

• 论 著 •

Hcy、FA、维生素 B₁₂ 水平及 MTHFR 基因多态性与脑梗死的相关性研究*

刘竞争¹, 晁 丹², 陈 燕¹, 方 芳¹, 邵春青¹, 司学众¹, 张国军^{1△}

(1. 首都医科大学附属北京天坛医院检验科 100050; 2. 首都医科大学医学检验系 2012 级本科毕业生 100050)

摘 要:目的 探讨血清同型半胱氨酸(Hcy)、叶酸(FA)、维生素 B₁₂ 水平及亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性与脑梗死的相关性。方法 选择首都医科大学附属北京天坛医院神经内科住院脑梗死患者 70 例作为试验组, 选择同期来该院进行体检的健康志愿者 30 例作为健康对照组。并采用循环酶法检测血清 Hcy 水平, 化学发光免疫法检测血清 FA、维生素 B₁₂ 水平, 采用实时荧光定量 PCR 检测试验组中血清 Hcy 高于正常值患者的 MTHFR 基因多态性。结果 试验组中脑梗死患者血清 Hcy 水平为高水平($\geq 15 \mu\text{mol/L}$)的例数有 48 例, 占 68.6%。试验组血清 Hcy 水平为 $(23.25 \pm 8.17) \mu\text{mol/L}$, 健康对照组血清 Hcy 水平为 $(7.09 \pm 2.25) \mu\text{mol/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。试验组血清 FA 水平 $(6.23 \pm 2.19) \text{ng/mL}$ 、维生素 B₁₂ 水平 $(329.89 \pm 125.79) \mu\text{mol/L}$ 与健康对照组血清 FA 水平 $(10.57 \pm 5.70) \text{ng/mL}$ 、维生素 B₁₂ 水平 $(598.85 \pm 142.56) \mu\text{mol/L}$ 比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。试验组血清 Hcy 水平与 FA 及维生素 B₁₂ 水平均呈负相关关系($P < 0.05$)。血清高 Hcy 患者的 MTHFR C677T 多态位点 CC、CT 和 TT 基因型频率分布分别为 CC 野生型 8.0%, TT 突变型 39.5%, CT 突变型 52.5%; MTHFR A1298C 多态位点基因型频率分布分别为 AC 突变型 33.3%, AA 野生型 67.3%。结论 MTHFR C677T 突变和血清高 Hcy 水平及脑梗死发病密切相关。

关键词: 脑梗死; MTHFR; 同型半胱氨酸; 叶酸; 维生素 B₁₂

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.02.002 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)02-0156-03

Correlation of Hcy, FA, Vitamin B₁₂ levels and MTHFR gene polymorphism with cerebral infarction*

LIU Jingzheng¹, CHAO Dan², CHEN Yan¹, FANG Fang¹, SHAO Chunqing¹, SI Xuezhong¹, ZHANG Guojun^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Grade 2012, Department of Medical Laboratory, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To investigate correlation of the serum homocysteine (Hcy), folic acid (FA), the level of Vitamin B₁₂ and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism with cerebral infarction. **Methods** Totally 70 cases of cerebral infarction patients in department of neurology, Beijing Tiantan Hospital were selected as the experimental group, 30 cases of healthy volunteers were selected as healthy control group. Circulating enzyme method was used to detect the serum Hcy level. The serum levels of FA and Vitamin B₁₂ were detected by chemiluminescence immunoassay, real-time quantitative PCR was used to detect the polymorphism of MTHFR gene in the patients with serum Hcy higher than normal in experimental group. **Results** The level of serum Hcy in patients with cerebral infarction in the experimental group (48 cases, 68.6%) was higher than the normal value ($\geq 15 \mu\text{mol/L}$), the serum Hcy level of experimental group was $(23.25 \pm 8.17) \text{mmol/L}$, the serum Hcy level of the control group was $(7.09 \pm 2.25) \text{mmol/L}$, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The serum level of FA in experimental group was $(6.23 \pm 2.19) \text{ng/mL}$ and Vitamin B₁₂ levels was $(329.89 \pm 125.79) \text{mol/L}$, the serum FA level in the healthy control group was $(10.57 \pm 5.70) \text{ng/mL}$, the Vitamin B₁₂ levels was $(598.85 \pm 142.56) \text{mol/L}$, the differences were statistically significant between the two groups ($P < 0.05$). In the experimental group, the levels of serum Hcy were negatively correlated with the levels of FA and Vitamin B₁₂ ($P < 0.05$). The frequency distributions of MTHFR C677T CC, CT and TT genotypes in the patients were CC wild type 8.0%, TT mutant 39.5%, and CT 52.5%; the genotype frequency distribution of MTHFR A1298C polymorphism loci were AC mutant 33.3% and AA wild type 67.3%. **Conclusion** MTHFR C677T mutation, high serum Hcy levels and the incidence of cerebral infarction is closely related.

Key words: cerebral infarction; MTHFR; homocysteine; folic acid; Vitamin B₁₂

脑梗死是一种常见的脑血管疾病, 其具有较高的病死率。因此, 脑梗死发病的危险因素的探讨已成为医学界的研究热点。高同型半胱氨酸(Hcy)水平与脑梗死和脑出血的关系密切, 而 Hcy 代谢过程中的重要辅酶有叶酸(FA)、维生素 B₁₂, 其二者血清水平减低可导致高同型半胱氨酸血症。参与 FA 代谢途径中的关键酶是亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)。

研究结果表明, MTHFR 基因主要有 2 个多态位点的突变, 分别为 MTHFR C677T 和 A1298C, 这 2 种突变类型均可导致 MTHFR 活性不同程度减低, 并最终影响血清 Hcy 水平^[1]。本研究通过对 70 例脑梗死患者血清 Hcy、FA、维生素 B₁₂ 水平的测定和对 MTHFR C677T 和 MTHFR A1298C 基因位点突变分析, 以探讨与脑梗死的关系。

* 基金项目: 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2013-3-052); 北京市优秀人才青年拔尖个人项目(2015000021223ZK34)。

作者简介: 刘竞争, 女, 检验技师, 主要从事临床生物化学检验研究。△ 通信作者, E-mail: tiantanzgj@163.com。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1—3 月首都医科大学附属北京天坛医院神经内科确诊为脑梗死的患者共 70 例,所有患者均符合中华医学会神经病学分会脑血管病学组制订的《中国急性缺血性脑卒中诊治指南(2010 版)》相关诊断标准^[2]。纳入试验组的患者已排除近 1 个月内服用 FA、维生素类药物者,且不包括患有甲状腺功能异常、恶性肿瘤、糖尿病、妊娠、严重的肝肾功能障碍患者。其中试验组男 38 例,女 32 例,年龄(59.4±5.9)岁。健康对照组采用同期在该院体检中心体检的 30 例健康者,男 18 例,女 12 例,年龄(56.3±5.4)岁。

1.2 研究方法

1.2.1 血清学指标 清晨空腹抽取静脉血 3~5 mL,标本在 2 h 内处理,离心 5 min、3 000 r/min 分离血清,备用检测血清学指标。采用日立 008 全自动生化分析仪,武汉长立公司试剂检测血清 Hcy 水平,且以血清 Hcy≥15 μmol/L 为高 Hcy。采用由 IMMULITE i2000 化学发光检测仪及配套试剂盒测定血清 FA、维生素 B₁₂ 水平,操作均按说明书严格进行。

1.2.2 MTHFR 基因多态性分析 采集 EDTA-K₂ 抗凝的外周血 1~2 mL,天根试剂盒提取基因组 DNA。采用江西诺德荧光试剂盒扩增,罗氏 lightCycler480 II 荧光定量分析 MTHFR C677T 和 MTHFR A1298C 基因位点突变。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行组间比较,采用 Spearman 相关检验进行相关性分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

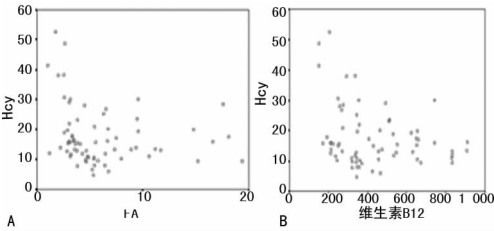
2.1 试验组与健康对照组 Hcy、FA、维生素 B₁₂ 水平比较 试验组患者血清 Hcy 水平为高 Hcy(≥15 μmol/L)的例数为 48 例,占试验组总例数的 68.6%。试验组血清 Hcy 水平(23.25±8.17) μmol/L,明显高于健康对照组(7.09±2.25) μmol/L,差异有统计学意义(*P*<0.05)。试验组血清 FA 和维生素 B₁₂ 水平明显低于健康对照组(*P*<0.05),见表 1。

表 1 试验组与健康对照组 Hcy、FA、维生素 B₁₂ 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Hcy (μmol/L)	FA (ng/mL)	维生素 B ₁₂ (μmol/L)
试验组	70	23.25±8.17 ^a	6.23±2.19 ^a	329.89±125.79 ^a
健康对照组	30	7.09±2.25	10.57±5.70	598.85±142.56

注:与健康对照组比较,^a*P*<0.05。

2.2 试验组 3 项血清学指标的分析 对试验组的 3 项血清学指标(Hcy、FA 和维生素 B₁₂)水平做相关性分析。分析结果显示,试验组的血清 Hcy 水平与血清 FA 和维生素 B₁₂ 水平均呈负相关(*r*=-0.464、-0.532,*P*<0.05),见图 1。

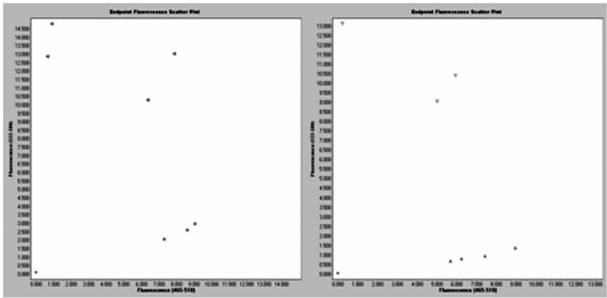


注:A 为试验组血清 Hcy 与 FA 水平的相关性分析;B 为试验组血清 Hcy 与维生素 B₁₂ 水平的相关性分析。

图 1 试验组 3 项血清学指标的相关性分析

2.3 Hcy 组 MTHFR C677T 和 MTHFR A1298C 扩增结果和基因多态性分析 检测 48 例患者的 MTHFR C677T 和

MTHFR A1298C 基因多态性。结果显示,MTHFR 中 C677T 位点 TT 突变为 39.5%,CT 突变 52.5%,CC 野生型 8.0%(图 2A)。MTHFR 中 A1278C 位点突变 AC 为 33.3%,AA 野生型为 67.3%(图 2B)。



注:A 表示 MTHFR 中 C677T 位点;B 表示 MTHFR 中 A1298C 位点。

图 2 基因多态性分析

3 讨论

Hcy 是在甲硫氨酸循环代谢过程中产生的一类含硫氨基酸,具有重要的生理意义,且该代谢过程依赖于维生素 B₁₂ 和 FA,当 FA 和维生素 B₁₂ 水平不足时,会造成 Hcy 代谢异常,导致大量 Hcy 蓄积^[3]。研究显示,血中 Hcy 水平过高是造成心脑血管疾病的原因,而不是传统中的认为脂质代谢紊乱^[4]。Hcy 能通促进脑梗死的发生和发展。其造成心脑血管疾病的主要作用机理是由于血栓形成的参与,响应氧化应激和造成内皮功能障碍^[5]。本文研究结果表明,试验组脑梗死患者的血清 Hcy 水平明显高于健康对照组(*P*<0.05),而 FA、维生素 B₁₂ 水平均低于健康对照组,且试验组的血清 FA 和维生素 B₁₂ 水平与 Hcy 水平均呈负相关。心脑血管疾病是多因素的,其发病机制是由遗传因素和环境因素和基因-基因和基因-环境相互作用决定的。本研究表明,试验组患者血清 Hcy 水平为高 Hcy(≥15 μmol/L)的例数为 48 例,占总试验组例数的 68.6%,高同型半胱氨酸血症可独立影响脑梗死的发生发展,或增加了与其他因素促进血管病变相关性疾病的风险。

在参与编码 Hcy 代谢酶的基因变异,或耗尽重要的辅因子或底物,包括 FA、维生素 B₁₂,可导致血清 Hcy 水平升高。MTHFR 基因位于 1 号染色体的 1p36.3。MTHFR 是 FA 代谢中的关键酶。它的缺乏可引起叶酸的血浆浓度显著降低,维生素 B₁₂ 和蛋氨酸,而 Hcy 升高。正常的 MTHFR 活性是 FA 和蛋氨酸代谢的关键,从而维持体内 Hcy 水平正常^[6]。C677T 位点是研究较多的突变位点,该突变位于 MTHFR 基因的 N 端,并且是维持酶活性功能及结构域中的一个重要位点。其突变是碱基 C 被 T 替代,致使酶的活性下降,影响 Hcy 复甲基化,从而使血中 Hcy 水平升高。近年来,A1298C 是另一个 MTHFR 被关注的突变点,它的突变能够引起丙氨酸替代谷氨酸^[7]。本研究结果显示,在高同型半胱氨酸血症中 MTHFR-C677T 2 种突变型共占 92.0%,而野生型只有 8.0%。故由此可以得出,MTHFR CT 和 TT 2 种突变与高 Hcy 密切相关。而在高 Hcy 患者 MTHFR 中 A1278C 野生型占 67.3%,突变型只占 33.3%,故本研究结果显示 MTHFR 中 A1278C 位点突变与高 Hcy 关系不大。

综上所述,高同型半胱氨酸血症是脑梗死的独立危险因素。给患者联合检测血清 Hcy、FA、维生素 B₁₂ 三者的血清水平及 MTHFR C677T 基因多态性具有重要的临床意义,不但能够发现因 FA 和维生素 B₁₂ 的缺乏和不足(下转第 160 页)

察,初步评估了患者凝血-纤溶功能状态,以期对临床工作有参考价值。由于存在潜在风险的出血,对于开颅术后是否要常规进行抗凝治疗及是否能够改善生存质量,仍需进一步研究^[20]。

参考文献

[1] Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, et al. Malignancies, pro-thrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis [J]. JAMA, 2005, 293: 715-722.

[2] Wun T, White RH. Venous thromboembolism (VTE) in patients with cancer: epidemiology and risk factors [J]. Cancer Investig, 2009, 27(Suppl 1): 63-74.

[3] Semrad TJ, O'Donnell R, Wun T, et al. Epidemiology of venous thromboembolism in 9 489 patients with malignant glioma [J]. J Neurosurg, 2007, 106: 601-608.

[4] Yman GH, Kborana AA. Cancer, clots and consensus: new understanding of an old problem [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(29): 4821-4826.

[5] Magnuson D, Astie RAKJ, et al. Oncogenes and the coagulation system-forces that modulate dormant and aggressive states in cancer [J]. Thromb Res, 2014, 133 (2Suppl), S1-S9.

[6] 王艳兰, 左灿, 卿之驹. 凝血-纤溶系统相关指标检测对胶质瘤患者的意义 [J]. 广东医学, 2015, 53(7): 1090-1092.

[7] 蓝美锐, 陈礼刚. 胶质瘤患者血浆 D-二聚体变化及临床意义 [J]. 实用医院临床杂志, 2014, 40(4): 149-151.

[8] Hoke M, Dieckmann K, Koppensteine R, et al. Prognostic value of plasma d-dimer levels in patients with glioblastoma multiforme Results from a pilot study [J]. Wien Klin Wochenschr, 2011, 123(7/8): 199-203.

[9] Thaler J, Ay C, Kaider A, et al. Biomarkers predictive of venous thromboembolism in patients with newly diagnosed high-grade gliomas [J]. Neuro Oncol, 2014, 16: 1645-1651.

[10] Prell J, Rachinger J, Smaczny R, et al. D-dimer plasma level: a reliable marker for venous thromboembolism after elective craniotomy [J]. J Neurosurg, 2013, 119(5): 1340-1346.

[11] Ruediger G, Manuela K, Volker S, et al. Hemostatic and hemorrhagic problems in neurosurgical patients [J]. Acta Neurochir, 2009, 151: 873-900.

[12] 张红, 赵花, 张琰. 恶性肿瘤患者纤维蛋白原与 D-二聚体检测的临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18): 2758-2759.

[13] Moshchev DA, Lubnin AI, Moshkin AV, et al. Prognostic value of D-dimer fibrin level in neurosurgical patients before elective hospitalization [J]. Anesteziol Reanimatol, 2013, 23(4): 59-63.

[14] Perry JR, Julian JA, Laperriere NJ, et al. PRODIGE: a randomized placebo-controlled trial of dalteparin low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis in patients with newly diagnosed malignant glioma [J]. J Thromb Haemost, 2010, 17: 1959-1965.

[15] Simanek R, Vormittag R, Hassler M, et al. Venous thromboembolism and survival in patients with high-grade glioma [J]. Neuro Oncol, 2007, 9: 89-95.

[16] Geriach R, Scheuer T, Beck J, et al. Surgery after early Nadroparin administration: results of a prospective study [J]. Neurosurgery, 2003, 53: 1028-1041.

[17] 于书卿, 贾桂军, 崔勇, 等. 神经外科手术后静脉血栓栓塞症预防性治疗研究 [J]. 北京医学, 2005, 27(7): 385-387.

[18] 杨秋继. 开颅手术对机体纤溶系统的影响 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.

[19] Kawaguchi T, Kumabe T, Kanamori M, et al. Early detection of venous thromboembolism in patients with neuroepithelial tumor: efficacy of screening with serum D-dimer measurements and Doppler ultrasonography [J]. J Neurooncol, 2011, 101(3): 495-504.

[20] Aishima K, Yoshimoto Y. Screening strategy using sequential serum D-dimer assay for the detection and prevention of venous thromboembolism after elective brain tumor surgery [J]. Br J Neurosurg, 2013, 117(3): 348-354.

(收稿日期: 2016-08-20 修回日期: 2016-10-26)

(上接第 157 页)

而导致的高同型半胱氨酸血症,并且可指导临床合理补充 FA 和维生素 B₁₂,从而降低血清 Hcy 水平,减少脑梗死的发生及发展,具有重要的社会价值。

参考文献

[1] 刘超, 祝群. 痛风与高尿酸血症的分子流行病学研究进展 [J]. 实用老年医学, 2015, 12(10): 382-383.

[2] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 (2010 版) [J]. 中国全科医学, 2011, 14(35): 4013-4017.

[3] Scigliano G, Musicco M, Soliveri P, et al. Reduced risk factors for vascular disorders in Parkinson disease patients: a case-control study [J]. Stroke. 2006, 37: 1184-1188.

[4] Mejia Mohamed EH, Tan KS, Ali JM, et al. TT genotype

of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is an important determinant for homocysteine levels in multiethnic Malaysian ischaemic stroke patients [J]. Ann Acad Med Singapore, 2011, 40(4): 186-191.

[5] Schaffer A, Verdoia M, Cassetti E, et al. Relationship between homocysteine and coronary artery disease. Results from a large prospective cohort study [J]. Thromb Res, 2014, 134: 288-293.

[6] 刘小艳. 同型半胱氨酸及 MTHFR 基因多态性与冠心病的相关性研究进展 [J]. 西部医学, 2015, 3(27): 478-479.

[7] Ashjzadeh N, Fathi M, Shariat A. Evaluation of Homocysteine Level as a Risk Factor among Patients with Ischemic Stroke and Its Subtypes [J]. Iran J Med Sci, 2013, 38(3): 233-239.

(收稿日期: 2016-08-21 修回日期: 2016-10-27)