

Hcy 水平无明显差异的 H 型高血压患者 *MTHFR* C677T 基因多态性与脑卒中的相关性*

卢宏艳¹, 张晋¹, 赵英¹, 索丽¹, 李书华¹, 解娜¹, 孙艳玲¹, 武剑²

(1. 房山区第一医院 神经内科, 北京 102400; 2. 清华大学附属北京清华长庚医院 神经内科, 北京 102218)

[摘要] 目的: 探讨同型半胱氨酸(Hcy)水平无明显差异的 H 型高血压患者亚甲基四氢叶酸还原酶(*MTHFR*) C677T 基因多态性与脑卒中发生的关系。方法: 选取 500 例确诊为 H 型高血压发生急性脑卒中的患者为病例组(按血 Hcy 水平进行分层,以性别和年龄为匹配原则),选择 500 例同期从未发生脑卒中的 H 型高血压患者作为对照组;比较 2 组患者一般基线资料(糖尿病、房颤、饮酒及吸烟人数)、体格检查指标[收缩压、舒张压、心率及体质量指数(BMI)]及实验室指标[血总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及三酰甘油(TG)],比较 2 组患者 *MTHFR* C677T 基因型及等位基因频率;以有无卒中为因变量,将 $P < 0.1$ 的因素作为自变量,纳入 *Logistic* 回归分析,分析 H 型高血压患者发生脑卒中的独立危险因素。结果: 病例组的吸烟人数、血 LDL-C 浓度及 TT 基因型明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);*Logistics* 回归分析显示,吸烟($OR = 2.342, 95\% CI$ 为 $1.156 \sim 4.202$)、高 LDL-C 血症($OR = 1.050, 95\% CI$ 为 $1.026 \sim 1.075$)及 TT 基因型($OR = 0.431, 95\% CI$ 为 $0.234 \sim 0.793$)是 H 型高血压患者发生脑卒中的独立危险因素($P < 0.05$)。结论: *MTHFR* C677T 基因多态性影响 H 型高血压的脑卒中发生率,TT 基因型是 H 型高血压患者发生脑卒中的危险因素。

[关键词] 亚甲基四氢叶酸还原酶; 高血压; 卒中; 危险因素; C677T 基因多态性; 高同型半胱氨酸血症

[中图分类号] R743.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)03-0281-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.03.007

The Correlation Between *MTHFR* C677T Gene Polymorphism and Stroke in Patients with H-type Hypertension of Same Hcy Level

LU Hongyan¹, ZHANG Jin¹, ZHAO Ying¹, SUO Li¹, LI Shuhua¹, XIE Na¹, SUN Yanling¹, WU Jian²

(1. Department of Neurology, the First Hospital of Fangshan District, Beijing 102400, China; 2. Department of Neurology, the Affiliated Beijing Tsinghua Changgung Hospital of Tsinghua University, Beijing 102218, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T gene polymorphism and stroke of H-type hypertension with no significant difference in homocysteine (Hcy) level. **Methods:** A total of 500 patients diagnosed as stroke with H-type hypertension in three hospitals were selected as case group (stratified with Hcy level and matching randomly according to age and gender), 500 cases who had never had stroke were selected as control group. Two groups patients were compared with baseline data (diabetes, atrial fibrillation, drinking and smoking), physical examination index [systolic pressure, diastolic blood pressure, heart rate and body mass index (BMI)] and laboratory index [blood total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), three acyl glycerin (TG)] while two groups of patients were compared with *MTHFR* genotype and allele frequency; the dependent variable and independent variables were set and included in *Logistic* regression analysis. The independent risk factors for stroke in patients with h-type hypertension were analyzed between gene ploymorphisms in C677T of *MTHFR* and stroke. **Results:** The number of smokers, blood LDL-C

*[基金项目]“十三五”国家重点研发计划——精准医学研究专项(2016YFC0903100)

concentration and TT genotype in the case group were significantly higher than those in the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that smoking ($OR = 2.342$, 95% $CI: 1.156 \sim 4.202$), high LDL-C ($OR = 1.050$, 95% $CI: 1.026 \sim 1.075$), TT genotype ($OR = 0.431$, 95% $CI: 0.234 \sim 0.793$) were independent risk factors for stroke in patients with h-type hypertension ($P < 0.05$). **Conclusion:** *MTHFR* C677T gene polymorphism affects the incidence of stroke in H-type hypertension, the TT genotype may be a risk factor for stroke in patients with H-type hypertension while CC genotype may be a protective factor for stroke.

[**Key words**] methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH); hypertension; stroke; risk factors; C677T gene polymorphism; hyperhomocysteinemia

随着我国人口老年化以及生活水平的提高,我国脑卒中的发病率逐年升高,2017 年我国脑卒中发病率为 24.68/万人、死亡率为 11.48/万人^[1],并有流行病学调查显示,每年我国脑卒中发病率为 379/10 万,124/10 万人死于脑卒中,且每年以 8.3% 的速度上升^[2]。脑卒中有很多的危险因素,提前识别危险因素并进行干预可预防 80% 的脑卒中发生^[3]。在报道的所有危险因素中高血压和高同型半胱氨酸(hyperhomocysteinemia, Hhcy)居于首位,高血压可刺激血管、引发动脉粥样硬化,而同型半胱氨酸(Hcy)则能激活细胞组分,抑制血管内皮修复,促进炎症因子的产生,引起内膜增厚和血小板聚集,从而损伤血管^[4]。同时,Hcy 还能通过影响血管紧张素转化酶 II(angiotensin II, Ang II)的活性、一氧化氮(NO)的浓度、刺激血管平滑肌增生、降低血管顺应性及增加循环阻力而加重高血压。有 75% 的高血压患者伴有 Hhcy 血症($Hcy > 10 \mu\text{mol/L}$),称之为 H 型高血压。有研究表明,收缩压每升高 10 mmHg 可使脑卒中危险性可增加 49%^[5],而 Hhcy 血症合并高血压可使脑卒中风险增加 12.1 倍。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)是 Hcy 甲基化途径的关键酶,通过将 5,10-亚甲基四氢叶酸还原为 5-甲基四氢叶酸,后者为 Hcy 甲基化的供体^[6-7]。故 *MTHFR* 的稳定性改变可使 Hcy 甲基化减慢而浓度升高,导致 Hhcy 血症。目前研究发现 *MTHFR* 至少有 65 个基因多态性位点,其中最常见的是第 4 个外显子的第 677 位 T(胸腺嘧啶)和 C(胞嘧啶)突变。近年来对 *MTHFR* C677T 基因多态性与 Hcy 水平的研究备受关注,认为 *MTHFR* C677T 基因是 Hcy 浓度增高的影响因素,但在 Hcy 水平无明显差异的情况下,*MTHFR* C677T 基因与脑卒中的关系尚未见文献报道。因此,本研究以 H 型高血压患者为研究对象,探讨 *MTHFR*

C677T 基因多态性与 H 型高血压发生脑卒中的相关性,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2016 年 1 月 - 2017 年 12 月因急性脑卒中入院的合并 H 型高血压的患者 500 例做病例组,根据第四届全国脑血管病学术会议关于脑卒中标准诊断,按血 Hcy 水平,以每 $2 \mu\text{mol/L}$ 为梯度进行分层,以性别和年龄为匹配条件;选取同期就诊的且从未发生脑卒中的 500 例 H 型高血压患者做对照组。本研究方案经伦理委员会批准,所入患者均签署知情同意书。入组标准:(1)符合《中国高血压防治指南 2010》高血压诊断标准,(2)确诊为 H 型高血压的患者(血 $Hcy \geq 10 \mu\text{mol/L}$ 或正在进行降 Hcy 治疗),(3)签署知情同意书。排出标准:(1)存在脑肿瘤、脑血管畸形、非血管性脑卒中及创伤等患者,(2)存在明显其他躯体疾病、异常实验室检查、或研究者认为不适合入组的患者,(3)严重精神疾病、或无法表达意愿患者,(4)无法长期随访者。病例组中男 326 例、女 174 例,年龄 46 ~ 73 岁、平均 (58 ± 6.83) 岁,平均 $Hcy (19.7 \pm 7.98) \mu\text{mol/L}$;对照组中男 305 例、女 195 例,年龄 42 ~ 69 岁、平均 (55 ± 7.93) 岁,平均 $Hcy (19.3 \pm 8.07) \mu\text{mol/L}$;2 组患者一般基础资料比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。病例组的脑卒中包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中 382 例,其余类型 118 例;按照 TOAST 分型,大动脉粥样硬化性脑梗死 104 例、小动脉闭塞性脑梗死 232 例、心源性脑梗死 4 例、其他原因脑梗死 42 例及出血性脑卒中 118 人;均根据 2014 年的脑出血和脑缺血的诊断标准,经头颅 CT 或 MRI 证实。

1.2 方法

1.2.1 资料收集 所有患者在入组后进行问卷调

查,登记年龄、性别、血压、心率、身高、体质量、吸烟史、饮酒史及基础疾病等,观察患者心电图;收集血样本(全血8 mL)−20℃冷保存,检测血Hcy、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、三酰甘油(TG)、血糖(GLU)浓度,测定患者MTHFR C677T基因型。所取血样均为禁食12 h后的空腹血样。

1.2.2 Hcy水平检测 Hcy检测试剂盒(速率法)购自秦乐德医疗有限公司,取血样本5 mL恢复室温后,于3 500 r/min离心20 min,采用循环酶法检测Hcy水平。

1.2.3 MTHFR基因分型检测 MTHFR基因检测试剂盒购自北京旌准医疗科技有限公司,取血样本2 mL按DNA试剂盒说明书提取DNA,按照MTHFR基因检测试剂盒说明书要求进行PCR扩增,取产物进行酶切,用2%琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。根据酶切结果分为3种基因型:含有174及72 bp片段为TT纯合子,含有246、174及72 bp片段为CT杂合子,含有246 bp片段为CC纯合子。

1.3 观察指标

比较2组患者一般基线资料(糖尿病、房颤、饮酒及吸烟人数)、体格检查指标[收缩压、舒张压、心率及体质量指数(BMI)]及实验室检查指标[血TC、HDL-C、TG及LDL-C],比较2组患者MTHFR C677T基因型及等位基因频率;以有无卒中为因变量,将 $P<0.1$ 的因素作为自变量,纳入Logistic回归分析,分析H型高血压患者发生脑卒中的独立危险因素。

1.4 统计学分析

采用SPSS 24.0软件统计对数据进行分析,用百分比(%)表示定性资料,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示定量资料。定性资料组间比较采用 χ^2 检验,符合正态分布和方差齐性的定量资料采用 t 检验,不符合正态分布或不符合方差齐性的使用 Z 检验。将有无发生脑卒中作为因变量,各影响因素作为自变量,先进行单因素分析,然后将单因素分析中 $P<0.1$ 的因素纳入Logistic回归模型进行多因素分析H型高血压患者发生脑卒中的独立危险因素, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般基线资料、体格检查及实验室检测指标
2组患者糖尿病、房颤及饮酒人数等一般资料

比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但病例组的吸烟人数明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);2组患者体格检查指标中的收缩压、舒张压、心率及BMI比较,差异无统计学意义($P>0.05$);2组患者实验室检查指标中的血TC、HDL-C及TG浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但病例组的LDL-C浓度明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 2组患者一般基线资料、体格检查及实验室指标比较

Tab. 1 Comparison of baseline data, physical examination and laboratory indicators between the two groups				
指标	病例组	对照组	χ^2/t	P
一般基线资料[n(%)]				
糖尿病	157(31.4)	149(29.8)	0.301	0.631
心房颤动	86(17.2)	72(14.4)	1.473	0.260
吸烟	263(52.6)	179(35.8)	28.609	<0.001
饮酒	176(35.2)	154(30.8)	2.189	0.158
体格检查				
收缩压/mmHg	158.0±11.7	142.0±13.5	1.564	0.097
舒张压/mmHg	91.0±4.3	89.0±6.2	1.363	0.263
心率/次	83.0±17.5	83.7±24.0	−0.534	0.549
BMI/(kg/m ²)	23.4±4.3	22.5±5.0	2.423	0.165
实验室指标				
TC/(mmol/L)	5.9±1.6	5.7±1.6	1.842	0.164
LDL-C/(mmol/L)	2.5±0.8	2.4±1.1	2.248	0.025
HDL-C/(mmol/L)	1.4±0.5	1.5±0.6	−0.326	0.722
TG/(mmol/L)	1.3±0.6	1.2±0.7	1.617	0.129

2.2 MTHFR C677T基因型及等位基因频率
经检验,2组患者的C677T基因频率均符合Hardy-weinberg平衡定律,均具有群体代表性。结果显示,2组患者CC、CT基因型,C、T等位基因频率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);病例组患者CC、CT的TT基因型明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 2组患者MTHFR C677T基因型及等位基因频率比较

Tab. 2 Comparison of MTHFR C677T genotype and allele frequency between the two groups					
组别	MTHFR 基因型[n(%)]			等位基因/%	
	CC	CT	TT	C	T
对照组	106(21.2)	227(45.4)	158(31.6)	43.9	56.1
病例组	96(19.2)	203(40.6)	201(40.2)	39.5	60.5
χ^2	0.620	2.350	8.035	0.399	
P	0.478	0.142	0.006	0.569	

2.3 脑卒中多因素 Logistic 回归分析

以有无发生脑卒中为因变量,将 $P < 0.1$ 的吸烟、收缩压、LDL-C 浓度及 TT 基因型为自变量,纳入 Logistic 回归分析,结果显示,吸烟、高 LDL-C 血症及 TT 基因型是 H 型高血压患者发生脑卒中的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 脑卒中多因素 Logistic 回归分析

Tab. 3 Multivariate Logistic regression analysis of stroke

变量	P	OR	OR 95% CI
吸烟	0.039	2.342	1.156 ~ 4.202
收缩压	0.095	1.974	0.889 ~ 4.383
LDL-C	<0.001	1.050	1.026 ~ 1.075
TT 基因型	0.007	0.431	0.234 ~ 0.793

3 讨论

Hcy 主要由食物获取,经食物蛋白中的甲硫氨酸转化生成,为甲硫氨酸和半胱氨酸在生物合成中的正常中间产物。Hcy 可促进动脉粥样硬化的发生、发展,是心脑血管疾病的独立性危险因素^[8],血清 Hcy 水平越高,脑血管及神经损伤程度越高^[9]。有研究表明,血 Hcy 浓度每增高 5 $\mu\text{mol/L}$,可使脑卒中风险增加 59%,每降低 3 $\mu\text{mol/L}$,可使脑卒中风险下降 29%^[10]。从目前的研究来看,Hcy 的升高可从多种途径增加脑卒中的发生率,机制为:(1)主要以氧化形式存在的 Hcy,可诱导血管内皮产生氧化应激,刺激血管内皮,引起血管重构、使血管内皮增厚、硬化而易堵塞、破裂^[11];(2)Hcy 可抑制凝血酶调节蛋白的表达,并激活血小板、抑制纤溶活性,使血液粘稠,诱导血栓生成^[12-13];(3)Hcy 通过氧化应激而刺激血管收缩,减少 NO 生成及利用,降低血管顺应性而致高血压^[14];(4)Hhcy 可使 5-甲基四氢叶酸去甲基化生成四氢叶酸,而四氢叶酸是促进蛋白合成发育的重要物质,四氢叶酸减少能减弱受损内皮的修复能力,加重血管损伤;(5)Hhcy 可逆向转化生成 S-腺苷 Hcy,S-腺苷 Hcy 可抑制基因启动子区的甲基转移酶,影响启动子正常甲基化,干扰基因正常表达,促进疾病发展^[15]。所以 Hcy 的升高是脑卒中的一个危险因素。Hcy 通常有 2 种去路,一种是在 MTHFR 以及甜菜碱的作用下甲基化变成蛋氨酸,另一种途径是在胱硫醚 β 合酶(CBS)的作用下与丝氨酸生成不可逆的胱硫醚,影响其代谢的酶主要有 MTHFR、

CBS、蛋氨酸合成酶(MS)等,任何一个关键酶受损都会影响 Hcy 升高。脑血管因缺少甜菜碱甲基化的保护作用,因此 5,10- MTHFR 的活性改变是脑卒中的常见影响因素。目前发现的 MTHFR 基因型有 MTHFR C677T 基因型、MTHFR A1298C 基因型、MTHFR A66G 基因型及 MTHFD1 G158A 基因型等,其中最常见的是 C677T 基因型突变,其对血 Hcy 浓度的影响最大。

本研究发现,脑卒中患者的 TT 基因型明显多于未发生脑卒中的患者,进一步 Logistic 分析显示,TT 基因型是 H 型高血压发生脑卒中的独立危险因素。该结果与众多研究结果一致。目前有研究表明,该位点突变使 MTHFR 中的丙氨酸在转录的过程中被缬氨酸替代,使 MTHFR 具有不稳定性^[16-17],有研究指出,MTHFR C677T 基因的 TT 型能使 MTHFR 的酶活性降低 70%,而 CT 型能使 MTHFR 酶活性降低 35%^[18],这一原因可以解释为何 TT 基因型和 CT 基因型患者血 Hcy 浓度升高。但本研究还发现,即便 Hcy 水平无明显差异,MTHFR 基因的 TT 基因型仍能增加脑卒中风险。另外,根据本研究 Logistic 回归分析发现,吸烟和高 LDL-C 血症也是患者发生脑卒中的独立危险因素。该研究的不足之处在于没有记录患者的治疗方案对脑卒中发生率的影响,也没有记录患者的饮食、生活习惯,可能会对研究结果有一些干扰。目前的 H 型高血压的主要治疗方案为降压联合补充叶酸,合并或不合并 B 族维生素(维生素 B12 与维生素 B6)。国外 Meta 分析显示,强化补充叶酸可以使血浆 Hcy 的浓度降低 23%,同时补充维生素 B12 可以使 Hcy 浓度降低 30%^[19]。一项针对中国人群的饮食调查结果显示,在补充了叶酸的条件下,可使脑血管疾病的死亡率减少 37%。但是不同基因型的患者对补充叶酸的敏感性不同^[20]。Zeng 等^[21]研究发现,在相同饮食的条件下,TT 基因型女性患者的 Hcy 水平对补充叶酸敏感,而 CC 基因型和 CT 基因型对补充叶酸的敏感性较差,这类患者补充维生素 B12 较好。也有研究报道,大剂量补充叶酸可能会增加前列腺癌和肺癌的发生率,也会加重糖尿病和肾功能不全患者的负担^[22]。因此早期识别 H 型高血压患者的 MTHFR 基因型,选择合理的饮食方案进行个体化干预,才能有效减小发病率,减少不良反应。

综上所述,本研究发现 H 型高血压发生急性脑卒中的患者中吸烟人数、血 LDL-C 浓度及 TT 基

因型明显高于 H 型高血压患者;吸烟、高 LDL-C 血症及 TT 基因型是 H 型高血压患者发生脑卒中的独立危险因素。说明 *MTHFR* C677T 基因多态性影响 H 型高血压的脑卒中发生率,TT 基因型是 H 型高血压患者发生脑卒中危险因素。但该研究结果不排除以下影响因素:(1)Hcy 浓度受食物、生活等多种因素影响,而本研究所调查的卒中患者 Hcy 值为入院时 Hcy 值,非脑卒中患者的 Hcy 值为门诊就诊时的 Hcy 值,不排除研究是否受入院的规律化饮食及生活影响;(2)本研究只采取一次样本,*MTHFR* 基因的 TT 基因型的患者更容易导致 Hcy 升高,Hcy 处于较高水平的时间可能比其他基因型长,对血管损伤更严重,更容易发生心脑血管终点事件。因此,具体原因还需要进一步研究证实。

4 参考文献

[1] 孙海欣,王文志. 中国脑卒中患病率、发病率和死亡率调查结果发表[J]. 中华神经科杂志, 2017, 50(5): 337 - 337.

[2] 郭健. 中国脑卒中及其危险因素的流行特征变化趋势(2002 - 2013 年)[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(2): 211 - 211.

[3] 国家卫生计生委防治工程委员会. 中国卒中流行报告 2015[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2015.

[4] 叶扬,王先化,盖有义. 脑卒中与 H 型高血压动脉血管狭窄的临床相关性研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(48): 7 - 9.

[5] AMYTIS T, DANIELA M, BRUCE O. Pronounced association of elevated serum homocysteine with stroke in subgroups of individuals: a nationwide study[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2010, 298(1): 153 - 157.

[6] 高雨田,彭鹏,褚春沐,等. 42 例脑梗死患者血清同型半胱氨酸水平研究[J]. 黑龙江医药科学, 2015, 38(1): 86 - 87.

[7] LEHOTSKY J, PETRAS M, KOVALSKA M, et al. Mechanisms involved in the ischemic tolerance in brain: effect of the homocysteine [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(1): 7 - 15.

[8] SEN S, HINDERLITER A L, SEN P K, et al. Aortic arch atheroma progression and recurrent vascular events in patients with stroke or transient ischemic attack[J]. Circulation, 2007, 116(8): 928 - 935.

[9] 荆鑫鑫,刘鸿飞,朱金玲,等. 初发和复发性脑梗死患者血清同型半胱氨酸水平的临床研究[J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(5): 33 - 36.

[10] KIM C S, KIM Y R, NAQIV A, et al. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc [J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(3): 466 - 475.

[11] LU S S, XIE J, SU C Q, et al. Plasma homocysteine levels and intracranial plaque characteristics: association and clinical relevance in ischemic stroke[J]. BMC Neurology, 2018, 18(1): 1 - 7.

[12] BISWAS A, RANJAN R, MEENA A, et al. Homocysteine levels, polymorphisms and the risk of ischemic stroke in young Asian Indians[J]. Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases, 2009, 18(2): 103 - 110.

[13] TSENG Y, CHANG Y Y, LIU J S, et al. Association of plasma homocysteine concentration with cerebral white matter hyperintensity on magnetic resonance images in stroke patients. [J]. Journal of the Neurological Sciences, 2009, 284(1): 36 - 39.

[14] LIU S, SUN Z, CHU P, et al. EGCG protects against homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells apoptosis by modulating mitochondrial-dependent apoptotic signaling and PI3K/Akt/eNOS signaling pathways[J]. Apoptosis, 2017, 22(5): 672 - 680.

[15] 吴凯,马胜超,孙炜炜,等. 在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠和人脐静脉平滑肌细胞中同型半胱氨酸对 B1 和 Alu 重复序列甲基化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(9): 785 - 790.

[16] 施梦丽,弓园芳,陈淅泠. 同型半胱氨酸浓度及 *MTHFR* 基因多态性与缺血性脑卒中的相关性[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(17): 53 - 54.

[17] ZHOU B, BU G, LI M, et al. Tagging SNPs in the *MTHFR* gene and risk of ischemic stroke in a Chinese population. [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(5): 8931 - 8940.

[18] TRIMMER E E. Methylenetetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance[J]. Current Pharmaceutical Design, 2013, 19(14): 2574 - 2593.

[19] CLARKE R, FROST C, SHERLIKER P, et al. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2005, 82(4): 806 - 812.

[20] MARK S D, WANG W, FRAUMENI J F, et al. Lowered risks of hypertension and cerebrovascular disease after Vitamin/Mineral supplementation the linxian nutrition intervention trial[J]. American Journal of Epidemiology, 1996, 143(7): 658 - 664.

(下转第 291 页)

- Recombinant vaccines against *T. gondii*: comparison between homologous and heterologous vaccination protocols using two viral vectors expressing SAG1 [J]. Public Library of Science One, 2013,8(5):63201.
- [6] NAEEM H, SANA M, ISLAM S, et al. Induction of Th1 type-oriented humoral response through intranasal immunization of mice with SAG1-*Toxoplasma gondii* polymeric nanospheres[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2018,46(2):1025–1034.
- [7] LALEK H, GÜRBÜZ E, KARACA S, et al. Cloning DNA vaccine candidate SAG1 gene of *Toxoplasma gondii* [J]. Türkiye Parazitologjii Dergisi, 2015, 39(4):255–259.
- [8] 刘慧颖,孙玲,李淑红,等. 弓形虫 GRA1 基因核酸疫苗的试验研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2012(3):181–185.
- [9] NASERIFAR R, GHAFARIFAR F, DALIMI A, et al. Evaluation of immunogenicity of cocktail DNA vaccine containing plasmids encoding complete GRA5, SAG1, and ROP2 antigens of *Toxoplasma gondii* in BALB/C mice[J]. Iran Journal of Parasitology, 2015,10(4):590–598.
- [10] 吴彬. 弓形虫 GRA1 和 MIC3 核酸疫苗的构建及免疫反应研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2013.
- [11] 曹雪涛,熊思东,姚智. 医学免疫学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2015:204–205.
- [12] 赵海忠,李良华,宋忠旭,等. 弓形虫基因工程疫苗研究进展[J]. 湖北畜牧兽医, 2019,40(4):10–12.
- [13] 朱刚. 弓形虫 pSMART2b-SAG3 DNA 疫苗的研制及其初步应用[D]. 长春:吉林大学, 2017.
- [14] ZHOU J, LI C, LUO Y, et al. Antigenic epitope analysis and efficacy evaluation of GRA41 DNA vaccine against *T. gondii* infection [J]. Acta Parasitologica, 2019, 64(3):471–478.
- [15] CHU J Q, HUANG S, YE W E, et al. Valuation of protective immune response induced by a DNA vaccine encoding GRA8 against acute toxoplasmosis in a murine model [J]. Korean Journal of Parasitology, 2018, 56(4):325–334.
- [16] CAO A, LIU Y, WANG J, et al. *Toxoplasma gondii*: vaccination with a DNA vaccine encoding T- and B-cell epitopes of SAG1, GRA2, GRA7 and ROP16 elicits protection against acute toxoplasmosis in mice[J]. Vaccine, 2015, 33(48):6757–6762.
- [17] 王燕娟,曹建平,孙雅雯,等. 荧光蛋白报告载体观察刚地弓形虫 SAG1、MIC3、ROP2 鸡尾酒 DNA 疫苗的表达及其免疫原性的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015,33(5):368–371,376.
- [18] WANG W, FENG F, LV J, et al. Major immunodominant region of hepatitis B virus core antigen as a delivery vector to improve the immunogenicity of the fusion antigen ROP2-SAG1 multiepitope from *Toxoplasma gondii* in mice [J]. Viral Immunology, 2017,30(7):508–515.
- [19] HAJISSA K, ZAKARIA R, SUPPIAN R, et al. Immunogenicity of multiepitope vaccine candidate against *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. [J]. Iranian Journal of Parasitology, 2018,13(2):215–224.
- [20] VAZINI H, GHAFARIFAR F, SHARIFI Z, et al. Evaluation of immune responses induced by GRA7 and ROP2 genes by DNA vaccine cocktails against acute toxoplasmosis in BALB/c mice[J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2018,10(1):2–8.
- (2020-01-12 收稿,2020-03-02 修回)
中文编辑: 严征; 英文编辑: 丁廷森

(上接第 285 页)

- [21] ZENG Q, LI F, XIANG T, et al. Influence of food groups on plasma total homocysteine for specific *MTHFR* C677T genotypes in Chinese population[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(2):324–435.
- [22] FIGUEIREDO J C, GRAU M V, HAOLE R W, et al. Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2009, 101(6):432–435.
- (2020-01-07 收稿,2020-02-18 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 冉海勇