

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与阿尔茨海默病的相关性临床研究

游孟哲¹,周霞²,尹文文²,万珂²,孙中武²

摘要 **目的** 探讨阿尔茨海默病(AD)进程中,亚甲基四氢叶酸还原酶(*MTHFR*) *C677T* 多态性与疾病的相关性,以及是否受 APOE 基因影响。**方法** 共纳入 74 例 AD 患者、85 例遗忘型轻度认知障碍患者(aMCI)和 81 例健康对照者(HC),检测 3 组血清同型半胱氨酸(Hcy)、叶酸和维生素 B12 水平,以及 *MTHFR C677T* 及 *APOE* 基因型,通过 Logistic 回归分析比较 *MTHFR C677T* 不同等位基因和基因型分别与 aMCI 和 AD 风险之间的关联,以及在不同 *APOE ε4* 亚组中的表现。**结果** AD 组和 aMCI 组的血清 Hcy 水平均较对照组显著升高($P < 0.001$, $P < 0.001$),而 aMCI 组血清叶酸水平较 HC 组明显降低($P = 0.017$)。与 *MTHFR CC*、*CT* 基因型者相比,TT 基因型者的血清叶酸水平明显降低($P =$

0.038),血清 Hcy 水平明显升高($P = 0.002$)。回归分析结果显示:在 *APOE ε4* 非携带者亚组中,*MTHFR TT* 基因型可能增加 aMCI 患病风险($OR = 3.670$, $95\% CI = 1.077 - 12.509$, $P = 0.038$),在 *APOE ε4* 携带者中则无相应表现。**结论** *MTHFR C677T* 多态性可导致血清 Hcy 水平增高和叶酸水平降低。在 *APOE ε4* 非携带者中,*MTHFR TT* 基因型可能增加 aMCI 的患病风险。

关键词 阿尔茨海默病;遗忘型轻度认知障碍;亚甲基四氢叶酸还原酶;同型半胱氨酸

中图分类号 R 741

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1081-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.026

2024-04-13 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202104j07020031)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院康复医学科,合肥 230601

²安徽医科大学第一附属医院神经内科,合肥 230022

作者简介:游孟哲,女,博士,医师;

孙中武,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: sunzhwu@126.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,遗忘型轻度认知功能障碍(amnesic mild cognitive impairment, aMCI)是介于正常的老年性认知衰退和痴呆之间的一种状态,被认为是 AD 的前驱阶段^[1]。高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinaemia, HHcy)可能在 AD 的发生发展中起到一定作用。正常健康人的同

of Deiodinase 2 (DIO2) in decidua tissues was determined by Western blot. The distribution of DIO2 in decidua tissues was determined by immunofluorescence and the fluorescence intensity was measured. The decidual vessel density was determined by immunohistochemistry using CD34 as an endothelial marker. The protein expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) was detected by Western blot. **Results** There was no significant difference in age, gestation days, TSH, T3, T4 and other basic data between the control group and the abortion group. The results of Western blot showed that the expression levels of THR- α and THR- β protein decreased, and the results of immunohistochemical staining of decidua tissues showed that the nuclear translocation of decidual thyroid hormone receptor in patients with spontaneous abortion decreased ($P < 0.05$). Western blotting results showed that the expression of DIO2 protein in the abortion group was lower than that in the control group, suggesting that thyroid hormone metabolism in decidua of spontaneous abortion pregnant women was affected. The results of immunofluorescence test showed that the fluorescence intensity of DIO2 in the abortion group was weaker than that in the control group ($P < 0.05$). Immunohistochemical CD34 labeling of decidual small blood vessels showed that the number of CD34⁺ blood vessels decreased in the abortion group with statistical difference ($P < 0.05$). Western blot results showed that there was no significant change in VEGFR-1 between the two groups, and the difference between the two groups was not statistically significant. **Conclusion** The abnormal signal of thyroid hormone receptors in decidua may decrease decidua angiogenesis and participate in spontaneous abortion.

Key words miscarriage; decidualization; thyroid hormone receptor

型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 浓度在 5 ~ 15 $\mu\text{mol/L}$ 之间, 超过 15 $\mu\text{mol/L}$ 即可诊断为 HHcy。亚甲基四氢叶酸还原酶 (5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 是 Hcy 代谢过程中的重要生物酶, 其基因多态性是影响 MTHFR 酶活性的主要原因^[2], MTHFR 基因最常见的单核苷酸多态性位点为 C677T(rs1801133), 分别有 CC 型、CT 型及 TT 型 3 种基因型, 而携带 T 突变基因的 CT 型和 TT 型人群的酶活性分别为 CC 型的 65% 和 30%, 可能通过降低酶的活性, 影响 Hcy 代谢, 导致血 Hcy 水平升高^[3-4]。

尽管 MTHFR C677T 多态性可能影响 Hcy 代谢, 但其是否与 AD 风险增加有关, 仍存在争议。关于 MTHFR C677T 是否与 AD 之间存在关联, 以及 APOE 基因是否参与其中, 仍不清楚。该研究旨在探讨 MTHFR C677T 多态性与 AD 和 aMCI 风险之间的关联, 并探讨其是否受到 APOE $\epsilon 4$ 基因影响, 以期深入了解 MTHFR C677T 的作用机制, 为 AD 的早期精准干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 纳入 2019 年 10 月至 2021 年 8 月于安徽医科大学第一附属医院神经内科门诊就诊的初诊 AD 和 aMCI 患者 (AD 组和 aMCI 组), 同期纳入年龄、性别和受教育程度匹配的认知功能正常的健康对照 (HC 组)。上述被试均为右利手, 中国汉族, 年龄在 50 ~ 85 岁之间。本研究受试对象均签署知情同意书且经该院伦理委员会批准 (PJ-2021-13-18)。

1.2 纳入及排除标准 AD 入组标准: 50 ~ 85 岁; 依据美国国家老龄化研究所和阿尔茨海默氏症协会 (National Institute on Aging and Alzheimer's Association, NIA-AA)^[5] 诊断标准修订如下: ① 达到可能或很可能的 AD 诊断标准; ② MMSE 得分: 文盲低于 17 分, 小学低于 20 分, 中学及以上文化程度低于 23 分; ③ CDR 为 1 ~ 2 分; ④ Hachinski 评分 ≤ 4 分。

aMCI 入组标准: 50 ~ 85 岁; 依据 NIA-AA 诊断标准^[6] 修订如下: ① 有记忆力下降主诉或由知情者证实的记忆障碍; ② 存在包括记忆受损在内的 1 个或多个认知领域受损, 记忆功能评分低于教育程度匹配的同龄人 1.0 至 1.5 个标准差; ③ 日常生活能力保留; ④ 客观认知障碍, 但未达到美国精神障碍诊断与统计手册第五版 (DSM-V) 痴呆标准, CDR 为 0.5 分; ⑤ MMSE 得分: 文盲 17 ~ 19 分, 小学 20 ~ 22 分, 初中及以上文化程度 23 ~ 26 分; ⑥ Hachinski 评

分 ≤ 4 分。

排除标准: ① 脑白质高信号 Fazakes 分级 $\geq \text{II}$ 级者; ② 有严重焦虑抑郁、躯体障碍、精神疾病史者; ③ 脑卒中、帕金森病、路易体痴呆等其他神经系统疾病导致认知损害者; ④ 肝肾疾病、癫痫、甲状腺疾病、风湿免疫疾病、消化系统疾病、恶性肿瘤患者; ⑤ 近 1 月服用叶酸或其它 B 族维生素者, 有促智药物、甲氨蝶呤、异烟肼、卡马西平、左旋多巴等药物服用史者; ⑥ 体内有金属植入物如人工耳蜗、心脏起搏器者; ⑦ 头颅 MRI 检查禁忌或不能耐受者; ⑧ 未签署知情同意书者。

1.3 方法

1.3.1 病例资料 采集所有受试者年龄、性别、受教育程度、身高、体质量、职业、既往史、个人史、家族史、疾病史、用药史等一般资料。

1.3.2 神经心理学测试 评估内容包括简易精神智力状态检查量表 (mini-mental state examination, MMSE)、蒙特利尔认知量表 (montreal cognitive assessment, MoCA)、剑桥老年认知检查量表 - 中文版 (cambridge cognitive examination-Chinese version, CAMCOG-C)、临床痴呆量表 (clinical dementia rating, CDR)、日常生活能力评估量表 (activity of daily living, ADL)、Hachinski 评分、焦虑自评量表 (self-rating anxiety scale, SAS) 和抑郁自评量表 (self-rating depression scale, SDS)。

1.3.3 血清学指标检测 所有被试均空腹抽取肘静脉血 4 ml 置于普通生化管, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 30 min 后, 以 1 500 r/min 转速离心 10 min, 收集上清液。分别进行血清 Hcy、叶酸和维生素 B₁₂ 浓度检测。血清 Hcy 检测: 通过全自动化学发光免疫分析仪 (型号为 ADVIA Centaur XP, 德国西门子) 测定, 由西门子公司提供 Hcy 试剂盒 (正常 Hcy 范围 $\leq 15 \mu\text{mol/L}$), 血清维生素 B₁₂ 和叶酸检测: 采用化学发光分析仪 (型号为 COBAS e 602, 瑞士罗氏) 测定, 使用罗氏公司提供的维生素 B₁₂ 和叶酸试剂盒。

1.3.4 MTHFR C677T、APOE 基因型检测 所有被试均空腹抽取 2 ml 静脉血液置于 EDTA 管中, 分析前将标本储存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。将血液样本统一送至安徽金准基因生物技术公司进行 MTHFR C677T 多态性 (rs1801133) 和 APOE 基因 (rs429358, rs7412) 的测序和分型。首先使用试剂盒 Magen HiPure Blood DNA Mini Kit (D3111-03) 从血液样本中提取 DNA, 然后采用 PARMS 方法进行 DNA 的 PCR 扩增, MTHFR C677T 和 APOE 基因 PCR 扩增

引物见表1。PCR扩增完成后,使用TECAN infinite M1000酶标仪读取荧光信号,然后通过snpdecoder (<http://www.snpway.com/snpdecoder/>)解析转换荧光信号,得到清晰直观的分型图,并根据颜色不同,输出基因型结果。采用 χ^2 检验来评估等位基因频率是否符合Hardy-Weinberg平衡, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 MTHFR rs1801133 and APOE rs429358, rs7412的测序引物

引物名	引物序列(5'-3')	扩增产物大小(bp)
rs429358_rs7412-F*	AGGAACAACCTGACCCCGGTG	326
rs429358_rs7412-R	CTGTTCCACCAGGGGCC	
rs1801133-F*	AGAGGACTCTCTGCCCAG	295
rs1801133-R	CCCTCACCTGGATGGGAAAG	

*:测序引物

1.3.5 神经影像学检查 所有扫描均在GE signa HDxt3.0磁共振成像仪上完成。采集被试头颅的T1WI、T2WI、T2 FLAIR的扫描数据。对所有图像进行检查是否存在伪影、软化灶、以及其他颅内病变等情况。

1.4 统计学处理 使用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料若符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用方差分析;若为偏态分布数据,则使用中位数和四分位数 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间差异比较采用秩和检验,其中两组间差异比较采用Mann-Whitney U 检验,3组间差异比较采用Kruskal-Wallis H 检验并进行两两多重比较校正。计数资料使用频数(百分比)表示,并采用卡方检验比较组间分布差异性。采用Logistic回归分析探究不同MTHFR C677T等位基因和基因型分别与aMCI和AD的相关性,得到相应优势比(odds ratio, OR)和95%置信区间(confidence interval, CI)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例资料比较 3组人口统计学、血清学指标、神经心理学和APOE $\epsilon 4$ 基因型分布情况如下所示:本研究最终共纳入240例被试,AD组74例,其中女性40例,男性34例,平均年龄为67(57.75, 73.25)岁,平均教育程度为9(6.75, 11.25)年;aMCI组85例,其中女性44例,男性41例,平均年龄为68(62.5, 73)岁,平均教育程度为9(8, 11.5)年;HC组81例,其中女性39例,男性42例,平均年龄为64(62, 71)岁,平均教育水平为10(8, 12)年。

AD组、aMCI组和HC组在性别、年龄和受教育程度方面没有明显差异。在血管危险因素方面,3组在吸烟史、饮酒史、高血压史、糖尿病史、心脏病史或高脂血症等差异无统计学意义。血清学指标方面,AD组和aMCI组的血清Hcy水平均较HC组显著升高,而aMCI组血清叶酸水平较HC组明显降低,三组血清维生素B₁₂水平差异则无统计学意义。此外,在认知功能方面,aMCI组和AD组患者整体认知功能以及各认知领域功能评分分别较HC组显著下降,其MMSE评分、MoCA评分、CAMCOG-C总分及其子项目定向、语言、记忆、注意、执行、思维、知觉评分均远低于与HC组。AD组的CAMCOG-C子项目计算评分显著低于HC组和aMCI组,而ADL评分则较另外两组显著增高。情绪方面,3组的SAS、SDS评分无显著差异。而在APOE $\epsilon 4$ 分布方面,AD组中APOE $\epsilon 4$ 携带者的比例显著高于aMCI组和HC组,而aMCI组和HC组在APOE $\epsilon 4$ 分布方面则差异无统计学意义,见表2。

2.2 MTHFR C677T基因型的分布 在HC组、aMCI组、AD组以及所有被试中,C和T等位基因频率在HC组中分别为59.9%和40.1% ($\chi^2 = 1.768$, $P = 0.413$),在aMCI组中分别为54.7%和45.3% ($\chi^2 = 1.348$, $P = 0.510$),在AD组中分别为62.2%和37.8% ($\chi^2 = 0.843$, $P = 0.656$),在所有被试中分别为58.7%和41.3% ($\chi^2 = 0.142$, $P = 0.932$),MTHFR C677T等位基因和基因型的分布情况如下所示:在aMCI组与HC组比较中,MTHFR C677T等位基因频率差异均无统计学意义,但TT基因型者比例较HC组显著增加($P = 0.034$),按APOE $\epsilon 4$ 状态分层后,在APOE $\epsilon 4(+)$ 亚组中,两组间的MTHFR C677T等位基因和基因型频率差异无统计学意义,但在APOE $\epsilon 4(-)$ 亚组中,aMCI组的TT基因型比例显著高于HC组($P = 0.022$),提示MTHFR TT基因型可能在APOE $\epsilon 4$ 非携带者中增加aMCI的发病风险,然后按性别对样本进行分层,显示男性aMCI患者中的TT基因型者比例显著高于男性健康对照者($P = 0.017$)。在AD组与HC组比较中,MTHFR C677T等位基因和基因型频率差异均无统计学意义,但按APOE $\epsilon 4$ 状态分层后,在APOE $\epsilon 4(+)$ 亚组中,AD组的T等位基因频率及含T风险基因者(CT+TT)比例则较HC组显著降低($P = 0.034$; $P = 0.038$);按性别进行分层后,AD组和HC组在等位基因和基因型频率分布情况差异均无统计学意义。见表3。

表2 AD组、aMCI组及健康对照组(HC)在人口学、临床、和神经心理特征等方面的比较[$n(\%)$, $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	HC($n=81$)	aMCI($n=85$)	AD($n=74$)	χ^2/Z 值	P 值
性别(女)	39(48)	44(52)	40(54)	0.554	0.758 ^a
年龄(岁)	64(62,71)	68(62.5,73)	67(57.75,73.25)	2.425	0.297 ^c
教育程度(年)	10(8,12)	9(8,11.5)	9(6.75,11.25)	4.337	0.114 ^c
吸烟史	15(19)	21(25)	16(22)	0.936	0.626 ^a
饮酒史	16(20)	26(31)	18(24)	2.623	0.269 ^a
高血压史	30(37)	34(40)	23(31)	1.394	0.498 ^a
糖尿病史	8(10)	16(19)	10(14)	2.768	0.251 ^a
心脏病史	12(15)	8(9)	4(5)	3.855	0.146 ^a
高脂血症	19(24)	13(15)	11(15)	2.557	0.279 ^a
Hcy($\mu\text{mol/L}$)	14.72(12.09,17.88)	17.08(14.11,21.84)	17.11(14.62,21.19)	16.966	<0.001 ^{e,1,2}
叶酸(ng/ml)	10.67(8.195,14.195)	9.05(6.85,12.24)	9.67(7.04,12.90)	8.110	0.017 ^{e,1}
维生素 B ₁₂ (pg/ml)	528(401,689.85)	482(396.5,582.5)	506(400.4,671.75)	1.318	0.517 ^c
MMSE	28(27,29)	24(23,26)	13(9.75,17)	197.647	<0.001 ^{e,1,2,3}
MoCA	26(24,27)	19(17,22)	9(5,12)	183.775	<0.001 ^{e,1,2,3}
CAMCOG-C	92(86.5,96)	76(71,83.5)	50(31.75,58.5)	171.306	<0.001 ^{e,1,2,3}
定向	10(10,10)	9(7,10)	4(2,6)	159.759	<0.001 ^{e,1,2,3}
语言	27(26,28.5)	25(22,26)	18(13,23)	119.493	<0.001 ^{e,1,2,3}
记忆	21(19,22)	14(10,17)	6(3,9)	168.903	<0.001 ^{e,1,2,3}
注意	7(6,7)	6(5,7)	2(0,3.25)	115.437	<0.001 ^{e,1,2,3}
执行	12(10.5,12)	10(8,11)	7(5,9)	99.227	<0.001 ^{e,1,2,3}
计算	2(2,2)	2(2,2)	1(0,2)	96.052	<0.001 ^{e,2,3}
思维	6(6,8)	6(5,7)	5(2,6)	42.659	<0.001 ^{e,1,2,3}
知觉	8(7,9)	7(6,8)	5(4,6.25)	82.373	<0.001 ^{e,1,2,3}
ADL	20(20,20)	20(20,20)	29(24.75,38)	149.846	<0.001 ^{e,2,3}
CDR	0(0,0)	0.5(0.5,0.5)	1(1.0,2.0)	207.519	<0.001 ^{e,1,2,3}
SAS	28.75(25.625,33.75)	28.75(25.32.5)	27.5(25,30)	5.025	0.081 ^c
SDS	28.75(26.25,33.75)	28.75(25,35)	30(25,33.75)	0.036	0.982 ^c
APOE					
$\epsilon 4$ 非携带者	65(80)	62(73)	33(45)	24.451	<0.001 ^{a,2,3}
$\epsilon 4$ 携带者	16(20)	23(27)	41(55)		

^a:采用 χ^2 检验; ^b:采用方差分析; ^c:采用秩和检验中的Kruskal-Wallis H 检验; 1:多重比较校正后 HC组和aMCI组之间差异有统计学意义; 2:多重比较校正后 HC组和AD组之间差异有统计学意义; 3:多重比较校正后 aMCI组和AD组之间差异有统计学意义

表3 MTHFR C677T 等位基因以及基因型分别在 HC 组、aMCI 组和 AD 组的分布情况[$n(\%)$]

项目	等位基因			基因型			P^b 值	P^c 值
	C	T	P^a 值	CC	CT	TT		
HC($n=81$)	97(59.9)	65(40.1)		25(30.8)	47(58.0)	9(11.1)		
APOE $\epsilon 4$ (+)	15(46.9)	17(53.1)		3(18.8)	9(56.3)	4(25.0)		
APOE $\epsilon 4$ (-)	82(63.1)	48(36.9)		22(33.8)	38(58.5)	5(7.7)		
女性	47(60.3)	31(39.7)		14(35.9)	19(48.7)	6(15.4)		
男性	50(59.5)	34(40.5)		11(26.2)	28(66.7)	3(7.1)		
aMCI($n=85$)	93(54.7)	77(45.3)	0.341	29(34.1)	35(41.1)	21(24.7)	0.034	0.741
APOE $\epsilon 4$ (+)	24(52.2)	22(47.8)	0.645	7(30.4)	10(43.5)	6(26.1)	0.770*	0.480*
APOE $\epsilon 4$ (-)	69(55.6)	55(44.4)	0.228	22(35.5)	25(40.3)	15(24.2)	0.022	0.846
女性	44(50.0)	44(50.0)	0.185	12(27.3)	20(45.5)	12(27.3)	0.390	0.398
男性	49(59.8)	33(40.2)	0.976	17(41.5)	15(36.6)	9(21.9)	0.017	0.141
AD($n=74$)	92(62.2)	56(37.8)	0.680	31(41.9)	30(40.5)	13(17.6)	0.090	0.182
APOE $\epsilon 4$ (+)	56(68.3)	26(31.7)	0.034	20(48.8)	16(39.0)	5(12.2)	0.087*	0.038
APOE $\epsilon 4$ (-)	36(54.5)	30(45.5)	0.249	11(33.3)	14(42.4)	8(24.2)	0.072*	0.960
女性	48(60.0)	32(40.0)	0.974	16(40.0)	16(40.0)	8(20.0)	0.718	0.707
男性	44(64.7)	24(35.3)	0.513	15(44.1)	14(41.2)	5(14.7)	0.086*	0.101

APOE $\epsilon 4$ (+):被试携带有1个或者2个 $\epsilon 4$ 等位基因;APOE $\epsilon 4$ (-):被试不携带 $\epsilon 4$ 基因; ^a:C、T等位基因频率比较; ^b:CC、CT、TT三种基因型频率之间比较; ^c:CC、CT+TT基因型频率之间比较; ^d:采用卡方检验分别对不同疾病组(AD组和aMCI组)与健康对照组(HC组)之间的等位基因和基因型分布进行比较; * :采用 Fisher 确切概率法检验

2.3 MTHFR C677T 不同基因型之间血清学指标的差异 不同 *MTHFR C677T* 基因型之间血清叶酸、维生素 B₁₂ 和 Hcy 水平的差异如下所示:在所有被试中,与 *CC*、*CT* 基因型者相比,*TT* 基因型者的血清叶酸水平明显降低($P=0.038$),血清 Hcy 水平明显升高($P=0.002$),此外,*T* 等位基因携带者(*CT+TT*)与 *CC* 基因型者的叶酸及 Hcy 水平差异有统计学意义($P=0.041$, $P=0.029$)。在不同诊断组中分别进行比较,HC 组中 *TT* 基因型者的血清 Hcy 水平均显著高于 *CC*、*CT* 基因型者($P=0.002$),同时可见到 *T* 等位基因携带者(*CT+TT*)的血清 Hcy 水平显著高于 *CC* 基因型者($P=0.005$)。而在 aMCI 组和 AD 组中,虽然在不同基因型者之间仅观察到 AD 组 *T* 等位基因携带者(*CT+TT*)叶酸水平低于 *CC* 基因型者($P=0.022$),其余血清学指标差异不显著,但是仍可观察到疾病组中 *TT* 基因型者及含 *T* 等位基因携带者(*CT+TT*)的 Hcy 水平较 *CC* 基因型者升高,叶酸水平较 *CC* 基因型者降低,见表 4。

2.4 MTHFR C677T 不同等位基因及基因型分别与 aMCI、AD 患病风险的相关性 不同亚组中 *MTHFR C677T* 的等位基因和基因型频率与 aMCI 和 AD 风险的关联分别如下所示:在 aMCI 回归模型中,尽管未直接观察到 *MTHFR C677T* 等位基因和不同基因型与 aMCI 患病风险增加的相关性,但在 *APOE ε4* 非携带者亚组中可以看到,与 *CC* 基因型相比,*TT* 基因型会增加 aMCI 的患病风险($OR =$

3.670 , $95\% CI = 1.077 - 12.509$, $P = 0.038$),但是在 *APOE ε4* 携带者中则没有相应表现,见表 5;在 AD 回归模型中,各组均未发现 *MTHFR T* 等位基因及基因型与 AD 患病风险增加存在统计学意义。见表 6。

3 讨论

由于 AD 的治疗手段有限,近年来,更多研究关注通过改变 AD 的一些可干预因素来达到预防以及延缓疾病进展的目的,本研究旨在研究 *MTHFR C677T* 多态性与 AD 和 aMCI 之间的关系,为 AD 危险因素早期识别和干预提供理论依据。

MTHFR 是 Hcy 代谢中的关键酶,在 Hcy 的再甲基化过程中发挥重要作用。*C677T* (rs1801133) 是 *MTHFR* 基因最常见的基因多态性,可导致编码的第 222 位氨基酸由丙氨酸变为缬氨酸,从而影响酶活性。同时,*MTHFR* 作为一种二聚体,其酶活性通过叶酸来稳定,突变后的 *TT* 基因型 *MTHFR* 酶活性不稳定,在 37 °C 时容易分解成单体,特别是在叶酸生物利用度降低的情况下^[7]。因此,突变的 *TT* 基因型酶活性相较于野生 *CC* 基因型显著降低,导致了 Hcy 水平增加,而这一现象在叶酸缺乏者中更甚^[8-9]。这也解释了本研究中 *MTHFR C677T* 不同基因型之间血清叶酸和 Hcy 水平的差异的原因,在所有被试中,与 *CC*、*CT* 基因型者相比,*TT* 基因型者 Hcy 水平明显升高,同时伴有血清叶酸水平显著下

表 4 *MTHFR C677T* 不同基因型之间血清叶酸、维生素 B₁₂、Hcy 的水平比较

项目	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CT+TT</i>	<i>P</i> ^a 值	<i>P</i> ^b 值
<i>N</i> = 240	85	112	43	155		
叶酸 (ng/ml)	10.29 (8.18, 13.36)	9.63 (7.11, 13.00)	8.80 (5.88, 12.90)	9.15 (6.90, 12.92)	0.038	0.041
维生素 B ₁₂ (pg/ml)	507 (394.3, 651.5)	510.5 (404.5, 644.0)	490.3 (361.0, 641.0)	507 (403, 641)	0.681	0.753
Hcy (μmol/L)	15.44 (12.40, 18.63)	16.14 (13.54, 19.51)	17.92 (15.33, 26.31)	16.75 (13.96, 21.22)	0.002	0.029
HC (<i>n</i> = 81)	25	47	9	56		
叶酸 (ng/ml)	10.4 (8.65, 13.09)	11.11 (7.93, 14.65)	10.0 (8.25, 13.50)	10.89 (7.94, 14.33)	0.951	0.818
维生素 B ₁₂ (pg/ml)	574 (372.7, 751.0)	529 (404.0, 690.0)	431 (333.4, 531.4)	517 (402.3, 645.8)	0.165	0.360
Hcy (μmol/L)	12.7 (10.90, 15.72)	14.78 (12.68, 18.52)	17.92 (15.97, 22.44)	15.15 (13.03, 18.72)	0.002	0.005
aMCI (<i>n</i> = 85)	29	35	21	56		
叶酸 (ng/ml)	9.44 (7.85, 12.94)	9.05 (6.87, 11.45)	7.18 (5.63, 12.88)	8.78 (6.26, 11.96)	0.238	0.127
维生素 B ₁₂ (pg/ml)	482 (404.0, 567.5)	473 (378.0, 580.0)	504 (329.5, 652.0)	483 (380.3, 588.8)	0.990	0.889
Hcy (μmol/L)	15.79 (13.94, 20.52)	16.95 (13.2, 21.06)	21.36 (15.64, 27.34)	17.71 (14.09, 23.25)	0.089	0.349
AD (<i>n</i> = 74)	31	30	13	43		
叶酸 (ng/ml)	11.16 (8.33, 14.82)	8.45 (6.56, 12.23)	7.14 (5.34, 12.68)	8.29 (6.04, 12.12)	0.058	0.022
维生素 B ₁₂ (pg/ml)	498 (336.0, 653.0)	503 (448.1, 696.3)	531 (394.5, 730.0)	511 (428.0, 684.0)	0.477	0.241
Hcy (μmol/L)	16.4 (13.13, 20.78)	17.35 (15.42, 21.61)	16.96 (14.74, 24.81)	17.25 (15.10, 23.30)	0.691	0.390

^a: *CC*、*CT*、*TT* 基因型之间的血清学指标比较; ^b: *CC*、*CT+TT* 基因型之间的血清学指标比较; 组间比较均采用秩和检验; 3 组之间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验; 两组之间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验

表5 不同 *MTHFR C677T* 等位基因及基因型对应的 aMCI 患病风险 OR 值和 95% 置信区间

项目	HC[n(%)]	aMCI[n(%)]	OR(95% CI)	OR (95% CI) ^a	P ^a 值
N	81	85			
等位基因					
C	97(59.9)	93(54.7)	1.00	1.00	-
T	65(40.1)	77(45.3)	1.236(0.799 - 1.910)	1.248(0.800 - 1.946)	0.328
基因型					
CC	25(30.8)	29(34.1)	1.00	1.00	-
CT	47(58.0)	35(41.1)	0.642(0.322 - 1.281)	0.557(0.270 - 1.150)	0.113
TT	9(11.1)	21(24.7)	2.011(0.781 - 5.183)	2.241(0.838 - 5.989)	0.108
CT + TT vs CC	56(69.1)	56(65.8)	0.862(0.450 - 1.652)	0.817(0.419 - 1.594)	0.554
<i>APOE ε4</i> (+)					
C	16(19.8)	23(27.1)			
等位基因					
C	15(46.9)	24(52.2)	1.00	1.00	-
T	17(53.1)	22(47.8)	0.809(0.328 - 1.997)	0.800(0.294 - 2.178)	0.662
基因型					
CC	3(18.8)	7(30.4)	1.00	1.00	-
CT	9(56.3)	10(43.5)	0.476(0.094 - 2.418)	0.432(0.072 - 2.606)	0.360
TT	4(25.0)	6(26.1)	0.643(0.101 - 4.097)	0.633(0.079 - 5.051)	0.666
CT + TT vs CC	13(81.3)	16(69.6)	0.527(0.113 - 2.455)	0.490(0.089 - 2.689)	0.411
<i>APOE ε4</i> (-)					
C	65(80.3)	62(73.0)			
等位基因					
C	82(63.1)	69(55.6)	1.00	1.00	-
T	48(36.9)	55(44.4)	1.362(0.824 - 2.250)	1.387(0.834 - 2.308)	0.208
基因型					
CC	22(33.8)	22(35.5)	1.00	1.00	-
CT	38(58.5)	25(40.3)	0.658(0.302 - 1.431)	0.549(0.241 - 1.251)	0.154
TT	5(7.7)	15(24.2)	3.000(0.929 - 9.685)	3.670(1.077 - 12.509)	0.038
CT + TT vs CC	43(66.2)	40(64.5)	0.930(0.448 - 1.933)	0.893(0.423 - 1.887)	0.768

^a:校正年龄、性别和教育程度后的值

降。不仅如此,在采用叶酸干预 HHcy 的治疗中,不同 *MTHFR C677T* 基因型者的疗效也有所差异。如 Fohr et al^[10] 发现,为 160 名女性给予叶酸干预 2 月后,TT 基因型者的血 Hcy 下降幅度超过 CT 和 CC 基因型者。因此将 *MTHFR* 基因多态性与叶酸结合,进行针对性地降低 Hcy 的精准治疗可能是一个与 AD 预防有关的干预试验研究方向。

目前公认 AD 是多基因遗传性疾病,除了最重要的遗传易感基因 *APOE ε4* 外,其他相关易感基因及环境因素也参与 AD 的发生和发展。部分荟萃分析支持 *MTHFR C677T* 多态性会增加 AD 患病的风险,并且相应的 OR 值范围为 1.2 ~ 1.5。种族或者遗传模型的差异可能会对结果产生一定影响,但大多认为在亚洲人群中,*MTHFR 677T* 等位基因是 AD 的遗传危险因素^[11-13]。*MTHFR C677T* 多态性与 AD 风险之间的关系是否受 *APOE ε4* 的影响尚不清楚。一项纳入 40 多项病例对照研究^[11],包括不同种族的 Meta 分析结果显示,*MTHFR C677T* 多态性与 AD 的风险增加相关,但是这种相关性仅存在于 *APOE ε4* 携带者中。而一项意大利的多中心,且纳

入超过 1 000 例被试的病例对照研究发现,无论是在 *APOE ε4* 携带者还是非携带者中,*MTHFR 677T* 等位基因和基因型频率均无显著差异。但是,仅在 *APOE ε4* 非携带者中,观察到 T 等位基因 (OR = 1.38; 95% CI = 1.03 - 1.85) 和 TT 基因型 (OR = 2.08; 95% CI = 1.11 - 3.90) 与 AD 风险增加有关^[14]。与上述结果类似的是,本研究中,仅在 *APOE ε4*(-) 亚组中,与 CC 基因型相比,TT 基因型与 aMCI 患病风险增加有关,但在 *APOE ε4* 携带者中则没有相应表现。*APOE ε4* 非携带者可能更容易受到 *MTHFR C677T* 多态性的影响原因可能如下:*MTHFR CC* 基因型对 AD 有保护作用,如研究^[15] 显示含有 *MTHFR 677C* 等位基因的单倍型与 AD 风险的降低有关,特别是在 *APOE ε4* 非携带者中,而 *MTHFR 677T* 风险基因可通过影响 Hcy 代谢和促进氧化应激等机制加速 AD 的进展。*APOE* 等位基因具有特异性抗氧化潜力 ($\epsilon 2 > \epsilon 3 > \epsilon 4$),在 *APOE ε4* 非携带者中,*MTHFR CC* 基因型和 *APOE* 基因可能在应对氧化应激过程中产生协同有益作用。不同研究结果之间的差异,一方面可能与研究的遗传背景

表6 不同 *MTHFR C677T* 等位基因及基因型对应的 AD 风险 OR 值和 95% 置信区间

项目	HC[<i>n</i> (%)]	AD[<i>n</i> (%)]	OR(95% CI)	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> ^a 值
<i>N</i>	81	74			
等位基因					
<i>C</i>	97(59.9)	92(62.2)	1.00	1.00	-
<i>T</i>	65(40.1)	56(37.8)	0.908(0.575-1.435)	0.921(0.580-1.463)	0.729
基因型					
<i>CC</i>	25(30.8)	31(41.9)	1.00	1.00	-
<i>CT</i>	47(58.0)	30(40.5)	0.515(0.256-1.035)	0.542(0.266-1.103)	0.091
<i>TT</i>	9(11.1)	13(17.6)	1.165(0.429-3.166)	1.162(0.423-3.191)	0.770
<i>CT+TT vs CC</i>	56(69.1)	43(48.1)	0.619(0.320-1.198)	0.647(0.331-1.266)	0.204
<i>APOE ε4</i> (+)	16(19.8)	41(55.4)			
等位基因					
<i>C</i>	15(46.9)	56(68.3)	1.00	1.00	-
<i>T</i>	17(53.1)	26(31.7)	0.410(0.178-0.945)	0.416(0.173-1.001)	0.050
基因型					
<i>CC</i>	3(18.8)	20(48.8)	1.00	1.00	-
<i>CT</i>	9(56.3)	16(39.0)	0.267(0.062-1.151)	0.330(0.072-1.517)	0.154
<i>TT</i>	4(25.0)	5(12.2)	0.188(0.031-1.122)	0.182(0.029-1.142)	0.069
<i>CT+TT vs CC</i>	13(81.3)	21(51.2)	0.242(0.060-0.979)	0.278(0.066-1.174)	0.081
<i>APOE ε4</i> (-)	65(80.3)	33(44.6)			
等位基因					
<i>C</i>	82(63.1)	36(54.5)	1.00	1.00	-
<i>T</i>	48(36.9)	30(45.5)	1.424(0.780-2.598)	1.476(0.796-2.738)	0.216
基因型					
<i>CC</i>	22(33.8)	11(33.3)	1.00	1.00	-
<i>CT</i>	38(58.5)	14(42.4)	0.737(0.285-1.902)	0.846(0.314-2.280)	0.741
<i>TT</i>	5(7.7)	8(24.2)	3.20(0.845-12.115)	3.166(0.812-12.341)	0.097
<i>CT+TT vs CC</i>	43(66.2)	22(66.6)	1.023(0.421-2.486)	1.171(0.463-2.960)	0.739

^a:校正年龄、性别和教育程度后的值

不同有关,考虑到 AD 涉及的多个因素,遗传背景或连锁不平衡模式的差异可能是导致这些区别的一个原因,在亚洲和高加索人群,或者混合人群中,*APOE ε4* 对 *MTHFR C677T* 多态性的潜在影响也不同。另一方面可能与纳入样本量的差异有关,如大部分病例对照研究中纳入的样本量较低,仅有少数研究分别纳入 300 名以上的病例和对照^[11],而同时拥有 *MTHFR C677T* 和 *APOE ε4* 基因数据的病例对照研究也相对较少^[12],从而导致了结论的差异。此外,研究选取的被试年龄范围不同、是否受到 B 族维生素的干预等也可能对结果产生一定影响。

本试验也存在如下局限:首先,本研究为单中心,小样本量的横断面病例对照研究,并不能阐明危险因素与疾病的因果关系,未来还需要大样本量、多中心的前瞻性研究、干预试验进一步明确 Hcy 在 AD 发病机制中的作用;其次,Hcy 及 *MTHFR C677T* 多态性对 AD 风险的影响仍需深入探索,尤其是在 *APOE ε4* 非携带者群体中,这为未来的精准干预及治疗策略提供一种新的可能。

参考文献

- [1] Petersen R C, Smith G E, Waring S C, et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome[J]. Arch Neurol, 1999, 56(3): 303-8.
- [2] Mattson M P, Shea T B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders[J]. Trends Neurosci, 2003, 26(3): 137-46.
- [3] Kang S S, Wong P W, Bock H G, et al. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations [J]. Am J Hum Genet, 1991, 48(3): 546-51.
- [4] Lange L A, Croteau-Chonka D C, Marvelle A F, et al. Genome-wide association study of homocysteine levels in Filipinos provides evidence for CPS1 in women and a stronger MTHFR effect in young adults[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(10): 2050-8.
- [5] McKhann G M, Knopman D S, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2011, 7(3): 263-9.
- [6] Albert M S, DeKosky S T, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease; recommen-

- dations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(3): 270-9.
- [7] Nishio K, Goto Y, Kondo T, et al. Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake[J]. *J Epidemiol*, 2008, 18(3): 125-31.
- [8] Devlin A M, Clarke R, Birks J, et al. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(3): 708-13.
- [9] Coppède F, Tannorella P, Pezzini I, et al. Folate, homocysteine, vitamin B₁₂, and polymorphisms of genes participating in one-carbon metabolism in late-onset Alzheimer's disease patients and healthy controls[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(2): 195-204.
- [10] Fohr I P, Prinz-Langenohl R, Brönstrup A, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women[J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75(2): 275-82.
- [11] Peng Q, Lao X, Huang X, et al. The MTHFR C677T polymorphism contributes to increased risk of Alzheimer's Disease: Evidence based on 40 case-control studies[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 586: 36-42.
- [12] Zhang M Y, Miao L, Li Y S, et al. Meta-analysis of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Res*, 2010, 68(2): 142-50.
- [13] Rai V. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and Alzheimer disease risk: a meta-analysis[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(2): 1173-86.
- [14] Stoccoro A, Tannorella P, Salluzzo M G, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and risk for late-onset Alzheimer's disease: further evidence in an Italian multicenter study[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 56(4): 1451-7.
- [15] Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, et al. A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is protective against late-onset Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(3): 291-4.

The clinical correlations of gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase with Alzheimer's disease

You Mengzhe¹, Zhou Xia², Yin Wenwen², Wan Ke², Sun Zhongwu²

(¹Dept of Rehabilitation, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Neurology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the correlation between the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism and disease in the course of Alzheimer's disease (AD), as well as whether whether it is affected by *APOE* gene. **Methods** A total of 74 AD patients, 85 aMCI patients and 81 healthy controls (HC) were included. The levels of serum homocysteine (Hcy), folate, and vitamin B₁₂, as well as the genotypes of *MTHFR* C677T and *APOE*, were determined. Logistic regression analysis was conducted to explore the relationship between *MTHFR* C677T polymorphism and the risk of AD and aMCI, as well as in different *APOE* ε4 subgroups. **Results** Compared with HC group, the serum Hcy levels in AD group and aMCI group were significantly higher ($P < 0.001$, $P < 0.001$), while serum folate levels in aMCI group was significantly lower ($P = 0.017$). The serum folate level was significantly lower ($P = 0.038$) in individuals with the *MTHFR* TT genotype compared to those with CC and CT genotypes, while the serum Hcy level was significantly higher ($P = 0.002$). Regression analysis showed that the *MTHFR* TT genotype might increase the risk of aMCI in the subgroup of *APOE* ε4 non-carriers ($OR = 3.670$, $95\% CI = 1.077 - 12.509$, $P = 0.038$), but not in *APOE* ε4 carriers. **Conclusion** *MTHFR* C677T polymorphism plays an important role in Hcy metabolism, which leads to increased serum Hcy levels and decreased folate levels. In *APOE* ε4 non-carriers, the *MTHFR* TT genotype may increase the risk of aMCI.

Key words Alzheimer's disease; amnesic mild cognitive impairment; methylenetetrahydrofolate reductase; homocysteine