

# 影响亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性的因素分析

郭虹, 胡兴文, 王波<sup>△</sup> (湖北省妇幼保健院检验科, 武汉 430070)

**【摘要】** 目的 了解影响女性亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T、A1298C 位点和甲硫氨酸合成酶还原酶(MTRR)A66G 位点基因多态性的因素。方法 采用横断面调查研究方法,以湖北省内 1 902 例女性为对象,采集口腔黏膜上皮细胞,提取 DNA,用实时荧光定量 PCR 技术检测 MTHFR 和 MTRR 基因,统计分析不同民族 MTHFR 和 MTRR 基因多态性的差异,与其他地区人群的 MTHFR 和 MTRR 基因多态性进行比较,并分析不同位点基因多态性之间的关联关系。结果 (1)湖北省汉族女性和少数民族女性在 MTHFR C677T 和 MTRR 基因多态性构成差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而 MTHFR A1298C 位点基因多态性构成差异有统计学意义( $P<0.05$ )。 (2)MTHFR C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率从南到北呈上升趋势, MTHFR A1298C 位点的纯合突变基因型 CC 的频率从南到北呈下降趋势,而 MTRR A66G 位点基因多态性在不同地区差异不大。 (3)MTHFR C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率在 A1298C 位点的正常型、杂合型、纯合突变型中分别为 15.9%、0.1%、0.0%,差异有统计学意义( $P<0.01$ );MTHFR C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率在 MTRR A66G 位点的正常型、杂合型、纯合突变型中分别为 9.4%、5.9%、0.7%,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 MTHFR A1298C 位点基因多态分布存在民族差异;而 MTRR C677T、A1298C 位点基因多态分布存在地区差异;同一基因不同位点的基因多态性有关联。

**【关键词】** 亚甲基四氢叶酸还原酶; 甲硫氨酸合成酶还原酶; 基因位点; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.13.010 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)13-1655-03

**Analysis of factors impacting the gene polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase** GUO Hong, HU Xing-wen, WANG Bo<sup>△</sup> (Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430070, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the factors which affect the gene polymorphism of C677T and A1298C in methylene tetrahydrofolate reductase(MTHFR) and A66G in methionine synthase reductase(MTRR). **Methods** A cross-sectional survey research method was used. A total 1 902 women in Hubei province were recruited and collected oral mucosal epithelial cells. The DNA of cells was extracted. The MTHFR and MTRR gene polymorphisms were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The MTHFR and MTRR gene polymorphisms were analyzed statistically among different ethnic women. And their MTHFR and MTRR gene polymorphisms were compared with other provinces. It was analyzed whether there was relationship between the different gene polymorphism. **Results** (1) There was not statistically significant difference in MTHFR C677T and MTRR gene polymorphisms between the Han and national minority women in Hubei Province( $P>0.05$ ), but there was significant difference in MTHFR A1298C( $P<0.05$ ). (2) The frequency of the mutant homozygous genotype TT of MTHFR C677T sites was upward trend from south to north. However, the frequency of the mutant homozygous genotype CC of MTHFR A1298C sites was downward trend from south to north. There wasn't difference in MTRR A66G gene polymorphism in the different province. (3) The frequency of the homozygous mutant genotype TT of MTHFR C677T in A1298C site of normal type, heterozygous and homozygous mutant was 15.9%, 0.1% and 0.0%, respectively. There was very significant difference( $P<0.01$ ). The frequency of the homozygous mutant genotype TT of MTHFR C677T in MTRR A66G site of normal-type, heterozygous and homozygous mutant was 9.4%, 5.9% and 0.7%, respectively. There was no statistical difference( $P>0.05$ ). **Conclusion** Here is significant difference in MTHFR A1298C gene polymorphism and MTHFR C677T, A1298C site gene polymorphism distribution in different areas. Because of association in different sites of gene polymorphism of the different gene.

**【Key words】** methylenetetrahydrofolate reductase; methionine synthase reductase; gene site; gene polymorphism

亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)和甲硫氨酸合成酶还原酶(MTRR)是叶酸代谢通路中的关键酶, MTHFR C677T 和 A1298C、MTRR A66G 等基因位点多态性影响着其编码酶的活性,血清和红细胞叶酸浓度,血浆同型半胱氨酸(Hcy)浓

度<sup>[1-3]</sup>。血浆 Hcy 水平升高与神经管缺陷、妊娠高血压综合征、动静脉栓塞性疾病等出生缺陷有关<sup>[4-5]</sup>。本研究通过分析湖北省女性 MTHFR 和 MTRR 的多态性分布特征,了解 MTHFR 和 MTRR 基因多态性是否与民族、地区和不同基因

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: wangbo1005@163.com。

位点基因多态性有关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 1 月至 2012 年 12 月在本院进行叶酸利用能力遗传检测的 1 902 例湖北籍女性为研究对象, 年龄 18~53 岁, 平均(28±3)岁, 汉族 1 876 例, 少数民族 26 例。

1.2 仪器和试剂 仪器: 实时荧光定量 PCR 仪 ABI7900(美国), 试剂: Applied Biosystems(美国)。

1.3 方法

1.3.1 标本 DNA 采集 采集受检者的口腔黏膜上皮细胞, 之后用柱式抽提试剂盒抽提 DNA 标本。

1.3.2 基因检测 对 MTHFR 基因 C677T、A1298C 和 MTRR 基因 A66G 位点的单核苷酸多态性采用实时荧光定量 PCR 技术进行检测。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 对三个位点分别进行荧光定量 PCR 检测, 检测所用 Taqman -MGB 探针信息如表 1 所示。每个反应的体系总体积为 10 μL, 包含浓度为 20 ng/μL 的 DNA 模板 1 μL, 2×Taqman Universal Master Mix 5 μL, 20×Taqman -MGB 探针 0.5 μL, 去离子水 3.5 μL。反应条件为 95℃ 10 min, 随后进行 20 个循环的扩增(92℃ 15 s, 60℃ 1 min), 再进行 30 个循环的扩增(89℃ 15 s, 60℃ 90 s), 之后 4℃ 保存。ABI 7900 型荧光定量 PCR 仪实时检测每一样品孔每一扩增循环的荧光强度, 根据荧光强度曲线, 利用其分析软件确定各个标本的基因分型结果。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 15.0 统计软件进行分析, 组间比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 湖北省汉族女性和少数民族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布比较 湖北省汉族女性和少数民族 MTHFR C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率分别为 16.0%、15.4%, 两组间基因型构成差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); MTHFR A1298C 位点的纯合突变基因型 CC 的频率分别为 3.1%、11.5%, 两组间基因型构成差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); MTRR A66G 位点的纯合突变基因型 GG 的频率分别为 6.5%、3.8%, 两组间基因型构成差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

2.2 湖北省女性和其他省份女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性比较 湖北省女性 MTHFR C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率为 16.0%, 高于广东省(7.4%)<sup>[4]</sup>和海南省(8.88%)<sup>[5]</sup>, 也高于四川省(8.63%)<sup>[6]</sup>, 但低于河南省(34.50%)和山东省(41.82%)<sup>[6]</sup>, MTHFR C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率从南到北呈上升趋势; 湖北省女性 MTHFR A1298C 位点的纯合突变基因型 CC 的频率为 3.2%, 比广东省、海南省和四川省低, 但比河南省和山东省高, MTHFR A1298C 位点的纯合突变基因型 CC 的频率从南到北呈下降趋势; MTRR A66G 位点的纯合突变基因型 GG 的频率为 6.5%, 和其他省份差不多, 见表 3。

表 1 Taqman -MGB 引物及探针序列

检测位点	引物		探针	
	正向引物(F)	反向引物(R)	VIC 荧光探针	FAM 荧光探针
MTHFR C677T	GAAAAGCTGCGTGATGATG	TTGAAGGAGAAGGTGTC	AATCG[G]CTCCCGC	AATCG[A]CTCCCGC
MTHFR A1298C	AAGAACGAAGACTTCAAA	TGGGGGAGGAGCTGAC	ACACTT[G]CTTCACT	ACACTT[T]CTTCACT
MTRR A66G	AGGCAAAGGCCATCGCA	ATCCATGTACCACAGCTT	AAGAAAT[A]TGTGAG	AAGAAAT[G]TGTGAG

表 2 湖北省妇女 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布[n(%)]

民族	MTHFR C677T			MTHFR A1298C		MTRR A66G			
	CC	CT	TT	AA	AC	CC	AA	AG	GG
汉族	683(36.4)	893(47.6)	300(16.0)	1 268(67.6)	550(29.3)	58(3.1)	1 067(56.9)	687(36.6)	122(6.5)
少数民族	13(50.00)	9(34.6)	4(15.4)	15(57.7)	8(30.8)	3(11.5)	15(57.7)	10(38.5)	1(3.8)
合计	696(36.6)	902(47.4)	304(16.0)	1 283(67.5)	558(29.3)	61(3.2)	1 082(56.9)	697(36.6)	123(6.5)

注: 两组间基因多态性比较, MTHFR C677T  $\chi^2 = 2.213, P = 0.331$ ; MTHFR A1298C  $\chi^2 = 6.096, P = 0.047$ ; MTRR A66G  $\chi^2 = 0.307, P = 0.858$ 。MTHFR C677T: CC 正常型; CT 杂合型; TT 突变型; MTHFR A1298C: AA 正常型; AC 杂合型; CC 突变型; MTRR A66G: AA 正常型; AG 杂合型; GG 突变型。

表 3 湖北省与其他省份 MTHFR、MTRR 基因型频率分布比较(%)

省份	MTHFR C677T			MTHFR A1298C		MTRR A66G			
	CC	CT	TT	AA	AC	CC	AA	AG	GG
湖北省	36.6	47.4	16.0	67.5	29.3	3.2	56.9	36.6	6.5
广东省 <sup>[6]</sup>	51.4	41.2	7.4	59.3	35.4	5.3	51.5	40.8	7.7
海南省 <sup>[7]</sup>	58.40	32.72	8.88	56.67	36.24	7.09	49.10	41.65	9.25
四川省 <sup>[8]</sup>	39.57	51.80	8.63	53.96	40.29	5.76	56.83	38.85	4.32
河南省 <sup>[8]</sup>	17.83	47.67	34.50	72.87	24.42	2.71	56.59	37.21	6.20
山东省 <sup>[8]</sup>	14.55	43.64	41.82	71.52	27.27	1.21	59.39	33.94	6.67

表 4 不同基因型中基因突变频率的比较(%)

基因	MTHFR A1298C			MTRR A66G		
	AA	AC	CC	AA	AG	GG
MTHFR C677T						
CC	363(19.1)	274(14.4)	59(3.1)	390(20.5)	257(13.5)	49(2.6)
CT	617(32.4)	283(14.9)	2(0.1)	513(27.0)	328(17.2)	61(3.2)
TT	303(15.9)	1(0.1)	0(0.0)	179(9.4)	112(5.9)	13(0.7)

注: MTHFR A1298C 中各型比较,  $\chi^2=278.473, P=0.000$ ; MTRR A66G 中各型比较,  $\chi^2=3.071, P=0.546$ 。

**2.3 不同位点基因型中基因突变频率的比较** 在 MTHFR 基因中, 在 C677T 位点的 CC、CT 和 TT 基因型中, A1298C 位点的纯合突变基因型 CC 的频率分别为 3.1%、0.1%、0.0%, 呈下降趋势; 在 A1298C 位点的 AA、AC 和 CC 的基因型中, C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率分别为 15.9%、0.1%、0.0%, 呈下降趋势, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。在同一 MTHFR 基因中, 当 C677T 位点发生纯合突变时, 则 A1298C 位点不会发生纯合突变; 同样当 A1298C 位点发生纯合突变时, 则 C677T 位点也不会发生纯合突变。在 MTRR A66G 位点的 AA、AG 和 GG 基因型中, C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率分别为 9.4%、5.9%、0.7%, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 4。

**3 讨论**

本研究显示, 在湖北地区汉族女性和少数民族女性在 MTHFR C677T 和 MTRR A66G 位点的基因型构成差异均无统计学意义( $P>0.05$ ), 但 MTHFR A1298C 位点的基因型构成差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 与文献[6-7]研究基本一致。这一结果也可能由于本研究少数民族的例数太少(只有 26 例)所致, 有待加大标本量进一步分析。

不同地区检测的 MTHFR 基因多态性分布差异较大, 虽然有两种不同的方法进行检测, 即实时荧光定量 PCR 技术和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法, 但两种方法对检测结果没有影响<sup>[8]</sup>, 说明 MTHFR 基因的多态性可能受环境或气候的影响较大。湖北地区女性 MTHFR C677T 位点纯合突变基因型 TT 的频率为 16.0%, 比广东省(7.4%)和海南省(8.88%)、四川省(8.63%)高, 但比河南省(34.50%)和山东省(41.82%)低<sup>[9]</sup>, 呈现从南方到北方逐步升高的趋势。中部的湖北省是南方的广东省和海南省的 2 倍左右, 河南省又是湖北省的 2 倍多, 山东省又比河南省高, 升高的幅度较大, 频率从 7.4% 升高到 41.8%。湖北省女性 MTHFR A1298C 位点的纯合突变基因型 CC 的频率为 3.2%, 湖北省的比广东省(5.3%)和海南省(7.09%)的低, 但比河南省(2.71%)和山东省(1.21%)的高<sup>[6,9-10]</sup>。其变化趋势恰好与 MTHFR C677T 位点的相反, 呈现从南方到北方逐步降低的趋势, 降低幅度从海南省的 7.09% 逐步降到山东省的 1.21%。湖北省女性 MTRR A66G 位点的纯合突变基因型 GG 的频率为 6.5%, 和其他省份差不多。

本研究结果显示 MTRR A66G 位点的 AA、AG 和 GG 基因型, C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率分别为 9.4%、5.9%、0.7%, 差异无统计学意义, 提示不同基因的不同位点基因多态性之间无关联。在同一 MTHFR 基因中, 当 C677T 位点发生纯合突变时, 则在 A1298C 位点不会发生纯合突变; 当 A1298C 位点发生纯合突变时, 则 C677T 位点不会发生纯合突

变。在 C677T 位点的 CC、CT 和 TT 基因型中, A1298C 位点的纯合突变基因型 CC 的频率呈下降趋势; 在 A1298C 位点的 AA、AC 和 CC 的基因型中, C677T 位点的纯合突变基因型 TT 的频率同样呈下降趋势, 显示在同一基因中, 一个位点的突变频率升高时, 另一个位点的突变频率就相应地下降, 提示同一基因不同位点的基因多态性有关联。尽管亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因位点存在多态性, 但机体在遗传过程中仍保持了基因的稳定性。

**参考文献**

- [1] Eskes TK. Open or closed? A world of difference; a history of homocysteine research[J]. Nutr Rev, 1998, 56(8): 236-244.
- [2] Nishio K, Goto Y, Kondo T et al. Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake [J]. J Epidemiol, 2008, 18(3): 125-131.
- [3] Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations [J]. Circulation, 1996, 93(1): 7-9.
- [4] 王素敏, 沈嵘, 石小燕, 等. 同型半胱氨酸代谢酶基因突变多态性与妊娠高血压综合征遗传易感性研究[J]. 中国优生与遗传, 2006, 14(4): 15-17.
- [5] 于海东, 郑红, 齐华, 等. 同型半胱氨酸代谢酶基因突变多态性与深静脉血栓的相关性研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(6): 635-639.
- [6] 劳海红, 贺宪民. 海南省汉族和黎族妇女亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究 [J]. 中国计划生育学杂志, 2011, 19(11): 655-657.
- [7] 肖雁, 单可人, 李毅, 等. 贵州荔波封闭人群 MTHFR 基因多态性研究分析 [J]. 人类学学报, 2005, 24(4): 315-318.
- [8] 尹志农, 李瑞杰. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性两种检测方法之比较 [J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(11): 1003-1004.
- [9] 贺宪民, 张群, 杨琦, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性研究 [J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 14(1): 13-18.
- [10] 尹爱华, 鲁衍强, 芮欣悦, 等. 广东省女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布研究 [J]. 中国公共卫生, 2012, 28(增刊): 156-158.