶作用下变成 s-腺苷同型半胱氨酸,再脱去腺苷生成同型半胱氨酸[8]。体内 Hcy 主要通过以下 2 个途径进行分解代谢:Hcy 在胱硫醚 β 合成酶(cystathione-β-synthase,CβS)作用下生成胱硫醚。在此过程中,CβS 的活性依赖于维生素 B_6。Hcy 可以再甲基化重新形成蛋氨酸而参加蛋氨酸循环,此过程需维生素 B_{12}、甲基转移酶、5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)、叶酸等参与[9]。2 种代谢过程各占 50% 左右。据此,人体内 Hcy 的浓度受叶酸代谢关键酶的活性、蛋氨酸浓度及维生素 B_6、维生素 B_{12} 等一些辅助因子浓度的影响。但目前 DS 患者叶酸代谢关键酶基因多态性、血浆同型半胱氨酸水平以及叶酸代谢关键酶基因多态性与血浆同型半胱氨酸水平之间的联系尚不明确。

MTHFR 编码的酶主要参与叶酸代谢,催化 5,10-亚甲基四氢叶酸还原为 5-甲基四氢叶酸。正常活性的 MTHFR 编码的酶可维持正常的叶酸代谢及蛋氨酸循环并有助于避免产生高半胱氨酸血症。MTHFR 常见的突变位点包括 677 位点,MTHFR 677 位点的胞嘧啶可被胸腺嘧啶代替,导致其编码的蛋白由丙氨酸转变为缬氨酸。C677T 等位基因编码的酶具有热不稳定性[10]。一系列人群试验数据显示 MTHFR C677T 在人群中的多态现象具有地区及种族差异。对欧洲白种人的研究数据显示德国人 MTHFR C677T 纯合突变率为 8%;一项对 234 例亚撒哈拉非洲黑人的相关研究显示 MTHFR C677T 突变率为 7%[11];而爱尔兰和英国这 2 个神经管缺陷高发的地区 MTHFR C677T 纯合突变率则分别为 11% 和 13%[12-13]。本研究所纳入的 53 例中国汉族儿童 MTHFR C677T 纯合突变率为 11.3%,高于德国人及非洲黑人,与爱尔兰及英国相近。考虑与本组受试对象中纳入了 20 例 DS 患儿有关。本试验中 DS 组 MTHFR C677T 基因突变频率较正常儿童显著升高,提示 MTHFR C677T 基因多态性可能参与 DS 的发病机制。进一步分析 MTHFR C677T 野型及突变型受试对象血浆同型半胱氨酸水平发现突变型受试对象血浆同型半胱氨酸水平较野型者明显升高。提示 MTHFR C677T 位点的突变导致 MTHFR 编码的酶活性降低,从而使同型半胱氨酸再甲基化重新形成蛋氨酸途径受阻,导致高同型半胱氨酸血症,可能参与 DS 患者精神发育迟滞。

本研究结果显示 DS 患儿组血浆同型半胱氨酸水平较正常对照组显著升高,DS 组高同型半胱氨酸血症

发生率为 15%，显著高于正常对照组。提示血浆同型半胱氨酸水平升高可能是导致 DS 患儿精神发育迟滞的危险因素。血浆同型半胱氨酸水平的增高对神经系统产生毒性的机制尚不清楚，其可能途径为：Hcy 影响海马神经元 DNA 修复；促进海马神经元凋亡；增加神经元对外源性毒物和氧化应激反应的敏感性；增加 β 淀粉肽的神经毒性[14-15]。

综上，本研究证实了中国汉族儿童中存在 MTHFR C677T 基因多态现象。DS 儿童 MTHFR C677T 基因多态现象较为普遍，该位点的基因突变可能导致编码叶酸代谢的关键酶活性降低，使同型半胱氨酸重新合成蛋氨酸途径受阻，从而导致高同型半胱氨酸血症，最终参与 DS 患儿精神发育迟滞。但本研究所纳入的受试对象来自三级甲等医院，未进行整群抽样，因此可能存在一定的抽样偏倚。我们将在本研究的基础上进一步开展多中心、更大样本量的研究。

参考文献：

[1] Eskes T K. Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: review of the literature[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2006, 124(2): 130-133.
[2] Acacio G L, Barini R, Bertuzzo C S, *et al*. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21 [J]. Prenat Diagn, 2005, 25(13): 1196-1199.
[3] Gueant J L, Anello G, Bosco P, *et al*. Homocysteine and related genetic polymorphisms in Down's syndrome IQ[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005, 76(5): 706-709.
[4] 钟巧莹，卢礼贤，杨志华，等. 血浆同型半胱氨酸水平及 MTHFR 基因多态性与血管性痴呆的关系[J]. 解剖学研究，2007，29(6)：432-434.
[5] A Z C, Yang Y, Zhang S Z, *et al*. Single nucleotide polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene might be a genetic risk factor for infertility for Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia[J]. Asian J Androl, 2007, 9(1): 57-62.
[6] Coppede F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome[J]. Mutat Res, 2009, 682(1): 54-70.
[7] Ravaglia G, Forti P, Maioli F, *et al*. Plasma homocysteine and inflammation in elderly patients with cardiovascular disease and dementia [J]. Exp Gerontol, 2004, 39(3): 443-450.
[8] 宫婷，李芬，Huang Hui，等. MTR、MTRR 基因多态性与先天性心脏病的相关性研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(2)：127-130.
[9] Nagga K, Rajani R, Mardh E, *et al*. Cobalamin, folate, methylmalonic acid, homocysteine, and gastritis markers in dementia[J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2003, 16(4): 269-275.
[10] Cortese C, Motti C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease [J]. Public Health Nutr, 2001, 4(2B): 493-497.
[11] Schneider J A, Rees D C, Liu Y T, *et al*. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(5): 1258-1260.
[12] Abbate R, Sardi I, Pepe G, *et al*. The high prevalence of thermolabile 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Italians is not associated to an increased risk for coronary artery disease (CAD) [J]. Thromb Haemost, 1998, 79(4): 727-730.
[13] Shaw G M, Rozen R, Finnell R H, *et al*. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida[J]. Am J Epidemiol, 1998, 148(1): 30-37.
[14] Mattson M P, Shea T B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders[J]. Trends Neurosci, 2003, 26(3): 137-146.
[15] Drouet B, Fifre A, Pincon-Raymond M, *et al*. ApoE protects cortical neurones against neurotoxicity induced by the non-fibrillar C-terminal domain of the amyloid-beta peptide [J]. J Neurochem, 2001, 76(1): 117-127.

（收稿：2010-07-23 修回：2010-09-19）
（编辑 张 维）

（上接 2631 页）

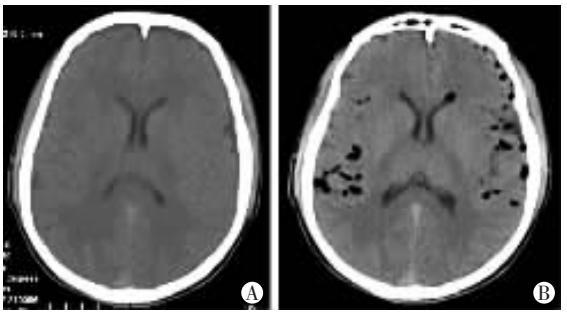


图 1 患者腰穿前(A)后(B)头颅 CT 表现

颅内积气是指颅腔内存在气体，多为脑外伤合并症或颅脑手术后表现，本患者无头部外伤及手术史，腰穿前头颅 CT 示脑实质密度均匀，脑室池无扩大或闭塞，骨窗无颅骨骨折，腰穿后脑实质内可见多个低密度影，测 CT 值为气体，考虑为腰椎穿刺过程中少量气体进入蛛网膜下腔，通过脑脊液循环到颅内[2]。由于操作过程中，脑脊液不能自动流出，需要针管抽取脑脊液，因此推测颅内积气的机制可能是由于患者颅内压过低，甚至低于周围大气压，导致在周围气压的作用，气体在大气压的作用下进入颅内。因此对于这种脑脊液压力低的患者，拔除穿刺针针芯后，应迅速用注射器封住穿刺针，防止针孔暴露的时间过长，避免气体在大气压的作用下通过穿刺针进入颅内。对低颅压患者行腰穿、抽取脑脊液后，脑脊液压力有可能进一步下降，导致患者出现头痛，应嘱患者注意平卧休息，多饮水，必要时予以激素治疗。

少量颅内气体对人体无病理损害，多在 2 周内吸收。由于 CT 可清楚地显示颅内积气，对于怀疑腰穿后有颅内积气的患者，可采用 CT 检查、复查。

参考文献：

[1] 刘红军. 自发性低颅内压头痛的临床及影像学特征[J]. 浙江临床医学，2006，8(8)：885.
[2] 姚芒旭，雷建中，黄光焕. 腰穿致蛛网膜下腔、脑池室积气 1 例报告[J]. 现代医用影像学，2000，9(1)：47.

（收稿：2010-08-25 修回：2010-10-26）
（编辑 邓强庭）