

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.05.012

◇临床医学◇

铜陵地区脑卒中病人 MTHFR C677T 基因多态性分布及同型半胱氨酸水平分析

朱娟娟¹, 崇慧峰¹, 胡志军¹, 吴宝明², 潘晓龙¹, 李旭光¹, 唐吉斌¹作者单位:¹铜陵市人民医院检验科, 安徽 铜陵 244000; ²安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

通信作者: 唐吉斌, 男, 主任检验师, 硕士生导师, 研究方向为分子检验和生物化学检验, E-mail: jibin158@163.com

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81500473); 安徽省铜陵市卫生局科研课题资助项目(卫科研[2019]17号)

摘要:目的 探讨铜陵地区脑卒中病人 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) C677T 基因多态性分布的特点及同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)的水平。方法 选取2017年6月到2019年4月铜陵市人民医院的脑卒中病人234例、非脑卒中对照者69例, 用焦磷酸测序技术检测 MTHFR 基因 C667T 多态性, 循环酶法检测血清 Hcy 水平, 比较不同组别 MTHFR 基因型分布特点, 并分析不同基因型 Hcy 水平的差异。结果 脑卒中组基因型分布为 CC 型 73 例(31.2%), CT 型 114 例(48.7%), TT 型 47 例(20.1%), 基因型分布无性别差异; 脑卒中组等位基因 T 频率(44.4%)高于对照组等位基因 T 频率(33.3%), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 脑卒中组 CC、CT、TT 基因型 Hcy 水平分别为 9.20(7.50, 12.35) $\mu\text{mol/L}$ 、9.60(7.60, 12.85) $\mu\text{mol/L}$ 、16.00(10.45, 30.05) $\mu\text{mol/L}$, 其中 TT 基因型病人的 Hcy 水平高于同组 CT、CC 基因型病人的 Hcy 水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 脑卒中组 TT 基因型病人的 Hcy 水平高于对照组同种基因型的 Hcy 水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 铜陵地区脑卒中病人 MTHFR C677T 基因突变频率较高并与 Hcy 水平相关, 可能是脑卒中的危险因素。

关键词: 卒中; 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶(FADH2); 扩增片段长度多态性分析; 基因多态性; 同型半胱氨酸

Analysis of MTHFR C677T gene polymorphis and homocysteine level in stroke patients in Tongling area

ZHU Juanjuan¹, CHONG Huifeng¹, HU Zhijun¹, WU Baoming², PAN Xiaolong¹, LI Xuguang¹, TANG Jibin¹Author Affiliations: ¹Department of Clinical Laboratory, Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui 244000, China;²Department of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China

Abstract: Objective To investigate the distribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism of and the level of homocysteine (Hcy) in stroke patients in Tongling area. **Methods** 234 stroke patients and 69 healthy controls were selected from Tongling People's Hospital from June 2017 to April 2019. The polymorphism of MTHFR C667T was detected by pyrophosphate sequencing technique. Serum Hcy level was detected by circulating enzyme method. The distribution characteristics of MTHFR genotypes in different groups were compared and the differences of Hcy levels among different genotypes were analyzed. **Results** In the stroke group, MTHFR C667T genotype distribution was CC genotype 73 cases (31.2%), CT genotype 114 cases (48.7%), TT genotype 47 cases (20.1%). There was no gender difference in genotype distribution. The frequency of T allele in the stroke group (44.4%) was higher than that in the control group (33.3%), the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In the stroke group, Hcy of CC, CT and TT genotype were 9.20(7.50, 12.35) $\mu\text{mol/L}$, 9.60(7.60, 12.85) $\mu\text{mol/L}$ and 16.00(10.45, 30.05) $\mu\text{mol/L}$, respectively. Hcy in TT genotype patients were higher than those in CT and CC genotype ($P < 0.05$). Compared with the control group, Hcy of TT genotype patients in the stroke group was higher ($P < 0.05$). **Conclusion** The frequency of MTHFR C677T gene mutation is higher in stroke patients in Tongling area, which is related to the level of Hcy, and may be a risk factor for stroke.

Key words: Stroke; 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (FADH2); Amplified fragment length polymorphism analysis; Gene polymorphism; Homocysteine

脑血管病是我国成年人致死和致残的首位原因,《中国脑卒中防治报告2018》概要指出,由于社会老龄化及不健康生活方式的流行,我国脑卒中有爆发式增长的态势,并且呈现出性别和地域差异明

显以及年轻化的趋势^[1]。血液中同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)水平增高被认为是脑卒中发病的风险因素之一^[2],其水平的增高受非遗传因素和遗传因素的影响;叶酸缺乏及糖摄入增加是常见的导

致Hcy水平增高的非遗传因素,而5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)活性下降是导致Hcy水平增高的主要遗传性因素之一^[3]。

MTHFR是Hcy代谢与叶酸代谢中的关键酶,它可催化5,10-亚甲基四氢叶酸使血中Hcy发生甲基化,维持其在血中的水平。MTHFR C677T基因多态性是由第677位的点突变导致的,突变导致的酶活性下降可引起高Hcy血症^[4]。

目前关于MTHFR C677T基因多态性与脑卒中的关系越来越引起人们的重视,但由于其基因分布频率受地域和种族影响^[5],研究结果尚有争议,本研究以铜陵地区脑卒中人群作为研究对象,分析该人群MTHFR C677T基因多态性分布及Hcy水平,探讨脑卒中发生的风险因素并为其个体化防治提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年10月到2019年4月铜陵市人民医院住院的脑卒中病人234例为研究对象,均为长期居住本地的汉族人。经头颅CT或MRI检查,符合中华医学会第四届全国脑血管病学术会议提出的各项脑血管病诊断标准,其中出血性脑卒中82例,缺血性脑卒中152例;男性140例,女性94例;年龄范围为23~92岁,年龄69岁,234例病人均进行MTHFR C677T基因多态性检测,其中227例进行了Hcy检测。选取同时间段无冠心病、高血压、脑血管病于医院其他科室69例住院病人作为对照组,其中男性35例,女性34例;年龄范围为22~88岁,年龄55岁,69例对照组均进行MTHFR C677T基因多态性检测,其中67例进行了Hcy检测。记录研究对象身高、体质量、有无高血压史,并计算体质量指数(Body Mass Index, BMI)。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。病人或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.2 主要仪器与试剂 PyroMark Q24焦磷酸测序仪(德国凯杰公司),高速低温离心机(德国赫担驰公司),基因扩增仪(北京东胜创新生物科技有限公司),全血基因组提取试剂盒及测序反应通用试剂盒(长沙三济公司),基因扩增试剂(日本Takara公司),扩增引物(上海捷瑞生物工程有限公司),全自动生化分析仪(德国西门子公司),Hcy检测试剂盒(安徽大千生物工程有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集 清晨采集受试者空腹静脉血标本,乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA dipotassium salt, EDTA-K2)抗凝血2 mL用于基因测序,未抗凝血2

mL待充分凝固后离心留取血清用于Hcy检测。

1.3.2 全血基因组DNA提取 采用柱式法从外周血细胞中将基因组DNA提取纯化,严格按照试剂盒说明书进行操作,提取后的DNA可短期保存于2~8℃或长期冻存于-20℃和-80℃。

1.3.3 PCR扩增 PCR扩增反应体系含样本DNA 2 μL、Taq酶0.5 μL、正向引物和反向引物各1 μL、缓冲液5 μL、dNTP 3 μL,最后用纯水补足总反应体系50 μL。扩增条件为:94℃ 5 min,94℃ 25 s,56℃ 25 s,72℃ 25 s,共35个循环,72℃ 5 min后扩增产物可进行测序。

1.3.4 基因测序 通过PyroMark Q24MDx系统采用焦磷酸测序法测定MTHFR C677T位点,确定各样本基因型。

1.3.5 Hcy检测 酶循环法检测血清Hcy水平。

1.4 统计学方法 使用SPSS 22.0进行统计分析,定性资料的描述使用百分比,统计推断使用 χ^2 检验,定量资料不服从正态分布时,统计描述使用中位数和四分位数间距,三样本之间的比较使用Kruskal-Wallis H检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,两样本之间的比较使用Mann-Whitney U检验,组间两两比较时校正后的检验水准 $\alpha = 0.05/3 = 0.017$,同时以Hcy为因变量进行多元线性回归分析,评价基因型、性别、年龄、BMI等对Hcy水平的影响。

2 结果

2.1 MTHFR C677T基因型检测结果分析 PCR产物经焦磷酸测序后,仪器测得峰高与检测位点结合模板的碱基数量成正比,经软件处理后自动转化为序列信息,确定该样本携带的基因型。见图1。

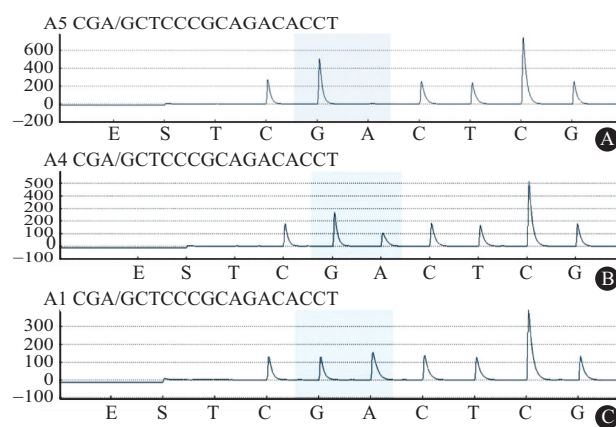


图1 MTHFR C677T基因测序结果分析图:A为野生纯合型(CC),B为杂合突变型(CT),C为纯合突变型(TT)

2.2 MTHFR C677T基因型频率及等位基因频率 如表1所示,本研究中脑卒中组MTHFR C677T的野生纯合基因型(CC)、杂合突变型基因型(CT)和

纯合突变型基因型(TT)的分布频率分别为31.2%、48.7%和20.1%,脑卒中组TT基因型频率高于对照组TT基因型频率,差异有统计学意义($P < 0.05$),而CC、CT基因型频率在两组中分布差异无统计学意义($P > 0.05$);脑卒中组和对照组T等位基因分布频率分别为44.4%和33.3%,脑卒中组T等位基因分布频率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。如表2所示,在脑卒中组中,不同性别的病人MTHFR C677T基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 MTHFR C677T 基因型及等位基因的分布频率/例(%)

组别	例数	基因型			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	69	29(42.0)	34(49.3)	6(8.7)	92(66.7)	46(33.3)
脑卒中组	234	73(31.2)	114(48.7)	47(20.1)	260(55.6)	208(44.4)
χ^2 值		2.8	0.007	4.79	5.404	
P值		0.094	0.935	0.029	0.02	

注:CC为野生纯合基因型,CT为杂合突变型基因型,TT为纯合突变型基因型

表2 MTHFR C677T 基因型在不同性别脑卒中病人中的分布频率/例(%)

组别	例数	基因型			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
男	140	42(30.0)	67(47.9)	31(22.1)	151(53.9)	129(46.1)
女	94	31(33.0)	47(50.0)	16(17.0)	109(58.0)	79(42.0)
χ^2 值		0.947			0.747	
P值		0.623			0.387	

注:CC为野生纯合基因型,CT为杂合突变型基因型,TT为纯合突变型基因型

2.3 MTHFR C677T 基因型与 Hcy 水平的相关性 如表3所示,在脑卒中组中,TT基因型病人的Hcy水平高于CC基因型和CT基因型,差异有统计学意义($P < 0.01$),而对照组三种不同基因型之间Hcy水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。将脑卒中组和对照组同种基因型的Hcy水平进行比较,可以

表3 MTHFR C677T 基因型与血清 Hcy 水平的关系/($\mu\text{mol/L}$)

组别	例数	不同基因型血清的Hcy水平		
		CC	CT	TT
对照组	69	8.75 (4.47, 11.78)	9.20 (5.75, 11.70)	10.45 (7.37, 12.30)
脑卒中组	234	9.20 (7.50, 12.35)*	9.60 (7.60, 12.85)*	16.00 (10.45, 30.05)
Z值		-1.377	-1.505	-2.177
P值		0.168	0.132	0.029

注:与TT型相比,* $P < 0.01$,CC为野生纯合基因型,CT为杂合突变型基因型,TT为纯合突变型基因型,Hcy为同型半胱氨酸

看出脑卒中组Hcy水平均增高,其中TT基因型的Hcy水平在两组间有差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 Hcy 水平与其他变量的多元线性回归 以Hcy为因变量,MTHFR C677T不同基因型、性别、年龄、有无高血压史和BMI为自变量进行的多元逐步分析结果显示,仅基因型、性别、高血压史与Hcy存在显著的线性关联,回归结果见表4,当基因型由野生型(CC)向杂合突变(CT)及纯合突变(TT)的转化时,Hcy水平也会随之增加,男性和有高血压的病人Hcy水平也会增加。

表4 影响同型半胱氨酸水平的多元线性回归分析

项目	β 值	标准误	标准系数	t值	P值
基因型	6.151	0.923	0.390	6.661	<0.001
性别	-5.377	1.324	-0.238	-4.061	<0.001
高血压史	4.163	1.893	0.143	2.436	0.016
常量	5.315	3.108	—	1.710	0.089

3 讨论

脑卒中具有发病率高、致残率高、死亡率高和复发率高的特点^[6],可造成个人及国家的大量医疗支出,如能采取有效的措施早期干预其发病的危险因素,可显著降低致残率和致死率。

血液中高浓度的Hcy会干扰血管内皮细胞功能,导致凝血和纤溶系统异常,使机体处于血栓前状态,也可作用于内皮细胞,使血管收缩,血压上升,促使动脉粥样硬化形成,增加脑血管病的发生风险^[4]。有研究认为高Hcy血症是独立于高脂血症、高血压、糖尿病、吸烟和年龄之外,引发心血管疾病的一个独立的危险因素^[7]。但也有文献指出目前国外的许多心血管疾病指南均未把高Hcy血症作为心血管病的危险因素,并不赞同高Hcy血症是心脑血管疾病的独立危险因素的说法^[8]。总体来说,国内的大多研究认为高Hcy血症是影响高血压病人心血管病预后的重要因素^[9]。降低血中Hcy水平可有效减低脑卒中的发病风险且改善急性脑梗死病人预后^[10-11]。

MTHFR是影响血中Hcy水平的主要遗传性因素之一,它是叶酸代谢过程中的关键酶^[12],MTHFR C677T是目前研究最多的基因多态位点,由于第677位的碱基胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)置换导致,导致其编码产物由丙氨酸被缬氨酸替代,从而影响酶的活性。这种点突变可产生三种基因型,分别是野生纯合型CC,杂合突变型CT,纯合突变型TT,CT型的酶活性是CC型的65%,TT型的活性仅为CC型的30%^[13]。目前,MTHFR C677T基因多态性与脑卒中相关性的研究很多:Li等^[14]指出中国人群MTHFR C677T基因多态性与缺血性脑卒中发病相关,可能

是由于其影响血中Hcy水平所致;Zhao等^[15]认为在中国高血压病人中,MTHFR C677T基因型和叶酸补充与Hcy对第一次卒中的影响密切相关,而且叶酸干预能显著降低CC和CT基因型病人由高Hcy导致的卒中风险,提示可根据个体遗传背景和营养状况对脑卒中中进行防治;张露等^[16]则认为MTHFR C677T基因突变可能与缺血性脑卒中无关;王超等^[17]的研究也表明MTHFR C677T基因在脑卒中组和健康人群组中的分布没有差异。造成研究结果差异的原因可能是由于研究样本量和分析方法不同导致,也有可能是研究人群具有不同遗传背景和营养状况导致,据报道中国人群具有较高的MTHFR C677T的突变频率^[13],且由于饮食烹饪习惯的原因导致大部分中国成年人(尤其在北方)叶酸摄入较低^[1],会导致较高的Hcy水平和脑卒中发病风险。

本研究中安徽铜陵地区脑卒中人群MTHFR C677T突变的T等位基因频率为45.1%,低于黑龙江地区^[17],高于广州地区^[18],说明该基因有一定的地域特点。脑卒中组MTHFR C677T突变基因T的频率高于对照组,提示在铜陵地区脑卒中可能与MTHFR C677T基因多态性相关。有报道指出MTHFR C677T基因多态分布有性别差异^[19],但本研究并未体现。在将脑卒中组和对照组进行同种基因型Hcy水平的比较时发现,脑卒中组均具有较高的Hcy水平,尤其TT基因型Hcy水平增高差异有统计学意义,提示当TT基因型和高Hcy的同时存在时脑卒中有较高的发病风险。脑卒中组三种基因型中TT基因型的Hcy水平高于其他两种基因型,可能是由于纯合突变的基因导致酶活性明显下降所致。对影响Hcy水平的其他因素进行多元线性回归结果显示,除了MTHFR C677T的基因型,性别及高血压史也会对Hcy水平造成一定影响,这也就解释了对对照组三种基因型之间Hcy水平无明显差异的原因,除了MTHFR C677T基因多态性,Hcy水平还可能受性别和血压情况等多种因素的影响。由于本研究是回顾性研究,研究对象叶酸摄取情况无法获得,因此进一步扩大研究样本量并对病人叶酸摄取情况进行问卷调查是我们接下来要做的工作。

综上所述,本研究结果表明,铜陵地区脑卒中病人具有较高的MTHFR C677T基因的突变频率和Hcy水平,可能是脑卒中发病的风险因素。进行MTHFR C677T基因多态性和Hcy水平的检测有助于筛选脑卒中高危人群,并有望根据基因型及Hcy水平进行不同剂量的叶酸补充,即个体化地指导脑卒中中的一级预防和药物治疗,可极大地减轻病人和社会的负担。

参考文献

- [1] 《中国脑卒中防治报告2018》编写组.我国脑卒中防治仍面临巨大挑战——《中国脑卒中防治报告2018》概要[J].中国循环杂志,2019,34(2):105-119.
- [2] 李萍.干预同型半胱氨酸,未必一定设置切点[J].中华高血压杂志,2018,26(3):19-21.
- [3] MOLL S, VARGA EA. Homocysteine and MTHFR Mutations [J]. Circulation, 2015, 132 (1): e6 - 9. DOI: 10.1161 / CIRCULATIONAHA.114.013311.
- [4] ZHU XY, HOU RY, PAN XD, et al. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and ischemic stroke in the Chinese population: a meta-analysis [J]. Int J Neurosci, 2015, 125 (12): 885-894.
- [5] YANG B, FAN S, ZHI X, et al. Geographical and ethnic distribution of MTHFR gene polymorphisms and their associations with diseases among Chinese population [J]. Clin Genet, 2017, 92(3):243-258.
- [6] 王陇德, 刘建民, 杨弋, 等.《中国脑卒中防治报告2017》概要[J].中国脑血管病杂志,2018,15(11):611-616,封3.
- [7] 杨英, 杨俊.同型半胱氨酸与心血管疾病关系的研究进展[J].临床心血管病杂志,2017,33(2):106-109.
- [8] 胡大一, 张啸飞.高同型半胱氨酸血症是心脑血管病的独立危险因素吗? [J].中华心血管病杂志,2018,46(9):675-679.
- [9] 孙宁玲, 李建平, 卢新政, 等.H型高血压诊断标准依据解读[J].中华高血压杂志,2017,25(6):508-510.
- [10] 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.
- [11] 李永军.舒血宁注射液对脑梗死患者临床疗效及血浆Hcy、UCH-L1及血清fibulin-5水平的影响[J].安徽医药,2018,22(1):143-146.
- [12] 李晓娜, 高秀叶, 孙茗, 等.育龄妇女叶酸代谢相关基因多态性分布研究[J].安徽医药,2018,22(6):1068-1070.
- [13] 朱娟娟, 唐吉斌.亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析的临床应用[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(6):7-12.
- [14] LI A, SHI Y, XU L, et al. A possible synergistic effect of MTHFR C677T polymorphism on homocysteine level variations increased risk for ischemic stroke [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(51): e9300. DOI: 10.1097/MD.0000000000009300.
- [15] ZHAO M, WANG X, HE M, et al. Homocysteine and stroke risk: modifying effect of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and folic acid intervention [J]. Stroke, 2017, 48(5): 1183-1190.
- [16] 张露, 崔晓燕, 张博爱.同型半胱氨酸及亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与缺血性卒中的关系研究[J].中国卒中杂志, 2017, 12(5):404-409.
- [17] 王超, 于莲, 季方茹, 等.MTHFR基因多态性在黑龙江东部地区脑卒中患者的频率分析[J].黑龙江医药科学,2017,40(4):48-50.
- [18] 于小琪, 秦琴保, 王双艳, 等.MTHFR基因多态性与广州市老年人缺血性脑卒中的相关性[J].实用医学杂志,2016,32(21):3540-3542.
- [19] 范超, 陈鸣, 邓少丽, 等.重庆地区脑卒中患者Hcy水平及MTHFR C677T基因多态性研究[J].重庆医学,2016,45(35):4932-4933,4937.

(收稿日期:2019-08-19,修回日期:2019-10-25)