

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.014

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.014>

MTHFR 基因 C677T 位点、5-HTTLPR 基因多态性与汉族儿童孤独症的相关性

张会春, 尚清, 高超, 耿香菊

(郑州大学附属儿童医院康复科, 河南省儿童医院, 郑州儿童医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的: 探究亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)基因C677T位点及5-羟色胺转运体启动子(5-HTTLPR)基因多态性与汉族儿童孤独症之间的相关性。方法: 选择2015年2月至2018年1月于郑州大学附属儿童医院康复科门诊就诊的68例孤独症患儿及100例同期查体的健康儿童作为研究对象, 对两组儿童*MTHFR*基因C677T, 5-HTTLPR基因多态性进行分析, 比较不同组别儿童基因型差异及基因频率差异, 分析基因与疾病的关系。结果: 病例组*MTHFR*基因C677T位点TT型及CT型比例显著高于对照组($P<0.05$); 病例组T等位基因频率显著高于对照组($P<0.05$); 两组受试者5-HTTLPR位点基因型频率及基因频率比较差异无统计学意义($P>0.05$); logistic回归分析示, *MTHFR*基因C677T位点在隐性遗传模型下与孤独症存在关联($P<0.05$), 在等位基因模型下与孤独症存在关联($P<0.05$)。结论: *MTHFR*基因C677T位点多态性与孤独症相关, 而5-HTTLPR位点多态性与儿童孤独症无明显相关性。

[关键词] 亚甲基四氢叶酸还原酶; 单核苷酸; 多态; 孤独症; 5-羟色胺转运体启动子

Correlation between gene polymorphism of *MTHFR* gene C677T locus, 5-HTTLPR and autism in Han nationality children

ZHANG Huichun, SHANG Qing, GAO Chao, GENG Xiangju

(Department of Rehabilitation, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan Children's Hospital, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the relationship between the gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene C677T locus, the serotonin transporter promoter (5-HTTLPR) and autism in Han nationality children. **Methods:** A total of 68 children with autism diagnosed at the rehabilitation clinic of Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University from February 2015 to January 2018 and 100 healthy children who underwent

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-13

通信作者 (Corresponding author): 耿香菊, Email: gengxiangjua@163.com

基金项目 (Foundation item): 河南省医学科技攻关计划 (201503236, 201702323); 河南省科技发展计划项目 (182102310403)。This work was supported by the Medical Science and Technology Program of Henan Province (201503236, 201702323) and Science and Technology Development Plan Project of Henan Province (182102310403), China.

physical examination in the same period were selected as the study subjects. The gene polymorphism of *MTHFR* gene C677T and 5-HTTLPR in the 2 groups were analyzed. The differences in genotype and gene frequency were compared between the 2 groups. The relationship between genes and diseases was analyzed. **Results:** The proportion of TT and CT types in the C677T locus of *MTHFR* gene in the case group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The frequency of T allele in the case group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in genotype frequency of 5-HTTLPR locus between the 2 groups ($P>0.05$). Logistic regression analysis showed that the C677T locus of *MTHFR* gene was associated with autism under the recessive genetic model ($P<0.05$), the C677T locus of *MTHFR* gene was associated with autism under the allelic model ($P<0.05$). **Conclusion:** The polymorphism of *MTHFR* gene C677T locus is associated with autism, while the polymorphism of 5-HTTLPR locus is not associated with autism in children.

Keywords methylenetetrahydrofolate reductase; mononucleotide; polymorphism; autism; 5-serotonin transporter promoter

儿童孤独症是一种广泛发育障碍疾病, 患儿通常3岁前起病, 男性发病率高于女性, 以语言障碍、人际交往障碍、行为方式刻板及兴趣狭窄等为主要表现, 部分患儿可出现感知、思维、注意力、意志行为等认知活动功能的损伤, 严重影响患儿生长发育与身心健康^[1]。目前儿童孤独症病因尚不明确, 相关基因多态性与该病的关系日益受到广泛关注。*MTHFR*基因是调控亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)活性的主要因素, C677T位点多态性被证实与多种代谢性疾病相关^[2-3]; 5-羟色胺(5-HT)是一种神经递质, 在认知、记忆、情绪等诸多方面发挥重要作用^[4]。5-羟色胺转运体启动子(5-HTTLPR)基因启动子区域插入缺失突变与儿童孤独症的关系也备受学者关注。本研究分析了汉族儿童孤独症及正常儿童*MTHFR*基因C677T位点、5-HTTLPR的基因多态性, 旨在探究其与儿童孤独症之间的相关性, 为研究儿童孤独症的发病机制提供理论基础。

1 对象与方法

1.1 对象

选择2015年2月至2018年1月于郑州大学附属儿童医院康复科门诊就诊的68例孤独症患者作为研究对象。纳入标准: 符合儿童孤独症诊断标准^[5]; 年龄3~12岁; 汉族; 孤独症儿童行为检查量表(autism behaviour checklist, ABC)^[6]评分 ≥ 53 ; 临床资料完整, 患儿及家属对本研究知情且签署同意书。排除标准: 存在已知病因的发育障碍或其他神经功能障碍性疾病; 已进行相关治疗者。另择同期于郑州大学附属儿童医院儿保科查体的100例汉族健康儿童作为对

照, 对照组受试者经体格、发育水平、精神状况及神经系统检查, 均未发现躯体疾病、神经系统疾病及发育迟缓, 既往无重大疾病及精神病家族史。经比较, 两组患者性别组成、年龄比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经郑州大学附属儿童医院医学伦理委员会批准, 患儿家属均签署知情同意书。

1.2 方法

DNA提取: 取受试者肘静脉血, EDTA抗凝管抗凝, 采用血液基因组提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)进行血液DNA提取, 实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

PCR扩增: 通过NCBI BLAST下载*MTHFR*基因C677T, 5-HTTLPR基因序列, 采用软件Oligo7进行引物设计。2种基因引物序列及扩增序列详见表1。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

酶切及电泳分型: *MTHFR*基因C677T位点采用限制性内切酶HinfI进行酶切, 酶切体系: ddH₂O 5 μ L, HinfI 1 μ L, 10 \times Buffer 1 μ L, PCR产物3 μ L; 体系置于37 $^{\circ}$ C水浴锅孵育3 h。采用2.5%的琼脂糖凝胶进行电泳, 观察结果。5-HTTLPR基因产物不进行酶切, 直接采用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0进行数据处理与分析, 两组受试者基因型多态性比例比较采用卡方检验, 基因型与孤独症发生的关系采用logistic回归分析, 以性别、年龄、家族史等资料作为协变量, 分析基因位点在不同遗传模型中的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 *MTHFR*基因C677T, *5-HTTLPR*基因引物序列及PCR程序Table 1 *MTHFR* gene C677T, *5-HTTLPR* gene primer sequence and PCR program

引物名称	引物序列	PCR程序
MTHFR/C677T-F	5'-TTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAG-3'	95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 66 °C 30 s; 72 °C 60 s, 35个循环; 72 °C 10 min
MTHFR/C677T-R	5'-GACTGGTAGCCCTGGATGGGAAAGATCCC-3'	
5-HTTLPR-F	5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3'	95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 62 °C 30 s; 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 10 min
5-HTTLPR-R	5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'	

2 结果

2.1 两组受试者一般资料比较

两组受试者性别、年龄、家族史及家庭收入情况比较差异均无统计学意义($P>0.05$, 表2)。

2.2 两组受试者 *MTHFR* 基因 C677T 位点基因型及基因频率分析

*MTHFR*基因C677T位点PCR扩增长度为173 bp, 酶切后表现为CC(1条带, 长度为173 bp)、CT(3条带, 分别为173, 125, 48 bp)、TT(2条带, 分别为125, 48 bp)3种基因型(图1)。两组受试者基因型频率及等位基因频率比较差异有统计学意义($P<0.05$, 表3)。

2.3 两组受试者 *5-HTTLPR* 基因型及基因频率分析

*5-HTTLPR*基因经扩增后检出2种等位片段, 依次为484 bp(S型)、528 bp(L型), 受试者基因型有SS型(1条带, 484 bp)、LL型(1条带, 528 bp)、SL型(2条带, 分别为484, 528 bp; 图2)。两组受试者基因型频率及等位基因频率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$, 表4)。

2.4 基因型与孤独症发生的相关性分析

Logistic回归模型显示:*MTHFR*基因C677T位点在隐性遗传模型下与孤独症存在关联($P<0.05$), 在等位基因模型下与孤独症存在关联($P<0.05$); *5-HTTLPR*基因在不同模型下均与孤独症无关联($P>0.05$, 表5)。

表2 两组受试者一般资料比较

Table 2 Comparison of general data between the 2 groups

组别	<i>n</i>	性别(男/女)/例	年龄/岁	家族史/例	家庭年收入>5万元/例
病例组	68	55/13	5.22 ± 1.07	5	39
对照组	100	78/22	5.19 ± 0.99	3	61
t/χ^2		0.204	0.187	0.868	0.098
<i>P</i>		0.652	0.852	0.352	0.755

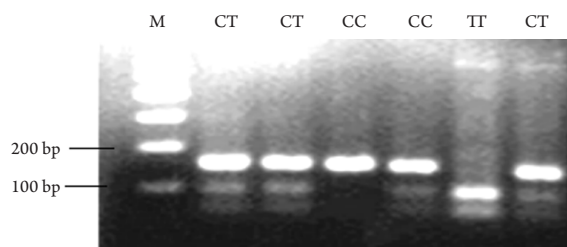
图1 *MTHFR*基因C677T位点PCR扩增结果Figure 1 *MTHFR* gene C677T site PCR amplification results

表3 两组受试者MTHFR基因C677T位点基因型及基因频率分析

Table 3 Genotype and gene frequency analysis of MTHFR gene C677T locus in two groups

组别	n	基因型分布/[例(%)]			等位基因频率/[例(%)]	
		CC	CT	TT	C	T
病例组	68	30 (44.11)	18 (26.47)	20 (29.41)	78 (57.36)	58 (42.64)
对照组	100	71 (71.00)	17 (17.00)	12 (12.00)	159 (79.50)	41 (20.50)
Z/ χ^2			9.945		14.659	
P			0.002		<0.001	

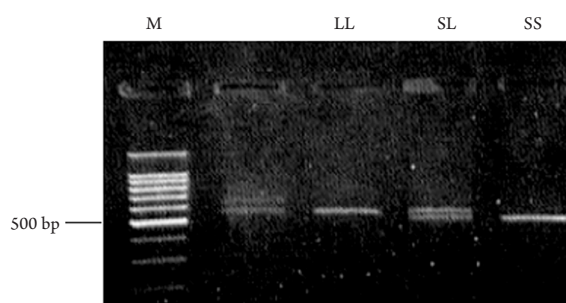


图2 5-HTTLPR基因PCR扩增结果

Figure 2 5-HTTLPR gene PCR amplification results

表4 两组受试者5-HTTLPR基因型及基因频率分析

Table 4 Genotype and gene frequency analysis of 5-HTTLPR in two groups

组别	n	基因型分布/[例(%)]			等位基因频率/[例(%)]	
		SS	SL	LL	S	L
病例组	68	39 (57.35)	20 (29.41)	9 (13.24)	98 (72.06)	38 (27.94)
对照组	100	42 (42.00)	48 (48.00)	10 (10.00)	132 (66.00)	68 (34.00)
χ^2			1.732		0.998	
P			0.188		0.318	

表5 基因型与孤独症发生的相关性分析

Table 5 Correlation analysis between genotype and autism

SNPs	遗传模型	OR (95%CI)	P
MTHFR基因C677T位点	杂合子模型	1.203 (0.986~1.526)	0.374
	纯合子模型	1.347 (0.812~1.669)	0.289
	显性模型	0.589 (0.278~0.869)	0.441
	隐性模型	2.136 (1.526~5.965)	0.037
	超显性模型	0.829 (0.668~1.965)	0.229
	等位基因模型	0.718 (0.612~1.649)	0.107
	5-HTTLPR基因	杂合子模型	0.956 (0.881~1.229)
纯合子模型		1.058 (0.921~1.338)	0.418
显性模型		0.812 (0.617~1.912)	0.526
隐性模型		0.928 (0.694~1.297)	0.334
超显性模型		0.856 (0.521~1.214)	0.189
等位基因模型		0.662 (0.807~1.029)	0.418

3 讨论

既往研究^[7]认为: 孤独症是一种遗传异质性疾病, 其发病可能与多基因调控相关。近年来, 诸多研究^[8-9]对儿童孤独症的候选基因进行研究, 结果不尽相同。人类*MTHFR*基因位于1号染色体, 其基因突变类型较多, 其中第677位CT突变与人类疾病发生最为相关。*MTHFR*基因合成的MTHFR酶主要作用是将N-5, N-10亚甲基四氢叶酸转换成N-5-MTHF, 同时参与蛋氨酸循环, 使同型半胱氨酸再甲基化形成蛋氨酸。*MTHFR*基因第677位CT突变可造成MTHFR酶活性下降, 影响DNA甲基化作用^[10]。DNA甲基化在调控神经干细胞增殖、分化及维持正常脑功能方面具有重要作用, 因此*MTHFR*基因第677位CT突变可能通过蛋氨酸循环间接影响DNA甲基化, 从而导致患儿孤独症发生风险增加^[11]。本研究对孤独症患者及健康儿童基因型进行分析, 结果显示: 孤独症患者组*MTHFR*基因C677T位点CC型显著少于正常组, 而TT型则多于正常组; 同时, 回归分析显示: *MTHFR*基因C677T位点在隐性遗传模型下及等位基因模型下与孤独症存在关联, 提示基因型为TT型的儿童可能具有更高的孤独症发生风险。赵栋等^[12]研究证实: *MTHFR*基因C677T位点发生突变的儿童患孤独症风险为该位点不发生突变患儿的3.080倍; 本研究与其研究结果类似。

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是一种机体重要神经递质, 与精神分裂症、抑郁症、焦虑症等一系列精神障碍相关, 并参与情绪、食欲、睡眠等行为能力的调节。既往研究^[13]证实: 脑内5-HT水平过高或过低均可破坏感觉皮层的突触连接, 可能为孤独症儿童感知异常、痛觉不敏感等症状的机制之一。5-HTT是存在于5-HT能神经突触前膜上的一类转运蛋白, 对5-HT高度亲和, 具有调节及运输能力^[14]。5-HTT具有2个重要的多态性位点, 其中5-HTTLPR位于基因转录启动部位上游约1 kb处, 其多态性涉及6~8个重复元件的插入(L型)或缺失(S型)。既往研究^[15]证实: 该位点基因多态性与基因转录活性高低相关, 其中S型等位基因转录活性显著高于L型。本研究结果显示: 孤独症儿童及正常儿童在基因型频率及等位基因频率方面均无明显不同, 提示该位点变异可能与孤独症相关性不强, 推测可能为5-HT受多基因调控所致。既往关于5-HTTLPR位点多态性与孤独症发生的相关性研究结果有所差异, Velasquez等^[16]报道5-HTTLPR基因型与孤独症发生相关;

Neves Mde等^[17]则认为该位点基因型与孤独症发生无显著相关; 国内近期研究^[18]也证实5-HTTLPR位点多态性与青少年重性抑郁障碍无明显关系。其差异可能与不同地域人群发病率差异有关。

综上, *MTHFR*基因C677T位点基因型为孤独症发生的相关因素, 而5-HTTLPR位点多态性与儿童孤独症无明显相关性。但本研究样本量较少, 且未将环境因素、多基因互作效应纳入分析, 2种基因位点与儿童孤独症的关系仍需进一步扩大样本量并矫正混杂因素加以证实。

参考文献

- Ginn NC, Clionsky LN, Eyberg SM, et al. Child-directed interaction training for young children with autism spectrum disorders: parent and child outcomes[J]. *J Clin Child Adolesc Psychol*, 2017, 46(1): 101-109.
- 张建武, 陈亮. MTHFR C677T位基因多态性及血浆同型半胱氨酸与冠心病心力衰竭的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(21): 50-52.
ZHANG Jianwu, CHEN Liang. Research progress of MTHFR C677T polymorphism and plasma homocysteine and coronary heart disease with heart failure[J]. *China Medical Herald*, 2017, 14(21): 50-52.
- 方绮雯, 刘振球, 王俊, 等. 上海地区孕妇MTHFR C677T基因多态性与血浆同型半胱氨酸水平的关联性分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2017, 21(7): 702-705.
FANG Qiwen, LIU Zhenqiu, WANG Jun, et al. Correlation between MTHFR C677T gene polymorphism and plasma homocysteine level in pregnant women in Shanghai[J]. *Chinese Journal of Disease Control*, 2017, 21(7): 702-705.
- 张玉向, 梁峰, 汤政, 等. 脑内5-羟色胺受体6对学习记忆和药物成瘾的调节作用[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2016, 25(4): 346-350.
ZHANG Yuxiang, LIANG Feng, TANG Zheng, et al. Regulatory effects of serotonin receptor 6 on learning and memory and drug addiction in the brain[J]. *Chinese Journal of Drug Dependence*, 2016, 25(4): 346-350.
- 邹小兵, 邓红珠. 美国精神疾病诊断分类手册第5版“孤独症谱系障碍诊断标准”解读[J]. *中国实用儿科杂志*, 2013, 28(8): 561-563.
ZOU Xiaobing, DENG Hongzhu. Interpretation of the diagnostic criteria for autism spectrum disorder in the fifth edition of the American diagnostic classification manual for mental disorders[J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*, 2013, 28(8): 561-563.
- Juneja M, Sharma S, Mukherjee SB. Sensitivity of the autism behavior checklist in Indian autistic children[J]. *J Dev Behav Pediatr*, 2010,

- 31(1): 48-49.
7. 张玉, 刘芸, 黄浩宇. 孤独症病因学的研究进展[J]. 中国全科医学, 2017, 20(11): 1392-1397.
ZHANG Yu, LIU Yun, HUANG Haoyu. Research progress in the etiology of autism[J]. Chinese Journal of General Practice, 2017, 20(11): 1392-1397.
 8. 杨友, 金志娟, 王剑, 等. 儿童孤独症谱系障碍DLGAP1基因多态性研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2016, 31(10): 761-764.
YANG You, JIN Zhijuan, WANG Jian, et al. Polymorphism of DLGAP1 gene in children with autism spectrum disorder[J]. Chinese Journal of Practical Pediatrics, 2016, 31(10): 761-764.
 9. 张英, 曾剑飞, 柯晓殷, 等. 孤独症儿童表情识别与5-HTTLPR、5-HT6、Neurexin、Neurologin基因多态性的研究[J]. 河北医药, 2016, 11(1): 9-11.
ZHANG Ying, ZENG Jianfei, KE Xiaoyin, et al. Expression recognition of autistic children and polymorphism of 5-HTTLPR, 5-HT6, Neurexin and Neurologin genes[J]. Hebei Medical Journal, 2016, 11(1): 9-11.
 10. 刘婉婉, 董宪喆, 刘屏. MTHFR-C677 T基因多态性-抑郁症治疗的新思路[J]. 中国药理学通报, 2015, 10(7): 915-919.
LIU Wanwan, DONG Xianzhe, LIU Ping. MTHFR 677 C/T polymorphism-new ideas about depressive disorder treatment[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2015, 10(7): 915-919.
 11. 黄芸, 林珊珊, 任爱国. DNA甲基化改变与神经管缺陷关系研究进展[J]. 中国生育健康杂志, 2018, 29(2): 190-193.
HUANG Yun, LIN Shanshan, REN Aiguo. Progress in the relationship between DNA methylation changes and neural tube defects[J]. Chinese Journal of Reproductive Health, 2018, 29(2): 190-193.
 12. 赵栋, 孙彩虹, 杨晓巍, 等. MTHFR基因C677T和A1298C多态性与儿童孤独症的关系[J]. 中国学校卫生, 2013, 34(1): 52-55.
ZHAO Dong, SUN Caihong, YANG Xiaowei, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase in gene C677T and A1298C polymorphism among children with autism[J]. Chinese Journal of School Health, 2013, 34(1): 52-55.
 13. 买热木古·阿布都热依木, 范桂君, 阿帕尔·卡哈尔, 等. 血清性激素、5-HT水平与围绝经期妇女抑郁焦虑的关系[J]. 国际精神病学杂志, 2016, 12(5): 848-850.
MAIREMUGU Abudureyi, FAN Guijun, APAER Kahaer, et al. The relationship of Serum sex hormone, 5-HT levels of anxiety and depression in perimenopausal women[J]. Journal of International Psychiatry, 2016, 12(5): 848-850.
 14. 章显宝, 汪燕, 王震, 等. 针刺对卒中后抑郁大鼠5-HTT、5-HT(1A)R、NE α 2R蛋白表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(9): 783-788.
ZHANG Xianbao, WANG Yan, WANG Zhen, et al. Effects of acupuncture on the expression of 5-HTT, 5-HT(1A)R and NE α 2R proteins in post-stroke depression rats[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2016, 39(9): 783-788.
 15. Luht K, Eensoo D, Tooding LM, et al. The association of measures of the serotonin system, personality, alcohol use, and smoking with risk-taking traffic behavior in adolescents in a longitudinal study[J]. Nord J Psychiatry, 2018, 72(1): 9-16.
 16. Velasquez F, Wiggins JL, Mattson WI, et al. The influence of 5-HTTLPR transporter genotype on amygdala-subgenual anterior cingulate cortex connectivity in autism spectrum disorder[J]. Dev Cogn Neurosci, 2017, 2(4): 12-20.
 17. Neves Mde C, Treméau F, Nicolato R, et al. Facial emotion recognition deficits in relatives of children with autism are not associated with 5HTTLPR[J]. Braz J Psychiatry, 2011, 33(3): 261-267.
 18. 左文博, 李淑英, 吕培培, 等. 5-HTTLPR基因多态性与首发青少年重性抑郁障碍临床特征及认知功能的相关性[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2016, 25(12): 1081-1086.
ZUO Wenbo, LI Shuying, LÜ Peipei, et al. The correlation between 5-serotonin transporter gene polymorphism and the first episode major de-pressive disorder and cognitive function in adolescents[J]. Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science, 2016, 25(12): 1081-1086.

本文引用: 张会春, 尚清, 高超, 耿香菊. MTHFR基因C677T位点、5-HTTLPR基因多态性与汉族儿童孤独症的相关性[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(1): 80-85. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.014

Cite this article as: ZHANG Huichun, SHANG Qing, GAO Chao, GENG Xiangju. Correlation between gene polymorphism of MTHFR gene C677T locus, 5-HTTLPR and autism in Han nationality children[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(1): 80-85. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.014