

# 帕金森病患者血清中 A $\beta$ 1-42 含量与 MTHFR C677T 基因多态性的关联性研究

吴 奇, 韩东阳, 周莎莎, 张江宽, 李 昕

作者单位: 450000 河南, 郑州大学第二临床学院(吴 奇, 韩东阳, 张江宽); 河南, 郑州大学第二附属医院神经内科(周莎莎, 李 昕)

作者简介: 吴 奇(1991-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 衰老性疾病的诊治。E-mail: wq110610@126.com

通讯作者: 李 昕(1975-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 衰老性疾病的诊治。E-mail: lizn999@126.com

**[摘要]** **目的** 探讨帕金森病(PD)患者血清  $\beta$ -淀粉样蛋白 1-42(A $\beta$ 1-42)水平与 N5, N10-亚甲四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性的关系。**方法** 采用多聚酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性技术(PCR-RFLP)分别检测 PD 患者 50 例和正常对照组 50 名 MTHFR 基因 C677T 位点多态性, 同时测定血清 A $\beta$ 1-42 水平。**结果** PD 组 MTHFR 基因 TT 型频率为 32.0%, CT 型频率为 52.0%, CC 型频率为 16.0%; 对照组分别为 12.0%、56.0% 和 32.0%。PD 组 T 等位基因频率为 60.0%, C 等位基因频率为 40.0%; 对照组分别为 42.0% 和 58.0%。PD 组 MTHFR 基因 TT 型患者血清 A $\beta$ 1-42 水平显著低于其他两型( $F=4.831, P=0.012$ ), CT 型血清 A $\beta$ 1-42 水平显著低于 CC 型( $P<0.05$ )。**结论** PD 患者 MTHFR 基因 C677T 突变与 A $\beta$ 1-42 水平显著相关, MTHFR 基因突变可能是引起低 A $\beta$ 1-42 的一个重要遗传因素。

**[关键词]** 帕金森病; N5, N10-亚甲四氢叶酸还原酶; 基因多态性;  $\beta$ -淀粉样蛋白 1-42

**[中图分类号]** R 741.02 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)05-0533-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.05.16

**Correlation between concentration of serum A $\beta$ 1-42 and MTHFR C677T gene polymorphism in patients with Parkinson's disease** WU Qi, HAN Dong-yang, ZHOU Sha-sha, et al. The Second Clinical Medical College of Zhengzhou University, Henan 450000, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the correlation between the serum levels of  $\beta$ -amyloid 1-42(A $\beta$ 1-42) and polymorphisms of N5, N10-methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene in patients with Parkinson's disease(PD). **Methods** The polymorphisms of MTHFR C677T gene were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) technique in 50 PD patients and 50 normal controls, and their serum levels of A $\beta$ 1-42 were detected by Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA) method. **Results** The frequency of TT type of MTHFR gene in PD patients was 32.0%; the frequency of CT type was 52.0% and the frequency of CC type was 16.0%. The frequencies of TT type, CT type and CC type in the control group were 12.0%, 56.0% and 32.0% respectively. In PD group, the frequency of T allele was 60.0% and the frequency of C allele was 40.0%. In the control group, the frequency of T allele was 42.0% and the frequency of C allele was 58.0%. The serum level of A $\beta$ 1-42 in the patients with TT type of MTHFR gene in PD group was significantly lower than that in the patients with other two types( $F=4.831, P=0.012$ ), and the serum level of A $\beta$ 1-42 in CT type was significantly lower than that in CC type( $P<0.05$ ). **Conclusion** The MTHFR C677T gene mutations may be significantly associated with A $\beta$ 1-42 levels in patients with PD and the homozygous mutation in MTHFR gene may be an important genetic factor of lower A $\beta$ 1-42.

**[Key words]** Parkinson's disease(PD); N5, N10-methylenetetrahydrofolate reductase; Gene polymorphism;  $\beta$ -amyloid 1-42

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是继阿尔茨海默病后第二大常见神经退行性疾病,也是最常见

的运动障碍性疾病之一。据统计,PD 主要发生在中老年人群中,我国 65 岁以上老年人的患病率为 1.7%,

并且随着年龄的增加其患病率随之升高<sup>[1]</sup>。预计这一数字将随着国家人口老龄化而更高。目前 PD 的发病机制尚不明确。β-淀粉样蛋白 1-42(Aβ1-42)是具有神经毒性淀粉样前体蛋白的降解产物,能加速多巴胺能神经元变性<sup>[2]</sup>,被认为参与 PD 的发生发展。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是叶酸和高半胱氨酸代谢中的关键酶之一,负责 5,10-亚甲基四氢叶酸不可逆转化成 5-甲基 THF,其作为甲基供体用于将高半胱氨酸甲基化为甲硫氨酸<sup>[3]</sup>。两种最常见的 MTHFR 基因多态性, C677T(Ala222-Val, rs1801133)和 A1298C(Glu429Ala, rs1801131)已被广泛研究。据报道,这 2 个基因多态性能够影响 30.0%~50.0%的普通人群,并与 PD 的易感性显著相关,是 PD 的风险基因<sup>[4]</sup>。在本研究中,我们拟用 ELISA 法进行 Aβ1-42 定量分析,同时通过多聚酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性技术(PCR-RELP)法进行 MTHFR 基因 C677T 位点多态性分析,探讨 PD 患者外周血中二者的关系,为 PD 的临床早期诊断提供理论支持。

### 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选取 2016-06~2017-09 在神经内科收治诊断为 PD 患者 50 例,其中轻度 16 例,中度 26 例,重度 8 例。纳入标准:(1)PD 诊断标准符合《中国帕金森病的诊断标准(2016 版)》<sup>[5]</sup>;(2)首次确诊,院外未经治疗;(3)患者本人及家属知情同意并配合完成相关检查;(4)根据病史、临床表现和相关的实验室及影像学检查排除其他可能引起 Aβ1-42 及血浆同型半胱氨酸水平升高的疾病,如阿尔茨海默病、脑血管畸形、严重肝肺肾脏疾病、合并全身感染性疾病、恶性肿瘤等。50 例中男 22 例,女 28 例,年龄 49~90(71.14±9.58)岁。另选取我院体检的健康人 50 名作为对照组,其中男 25 名,女 25 名,年龄 48~89(69.58±9.47)岁。本研究经郑州大学第二附属医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

### 1.2 标本采集及测定

**1.2.1 MTHFR 基因多态性检测** (1)基因组 DNA 提取空腹采集静脉血 2 ml,置于 EDTA 抗凝管中摇匀,静置 30 min 后,在高速低温离心机内 4℃条件下以 3 000 转/min 离心 10 min;血细胞于 -20℃保存,采用 DNA 提取试剂盒(上海莱枫生物科技有限公司)提取基因组 DNA。(2)PCR 扩增采用 PCR-RFLP 分析法。引物由上海生工生物医学有限公司合成。引物 1:5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA 3';引

物 2:5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 3'。在 PCR 扩增仪上 94℃预变性 5 min,再 94℃45 s,60℃45 s,72℃50 s,循环 30 次,72℃延伸 10 min。(3)检测分析采用内切酶消化 PCR 产物,酶切产物应用 3.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.2.2 血清 Aβ1-42 测定** 空腹采集静脉血 2 ml,分离上层血清,采用 ELISA 试剂盒测定血清 Aβ1-42。以上所用试剂、仪器设备均由上海百傲科技有限公司提供。

**1.2.3 PD 患者病情评定** 应用 Hoehn-Yahr(修正)分级表记录 PD 病情严重情况。0 级:无症状;1 级:单边/侧身体受影响,但没有影响平衡;1.5 级:身体单侧受影响,并影响平衡;2 级:身体双边/侧受影响,但没有影响平衡;2.5 级:身体双边受影响,但是在拉动试验下能够自行恢复平衡;3 级:平衡受影响(轻度到中度疾病),但患者可以独立生活;4 级:无活动能力(严重),但患者可以自行走动和站立;5 级:在没有他人帮助的情况下,只能卧床或坐轮椅。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用成组 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验,对基因频率在人群中分布采用 H-W 平衡吻合度检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 两组 MTHFR 基因多态性分析结果** PCR 扩增产物片段为 246 bp,酶切结果显示 MTHFR(C677T)基因型有 CC、CT、TT 3 种,含 C 等位基因的 246 bp 片段不被酶切,含 T 等位基因的片段被酶切为 175 bp 和 198 bp 两个片段。PD 组和对照组基因分布均符合 H-W 遗传平衡定律( $P > 0.05$ )。PD 组 MTHFR(C677T)基因纯合子 TT 和杂合子 CT 发生率明显高于对照组( $P < 0.05$ )。同样,PD 组 T 等位基因频率高于对照组( $P < 0.05$ )。说明 MTHFR(C677T)位突变可能与 PD 的发生相关。见表 1。

表 1 两组 MTHFR 基因型频率及等位基因分布[n(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
PD 组	50	8(16.0)	26(52.0)	16(32.0)	40(40.0)	60(60.0)
对照组	50	16(32.0)	28(56.0)	6(12.0)	58(58.0)	42(42.0)
$\chi^2$	-		7.286			6.483
P	-		0.026			0.011

**2.2 两组血清 Aβ1-42 水平比较** PD 组血清 Aβ1-42 水平显著低于对照组( $P = 0.034$ ),提示血清 Aβ1-42 水平的下降可能是 PD 发生的一个危险因素。见表 2。

表2 两组血清 Aβ1-42 水平比较[( $\bar{x} \pm s$ ), ng/ml]

组别	例数	Aβ1-42
PD组	50	1.25 ± 0.49
对照组	50	1.47 ± 0.53
<i>t</i>	-	2.155
<i>P</i>	-	0.034

**2.3 PD 严重程度与血清 Aβ1-42 水平的关系** 随着血清 Aβ1-42 水平的降低, Hoehn-Yahr 分级逐渐增加, PD 病情加重。与轻度组比较, 中度及重度组患者血清 Aβ1-42 水平均下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 重度组患者血清 Aβ1-42 水平与中度组相比也显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示血清 Aβ1-42 水平的下降可能会导致患者病情加重, 促进 PD 进展。见表3。

表3 PD 严重程度与血清 Aβ1-42 水平的关系( $\bar{x} \pm s$ )

严重程度	例数	Aβ1-42 (ng/ml)	Hoehn-Yahr 分级
轻度	16	1.28 ± 0.34	1~2级
中度	26	1.24 ± 0.46*	2.5~3级
重度	8	1.22 ± 0.52 <sup>△#</sup>	4~5级
<i>F/Z</i>	-	2.121	3.045
<i>P</i>	-	0.044	0.031

注: 与轻度组比较, \* $P < 0.05$ , <sup>△</sup> $P < 0.01$ ; 与中度组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$

**2.4 MTHFR 不同基因型对血清 Aβ1-42 水平的影响** 在 PD 组和对照组中, 存在 MTHFR 基因 C677T 碱基突变者, 无论是 TT 型纯合子突变还是 CT 型杂合子突变, 血清 Aβ1-42 水平均显著低于无基因突变的 CC 型。见表4。

表4 MTHFR 基因型血清 Aβ1-42 水平的比较[( $\bar{x} \pm s$ ), ng/ml]

组别	例数	CC	CT	TT	<i>F</i>	<i>P</i>
PD组	50	1.38 ± 0.34	1.06 ± 0.83*	0.97 ± 0.25*	4.831	0.012
对照组	50	1.86 ± 0.67	1.48 ± 0.53*	1.09 ± 0.49**	5.162	0.009

注: 与同组 CC 型比较, \* $P < 0.05$ ; 与 CT 型比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

PD 是我国常见的神经退行性疾病, 其诊断主要基于临床表现。随着疾病的进展, PD 患者在运动和认知功能方面逐渐恶化, 这是 PD 最致残的非运动特征之一。这提示与认知功能密切相关的 Aβ1-42 可能参与 PD 的发生发展。同样, 国内外越来越多的研究表明, Aβ1-42 与 PD 密切相关<sup>[6]</sup>, Aβ1-42 水平降低是 PD 认知功能减退的独立危险因素之一<sup>[7]</sup>。

**3.1 Aβ1-42 为由膜淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 的蛋白水解切割产生的肽, 具有较强的神经毒性<sup>[8]</sup>。**

正常情况下人体大脑中 APP 合成、分解呈动态平衡, 当基因突变等原因导致 APP 分解增多时, Aβ1-42 含量积聚, 并与神经元特异性 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶 (NAKα3) 的 α 亚基相互作用<sup>[9]</sup>, 导致突触前钙超载和多巴胺能神经元变性死亡。Aβ1-42 也可通过诱导炎症级联反应、氧化应激反应, 导致神经元损伤甚至凋亡<sup>[10]</sup>。Aβ1-42 的异常聚集被认为在阿尔茨海默病发病机制中起到重要作用, 但其与 PD 的发生发展的关系仍需进一步证实。本研究采用 ELISA 技术检测外周血 Aβ1-42 含量, 与正常对照组相比, PD 患者外周血中 Aβ1-42 含量较低, Aβ1-42 的异常表达与 PD 密切相关。

**3.2 MTHFR 是一种叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 依赖性酶, 在调节叶酸和同型半胱氨酸代谢途径中起着关键作用<sup>[11]</sup>。**MTHFR 遗传基因具有多态性, C677T、A1298C 及 G1793A 编码区分别涉及 Ala222Val, Ala429Glu 和 Arg594Gln 的氨基酸替换。大量文献证实 MTHFR 通过影响同型半胱氨酸稳态参与了神经退行性疾病的病理机制<sup>[12,13]</sup>, 为 PD 的危险因素。高同型半胱氨酸血症是 PD 的独立危险因素。这些报道以及文献综述<sup>[4,14,15]</sup> 都显示, MTHFR C677T 基因型的 PD 患者的同型半胱氨酸明显增加, 尤其是对于血浆叶酸水平低的患者。然而, MTHFR 的叶酸代谢途径和其他危险因素在 PD 发病机制中可能存在协同作用。有研究<sup>[16]</sup> 发现, C677T 基因突变, 能使 MTHFR 的热敏感性改变而影响酶活性。当 MTHFR 基因发生突变时, 相关酶活性显著改变, 影响 Aβ1-42 参与的代谢水平, Aβ1-42 被大量消耗, 导致其在血清中的水平显著下降<sup>[17,18]</sup>。

综上所述, Aβ1-42 蛋白、MTHFR 共同参与了 PD 的发病过程, 这一点在本研究中也得到了证实, MTHFR C677T 基因纯合突变 (TT) 和杂合突变型 (CT) 的 Aβ1-42 蛋白水平明显低于野生型 (CC), 结果差异具有统计学意义。这些结果也进一步提示血清中 Aβ1-42 蛋白降低, 尤其携带 MTHFR C677T 突变基因的患者 Aβ1-42 蛋白的降低可以在 PD 的早期诊断、筛查、治疗及预后等方面起到重要的指导意义。

### 参考文献

- 刘疏影, 陈 彪. 帕金森病流行现状[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2016, 16(2): 98-101.
- 吴文波, 王 超, 牛德旺, 等. 血清 Aβ1-42、UA 水平和血清炎症因子与帕金森病发病的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(3): 484-486.
- Nefic H, Mackie-Djurovic M, Eminovic I. The frequency of the 677C

>T and 1298A > C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in the population[J]. Med Arch, 2018,72(3):164-169.

4 Liu L, Zhang L, Guo L, et al. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms may contribute to the risk of Parkinson's disease: A meta-analysis of 19 studies[J]. Neurosci Lett, 2018,662:339-345.

5 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组,中国医师协会神经内科医师分会帕金森病及运动障碍专业委员会. 中国帕金森病的诊断标准(2016版)[J]. 中华神经科杂志,2016,49(4):268-271.

6 Ohnishi T, Yanazawa M, Sasahara T, et al. Na, K-ATPase  $\alpha 3$  is a death target of Alzheimer patient amyloid- $\beta$  assembly[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(32):E4465-E4474.

7 Constantinides VC, Paraskevas GP, Emmanouilidou E, et al. CSF biomarkers  $\beta$ -amyloid, tau proteins and  $\alpha$ -synuclein in the differential diagnosis of Parkinson-plus syndromes[J]. J Neurol Sci, 2017,382:91-95.

8 赵明,闫雷,龚守良,等. A $\beta$ 42介导的阿尔茨海默病对小脑AMPA受体GluR2亚基及caspase-3表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(10):2436-2438.

9 Rochester L, Galna B, Lod S, et al. Decrease in A $\beta$ 42 predicts dopa-resistant gait progression in early Parkinson disease[J]. Neurology, 2017,88(16):1501-1511.

10 Stallings NR, O'Neal MA, Hu J, et al. Pin1 mediates A $\beta$ 42-induced dendritic spine loss[J]. Sci Signal, 2018, 11(522):eaap8734.

11 周佳菁,袁箐,韩峻松,等. 亚甲基四氢叶酸还原酶多态性的临

床应用研究进展[J]. 医学综述,2018,24(7):1266-1272.

12 Stocco A, Tannorella P, Salluzzo MG, 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):1451-1457.

13 Żur-Wyrozumska K, Pera J, Dziubek A, et al. Association between C677T polymorphism of MTHFR gene and risk of amyotrophic lateral sclerosis: Polish population study and a meta-analysis[J]. Neurol Neurochir Pol, 2017,51(2):135-139.

14 Yuan L, Song Z, Deng X, et al. Association of the MTHFR rs1801131 and rs1801133 variants in sporadic Parkinson's disease patients[J]. Neurosci Lett, 2016,616:26-31.

15 Zhu Y, Zhu RX, He ZY, et al. Association of MTHFR C677T with total homocysteine plasma levels and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis[J]. Neurol Sci, 2015, 36(6):945-951.

16 Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases[J]. Eur J Med Genet, 2015,58(1):1-10.

17 Terrelonge M Jr, Marder KS, Weintraub D, et al. CSF  $\beta$ -amyloid 1-42 predicts progression to cognitive impairment in newly diagnosed Parkinson disease[J]. J Mol Neurosci, 2016,58(1):88-92.

18 Bäckström DC, Eriksson Domellöf M, Linder J, et al. Cerebrospinal fluid patterns and the risk of future dementia in early, incident Parkinson disease[J]. JAMA Neurol, 2015, 72(10):1175-1182.

[收稿日期 2018-09-09][本文编辑 韦颖 韦所苏]

博硕论坛·论著

# 快通道麻醉在支撑喉镜下声带息肉摘除术中的效果观察

解冉, 王皓, 纪凡层, 岳天强

作者单位: 261000 山东, 潍坊医学院麻醉学系(解冉); 272500 山东, 汶上县人民医院康复科(王皓); 261000 山东, 潍坊市人民医院麻醉科(纪凡层); 261000 山东, 潍坊市昌乐县中医院麻醉科(岳天强)

作者简介: 解冉(1993-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床麻醉学。E-mail: 948003185@qq.com

通讯作者: 岳天强(1968-), 男, 大学本科, 副主任医师, 研究方向: 临床麻醉学。E-mail: sdcltyq@yeah.net

**[摘要]** **目的** 观察靶控输注丙泊酚瑞芬太尼复合米库氯铵的快通道麻醉在支撑喉镜手术中的临床应用效果。**方法** 选择成人择期声带息肉摘除手术患者60例, ASA I~II级, 随机分为观察组和对照组, 各30例。观察组采用靶控输注丙泊酚瑞芬太尼复合米库氯铵全凭静脉麻醉。对照组采用丙泊酚舒芬太尼复合罗库溴铵麻醉。监测两组麻醉前( $T_0$ )、插管前( $T_1$ )、插管固定后( $T_2$ )、支撑喉镜放置后( $T_3$ )、撤除喉镜后( $T_4$ )、出麻醉恢复室(PACU)( $T_5$ )的平均动脉压(MAP)、心率(HR), 记录手术时间、麻醉时间、拔管时间、PACU观察时间、PACU内Riker镇静躁动评分。**结果** 与同组 $T_0$ 相比, $T_1$ 、 $T_2$ 的MAP、HR均明显下降( $P < 0.05$ ); 与同组 $T_1$ 、 $T_2$ 、 $T_4$ 相比, $T_3$ 的MAP、HR显著升高( $P < 0.05$ )。不同时点MAP、HR水平两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。