

· 论 著 ·

高血压与非高血压脑梗死患者 MTHFR 基因 C667T 多态性与同型半胱氨酸水平的相关性

吴子瑜, 杨津, 郭太林, 陈艳, 阮景明

福建省立医院老年科 福建省立医院干部特诊一科, 福建 福州 350000

摘要: **目的** 探讨脑梗死患者亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C667T 多态性及其与同型半胱氨酸(Hcy)水平的相关性,并进一步比较高血压与非高血压脑梗死患者 MTHFR 基因 C667T 多态性特点和 Hcy 水平。**方法** 选取 2016 年 1 月至 12 月福建省立医院脑梗死患者 306 例(高血压性脑梗死 237 例,非高血压性脑梗死 69 例)及非脑梗死 306 例(对照组)进行对照研究。采用焦磷酸测序技术检验 MTHFR 基因 C667T 多态性,采用循环酶法检测血清 Hcy 水平,比较不同组别 MTHFR 基因型分布及不同基因型患者的 Hcy 水平。**结果** 脑梗死患者 MTHFR 基因具有 C667T 多态性。在 306 例脑梗死患者中基因型分布:TT 型 69 例(22.5%),CT 型 138 例(45.1%),CC 型 99 例(32.4%);脑梗死患者等位基因 T 频率(45.1%)明显高于非脑梗死患者等位基因 T 频率(32.4%, $P < 0.05$)。不同基因型脑梗死患者 Hcy 水平:TT 型的 Hcy 水平 $[(26.2 \pm 8.6) \mu\text{mol/L}]$ 分别高于 CT 型 $[(12.9 \pm 4.4) \mu\text{mol/L}]$ 、CC 型 $[(11.1 \pm 4.5) \mu\text{mol/L}]$ (P 均 < 0.01)。脑梗死患者中,高血压患者 TT 型频率(44.3%)与非高血压患者 TT 型频率(47.8%)差异无统计学意义($P > 0.05$),但 TT 型高血压患者 Hcy 浓度 $[(21.8 \pm 9.1) \mu\text{mol/L}]$ 显著高于非高血压患者 $[(15.9 \pm 6.8) \mu\text{mol/L}]$ ($P < 0.05$)。**结论** 脑梗死患者 MTHFR 基因具有 C667T 多态性,其中 TT 型纯合突变与血清高 Hcy 水平有关,可能是脑梗死发生的危险因素;TT 基因型高血压性脑梗死患者相对于该基因型非高血压性脑梗死患者具有更高的 Hcy 水平。

关键词: 脑梗死; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性; 同型半胱氨酸; 高血压

中图分类号: R 743.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)04-0477-04

Relationship between MTHFR gene C677T polymorphism and homocysteine level in cerebral infarction patients with or without hypertension

WU Zi-yu, YANG Jin, GUO Tai-lin, CHEN Yan, RUAN Jing-ming

Department of Geriatrics, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350000, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and serum homocysteine (Hcy) level in cerebral infarction patients, and further analyze the feature of MTHFR gene C677T polymorphism and Hcy level in cerebral infarction patients with or without hypertension. **Methods** A total of 306 patients with cerebral infarction including 237 cases of hypertensive cerebral infarction and 69 cases of non-hypertensive cerebral infarction as well as 306 cases of non-cerebral infarction (control group) who were admitted in Fujian Provincial Hospital between January and December 2016 were selected for clinical control study. Pyrosequencing technology was used to detect MTHFR gene C677T polymorphism. Enzymatic cycling assay was used to detect serum Hcy level. MTHFR genotype distribution and Hcy level in patients with different genotype were compared in different groups. **Results**

MTHFR gene had C667T polymorphism in cerebral infarction patients. Genotype distributions of 306 cases of cerebral infarction were TT type [69 cases(22.5%)], CT type [138 cases(45.1%)], CC type [99 cases(32.4%)]. The allele T frequency in cerebral infarction patients was significantly higher than that in non-cerebral infarction patients (45.1% vs 32.4%, $P < 0.05$). Hcy level of TT type $[(26.2 \pm 8.6) \mu\text{mol/L}]$ was significantly higher than that of CT type $[(12.9 \pm 4.4) \mu\text{mol/L}]$ and of CC type $[(11.1 \pm 4.5) \mu\text{mol/L}]$ respectively. There was no significant difference in TT type frequency between cerebral infarction patients and non-cerebral infarction patients (44.3% vs 47.8%, $P > 0.05$), but Hcy concentration in TT type hypertension cerebral infarction patients was significantly higher than that in TT type non-hypertension cerebral infarction patients $[(21.8 \pm 9.1) \mu\text{mol/L}]$ vs $[(15.9 \pm 6.8) \mu\text{mol/L}]$, $P < 0.05$.

Conclusions MTHFR gene has C667T polymorphism in cerebral infarction patients. MTHFR gene TT type homozygous mutation is associated with high serum Hcy level, and it might be a risk factor of cerebral infarction occurrence. The hypertensive cerebral infarction patients with TT genotype has relatively high Hcy level compared with TT genotype non-hypertensive cerebral infarction patients.

Key words: Cerebral infarction; Methylenetetrahydrofolate reductase; Gene polymorphism; Homocysteine; Hypertension

高血压、同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平、N5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate, MTHFR) C667T 基因多态性与脑梗死的相关性为研究者所关注,国内报告相对较少。本研究探讨脑梗死患者 MTHFR C667T 基因多态性特点及其与 Hcy 水平的相关性,并进一步分析高血压与非高血压脑梗死患者 MTHFR C667T 基因多态性特点和 Hcy 水平。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2016 年 1 月至 12 月在福建省立医院住院的脑梗死患者 306 例(脑梗死组),脑梗死的诊断依据 1995 年全国第四届脑血管会议修订的诊断标准^[1];其中男性 216 例,女性 90 例;年龄 39~96 岁,中位年龄 67 岁。在脑梗死组中高血压性 237 例,非高血压性 69 例。高血压诊断符合 2011 年版中国高血压防治指南中的诊断标准^[2]。所有患者或监护人均签署知情同意书。选取 2016 年 1 月至 12 月在福建省立医院住院的非脑梗死患者 306 例(非脑梗死组),其中男性 213 例,女性 93 例;年龄 20~98 岁,中位年龄 63 岁。

1.2 主要仪器和试剂 Hcy 测定试剂盒(四川迈克生物科技);DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit(德国 Qiagen 公司,产品号 51304);2×缓冲液(美国 Promega 公司)。美国 BIO-RAD C1000Touch PCR 仪;生物安全柜(Babeulmre A2,德国 Esco 公司);低温离心机(美国 Thermo 公司);Q24 焦磷酸测序仪(德国 Qiagen 公司);Nanodrop 1000 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 标本采集 清晨采集空腹肘静脉血 2 ml,乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA dipotassium salt, EDTA-K2)抗凝,采集后立即充分混匀;未抗凝血第 2 天采集,充分凝固后离心,留取血清。

1.4 血清 Hcy 水平检测及 MTHFR 基因多态性检测

(1)血清 Hcy 水平检测:采用 Hcy 测定试剂盒(循环酶法)对 Hcy 进行检测。(2)MTHFR 基因多态性检测:①DNA 提取,采用 Qiagen 提取试剂盒按照试剂说明书提取 DNA,每份样本提取后采用 Nano-

drop1000 微量分光光度计测定浓度和纯度。②引物设计,引物设计参照文献, MTHFR-F:5'-GAG GCT GAC CTG AAG CAC TTG A-3',标记 Biotin; MTHFR-R:ATG CCT TCA CAA AGC GGA AGA;测序引物:5'-CGT GAT GAT GAA ATC G-3';由上海英潍捷基贸易合成。③PCR 扩增,反应体系 50 μl,上游引物 1 μl,下游引物 1 μl,2×反应混合物(master mix)25 μl, DNA 模板 2 μl,水 21 μl。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。④焦磷酸测序,取 25 μl PCR 产物,分别加入结合缓冲液和亲和素磁珠,振荡 15 min,结合带有生物素标记的 PCR 产物。真空泵吸附结合液后分别用 70% 乙醇、变性液和清洗液处理。PCR 产物洗脱后加入测序引物。反应液 80℃ 变性 2 min 后上焦磷酸测序仪进行分析检测结果。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 11.7 软件进行分析。所有数据均由双人录入 Excel 表,并经过逻辑查错和一致性检查。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同基因型组内变量比较采用 ANOVA 检验,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料的比较采用四格表 χ^2 检验和 R×C 表 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑梗死组和非脑梗死组患者 MTHFR 基因分型结果 脑梗死与非脑梗死患者的 MTHFR 基因型(TT 型、CT 型、CC 型)分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。脑梗死组等位基因 T 频率 45.1%,等位基因 C 频率 54.9%;非脑梗死组等位基因 T 频率 32.4%,等位基因 C 频率 67.6%;脑梗死组等位基因 T 频率高于非脑梗死组($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 脑梗死组高血压和非高血压患者 MTHFR 基因型分析 脑梗死组中高血压和非高血压患者的 MTHFR 基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。高血压者等位基因 T 频率 44.3%,C 频率 55.7%;非高血压者等位基因 T 频率 47.8%,C 频率 52.2%;脑梗死组高血压和非高血压患者等位基因 T 频率、C 频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 脑梗死组与非脑梗死组 MTHFR 不同基因型患者的 Hcy 水平比较 在 306 例脑梗死患者三种基因型中,TT 型的 Hcy 水平 $[(26.2 \pm 8.6) \mu\text{mol/L}]$ 分别高于 CT 型 $[(12.9 \pm 4.4) \mu\text{mol/L}]$ 、CC 型 $[(11.1 \pm 4.5) \mu\text{mol/L}]$ (P 均 < 0.01)。在 306 例非脑梗死三种基因型中,TT 型、CT 型及 CC 型的 Hcy 水平比较无统计学差异($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 脑梗死组高血压与非高血压及其 MTHFR 不同基因型患者的 Hcy 水平比较 (1) 在 306 例脑梗死患者中,高血压与非高血压患者的 Hcy 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);但高血压 MTHFR 基因 TT 型者 Hcy 浓度 $[(21.8 \pm 9.1) \mu\text{mol/L}]$,显著高于非高血压 TT 型患者 $[(15.9 \pm 6.8) \mu\text{mol/L}]$ ($P < 0.05$)。高血压与非高血压 CT 型和 CC 型患者的 Hcy 水平无统计学差异(P 均 > 0.05)。(2) 在 237 例高血压性脑梗死患者中,TT 型 Hcy 浓度分别高于 CT 型与 CC 型 Hcy 浓度(P 均 < 0.05);CT 型与 CC 型血清 Hcy 水平无统计学差异($P > 0.05$)。(3) 在 69 例非高血压性脑梗死患者中,TT 型 Hcy 浓度分别高于 CT 型与 CC 型 Hcy 浓度(P 均 < 0.05);CT 型与 CC 型血清 Hcy 水平无统计学差异($P > 0.05$)。见表 4。

表 1 脑梗死组和非脑梗死组 MTHFR 基因分型结果 ($n = 306$)

组别	基因型频率 [例(%)]			等位基因频率 (%)	
	TT	CT	CC	T	C
脑梗死组	69(22.5)	138(45.1)	99(32.4)	45.1	54.9
非脑梗死组	37(12.1)	124(40.5)	145(47.4)	32.4	76.6
P 值	< 0.05			< 0.05	

表 2 脑梗死高血压与非高血压患者 MTHFR 基因分型结果

因素	例数	基因型频率 [例(%)]			等位基因频率 (%)	
		TT	CT	CC	T	C
高血压	237	51(21.5)	108(45.6)	78(32.9)	44.3	55.7
非高血压	69	18(26.1)	30(43.5)	21(30.4)	47.8	52.2
P 值		> 0.05			> 0.05	

表 3 脑梗死组与非脑梗死组 MTHFR 不同基因型患者血清 Hcy 水平比较 ($n = 306, \mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	不同基因型血清 Hcy 水平			
	TT	CT	CC	TT+CT+CC
脑梗死组	26.2 ± 8.6	$12.9 \pm 4.4^*$	$11.1 \pm 4.5^*$	15.4 ± 7.5
非脑梗死组	16.8 ± 10.2	12.0 ± 3.9	10.9 ± 3.3	11.7 ± 8.6
P 值	< 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05

注:与 TT 型相比, $*P < 0.01$ 。

表 4 脑梗死高血压与非高血压 MTHFR 不同基因型患者血清 Hcy 水平比较 ($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$)

因素	例数	不同基因型血清 Hcy 水平			
		TT	CT	CC	TT+CT+CC
高血压	237	21.8 ± 9.1	$13.3 \pm 5.1^*$	$11.5 \pm 4.8^*$	13.9 ± 9.0
非高血压	69	15.9 ± 6.8	$12.2 \pm 2.6^*$	$9.2 \pm 2.2^*$	12.1 ± 3.0
P 值		< 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

注:与 TT 型相比, $*P < 0.05$ 。

压性脑梗死患者中,TT 型 Hcy 浓度分别高于 CT 型与 CC 型(P 均 < 0.05)。CT 型与 CC 型血清 Hcy 水平无统计学差异($P > 0.05$)。见表 4。

3 讨论

血 Hcy 属于含硫氨基酸,是甲硫氨酸循环的重要中间产物,N5、10-亚甲基四氢叶酸还原酶由 MTHFR 基因编码,是 Hcy 代谢中的关键酶,主要生化功能是催化亚甲基四氢叶酸还原为甲基四氢叶酸,而后者再将甲基转移给 Hcy,使其生成甲硫氨酸。MTHFR 基因 C667T 碱基突变位于 MTHFR 基因第 4 外显子,677 位胞嘧啶被胸腺嘧啶所取代,相应蛋白位置丙氨酸被缬氨酸所取代,造成 MTHFR 活性和耐热性下降,MTHFR 基因纯合突变 TT 的酶活性只有正常的 30%,杂合 CT 型的酶活性只有正常的 65%,MTHFR 酶活性明显下降引起血清叶酸水平异常,导致高 Hcy 血症^[3-5]。本研究中 TT 基因型血清 Hcy 水平明显高于 CT 基因型和 CC 基因型,说明 C677T 位点突变在高 Hcy 血症形成机制中扮演着重要角色。

本研究对象均长期居住福建地区,脑梗死病例组 MTHFR-C667T 基因 T 等位基因突变率为 45.1%,低于陈芳等^[6]报道河南脑梗死人群的 T 等位基因突变率(61.9%)。有很多研究均表明 TT 基因型和等位基因 T 突变率可能是我国脑梗死的一个遗传风险因子,如李慧等^[7]对延安地区患者的研究认为,MTHFR C677T 多态性 TT 基因型致 Hcy 水平增高,可能是引发脑梗死的重要遗传因素。但本研究福建脑梗死人群的 MTHFR-C667T 基因 T 等位基因突变率却较低,这可能与地域差异有关。

血 Hcy 易生成多种强氧化物,损伤细胞结构及其功能,同时诱发血管局部炎症因子损伤血管内皮及刺激血管平滑肌增生,与动脉粥样硬化密切相关^[8-11]。本研究 306 例脑梗死患者中 TT 基因型的 Hcy 水平明显高于 CC 基因型和 CT 基因型,与相关研究一致^[12-13]。另外本研究脑梗死组的 Hcy 水平 $[(15.4 \pm 7.5) \mu\text{mol/L}]$ 高于非脑梗死的 Hcy 水平 $[(11.7 \pm 8.6) \mu\text{mol/L}]$,说明高 Hcy 血症可能是脑梗死的危险因素,与黄一宁等^[14]研究认为血浆 Hcy 水平与缺血性脑血管病密切相关相一致。

Vijayan 等^[15]研究认为 MTHFR 等位基因 T 频率与缺血性脑血管病密切相关。在本研究结果中,脑梗死组中 MTHFR TT 型的频率和等位基因 T 频率均明显高于非脑梗死组,说明 TT 型的频率和等位基因 T 频率的升高与脑梗死有明确相关性。将脑梗死组根

据是否伴有高血压分组,发现脑梗死组高血压患者 MTHFR 基因 TT 型、CT 型的频率与非高血压患者无统计学差异;但是高血压 MTHFR 基因 TT 型的 Hcy 水平(21.8 ± 9.1) $\mu\text{mol/L}$,显著高于非高血压者的(15.9 ± 6.8) $\mu\text{mol/L}$,这一现象说明 TT 基因型脑梗死中高血压患者比非高血压患者的血清 Hcy 水平更高,因此对于高血压患者更应该早期检测血清 Hcy 水平,早期预防脑梗死。

综上所述,MTHFR 基因 C667T 多态性与 Hcy 水平密切相关,并且该基因多态性和血清高 Hcy 水平均为脑梗死的危险因素。由于 MTHFR 基因 C667T TT 纯合突变降低酶活性明显,所有高血压人群需及时检查该基因与 Hcy 水平,争取做到早期预防、早期干预。

参考文献

[1] 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志,1996,3(2):379-380.

[2] 高润霖. 遵循指南 进一步规范冠心病介入治疗[J]. 中华心血管病杂志,2012,40(4):265-267.

[3] Frosst P,Blom HJ,Milos R,et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease;a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase[J]. Nat Genet,1995,10(1):111-113.

[4] Wayne TF Jr. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism,venous thrombosis,cardiovascular risk,and other effects[J]. Angiology,2015,66(5):401-404.

[5] Wang Y,Li X,Qin X,et al. Prevalence of hyperhomocysteinaemia and its major determinants in rural Chinese hypertensive patients

aged 45-75 years[J]. Br J Nutr,2013,109(7):1284-1293.

- [6] 陈芳,封青川,郑红,等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态与河南汉族人群缺血性脑血管病的相关性[J]. 中华神经科杂志,2009,42(12):798-802.
- [7] 李慧,惠玉芬,白利芬,等. 脑梗死患者同型半胱氨酸水平与亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态相关性研究[J]. 标记免疫分析与临床,2016,23(8):895-898.
- [8] Weiss N,Keller C,Hoffmann U,et al. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia [J]. Vasc Med,2002,7(3):227-239.
- [9] 王桂红,王拥军,何耀,等. 血浆同型半胱氨酸水平与脑大动脉粥样硬化性病变的相关性分析[J]. 中华内科杂志,2006,45(9):744-747.
- [10] 贺亚龙. 血浆同型半胱氨酸与缺血性脑血管病患者颈动脉粥样硬化斑块的关系[J]. 中国实用神经疾病杂志,2015,18(19):18-20.
- [11] Smulders YM,Blom HJ. The homocysteine controversy[J]. J Inherit Metab Dis,2011,34(1):93-99.
- [12] 陈芳,吕海东,秦东香,等. 中青年缺血性脑血管病与 MTHFR 基因多态性及血浆同型半胱氨酸的相关性[J]. 中华神经医学杂志,2014,13(5):489-493.
- [13] 蒋萍,臧大维. 急性脑梗死患者 MTHFR 基因多态性与血浆同型半胱氨酸水平的关系[J]. 山东医药,2014,54(8):1-4,8.
- [14] 黄一宁,赵宇岚,李舜伟. 同型半胱氨酸和 MTHFR 基因多态性与缺血性脑血管病的关系[J]. 中华医学杂志,2002,82(2):119-122.
- [15] Vijayan M,Chinniah R,Ravi PM,et al. MTHFR (C677T) CT genotype and CT-apoE3/3 genotypic combination predisposes the risk of ischemic stroke[J]. Gene,2016,591(2):465-470.

收稿日期:2017-08-29 修回日期:2017-11-03 编辑:周永彬

(上接第 476 页)

[13] 马静,赵立华,谢云. 2 型糖尿病合并高尿酸血症患者与空腹 C 肽和胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志,2015,23(1):46-49.

[14] Avula NR,Shenoy D. Evaluation of association of hyperuricaemia with metabolic syndrome and insulin resistance [J]. J Clin Diagn Res,2016,10(12):OC32-OC34.

[15] Zhou XR,Sun CH,Liu JR,et al. Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR gamma gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance[J]. Growth Horm IGF Res,2008,18(5):361-368.

[16] Nakata M,Okada T,Ozawa K,et al. Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release [J]. Biochem Biophys Res Commun,2007,353(4):1046-1051.

[17] Nieto FJ,Iribarren C,Gross MD,et al. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis [J]. Atherosclerosis,2000,148(1):131-139.

- [18] Bock G,Dalla Man C,Campioni M,et al. Pathogenesis of pre-diabetes:mechanisms of fasting and postprandial hyperglycemia in people with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance [J]. Diabetes,2006,55(12):3536-3549.
- [19] Quiñones Galvan A,Natali A,Baldi S,et al. Effect of insulin on uric acid excretion in humans [J]. Am J Physiol,1995,268(1 Pt 1):E1-E5.
- [20] Yamada A,Sato KK,Kinuhata S,et al. Association of visceral fat and liver fat with hyperuricemia [J]. Arthritis Care Res (Hoboken),2016,68(4):553-561.
- [21] Tamba S,Nishizawa H,Funahashi T,et al. Relationship between the serum uric acid level,visceral fat accumulation and serum adiponectin concentration in Japanese men [J]. Intern Med,2008,47(13):1175-1180.

收稿日期:2017-09-19 修回日期:2017-10-21 编辑:王国品