

原发性闭角型青光眼血浆同型半胱氨酸水平及其代谢相关指标的检测分析

陈丽妃, 徐帆, 黄慧, 赵昕, 钟海彬, 李敏

基金项目: 广西自然科学基金项目(No. 2012GXNST-AA276039)
作者单位: (530021) 中国广西壮族自治区南宁市, 广西壮族自治区人民医院眼科
作者简介: 陈丽妃, 女, 毕业于广西医科大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 青光眼、眼底疾病。
通讯作者: 李敏, 女, 毕业于广州中山医科大学, 硕士, 主任医师, 眼科科主任, 研究方向: 青光眼、眼底疾病. limin00899@163.com
收稿日期: 2016-01-05 修回日期: 2016-05-05

Detection and analysis of plasma homocysteine levels and its metabolism related indicators in patients with primary angle-closure glaucoma

Li-Fei Chen, Fan Xu, Hui Huang, Xin Zhao, Hai-Bin Zhong, Min Li

Foundation item: Guangxi Natural Science Foundation (No. 2012GXNST-AA276039)

Department of Ophthalmology, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Min Li. Department of Ophthalmology, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. limin00899@163.com

Received: 2016-01-05 Accepted: 2016-05-05

Abstract

• AIM: To explore the relation of homocysteine (Hcy) and its metabolic related indicators with primary angle-closure glaucoma (PACG).

• METHODS: In this study, a total of 150 PACG patients and 150 controls were enrolled. The patients with PACG were diagnosed by applanation tonometer, Humphrey perimetry (HVF), optical coherence tomography (OCT), gonioscope. The normal controls were recruited from physical examination center. Blood samples were collected and the plasma was used to determine homocysteine, vitamin B12 and folic acid. DNA was extracted to determine the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T genotype and gene polymorphism.

• RESULTS: There was a statistically significant difference ($t=2.04, P=0.04$) in mean homocysteine levels between

patients with PACG ($16.11 \pm 1.66 \mu\text{mol/L}$) and controls ($15.74 \pm 1.52 \mu\text{mol/L}$). The level of vitamin B12 in PACG group was $248.09 \pm 119.07 \text{pg/mL}$ and the control group was $230.21 \pm 142.93 \text{pg/mL}$. No statistically significant difference was found on the vitamin B12 level between the two groups ($t=0.84, P=0.40$). The folic acid levels showed no statistically significant differences ($t=1.65, P=0.17$) between the PACG group ($12.02 \pm 7.81 \text{ng/mL}$) and the control group ($13.15 \pm 6.25 \text{ng/mL}$). The frequency distribution of the MTHFR C677T genotypes was found to be significantly associated ($\chi^2=6.2, P<0.05$) with PCAG (CC 84.7%, CT 4.7%, TT 10.7%) as compared to the controls (CC 94.7%, CT 2.0%, TT 3.3%). The frequency distribution of TT genotypes of MTHFR C677T in the PACG group was significantly higher than that in the control group. Moreover, our findings showed significant difference ($\chi^2=14.2, P<0.05$) between the allele frequency of the C677T single nucleotide polymorphism within the MTHFR gene in POAG patients (T 87.0%, C 13.0%) and the control group (T 95.7%, C 4.3%).

• CONCLUSION: These results show that the Hcy level and the TT genotypes of MTHFR C677T were higher in the PACG patients than in controls. Therefore, our data suggests that high Hcy level and the related indicators are associated with high PACG risk.

• KEYWORDS: homocysteine; vitamin B12; folic acid; MTHFR C677T; primary angle-closure glaucoma

Citation: Chen LF, Xu F, Huang H, *et al*. Detection and analysis of plasma homocysteine levels and its metabolism related indicators in patients with primary angle-closure glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(6):1092-1095

摘要

目的: 探讨同型半胱氨酸水平及其代谢相关指标与原发性闭角型青光眼的关系。

方法: 选取 150 例经压平眼压计、Humphrey 视野计 (HVF)、光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT)、房角镜等检查确诊为原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma, PACG) 的患者作为试验组和同期 150 例我院体检中心健康者为正常对照组, 抽取空腹外周静脉血, 而后测定血浆中同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 浓度、维生素 B12 及叶酸的浓度, 并提取 DNA, 检测 Hcy 代谢途径中关键酶——亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) C677T 的基因型及基因多态性。

结果:试验组血浆中 Hcy 的浓度为 $16.11 \pm 1.66 \mu\text{mol/L}$, 正常对照组为 $15.74 \pm 1.52 \mu\text{mol/L}$, 两组比较, 差异有统计学意义 ($t=2.04, P=0.04$)。试验组血浆中维生素 B12 的浓度为 $248.09 \pm 119.07 \text{pg/mL}$, 正常对照组为 $230.21 \pm 142.93 \text{pg/mL}$, 两组比较差异无统计学意义 ($t=0.84, P=0.40$)。试验组血浆中叶酸的浓度为 $12.02 \pm 7.81 \text{ng/mL}$, 正常对照组为 $13.15 \pm 6.25 \text{ng/mL}$, 两组比较差异无统计学意义 ($t=1.65, P=0.17$)。试验组 MTHFR C677T 基因型 (CC、CT、TT) 分布频率分别 84.7%、4.7%、10.7%, 正常对照组分别为 94.7%、2.0%、3.3%, 两组基因型分布频率差异具有统计学意义 ($\chi^2=6.2, P<0.05$); 其中试验组 MTHFR 基因 TT 纯合子的分布频率高于正常对照组; 试验组 MTHFR 基因 T、C 等位基因频率分别为 87.0%、13.0%, 正常对照组为 95.7%、4.3%, 两组差异具有统计学意义 ($\chi^2=14.2, P<0.05$)。

结论:PACG 患者血浆中 Hcy 的浓度及 MTHFR 基因型 TT 纯合子的分布频率高于正常对照组, 说明高 Hcy 水平及其代谢相关因素可能与 PACG 的发病与发展密切相关。

关键词:同型半胱氨酸; 维生素 B12; 叶酸; MTHFR C677T; 原发性闭角型青光眼

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.6.22

引用:陈丽妃, 徐帆, 黄慧, 等. 原发性闭角型青光眼血浆同型半胱氨酸水平及其代谢相关指标的检测分析. 国际眼科杂志 2016; 16(6):1092-1095

0 引言

青光眼是世界范围内第一位不可逆致盲性眼病, 其病理学基础是视网膜神经节细胞的凋亡, 及在此基础上导致的特征性视神经结构和功能损害。青光眼视神经损害的发病机制复杂, 目前认为主要有眼压升高的机械压迫学说和血管病变的缺血学说。视网膜视神经血管在高压作用下, 其自我调节功能会发生障碍, 进而导致视网膜和视神经的缺血。近年来研究发现, 血清同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平升高会导致血管病变^[1], 其与眼部血管病变及青光眼视神经损害的发生和发展也有一定关系^[2-3]。为此我们对一组原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma, PACG) 患者血浆 Hcy 水平及参与 Hcy 代谢的维生素 B12 和叶酸, 以及表达 Hcy 代谢关键酶——亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylentetrahydrofolate reductase, MTHFR) 的基因多态性进行检测, 旨在进一步探讨 PACG 患者血浆 Hcy 水平的变化, 以及导致 PACG 患者血浆 Hcy 变化的可能机制和意义, 现总结如下。

1 对象和方法

1.1 对象 PACG 的诊断标准: (1) 具有青光眼性视盘损害和 (或) 视神经纤维层缺损; (2) 青光眼性视野缺损; (3) 前房角镜检查显示前房角为闭角^[4]。本研究中试验组主要纳入标准: 房角狭窄或关闭, 无其他继发性因素; 眼底有典型的青光眼性视乳头凹陷、萎缩; 具有不同程度的青光眼性视野缺损。正常对照组纳入标准为: 无眼部疾病史 (屈光不正、白内障或斜视除外); 眼底视盘正常; 眼压小

于 21mmHg。试验组及正常对照组排除标准: 研究对象间有亲缘关系; 严重影响体内血管的疾病, 例如血栓、严重肾、肝、胃肠和神经系统疾病, 高血压、糖尿病、心脏病, 自身免疫性疾病, 风湿性关节炎, 类风湿关节炎; 服用维生素或激素或其他已知的影响 Hcy 浓度的药物, 例如抗抑郁药、多巴胺类药物、卡马西平、苯妥英钠、贝特类、他汀类药物、抗菌药物。本研究遵循 ARVO 宣言和医院伦理委员会批准。依据 PACG 诊断标准及本研究的纳入标准和排除标准, 收集 2013-12/2015-10 在我院经 Topcon 裂隙灯显微镜、Topcon 检眼镜、Nidek SL-20 压平眼压计、Ocular 房角镜、Zeiss Humphrey 视野计 (HVF)、Topcon 光学相干断层扫描仪 (optical coherence tomography, OCT) 等检查确诊为原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma, PACG) 的患者 150 例作为试验组, 其中男 73 例, 女 77 例, 年龄 41~87 (平均 61 ± 13.53) 岁。选取同期来我院体检中心体检的健康人 150 例为正常对照组, 其中男 74 例, 女 76 例, 年龄 45~86 (平均 61 ± 9.42) 岁。两组间研究对象的年龄及性别差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 标本搜集 禁食 10h 后, 在肘正中静脉抽取空腹静脉血 2mL 标本 3 份, 并迅速采取抗凝、避光、低温处理。于 30min 内, 送实验室采用 2000r/min 离心 10min, 取上清液, 并于 -80°C 保存, 等待下一步检测。

1.2.2 试验方法 利用循环酶法测定 Hcy 浓度, 具体检测方法如下: 于清晨空腹抽取静脉血 2mL, 置于促凝管中, 常温下离心分离血清, 并立即送检, 采用全自动生化分析仪及其配套试剂检测 Hcy。利用化学发光免疫方法检测两组间叶酸、维生素 B12 浓度, 具体检查方法如下: 在专用拇指管中加入 150 μL 血液样本, 依次加入 50 μL 裂解液和 300 μL 沉淀剂, 充分振荡 30s 至变色, 然后 11000r/min 离心 7min, 上清液倒入样品杯中。肝素抗凝血以 3500r/min 离心 10min, 取 500 μL 血浆放入样品杯中。运行化学发光免疫分析仪, 依次加入处理好的样本, 设置系统参数。运行系统, 读取数据并记录。利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法 (PCR-RFLP) 检测 MTHFR 基因型, 具体检测方法如下: 吸取 EDTA 抗凝管中外周静脉血 200 μL 至 1.5mL 离心管中, 加入 20 μL Proteinase K, 混匀。加入 200 μL 缓冲液 GB, 充分颠倒混匀, 56°C 水浴箱中放置 10min, 期间颠倒数次, 溶液变清亮。加入 200 μL 无水乙醇, 充分颠倒混匀。将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中 (吸附柱 CB3 放入收集管中), 13400g 离心 30s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CB3 放入收集管中。向吸附柱 CB3 中加入 500 μL 缓冲液 GD, 13400g 离心 30s, 倒掉收集管中的废液。向吸附柱中加入 600 μL 漂洗液 PW, 13400g 离心 30s, 倒掉收集管中废液。重复操作步骤 6 次。13400g 离心 2min, 倒掉废液。将吸附柱 CB3 至于室温放置数 10min, 以彻底晾干吸附柱材料中残余的漂洗液。将吸附柱 CB3 转入 1.5mL 离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 100 μL 洗脱缓冲液 TB, 室温放置 15min, 13400g 离心 2min, 将溶液收集到离心管中。所得 DNA 产物保存在 -20°C 。基因组 DNA 浓度测定。吸取

2 μ L DNA 样本,加入到 198 μ L 灭菌去离子水中,紫外分光光度计测量仪读取数值,重复测量,取平均值。应用 PCR 仪扩增大小约 146bp 的 DNA 片段。琼脂糖电泳,应用 2.0% 琼脂糖凝胶水平电泳检测 PCR 产物,在凝胶成像系统下观察电泳条带及 Marker (MD101) 相比位置是否正确和是否有非特异扩增。Hinf I 酶切反应体系在最适温度 37 $^{\circ}$ C 下水浴 2h。取 5 μ L 酶切产物加 0.5 μ L 6 \times Loading buffer 上样缓冲液混匀后上样,电泳缓冲液为新配制的 (0.5 \times TBE);使用时加双蒸水稀释 (5 \times TBE) 缓冲液,室温下恒压 120V 电流 320mA 电泳 30min。血浆中总 Hcy 浓度参考值为 5.90 ~ 16.00 μ mol/L,叶酸正常范围参考值为 2.00 ~ 16.00ng/mL,维生素 B12 正常范围参考值为 191.00 ~ 663.00pg/mL。

1.2.3 观察指标 记录试验组及正常对照组的血浆中总 Hcy、维生素 B12 及叶酸的浓度,MTHFR C677T 的基因型。测量的方法、标准、人员一致,以免出现测量偏倚。

统计学分析:应用 SPSS 19.0 软件进行分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验比较组间差异;采用 χ^2 检验,比较试验组和正常对照组的基因型和等位基因频率的分布。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血浆中总 Hcy 和维生素 B12 及叶酸的浓度 试验组血浆中 Hcy 的浓度为 16.11 \pm 1.66 μ mol/L,正常对照组为 15.74 \pm 1.52 μ mol/L,两组比较差异有统计学意义 ($t=2.04, P=0.04$)。试验组血浆中维生素 B12 的浓度为 248.09 \pm 119.07pg/mL,正常对照组为 230.21 \pm 142.93pg/mL,两组的差异无统计学意义 ($t=0.84, P=0.40$)。试验组血浆中叶酸的浓度为 12.02 \pm 7.81ng/mL,正常对照组为 13.15 \pm 6.25ng/mL,两组比较差异无统计学意义 ($t=1.65, P=0.17$)。

2.2 两组 MTHFR 基因 C677T 多态性电泳结果 MTHFR 基因 C677T 经内切酶 Hinf I 消化及琼脂糖凝胶电泳后,呈现三种基因型,分别为纯合子野生型 C/C、杂合子型 C/T、纯合子野生型 T/T。MTHFR 基因 C677T C/C、C/T 和 T/T 基因型分布频率在试验组分别为 84.7% (127/150), 4.7% (7/150), 10.7% (16/150), 正常对照组分别为 94.7% (142/150), 2.0% (3/150), 3.3% (5/150), 两组之间的基因型频率分布差异有统计学意义 ($\chi^2=6.2, P<0.05$); MTHFR 基因 C677T C 等位基因与 T 等位基因分布频率在试验组分别为 87.0% (267/300)、13.0% (39/300), 正常对照组分别为 95.7% (287/300)、4.3% (13/300), 两组之间的等位基因频率分布差异有统计学意义 ($\chi^2=14.2, P<0.05$)。

3 讨论

青光眼的发病与多种因素有关,比如房角解剖结构、年龄、性别、环境、基因遗传^[5]。原发性青光眼根据房角解剖形态分为原发性闭角型青光眼和原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG),其中 PACG 是中国主要的青光眼类型^[6]。我国 PACG 患病率高,预计至 2020 年患者将达到 1 009 万,约占世界 PACG 患者总数的 48%^[7],这一数据冲击迫使我们把 PACG 作为我国重要的

公共卫生问题。

青光眼的发病机制尚未完全明了。目前,青光眼的发病机制主要有两种学说,一种是机械学说,另一种是血管缺血学说。机械学说是一种比较公认的青光眼发病机制,强调的是高眼压对视神经的损害。近年来,越来越多的学者将研究方向转向了血管缺血学说,血管缺血学说中强调的是视网膜视神经血管调节障碍和相关代谢对视神经纤维的影响,降低视神经纤维及视神经对眼压的耐受力^[8]。

大量研究表明,Hcy 是公认的心脑血管疾病重要的危险因素之一^[1]。此外,Hcy 也是视网膜血管疾病的一个危险因素,比如视网膜中央静脉阻塞和视网膜中央动脉阻塞^[2];并且,环境和基因因素可引起血浆中 Hcy 浓度的改变。Hcy 水平是否与原发开角型青光眼的发病有关仍然存在争议,Johannes 等的研究表明,Hcy 的水平在原发开角型青光眼患者的血浆中是升高的^[9];Laura 等的研究表明 Hcy 与剥脱性青光眼 (pseudoexfoliative glaucoma, PXG) 的发生和发展有关,在 PXG 患者中,血浆 Hcy 水平升高;但是在原发开角型青光眼和正常人中,血浆 Hcy 水平未见明显升高^[10]。在本研究中,原发性闭角型青光眼的 Hcy 浓度为 16.11 \pm 1.66 μ mol/L,正常对照组为 15.74 \pm 1.52 μ mol/L,两组的差异较小,但差异仍具有统计学意义 ($t=2.04, P=0.04$)。Hcy 是可以反应视神经受损的敏感指标之一^[11],Hcy 可以直接对青光眼患者的视神经结构产生损害作用,亦可通过对营养视网膜和视神经血管产生的影响,间接和青光眼性视神经损害发生关系。基于本次研究结果,在原发闭角型青光眼中,除了高眼压对视神经有损害之外,Hcy 的高水平在其发病及发展中可能是一个危险因素。

作为辅助因子的 B 族维生素 (叶酸、维生素 B12、维生素 B6) 是 Hcy 代谢途径中的关键因素。因我院未能行维生素 B6 的测定,故只测定叶酸及维生素 B12 的浓度。既往的研究表明,B 族维生素的水平在各种类型的青光眼中是不一样的。Tongabay 等的研究表明,维生素 B12 的浓度在剥脱性青光眼患者、原发性开角型青光眼患者、正常眼压性青光眼患者以及正常人血浆中的差异是无统计学意义的;叶酸的浓度在剥脱性青光眼患者血浆中较正常人是明显降低的,而在原发性开角型青光眼患者、正常眼压性青光眼患者中的浓度与正常人的相比,浓度相当,差异无统计学意义^[12]。本课题研究的结果表明,维生素 B12、叶酸虽然是 Hcy 代谢组的关键辅助因子,但是它们的水平差异在原发闭角型青光眼患者和正常人中没有意义,说明 Hcy 的水平不受维生素 B12 和叶酸浓度的影响。

MTHFR 是 Hcy 代谢途径中的关键酶,它催化从 5,10-亚甲基四氢叶酸到 5-甲基四氢叶酸的还原反应。C677T-C-T 突变是 MTHFR 基因中最常见的基因突变,不同的基因型可能会影响 MTHFR 的活性。宗永华等^[13]在对 241 例的原发性高血压患者进行 Hcy 与 C677T 基因多态性关系的探索中发现,C677T 基因多态性与 Hcy 和高血压关系密切,其中 C677T 的纯合突变可能是 Hcy 升高和 H 型高血压重要遗传因素。Shazia 等研究发现,在原发闭角型青

光眼患者中,C677T的多态性会降低MTHFR的酶活性,从而导致血浆中Hcy水平的升高^[14]。在本研究中,MTHFR基因C677T C/C、C/T和T/T基因型分布频率在试验组分别为84.7%、4.7%、10.7%,正常对照组分别为94.7%、2.0%、3.3%,两组之间的基因型频率分布差异具有统计学意义($\chi^2=6.2, P<0.05$);MTHFR基因C677T C等位基因与T等位基因在实验组的分布频率分别为87.0%、13.0%,在正常对照组中分别为95.7%和4.3%,两组之间的等位基因频率分布差异有统计学意义($\chi^2=14.2, P<0.05$)。结果说明了C677T的多态性会降低MTHFR的酶活性,致使血浆中Hcy水平的升高,从而导致PACG易感。研究结果与Micheal等的研究结果一致。

在本研究中,充分说明了Hcy水平及其代谢相关指标与原发性闭角型青光眼相关,其中,Hcy水平的升高和C677T的基因多态性与原发性闭角型青光眼的发病发展密切相关,高Hcy水平可以导致神经细胞死亡及氧化损伤,是原发性闭角型青光眼的危险因素之一。这提示我们,在控制青光眼的同时积极预防和治疗高Hcy血症是有效控制青光眼高发的重要措施。

参考文献

- 1 Zhang D, Xie X, Chen Y, *et al.* Homocysteine upregulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium *in vitro* and *in vivo*. *Circ Res* 2012;110(6):808-817
- 2 Li D, Zhou M, Peng X, *et al.* Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, and risk of retinal vein occlusion: an updated meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 2014;14:147
- 3 张坤. 青光眼患者血流变、A β 、 β -EP、Hcy及眼部血流动力学指标的变化观察. *国际眼科杂志* 2014;14(5):822-824

- 4 陈翔宇,才瑜.原发性闭角型青光眼的流行病学研究及分类现状. *中华眼科杂志* 2011;47(10):949-952
- 5 Rao KN, Nagireddy S, Chakrabarti S. Complex genetic mechanisms in glaucoma: an overview. *Indian J Ophthalmol* 2011;59 Suppl:S31-42
- 6 章余兰,汪昌运,彭爱民.青光眼住院病人的疾病构成特点. *中国实用眼科杂志* 2011;29(3):284-286
- 7 Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006;90(3):262-267
- 8 李敏,黎云,徐帆,等.原发性开角型青光眼与血浆同型半胱氨酸浓度关系的研究. *广西医学* 2013;35(11):1466-1467
- 9 Roedl JB, Bleich S, Schlotzer-Schrehardt U, *et al.* Increased homocysteine levels in tear fluid of patients with primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Res* 2008;40(5):249-256
- 10 Tranchina L, Centofanti M, Oddone F, *et al.* Levels of plasma homocysteine in pseudoexfoliation glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(3):443-448
- 11 Moghimi S, Torabi H, Fakhraie G, *et al.* Dynamic contour tonometry in primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma: factors associated with intraocular pressure and ocular pulse amplitude. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2013;20(2):158-162
- 12 Cumurcu T, Sahin S, Aydin E. Serum homocysteine, vitamin B12 and folic acid levels in different types of glaucoma. *BMC Ophthalmology* 2006;23(6):6
- 13 宗永华,李小鹰,陈光亮,等.同型半胱氨酸水平与N5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的关系. *临床血管病杂志* 2011;27(3):203-207
- 14 Micheal H, Qamar R, Akhtar F, *et al.* MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and homocysteine levels in primary open angle and primary closed angle glaucoma. *Mol Vis* 2009;9(15):2268-2278