

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

**胱硫醚 - 合成酶合合合合合合合合合合 B-6 補充劑對高同
半胱胺酸血症合罹患冠狀動脈心臟病合影響**

計畫類別：個別合計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-032-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學營養科學研究所

計畫主持人：黃怡嘉

共同主持人：程建祥，李博仁

計畫參與人員：林娉婷，陳慧文

報告類合：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 14 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

胱硫醚 β -合成酶基因之多型性及維生素 B-6 補充劑對高同半胱胺酸血症罹患冠
狀動脈心臟病之影響

The effects of cystathionine β -synthase polymorphism and vitamin B-6
supplementation on hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease.

執行期間：93 年 8 月 1 日 至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃怡嘉 教授 (E-mail address : ych@csmu.edu.tw)

共同主持人：李博仁、程建祥 醫師

計畫參與人員：林娉婷、陳慧文

成果報告類型 (依經費何鄧清單規定繳交)：精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、

列管計畫及下列情形外，得立即公開查詢

涉及專利及其他智慧財產權，一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學營養科學研究所

中 華 民 國 94 年 10 月 13 日

【中文摘要】

許多研究均證實無論是禁食高同半胱氨酸血症或甲硫胺酸負荷後高同半胱氨酸血症是造成冠狀動脈心臟病的重要獨立危險因子。導致高同半胱氨酸血症的原因很多，其中胱硫醚 β -合成酶（Cystathionine β -Synthase; CBS）]缺陷已經受到廣泛的重視。本計畫目的為：1)了解心血管疾病族群及健康族群的 CBS 844ins68 基因之多型性之分布；2)探討 CBS844ins68 基因之多型性對血漿同半胱氨酸濃度之關聯、血液 B-維生素營養狀況之影響及罹患心血管疾病危險性(odds ratio)之影響。結果顯示 CAD 組之受試者發現有較高的 CBS 844ins68 插入突變頻率，且 CBS 844ins68 基因型對維生素 B-12 濃度有顯著之影響。但此插入突變對血漿同半胱氨酸濃度、血清葉酸、血漿 PLP 濃度及 CAD 罹患率並無險之影響。

【關鍵字】：心血管疾病、血漿同半胱氨酸、葉酸、維生素 B-12、維生素 B-6、胱硫醚 β -合成酶基因。

【Abstract】

Many factors are associated with the elevation of plasma homocysteine; of particular interest are nutritional deficiencies (folic acid, vitamin B-6 and B-12) and genetic defects (methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) or cystathionine β -synthase (CBS) deficiency). Recently, the effects of CBS 844ins68 gene polymorphism on hyperhomocysteinemia and/or CAD mortality have been paid much attention. The purpose of the first year is going to:

1) to investigate CBS 844ins68 polymorphism in CAD and health subjects by using restriction fragment length-polymerase chain reaction (RFLP-PCR); 2) to determine the effects of CBS 844ins68 polymorphism on serum folate, vitamin B-12 and plasma pyridoxal 5'-phosphate concentration; 3) to investigate the effects of CBS 844ins68 polymorphism on plasma homocysteine and CAD mortality. The results shows CAD group had significantly higher insertion frequency of CBS 844ins68 genotypes. It is interesting to find CBS 844ins68 had significantly effect on vitamin B-12 level. However, there had no effect on plasma homocysteine concentration, serum folate, plasma pyridoxal-5'-phosphate value and CAD mortality.

【Key words】: Cardiovascular disease, Homocysteine, Folate, Vitamin B-12, Vitamin B-6, Cystathionine β -Synthase

【計畫緣由與目的】

許多研究均證實無論是禁食高同半胱氨酸血症或甲硫胺酸負荷後高同半胱氨酸血症是造成冠狀動脈心臟病的重要獨立危險因子。導致高同半胱氨酸血症的原因很多，其中酵素基因[如：5，10-甲基四氫葉酸還原酶或胱硫醚 β -合成酶（Cystathionine β -Synthase; CBS）]缺陷已經受到廣泛的重視。CBS 844ins68 突變基因對於同半胱氨酸的代謝及罹患冠狀動脈心臟病的影響已被熱烈的討論。最近的一些研究都顯示

具有 CBS 844ins68 異型合子基因型 (+/-) 的受試者其血漿同半胱胺酸濃度顯著低於 CBS 同型合子之基因型 (+/+; -/-) 之受試者。然而，並非所有研究都認為 CBS 844ins68 的基因突變有降低血漿同半胱胺酸濃度及對心血管疾病具有保護效果。

CBS 為一獨特含血紅素之酵素，其需要維生素 B-6 (Pyridoxal 5'-Phosphate; PLP) 作為輔酶來參與絲胺酸的縮合反應及促使同半胱胺酸轉硫作用形成胱硫醚 (Cystathionine)，故 CBS 為一維生素 B-6 依賴型酵素。然而，有關 CBS 844ins68 異型合子基因型的活性與血漿 PLP 濃度相關性的研究卻不多。我們認為若能了解一個種族其基因的多型性分布及環境對基因的影響，以及了解基因多型性與其相關參與代謝途徑的相關性將可以提供治療與此基因多型性相關疾病的參考。本計畫目的為：1) 了解心血管疾病族群及健康族群的 CBS 844ins68 基因之多型性之分布；2) 探討 CBS844ins68 基因之多型性對血漿同半胱胺酸濃度之關聯、血液 B-維生素營養狀況之影響及罹患心血管疾病危險性(odds ratio)之影響。希望透過本研究計畫了解台灣冠狀動脈心臟病病人 CBS 844ins68 基因型之多型性分佈情形及其基因之多型性是否會對血漿同半胱胺酸濃度有所影響，進而增加罹患冠狀動脈心臟病之危險性。

【研究方法】

本研究 CAD 組受試者由台中榮總心臟內科門診取得。經心導管檢查診斷冠狀動脈狹窄程度大於 70 % 者 (CAD group; 186 位); 而檢查小於 70

% 者非 CAD 組 (Reference group; 72 位)。另外，於台中榮總健檢病人依其血清生化值 (包括：血清尿素氮、肌肝酸、天門冬胺酸胺基轉化酶、丙胺酸胺基轉化酶、血脂質濃度) 收集 321 位健康受試者 (Health group)。此外，本研究通過人體試驗委員會且所有受試者均簽署同意書。

利用不含及含有抗凝血劑(EDTA)之真空採血管分別採集所有受試者空腹禁食至少 8 小時後的 10 ml 全血，來進行以下的分析：

- (1) 血漿同半胱胺酸及半胱胺酸之濃度：方法參考 Araki 及 Sako (1987)，以高效能液相層析法來測量血漿同半胱胺酸及胱胺酸的含量。使用的分離管柱為 LiChrospher® 100 RP-18e (250 mm × 4 mm I.D, Merck)。移動相為 0.1 M KH₂PO₄，3.5% acetonitrile，pH=3.5，流速為 1.2 ml/min，螢光檢測器之 excitation 波長為 385 nm，emission 波長為 515 nm。
- (2) 血清葉酸及維生素 B-12 濃度：利用 competitive Immunoassay 分析，及於室溫下進行化學發光的技術 (chemiluminescent technology) 來測定其含量。係採用 Bayer 公司專門分析葉酸的 kit package (ACS: 180® Automated Chemiluminescence System)。
- (3) 血漿磷酸比哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate; PLP) 濃度：方法參考 Bates 等人 (1999) 的方法，以高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析

血漿 PLP 之濃度。使用之管柱為 symmetry shield RP8 (內徑 5 μ m, 4.6 \times 250 mm I.D., Waters, 愛爾蘭)。移動相 (mobile phase) 包含 75 mmol/L 的 semicarbazide hydrochloride (H₂NCONHNH₂ · HCL) 和 50 mmol/L 的 KH₂PO₄, 以 H₃PO₄ 調整酸鹼值至 2.85。幫浦流速為 1.5 mL/min。螢光偵測器, excitation 波長為 325 nm, emission 波長為 418 nm。

(4) CBS 基因多型性之分析：

DNA extraction: 方法參考 Sambrook 等人 (1994)。CBS 基因 844ins68 多型性分析方法參考 Giusti 等人 (1999)、Zhang 等人 (2001)。

利用 Primers E :

5'-CTGGCCTTGAGCCCTGAA-3' 及 F : 5'-GGCCGGGCTCTGGACTC-3'。

利用 PCR 來將基因增幅 (95 $^{\circ}$ C, 5 分鐘 \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 50 秒, 61 $^{\circ}$ C, 50 秒, 72 $^{\circ}$ C, 1 分鐘, 循環 30 次 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 10 分鐘)。利用 *Bsr*I 內切酶切割後以 3% 洋菜電泳分析。

資料分析使用 SigmaState statistical software (version 2.03; Jandel Scientific, San Rafael, CA)。利用 t-test 來比較兩組數值之差異。利用史匹曼等級相關性 (Spearman rank order correlation) 來探討 CBS 844ins68 基因型之血漿同半胱胺酸與 B-維生素之相關性。以複迴歸分析 (Multiple linear regression) 探討 CBS 基因及 B-維生素對血漿同半胱胺酸濃度之影響。最後利用邏輯式迴歸 (Multiple logistic regression) 探討 CBS 基因之多型性對罹患心血管疾病危險性之影響。所有

統計結果設定在 *p* 值小於 0.05 才具有統計上的意義。

【結果與討論】

【表一】為受試者基本資料。結果顯示：CAD 與 Reference 組的年齡、BMI 及收縮壓顯著高於 Health 組。CAD 組的血脂質濃度 (總膽固醇、低密度脂蛋白及總膽固醇與高密度脂蛋白比值)、血清肌肝胺酸、超敏感反應性蛋白、血漿同半胱胺酸及血清葉酸濃度皆顯著高於 Reference 或 Health 組；但高密度脂蛋白及血漿 PLP 濃度則顯著低於 Reference 或 Health 組。在 CBS 844 ins 68 基因分布方面, CAD 組插入 (insertion) 的頻率顯著高於 Health 組；而在 Reference 組並無發現有 CBS 844ins68 插入突變基因之受試者。此外, 三組在於抽煙、喝酒之頻率並無顯著之差異。

【表二】為 CBS 844ins68 基因型對血漿同半胱胺酸及 B-維生素濃度之影響。由於 Reference 組並無發現有 CBS 844ins68 插入突變基因之受試者, 因此表二只探討 CAD 及 Health 組之數值。結果發現在調整年齡、性別等因子後 CBS 844ins68 基因型對血漿同半胱胺酸、血清葉酸及血漿 PLP 濃度無顯著之影響。有趣的是發現在 CAD 組及合併組 (pooled group), CBS 844ins68 對血清維生素 B-12 濃度有顯著之影響。

【表三】為 CBS 844ins68 基因型與血漿同半胱胺酸濃度對 CAD 罹患之勝算比 (Odds ratio; OR)。調整年齡、性別、血漿同半胱胺酸及 B-維生素後發現 CBS 844ins68 基因型對 CAD 罹患之勝算比並無顯著影響。但當血漿

同半胱胺酸濃度大於或等於 12 $\mu\text{mol/L}$ 時，受試者罹患 CAD 的機會是血漿同半胱胺酸濃度小於 12 $\mu\text{mol/L}$ 的 4.44 倍（95% 信賴區間 = 2.03 – 9.70； $P < 0.001$ ）。

【結論】

雖然在 CAD 組之受試者發現有較高的 CBS 844ins68 插入突變頻率，但此插入突變對 CAD 罹患率卻並無險之影響。

【計畫成果自評】

本研究計畫內容與原先計畫相評目前已達 100%。受試者的取得順利，原因為參與本研究計畫的心臟科醫生全力支持與協助。此外，此研究計畫成果未來將發表於 SCI 期刊。

【參考文獻】

Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 422: 43-52.

Bates CJ, Pentieva KD, Matthews N, Macdonald A. A simple, sensitive and reproducible assay for pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human plasma. *Chin Chim Acta* 1999;280:101

Giusti B, Camacho-Vanegas O, Attansio M, Comeglio P, Gori AM, Brunelli T, Prisco D, Gensini GF, Abbate R, Pepe G. Microheterogeneity in the distribution of the 844ins68 in the cystathionine

β -synthase gene in Italy. *Thromb Res* 1999: 249-54.

Sambrook J, Fritsch EE, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Zhang G, Dai C. Gene polymorphism of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular disease. *Thromb Res* 2001; 104: 187-95.

表一：受試者之基本資料

Characteristics	Groups		
	CAD group (<i>n</i> = 186)	Reference group (<i>n</i> = 72)	Health group (<i>n</i> = 321)
Male / Female	148/38	46/26	168/153
Age (y)	68.0 ± 11.0 ^a	66.6 ± 10.2 ^a	49.8 ± 11.1 ^b
BMI (kg/m ²)	25.3 ± 3.3 ^a	24.7 ± 3.2 ^a	23.5 ± 3.2 ^b
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	131.1 ± 19.3 ^a	132.1 ± 21.4 ^a	116.9 ± 16.4 ^b
Diastolic	73.3 ± 12.9	73.6 ± 12.7	73.7 ± 10.9
Cholesterol (mg/dL)			
Total	190.3 ± 43.7 ^a	171.5 ± 37.4 ^b	185.4 ± 30.7 ^a
HDL	41.7 ± 10.6 ^a	45.1 ± 12.7 ^a	61.6 ± 14.5 ^b
LDL	124.1 ± 38.2 ^a	110.7 ± 31.3 ^b	101.1 ± 29.2 ^b
Total cholesterol/HDL ratio	4.8 ± 1.4 ^a	4.0 ± 1.1 ^b	3.2 ± 0.8 ^c
Triacylglycerol (mg/dL)	153.9 ± 95.7 ^a	124.3 ± 67.9 ^{ab}	114.8 ± 70.1 ^b
hs-CRP (mg/dL)	1.1 ± 2.7 ^a	0.5 ± 1.3 ^b	0.1 ± 0.3 ^c
Serum creatinine (mg/dL)	1.4 ± 1.5 ^a	1.1 ± 1.6 ^b	1.0 ± 0.2 ^a
CBS 844ins68 genotypes			
Wild type (<i>n</i> ;%)	182 (97.3%)	72 (100%)	320 (99.7%)
Insertion (<i>n</i> ;%)	5 (2.7%) ^a	0 (0%)	1 (0.3%) ^b
Plasma homocysteine (μmol/L)	13.0 ± 6.3 ^a	10.3 ± 3.3 ^b	9.4 ± 3.7 ^c
Serum folate (ng/mL)	15.4 ± 9.2 ^a	16.4 ± 7.9 ^a	10.9 ± 5.3 ^b
Serum vitamin B-12 (pg/mL)	507.1 ± 293.7	546.6 ± 198.6	497.2 ± 186.7
Plasma PLP (nmol/L)	40.4 ± 41.6 ^a	40.1 ± 67.8 ^a	66.3 ± 57.0 ^b
Smoking (%)	22.0	25.0	21.2
Drinking (%)	10.8	8.3	15.6

¹Values are means ± standard deviation. Values with different superscript letters are significantly different among groups; *P* < 0.05.

BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein cholesterol; LDL, low-density lipoprotein cholesterol; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; PLP, pyridoxal-5'-phosphate.

表二：CBS 844ins68 基因型對血漿同半胱氨酸及 B-維生素濃度之影響

	CAD group (<i>n</i> = 186)	Health group (<i>n</i> = 321)	Pooled (<i>n</i> = 507)
	β^1 (<i>P</i> value)		
Homocysteine ($\mu\text{mol/L}$)			
Model 1 ²	0.35 (0.905)	-1.74 (0.614)	0.58 (0.766)
Model 2 ³	-1.01 (0.769)	-1.07 (0.761)	-0.59 (0.790)
Serum folate (ng/mL)			
Model 1	0.75 (0.858)	1.52 (0.771)	2.00 (0.500)
Model 3 ⁴	-2.26 (0.604)	0.79 (0.879)	-0.27 (0.931)
Serum vitamin B-12 (pg/mL)			
Model 1	407.72 (0.005)	324.82 (0.078)	393.96 (< 0.001)
Model 3	393.619 (0.005)	324.93 (0.072)	380.90 (< 0.001)
PLP (nmol/L)			
Model 1	-12.35 (0.517)	-29.04 (0.613)	-23.95 (0.275)
Model 3	-10.74 (0.604)	-39.77 (0.472)	.29.24 (0.215)

¹ β , correlation. coefficient

²Adjusting for age, gender.

³Adjusting for age, gender and three B-vitamins.

⁴ Adjusting for age, gender, homocysteine and other two B-vitamins.

PLP, pyridoxal-5'-phosphate

表三：為 CBS 844ins68 基因型對 CAD 罹患之勝算比 (Odds ratio; OR)

	Factors adjusted ¹		
	OR	95% CI	<i>P</i>
CBS 844ins68			
Wild type	1		
Insertion	3.31	(0.14-81.07)	0.463
Plasma homocysteine			
< 12 μmol/L (Q1-3)	1		
≥ 12 μmol/L (Q4)	4.44	(2.03-9.70)	< 0.001

¹Adjusting for age, gender, homocysteine and three B-vitamins.

CI, 95% confidence interval; OR, odds ratio