

口服还原型谷胱甘肽治疗不同基因型高同型半胱氨酸血症的临床观察

金开山¹, 傅春琳¹, 陆燕¹, 田海荣²(1.华东疗养院老年病科, 江苏 无锡 214065; 2.上海市第六人民医院金山分院内分泌科, 上海 201500)

摘要: 目的 观察口服还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)对亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)不同基因型高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)的治疗效果。方法 107例 HHcy患者被分为G组(55例, 口服GSH 0.2 g bid)和F组(52例, 口服叶酸片 0.4 mg bid)。所有患者抽取外周血提取DNA, 通过聚合酶链反应-芯片杂交法进行MTHFR C677T位点的基因分型(CC型、CT型和TT型)。12个月后比较2组的总体平均血清同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)浓度, 以及2组中MTHFR C677T位点不同基因型患者的平均Hcy浓度。结果 12个月后, G组、F组Hcy浓度均显著低于治疗前($P < 0.01$), G组与F组比较差异无统计学意义; 在不同基因型患者, G组、F组Hcy浓度均低于治疗前; 但在CC型患者, G组Hcy浓度降低较F组更明显($10.3 \pm 3.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs $15.5 \pm 3.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$); 在CT型患者, 2组治疗后Hcy浓度差异无统计学意义; 而在TT型患者, F组Hcy浓度降低较G组更明显($26.7 \pm 9.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs $45.5 \pm 10.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$)。结论 GSH能有效降低Hcy, 总体降低Hcy浓度效应与叶酸相近。但在MTHFR C677T CC型及TT型HHcy患者中, GSH与叶酸降低Hcy的作用有差异。GSH可作为治疗HHcy药物之一, 尤其对MTHFR C677T CC型HHcy患者, 建议优先推荐应用。

关键词: 还原型谷胱甘肽; 叶酸; 同型半胱氨酸; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性

中图分类号: R969.4 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)03-0350-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.03.018

引用本文: 金开山, 傅春琳, 陆燕, 等. 口服还原型谷胱甘肽治疗不同基因型高同型半胱氨酸血症的临床观察[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(3): 350-353.

Clinical Efficacy of Oral Reduced Glutathione in Hyperhomocysteinemia Patients with Different Genotype

JIN Kaishan¹, FU Chunlin¹, LU Yan¹, TIAN Hairong²(1.Department of Geriatrics, Huadong Sanatorium, Wuxi 214065, China; 2.Department of Endocrinology, Jinshan Branch of Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 201500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of reduced glutathione(GSH) by oral in hyperhomocysteinemia(HHcy) patients with different methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) C667T point genotype. **METHODS** One hundred and seven patients with HHcy were randomized divided into 2 groups: group G($n=55$, GSH 0.2 g bid), group F($n=52$, folic acid tablets 0.4 mg bid). In all patients, the genomic DNA was extracted from the peripheral blood by using Genomic DNA kit, and single nucleotide polymorphisms of MTHFR C667T was genotyped by PCR-chip hybridization(type CC, CT and TT). The total average serum homocysteine(Hcy) as well as the average serum Hcy of each genotype patients between the 2 groups were compared after 12 months. **RESULTS** After 12 months, compared with before treatment, the average serum Hcy of group G and group F decreased significantly($P < 0.01$), but there was not significant difference between the 2 groups. The average serum Hcy of each genotype patients in group G and group F decreased significantly. But for type CC patients, the average serum Hcy of group G decreased lower than group F($10.3 \pm 3.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs $15.5 \pm 3.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$). For type CT patients, there was not significant difference between group G and group F. While for type TT patients, the average serum Hcy of group F decreased lower than group G($26.7 \pm 9.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ vs $45.5 \pm 10.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** GSH can effectively reduce Hcy, and the overall effect of reducing Hcy concentration is similar to that of folic acid. But in MTHFR C677T CC and TT HHcy patients, the effects between GSH and folic acid may be different. GSH may be an effective method to treat HHcy, especially to those patients with HHcy of CC genotype of MTHFR C677T.

KEYWORDS: reduced glutathione; folic acid; homocysteine; methylenetetrahydrofolate reductase; gene polymorphism

还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)在临床的应用越来越广, 其对同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)的影响已引起研究者的注意。李继东等^[1]在动物实验研究中证实GSH可降低兔血清Hcy。胡郁

刚等^[2]在观察GSH治疗2型糖尿病合并脑梗死的研究中亦发现其降低Hcy的作用。但这些研究均采用GSH注射剂, 给药途径为肌肉注射和静脉滴注, 用药时间分别为8周和2周。本研究探讨长

作者简介: 金开山, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: 139152963456 E-mail: jks1218@163.com

期口服 GSH 对高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 的治疗作用, 并与叶酸比较在亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) C677T 位点不同基因型(CC 型、CT 型和 TT 型)患者中的治疗效果, 有助于临床药物干预 HHcy 时精准选择。

1 资料与方法

1.1 对象

选择 2016 年 7 月—2017 年 7 月在华东疗养院、上海市第六人民医院金山分院门诊的 HHcy 患者。HHcy 诊断标准: 轻度为血清 Hcy 浓度 $15\sim 30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、中度为 $31\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、重度为 $>100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [3]。入选患者 107 人, 年龄 24~76 岁, 平均年龄(42.75 ± 5.46)岁, 其中男性 78 例, 女性 29 例。本研究获得医院伦理委员会同意, 患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 107 例患者被分为 2 组: G 组, 55 例, 口服 GSH(阿拓莫兰, 重庆药友制药有限责任公司, 国药准字: H20050667; 规格: $0.1\ \text{g}\times 36$ 片) $0.2\ \text{g}\ \text{bid}$; F 组, 52 例, 口服叶酸片(江苏联环药业股份有限公司, 国药准字: H20044917; 规格: $0.4\ \text{mg}\times 31$ 片) $0.4\ \text{mg}\ \text{bid}$ 。2 组治疗前全部经 MTHFR C677T 位点基因多态性检测。12 个月后比较 2 组的总体血清 Hcy 浓度, 以及 2 组中 MTHFR C677T 不同基因型(CC 型、CT 型和 TT 型)患者的血清 Hcy 浓度。

1.2.2 MTHFR C677T 位点基因多态性检测 采用乙二胺四乙酸二钾抗凝管采集所有对象空腹静脉血 2~3 mL, 其中 200 μL 全血用于 DNA 核酸提取及检测。采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)-芯片杂交法检测 MTHFR C677T 位点基因多态性, 试剂盒由上海百傲科技有限公司生产, 基因芯片中设有空白与阴性对照, 如阴性对照孔与空白出现斑点, 说明受污染, 需重新检测。

1.2.3 生化指标检测 血脂、空腹血糖(FBG)、血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(Cr)、血清 Hcy 由奥林巴斯 AU5400 全自动生化分析仪(日本奥林巴斯产业株式会社)检测。糖化血红蛋白(HbA_{1c})由伯乐 D10 糖化血红蛋白检测仪(美国 Bio-Rad 公司)检测。

1.2.4 质控 本研究采用分批样本采集、测定, 通过室内质控、室间质控、定标等措施, 对不同批次样本检测进行矫正, 控制误差在允许范围。

1.3 统计学方法

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 16.0 统计软件对组间均数进行方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料

2 组患者性别比例、平均年龄、HHcy 各级病例占比、MTHFR C677T 不同基因型占比均具有可比性。见表 1。

表 1 2 组患者基本资料

Tab. 1 Basic information of 2 groups patients

项目	G 组(n=55)	F 组(n=52)
性别		
男/例(%)	40(72.7)	38(73.1)
女/例(%)	15(27.3)	14(26.9)
年龄/岁	43.04±6.03	42.88±5.73
体质量指数/ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$	22.61±0.18	23.00±0.24
血压		
收缩压/mmHg	116.23±14.45	120.31±15.22
舒张压/mmHg	70.65±9.23	68.87±10.45
血生化		
TG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.09±0.77	1.89±0.64
TC/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.03±0.66	5.11±0.72
LDL-C/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	3.12±0.49	3.08±0.45
HDL-C/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.06±0.12	0.99±0.17
FBG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.53±1.14	5.46±1.45
HbA _{1c} /%	5.18±0.46	5.13±0.51
BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.82±1.06	5.70±1.11
Cr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	78.22±22.08	76.94±21.65
高同型半胱氨酸血症分级		
轻度/例(%)	39(70.9)	38(73.1)
中度/例(%)	11(20.0)	10(19.2)
重度/例(%)	5(9.1)	4(7.7)
MTHFR C677T 基因型		
CC 型/例(%)	31(56.4)	29(55.8)
CT 型/例(%)	14(25.4)	15(28.8)
TT 型/例(%)	10(18.2)	8(15.4)
并发症情况		
高血压病/例(%)	11(20.0)	12(23.1)
冠心病/例(%)	3(5.5)	3(5.8)
2 型糖尿病/例(%)	7(12.7)	8(15.4)
用药情况		
ACEI 类药物/例(%)	3(5.5)	2(3.8)
ATII 类药物/例(%)	6(10.9)	8(15.4)
阿司匹林/例(%)	14(25.5)	16(30.8)
他汀类/例(%)	8(14.5)	6(11.5)
二甲双胍/例(%)	5(9.1)	4(7.7)

2.2 2组总体血清 Hcy 变化

12 个月后, 2 组血清 Hcy 浓度显著低于治疗前($P<0.01$)。G 组与 F 组比较差异无统计学意义。结果见表 2。

表 2 2 组总体血清 Hcy 变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Changes of the total serum Hcy between the 2 groups($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	治疗前	治疗后
G 组($n=55$)	24.8±5.5	18.3±4.2 ¹⁾
F 组($n=52$)	25.0±5.7	17.9±3.8 ¹⁾

注: 与治疗前比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with pretherapy, ¹⁾ $P<0.01$.

2.3 2 组中 MTHFR C677T 位点不同基因型患者的血清 Hcy 浓度变化

在不同基因型患者, G 组、F 组治疗后 Hcy 浓度均显著下降(G 组各基因型 $P<0.01$; F 组 CC 型 $P<0.05$, CT 型、TT 型 $P<0.01$)。但在 CC 型患者, G 组 12 个月后 Hcy 浓度降低较 F 组更明显($P<0.01$)。在 CT 型患者, 2 组治疗后 Hcy 浓度差异无统计学意义。而在 TT 型患者, F 组 Hcy 浓度降低较 G 组更明显($P<0.01$)。结果见表 3。

表 3 2 组中 MTHFR C677T 不同基因型患者血清 Hcy 浓度变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Changes of the serum Hcy of each genotype patients between the 2 groups($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	CC 型		CT 型		TT 型	
	<i>n</i>	Hcy	<i>n</i>	Hcy	<i>n</i>	Hcy
G 组	治疗前	18.4±3.5	14	41.6±9.2	10	68.4±12.2
	治疗后	10.3±3.2 ²⁾³⁾	14	24.4±6.3 ²⁾	10	45.5±10.6 ²⁾³⁾
F 组	治疗前	17.8±4.1	15	42.0±10.4	8	70.2±13.5
	治疗后	15.5±3.6 ¹⁾	15	25.0±7.1 ²⁾	8	26.7±9.8 ²⁾

注: 与治疗前比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 F 组比较, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with pretherapy, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with F group, ³⁾ $P<0.01$.

3 讨论

HHcy 是指空腹血浆总 Hcy 水平在多种原因作用下出现升高。目前国际上对 Hcy 的正常分界点尚未规范标准。我国的高血压防治指南中提出空腹血浆总 Hcy 水平 $>10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 即可定义为 HHcy, 但更多的文献将 HHcy 定义为血浆 Hcy 浓度 $>15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。HHcy 是多种疾病的危险因素, 特别是冠状动脉粥样硬化、老年性痴呆、中风、静脉血栓等心脑血管疾病。此外, 血浆中 Hcy 升高还可导致新生儿缺陷和习惯性流产。

由于 HHcy 已成为诱发多种疾病特别是心脑血管疾病的独立风险因子^[4], 因此药物治疗 HHcy 的研究正引起更多的关注。目前研究较多的药物主要有叶酸、维生素 B12、*N*-乙酰半胱氨酸^[5]、茴香脑二硫化乙砒(ADT)^[6], 及中药黄芪皂苷等^[7], 而对于叶酸治疗 HHcy 的研究最为充分, 包括不同叶酸剂量、疗程长短, 以及叶酸治疗的敏感性等。但研究显示, 补充叶酸仅能够降低血浆总 Hcy 水平的 25%~33%^[8]。随着 MTHFR C677T 基因多态性研究的广泛开展, HHcy 患者治疗前检测 MTHFR C677T 位点的基因型, 有助于选择合适的治疗方案^[9]。MTHFR 是叶酸和 Hcy 代谢途径中的一个关键酶, 在 Hcy 向蛋氨酸的转化中有重要作用, 其活性尤其受到叶酸的影响。Rosenberg 等^[10]的研究指出, MTHFR C677T 位点基因多态性是一个在 MTHFR 基因第 677 位上由胸腺嘧啶替代半胱氨酸的点突变, 其最终导致在 MTHFR 上的缬氨酸被丙氨酸替代, 使酶活性降低, 并引发一系列疾病。与 MTHFR C677T 基因多态性相关的疾病包括血管病变、肿瘤、神经病变、糖尿病、银屑病等^[11]。2014 年 Zappacosta 等研究结果表明^[12], Hcy 和血清叶酸浓度在 MTHFR C677T 的不同基因型之间有显著性差异(Hcy: TT 型均大于 CT 型和 CC 型; 血清叶酸: TT 型均小于 CT 型和 CC 型), 本研究结果与其一致。研究显示, 对于 MTHFR C677T CC 型患者, 由于 MTHFR 活性高, 叶酸转化能力正常, 应用叶酸治疗降低 Hcy 的效果欠佳^[13]。

GSH 是广泛存在于生物体内的一种生物活性肽, 由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成, 含有巯基, 是细胞内重要的还原剂, 对过氧化物、自由基和亲电子基起拮抗作用, 能清除过氧化代谢产物, 阻断脂质过氧化反应, 从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用^[14]。GSH 常用于肝病治疗^[15], 但随着研究深入, 其应用范围在不断扩大。

关于 GSH 降低 Hcy 的机制, Daniela Giustarini 等^[6]提出以下假设: 机体 80% 以上的 Hcy 以二硫键与白蛋白结合, 形成蛋白结合的 Hcy(Hcyssp)。Hcyssp 在 GSH 作用下产生游离 Hcy(f-Hcys)及蛋白结合的谷胱甘肽(GSSP), 当组织或血浆中 GSH 水平升高, 反应右移。而 f-Hcys 较 Hcyssp 具有更强的膜渗透性, 更容易被细胞摄取和降解。其反应的平衡如下: $\text{Hcyssp} + \text{GSH} \rightleftharpoons \text{f-Hcys} + \text{GSSP}$ 。

在本研究中, 笔者以较小剂量 GSH 长期口服

治疗 HHcy, 同时设立口服叶酸片的对照组, 评估 GSH 降低 Hcy 的疗效。结果显示, GSH 能有效降低 Hcy, 总体降低 Hcy 的效应与叶酸相近。但在 MTHFR C677T CC 型及 TT 型, GSH 与叶酸降低 Hcy 的作用有差异。MTHFR 与叶酸代谢更相关, 表现在 TT 型效应更强。还原型谷胱甘肽对各型也均有效, 但其在各型作用效应可能相近。由于 TT 型血清 Hcy 浓度通常更高, 使得 GSH 的效应显得不如叶酸明显。造成这个差别的原因, 可能正是两者的不同作用机制。在 MTHFR C677T CC 型, GSH 降低 Hcy 效果更优于叶酸。当然, 服用不同剂量 GSH, 以及更长时间服用 GSH, 其降低 Hcy 的效应有待进一步研究。另外, 是否也存在机体对 GSH 的敏感性, 亦值得进一步研究。

总之, 本研究显示长期口服较小剂量 GSH 能有效降低血清 Hcy, 可以作为临床上治疗 HHcy 的方法之一。尤其对于 MTHFR C677T CC 型 HHcy 患者, 可考虑优先推荐 GSH 治疗。

REFERENCES

- [1] LI J D, YAO C L. Experimental study on glutathione decrease the level of serum homocysteine in rabbits [J]. *Ningxia Med J(宁夏医学杂志)*, 2010, 32(5): 395-396.
- [2] HU Y G, WU X D, LIU X C. Clinical study on reduced glutathione in treatment of type 2 diabetes complicated with cerebral infarction [J]. *Hebei Med(河北医学)*, 2014, 20(4): 614-617.
- [3] 王新, 董丹. 小剂量叶酸联合维生素治疗高同型半胱氨酸血症的临床疗效[J]. *实用心脑血管杂志*, 2014, 22(11): 112-113.
- [4] ANSARI R, MAHTA A, MALLACK E, et al. Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review [J]. *J Clin Neurol*, 2014, 10(4): 281-288.
- [5] HILDEBRANDT W, SAUER R, BONATERRA G, et al. Oral N-acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentrations regardless of lipid or smoking status [J]. *Am J Clin Nutr* 2015, 102(5): 1014-1024.
- [6] GIUSTARINI D, FANTI P, SPARATORE A, et al. Anethole dithiolethione lowers the homocysteine and raises the glutathione levels in solid tissues and plasma of rats: a novel non-vitamin homocysteine-lowering agent [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 89(2): 246-254.
- [7] 鞠洪艳, 赵建国. 同型半胱氨酸的临床研究进展[J]. *中国医疗前沿*, 2010, 5(20): 25-26.
- [8] 刘海波. 以叶酸为基础的维生素补充治疗降低血同型半胱氨酸: 随机试验的汇总分析[J]. *英国医学杂志: 中文版*, 1998, 1(3): 119-123.
- [9] 安妮, 张阳, 宋沧桑. 叶酸代谢相关基因多态性与其个体化补充的研究进展[J]. *中国药房*, 2017, 28(17): 2446-2448.
- [10] ROSENBERG N, MURATA M, IKEDA Y, et al. The frequent 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in Whites, Japanese and Africans [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(3): 758-762.
- [11] LIEW S C, GUPTA E D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases [J]. *Eur J Med Genet*, 2015, 58(1): 1-10.
- [12] ZAPPACOSTA B, GRAZIANO M, PERSICHILLI S, et al. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(1): 1-4.
- [13] HUANG X, QIN X, YANG W, et al. MTHFR gene and serum folate interaction on serum homocysteine lowering: prospect for precision folic acid treatment [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3): 679-685.
- [14] NOMI Y, AIZAWA H, KURATA T, et al. Glutathione reacts with glyoxal at the N-Terminal [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(11): 2408-2411.
- [15] LV F M. The clinical effect of reduced glutathione in treatment of alcoholic cirrhosis [J]. *China Mod Med(中国当代医药)*, 2015, 22(2): 67.

收稿日期: 2019-04-09
(本文责编: 沈倩)