

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.06.041

◇临床医学◇

亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与同型半胱氨酸水平的相关性

唐慧荣¹, 马举娟², 陈瑞祥¹作者单位:¹云南省第三人民医院药剂科, 云南 昆明 650011; ²大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000

通信作者: 陈瑞祥, 男, 副主任药师, 研究方向为临床药学、治疗药物监测、药物基因组学等, E-mail: 315326241@qq.com

基金项目: 云南省科技厅项目[2018FF001(-062)]

摘要: **目的** 探究985例云南地区人群亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR) C677T基因多态性与同型半胱氨酸(Hcy)水平的相关性。**方法** 选取2018年1月至2019年3月就诊于云南省第三人民医院并进行MTHFR C677T基因检测的985例汉族人群(包括住院病人559例、体检人群426例)作为研究对象, 将所有研究对象按照基因型分为CC、CT、TT三组。采用PCR-芯片杂交法检测MTHFR C677T基因型。**结果** 男性CC、CT、TT基因型分布频率与女性比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。三种基因型在不同年龄组中分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。985例研究对象Hcy检出最高浓度为86.40 mmol/L, 最低浓度为5.00 mmol/L, 均为CT基因型。三种基因型Hcy浓度为13.50(5.55, 21.45) mmol/L, 其中CC基因型Hcy水平为12.30(6.73, 17.87) mmol/L, CT基因型Hcy水平为12.68(7.20, 18.16) mmol/L, TT基因型Hcy水平为19.04(4.11, 42.19) mmol/L, TT基因型Hcy水平高于CC和CT, 差异有统计学意义($P < 0.001$), CC和CT基因型的Hcy水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 985例云南地区人群MTHFR C677T基因多态性与Hcy水平具有相关性, TT基因型可能为高Hcy血症的危险因素。

关键词: 亚甲基四氢叶酸还原酶(NADPH); 多态性, 单核苷酸; 芯片分析技术; 同型半胱氨酸

Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and its correlation with homocysteine

TANG Huirong¹, MA Jujuan², CHEN Ruixiang¹Author Affiliations: ¹Pharmaceutical Department, Yunnan Third People's Hospital, Kunming, Yunnan 650011, China;²School of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

Abstract: Objective To explore the relationship between MTHFR C677T gene polymorphism and homocysteine (Hcy) level of 985 people from Yunnan Province. **Methods** Nine hundred and eighty-five Han patients (including 559 hospitalized patients and 426 physical examination patients) who were treated in the Yunnan Third People's Hospital from January 2018 to March 2019 and tested for the MTHFR C677T gene were selected for the study subjects. All subjects were assigned into CC, CT and TT groups according to genotype. Chain reaction (PCR)-chip hybridization was used to detect the MTHFR C677T genotype. **Results** There was no significant difference in the frequency of genotype CC, CT and TT between men and women ($P > 0.05$). There was no significant difference in the distribution of three genotypes in different age groups ($P > 0.05$). The highest concentration of Hcy detected in 985 subjects was 86.40 $\mu\text{mol/L}$ and the lowest concentration was 5.00 $\mu\text{mol/L}$, and both were CT genotypes. The mean Hcy level of three genotypes was 13.50 (5.55, 21.45) mmol/L. Hcy level of CC genotype was 12.30 (6.73, 17.87) $\mu\text{mol/L}$, CT genotype Hcy level was 12.68 (7.20, 18.16) $\mu\text{mol/L}$, TT genotype Hcy level was 19.04 (4.11, 42.19) $\mu\text{mol/L}$. The Hcy level of TT genotype was higher than CC and CT, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). There was no significant difference in Hcy levels between CC and CT genotypes ($P > 0.05$). **Conclusion** The polymorphism of MTHFR C677T gene is correlated with Hcy levels in 985 cases from Yunnan Province, and TT genotype may be a risk factor for hyperhomocysteinemia.

Key words: Methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH2); Polymorphism, single nucleotide; Microchip analytical procedures; Homocysteine

同型半胱氨酸(Hcy)水平升高是多种疾病发生的独立危险因素。有研究表明, Hcy水平每升高5 mmol/L, 缺血性心脏病的发生风险增加32%, Hcy水平每降低3 mmol/L, 缺血性心脏病的发生风险降低

16%^[1]; Hcy ≥ 16 mmol/L的脑卒中病人, 其病死率和复发率是Hcy正常病人的1.47倍和1.31倍^[2]。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是Hcy代谢途径中的关键酶, 它能够催化5, 10-亚甲基四氢叶酸还原为5-

甲基四氢叶酸,为Hcy再甲基化为甲硫氨酸提供甲基,并维持体内正常的Hcy水平。当MTHFR基因发生突变,可使体内MTHFR酶活性下降,Hcy发生再甲基化途径受阻,造成Hcy在体内蓄积,进而引发高Hcy血症^[3]。MTHFR C677T是目前发现MTHFR最常见的突变位点^[4],存在CC、CT、TT三种基因型,有研究表明,TT基因型可增加高Hcy血症的发病风险^[5]。MTHFR C677T基因在不同国家、地区、民族的分布具有明显差异:欧洲人群的T等位基因分布较多(24.5%~43.8%),亚洲居中(2.5%~36%),非洲最低(4.9%~9.1%)^[6]。因此,通过研究不同地域人群MTHFR C677T基因多态性以及Hcy水平的相关性,将有助于该地区人群在疾病发生前后采取有效的预防和治疗措施。目前国内外关于MTHFR C677T基因多态性的地域分布以及与Hcy相关性的报道很多,但云南地区还未见有大数据的相关研究。本研究通过探讨985例云南地区人群MTHFR C677T基因分布特征及其与Hcy水平的相关性,旨在为本地区人群预防和治疗MTHFR C677T基因突变引起的高Hcy血症及其相关疾病提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年1月至2019年3月就诊于云南省第三人民医院并进行MTHFR C677T基因检测的985例汉族人群(包括住院病人559例、体检人群426例)作为研究对象,病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

入选标准:在该院进行MTHFR C677T基因检测并在云南省长期居住的汉族人群,研究个体间无血缘关系。**排除标准:**检测Hcy水平前2周曾服用或目前正在服用叶酸、B族维生素类或复合维生素药物的病人;合并肿瘤、肝、肾功能不全者;甲状腺功能异常者。

1.2 方法

1.2.1 分组 将所有研究对象按照基因型分为CC、CT、TT三组进行分析,并按照年龄分为青年组(<45岁)、中年组(45~60岁)与老年组(>60岁);由于高Hcy血症的诊断目前还没有统一标准,因此本研究按照Hcy水平分为正常组(5~10 mmol/L),临界组(>10~15 mmol/L),高Hcy组(>15 mmol/L)。

1.2.2 数据收集 本研究收集数据包括:①人口学数据:姓名、性别、年龄、体质量、民族、职业等;②既往病历资料:包括家族史,既往病史及现病史,用药情况(是否服用过叶酸、B族维生素类药物);③相关实验室检查:Hcy检测结果。去除个人标识信息。

1.2.3 MTHFR C677T基因多态性检测

1.2.3.1 样本采集 要求受检者清晨空腹状态下(采血前一天晚餐后至第2天早上采血前禁食8~14 h),取坐位,采集肘静脉血,约3~5 mL,加至EDTA抗凝管中,并充分混匀,避免凝血或溶血,立即放置于-20℃冰箱保存,用于测定MTHFR C677T基因多态性。

1.2.3.2 全血DNA提取 实验前准备:打开金属浴,设置为56℃;从2~8℃冰箱中取出核酸提取试剂盒,向缓冲液BW1中加入5 mL无水乙醇、向缓冲液BW2中加入7 mL无水乙醇,并做标记。随后进行①活化吸附柱、②裂解细胞、③洗涤。

洗脱获得DNA:取1.5 mL离心管,将吸附柱插入其中,弃去装废液的收集管,向吸附柱膜中间位置悬空滴加60 mL洗脱液BE,盖紧盖子,室温放置5 min,12 000 r/min离心2 min(DNA样本-20℃保存1个月,期间反复冻融不超过3次)。

1.2.3.3 PCR-芯片杂交法检测MTHFR C677T基因型 **PCR扩增:**-20℃冰箱中取出试剂(扩增液,反应液A)放置室温,低速离心;将新开启的扩增液进行冰上分装(扩增液忌反复冻融):取12个0.2 mL的PCR管,每管分装22 μL,留用实验所需数量的扩增液,其余放入-20℃冰箱保存(用于之后实验按需取出相应数量分装好的扩增液);在PCR管盖上进行样本编号;在各扩增管中依次加入1 mL反应液A,2 μL提取好的DNA样品溶液,混匀;将各扩增管放入PCR仪中,按下列条件进行扩增:50℃ 5 min;94℃ 5 min;94℃ 25 s,56℃ 25 s,72℃ 25 s,35个循环;72℃ 5 min;取出扩增产物,2~8℃保存。

芯片杂交显色:-20℃冰箱中取出反应液B,室温解冻后,低速离心,取10 μL加入杂交缓冲液中,做好标记,在手中转动混匀;-20℃冰箱中取出抗体和抗体稀释剂,将抗体和抗体稀释剂按照1:3 000比例混匀,12 000 r/min离心30 s,取上清液使用;从杂交显色试剂盒中取出所需数量的8联管,在8联管圆头的侧壁标注样本编号并放置于试剂架上;吸取190 μL杂交缓冲液加入其中,再加入10 μL扩增液的扩增产物,吸打混匀;加入200 μL抗体;加入200 μL显色液;-20℃冰箱中取出MTHFR基因芯片,将芯片与8联管依次放入杂交仪中,加载杂交程序,进行杂交反应。

读取结果:使用生物芯片识读仪读取结果。

1.3 统计学方法 运用SPSS 22.0软件进行数据处理,定量资料不服从正态分布时采用中位数(下、上四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]描述。采用 χ^2 检验进行各

基因组性别、年龄频率的比较,分析 MTHFR C677T 基因多态性与性别、年龄的相关性;采用 Kruskal-Wallis 秩和检验进行组间 Hcy 水平总体差异的比较,采用 Games-Howell 检验进行多组间的两两比较,分析 MTHFR C677T 基因多态性与 Hcy 水平的相关性;采用趋势 χ^2 检验比较不同组间基因型分布频率随 Hcy 水平分层变化的趋势。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。应用 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验方法检测样本的群体代表性, $P > 0.05$ 说明样本人群该基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。

2 结果

2.1 985 例检测人群 MTHFR C677T 基因分布特征 MTHFR C677T 中 CT 基因型分布频率相对较高 49.9% (492/985), CC 基因型分布频率相对较低 19.6% (193/985), TT 基因型分布频率居中 30.5% (300/985)。经检验,样本人群符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($\chi^2 = 0.115, P = 0.944$),具有群体代表性。

2.2 不同性别 MTHFR C677T 基因分布特征 男性 CC、CT、TT 基因型分布频率与女性比较差异无统计学意义($\chi^2 = 5.88, P = 0.053$),见表 1。

表 1 不同性别汉族人群 MTHFR C677T 基因型频数和频率分布/例(%)

性别	例数	CC	CT	TT
男	617	130(21.1)	290(47.0)	197(31.9)
女	368	63(17.1)	202(54.9)	103(28.0)

注:整体比较 $\chi^2 = 5.88, P = 0.053$

2.3 不同年龄 MTHFR C677T 基因分布特征 结果显示三种基因型在不同年龄组中分布差异无统计学意义($\chi^2 = 4.33, P = 0.363$),见表 2。

表 2 不同年龄汉族人群 MTHFR C677T 基因型频数和频率分布/例(%)

年龄	例数	CC	CT	TT
< 45 岁	143	25(17.5)	76(53.2)	42(29.3)
45~60 岁	390	77(19.7)	205(52.6)	108(27.7)
> 60 岁	452	91(20.1)	211(46.7)	150(33.2)

注:整体比较 $\chi^2 = 4.33, P = 0.363$

2.4 MTHFR C677T 基因多态性与血浆 Hcy 相关性

2.4.1 MTHFR C677T 不同基因型血浆 Hcy 水平比较 Hcy 检出最高浓度为 86.40 mmol/L,最低浓度为 5.00 mmol/L,均为 CT 基因型。经正态性检验,血浆 Hcy 水平不服从正态分布,三种基因型 Hcy 浓度为 13.50(5.55, 21.45) mmol/L, CC、CT、TT 基因型 Hcy 浓度分别为 12.30(6.73, 17.87) mmol/L、12.68(7.20, 18.16) mmol/L、19.04(4.11, 42.19) mmol/L。经 Krus-

kal-Wallis 检验,不同基因型组间 Hcy 水平总体差异有统计学意义($H = 134.96, P < 0.001$),采用 Games-Howell 检验进行组间两两比较,结果显示,TT 基因型的 Hcy 水平高于 CC 和 CT($P < 0.001$),CC 和 CT 基因型的 Hcy 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4.2 Hcy 水平不同分层中 MTHFR C677T 基因分布特征 CC、CT 基因型在 Hcy 水平临界组($> 10 \sim 15$ mmol/L)中分布频率相对较高,TT 基因型在高 Hcy 组(Hcy > 15 mmol/L)中分布频率相对较高,见表 3。

表 3 Hcy(同型半胱氨酸)水平不同分层中汉族人群 MTHFR C677T 基因分布特征/例(%)

Hcy 水平	例数	MTHFR C677T 基因型分布		
		CC	CT	TT
5~10 μ mol/L	179	46(25.7)	106(59.2)	27(15.1)
> 10~15 μ mol/L	409	90(22.0)	237(58.0)	82(20.0)
> 15 μ mol/L	397	57(14.3)	149(37.5)	191(48.2)

注:三种 MTHFR C677T 基因型在 Hcy 水平不同组间整体比较, $\chi^2 = 99.81, P < 0.001$;TT 基因型在 Hcy 水平不同组中的比较, $\chi^2 = 64.77, P < 0.001$

3 讨论

MTHFR 是 Hcy 代谢的关键酶,MTHFR 基因突变可改变体内 MTHFR 氨基酸结构,使 MTHFR 酶活性降低,导致 Hcy 再甲基化受阻,Hcy 水平升高,进而引发高 Hcy 血症。MTHFR C677T 是 MTHFR 最常见的突变位点^[4],同时 MTHFR C677T 基因多态性也是乳腺癌、食管癌、胃癌等恶性肿瘤的易感基因^[7-9],《中国高血压防治指南 2010》中将 Hcy 水平 ≥ 10 mmol/L 列为心血管事件发生的独立危险因素。

Frosst 等^[4]在 1995 年首次提出 MTHFR 核苷酸第 677 位胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)替换,导致第 222 位氨基酸由高度保守的丙氨酸变为缬氨酸,由此突变产生了 CC、CT、TT 三种基因型,研究表明 CT 基因型可使酶活性降低 35%,TT 基因型可使酶活性降低 70%^[10]。

本研究对 985 例云南地区人群 MTHFR C677T 基因多态性进行了分析,结果显示 CC 型 19.6%,CT 型 49.9%,TT 型 30.5%。与其他地区相比,CC 基因型分布高于北方山东(14.6%)、河南(16.6%),低于天津(21.4%)、陕西(21.7%),且低于南方江苏(32.7%)、湖北(36.2%)、四川(41.8%)、云南(42.7%)、广东(51.3%)、海南(58.5%),TT 基因型分布在北方地区高于天津和陕西(均为 30.4%),低于山东(40.8%)、河南(37.0%),高于南方江苏(19.7%)、湖北(16.8%)、四川(13.8%)、云南(15.3%)、广东(8.3%)、海南(6.4%)^[19]。上述结果表

明985例云南地区人群MTHFR C677T基因多态性与其他地区相比存在地域差异性。此外,本研究中,与其他民族相比,汉族TT基因型(30.5%)分布频率较高(布依族0.84%、苗族7.45%、回族3.42%、壮族0%、维吾尔族5.26%、蒙古族15.20%^[11]),表明MTHFR C677T基因多态性分布具有民族差异性,以上结论与国内外相关报道结论一致^[12-15]。

在不同性别方面,大部分研究结论认为MTHFR C677T基因多态性不存在性别差异^[11,16],但也有个别研究得出相反结论。如吴自强、徐韞健^[17]研究结果显示突变基因型CT、TT在女性中的分布频率(38.7%, 16.1%)均高于男性(30.2%, 9.8%), ($P < 0.05$)。本研究中CC、CT、TT基因型分布频率男性(67.4%, 58.9%, 65.7%)与女性(32.6%, 41.1%, 34.3%)差异无统计学意义($P = 0.053$)。在不同年龄方面,本研究结果显示:CC、CT、TT基因型在60岁及以上人群中分布频率(47.2%, 42.9%, 50.0%)与在45岁以下人群(12.9%, 15.4%, 14.0%)也差异无统计学意义($P = 0.363$)。此结论与任玮等^[18]研究结论相一致。

MTHFR C677T基因突变引起的Hcy水平升高是目前最常见的遗传因素之一,并且由MTHFR C677T基因突变引起的Hcy水平变化可增加疾病的发生风险。本研究对MTHFR C677T多态性与Hcy水平相关性进行分析,结果显示:TT基因型的Hcy水平19.04(4.11, 42.19) $\mu\text{mol/L}$ 较高,其次为CT基因型12.68(7.20, 18.16) $\mu\text{mol/L}$, CC型Hcy水平较低12.30(6.73, 17.87) $\mu\text{mol/L}$, TT基因型与CC、CT型Hcy水平差异有统计学意义。进一步对Hcy水平进行分组,结果显示:TT基因型在Hcy水平正常组(5~10 mmol/L)、临界组(>10~15 $\mu\text{mol/L}$)以及高Hcy组(Hcy > 15 $\mu\text{mol/L}$)中的分布频率分别为9.0%、27.3%、63.7%, TT基因型的分布频率随着Hcy水平的升高而增大。以上结果表明MTHFR C677T多态性与Hcy水平存在关联,并且TT基因型可能是发生高Hcy血症的危险因素,此结论也与国内外大部分相关研究结论一致^[19-20]。

参考文献

- [1] WALD DS, LAW M, MORRIS JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis [J]. *BMJ* (Clinical research ed), 2002, 325(7374): 1202.
- [2] ZHANG W, SUN K, CHEN J, et al. High plasma homocysteine levels contribute to the risk of stroke recurrence and all-cause mortality in a large prospective stroke population [J]. *Clinical science* (London, England: 1979), 2009, 118(3): 187-194.
- [3] 陈甲, 和儒林, 朗莹, 等. 中国人MTHFR基因C677T多态性与

- 青中年缺血性脑卒中相关性的meta分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2014, 14(4): 435-442.
- [4] FROSST P, BLOM HJ, MILOS R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [J]. *Nature Genetics*, 1995, 10(1): 111-113.
- [5] 冯琳琳, 张微, 张浩, 等. 体检人群血清同型半胱氨酸水平与MTHFR C677T基因型频率的调查[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(13): 2225-2226, 2229.
- [6] BOTTO LD, YANG Q. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a huge review [J]. *American journal of epidemiology*, 2000, 151(9): 862-877.
- [7] 季枚, 蒋敬庭, 徐斌, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶C667T基因多态性对以5-氟尿嘧啶为基础化疗的晚期胃癌患者生存期的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(2): 242-244.
- [8] 毛仁芳, 范义辉, 白静, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性及其与疾病的关系[J]. *国际遗传学杂志*, 2007, 30(1): 39-44.
- [9] MCKINNON PJ, CALDECOTT KW. DNA strand break repair and human genetic disease [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, 8: 37-55.
- [10] JAMES SJ, POGRIKNA M, POGRIKNA IP, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for down syndrome [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 70(4): 495-501.
- [11] 宋姗姗, 杨博逸, 孙贵范. 中国人MTHFR C677T和A1298C基因多态性与乳腺癌相关性的meta分析[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2013, 21(5): 560-564.
- [12] YADAV U, KUMAR P, GUPTA S, et al. Distribution of MTHFR C677T gene polymorphism in healthy north indian population and an updated meta-analysis [J]. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, 2017, 32(4): 399-410.
- [13] YANG B, LIU Y, LI Y, et al. Geographical distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms in China: findings from 15357 adults of Han nationality [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57917. DOI: 10.1371/journal.pone.0057917.
- [14] 杜梅, 余云志, 鲁衍强, 等. 大理白族自治州汉族和白族女性5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶、甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性研究[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(9): 1947-1950.
- [15] 郝友瑛, 赵红, 鲁衍强, 等. 新疆维吾尔族和汉族女性MTHFR和MTRR基因单核苷酸多态性比较[J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(21): 3495-3497.
- [16] 蒋捷, 王富乾, 马浩然, 等. 武汉地区汉族人群MTHFR基因多态性的分布研究[J]. *中南药学*, 2017, 15(1): 57-60.
- [17] 吴自强, 徐韞健. 华南地区汉族人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(13): 1791-1792, 1795.
- [18] 任玮, 李艳, 童永清, 等. 武汉地区353例体检者MTHFR C677T基因多态性分布[J]. *实用预防医学*, 2016, 23(8): 1007-1010.
- [19] 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*, 2017, 96(51): e9300. DOI: 10.1097/MD.00000000000009300.
- [20] 罗雯媛, 关幸求, 毕佳佳, 等. 深圳青年高同型半胱氨酸血症MTHFR C677T基因无创纳米筛查及基因多态性研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(20): 2063-2066.

(收稿日期: 2019-06-28, 修回日期: 2019-07-22)