

· 论 著 ·

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与缺血性脑卒中的相关性研究^{*}

赵 娇, 张冬青, 王海滨[△]

(解放军总医院第一附属医院检验科, 北京 100048)

摘要:目的 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T、A1298C 2 个位点基因多态性与缺血性脑卒中发病风险、疾病严重程度的相关性。评价同型半胱氨酸(Hcy)作为脑卒中血清危险因子的可行性。方法 选取初发缺血性脑卒中患者 130 例作为病例组, 健康体检者 100 例作为健康对照组。采用实时荧光定量 PCR 方法分别检测 2 组 MTHFR C677T 和 A1298C 位点基因型。使用循环酶法测定 2 组血清 Hcy 水平。比较 2 组研究对象的基因型分布差异及 Hcy 水平差异。结果 病例组与健康对照组比较, C677T 位点突变型(CT 型+TT 型)所占比例显著增高(89.23% vs. 56.00%), 差异有统计学意义($P<0.05$); 突变型等位基因 T 的分布频率比较(65.38% vs. 44.00%), 差异有统计学意义($P<0.05$); 且脑梗死面积增大, 突变型所占比例明显增大。A1298C 位点的突变频率在 2 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。病例组血清 Hcy 水平显著高于对照组[(16.15±9.71)μmol/L vs. (12.68±4.01)μmol/L, $P<0.05$], 且以脑梗死组为最高。单一位点的突变与血清 Hcy 水平未发现显著的相关性。C677T 与 A1298C 联合突变的比例, 病例组显著高于对照组(16.15% vs. 9.00%, $P<0.05$), 且脑梗死面积增大, 联合突变者所占比例明显增大。在病例组内, 2 位点同时发生杂合突变时 Hcy 显著高于仅 C677T 杂合突变[(21.13±8.47)mol/L vs. (11.52±4.36)mol/L, $P<0.05$]。结论 血清 Hcy 水平升高会加大缺血性脑卒中的发病风险。MTHFR C677T 基因发生突变可能是缺血性脑卒中的独立危险因素, 且与疾病严重程度呈正相关。A1298C 位点单独发生突变时与缺血性脑卒中的发生未发现相关性, 但与 C677T 存在明显的协同作用, 即 2 位点同时发生突变时, 缺血性脑卒中的患病风险概率增加。

关键词:亚甲基四氢叶酸还原酶; 同型半胱氨酸; 基因多态性; 缺血性脑卒中

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.13.001 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)13-1847-04

The relationship of polymorphism in MTHFR with ischemic stroke^{*}

ZHAO Jiao, ZHANG Dongqing, WANG Haibin[△]

(The Department of Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between the polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene and the risk of ischemic stroke(IS). To investigate the correlation between the polymorphisms of MTHFR gene and plasma homocysteine(Hcy) levels in patients with IS. **Methods** 130 stroke patients and 100 healthy controls were collected. The polymorphisms were detected by real-time PCR, and the serum Hcy levels were measured by enzymatic cycling assay. **Results** In case group, the frequencies of mutant genotypes(CT+TT)and T alleles were 89.23% and 56.00% respectively, which were both significantly higher than those of the control group($P<0.05$). With the increase of infarct size, the proportion of mutant increased obviously($P<0.05$). While there was no significant difference in mutation frequency of A1298C among each group($P>0.05$). Serum Hcy levels in case group was significantly higher as compared with that of control group($P<0.05$). There was a significant variation in the frequency of double heterozygote MTHFR 677CT/1298AC between IS patients and healthy people($P<0.05$). In addition, the frequency was higher along with the increment of infarction area Homocysteine levels were significantly higher in IS patients with the double heterozygote($P<0.05$); however, the difference was not significant with the single-site mutation. **Conclusion** Our results show a significant association of Hcy with the risk of IS. A correlation also seems to be observed between IS and the MTHFR C677T genotype frequencies, but not in A1298C. However, a significant synergistic interaction was found with the double heterozygote MTHFR 677CT/1298AC.

Key words: methylenetetrahydrofolate reductase; homocysteine; gene polymorphism; ischemic stroke

缺血性脑卒中(IS)以其高致残率及高致死率, 已逐渐成为世界范围内严重危害人类健康的主要疾病之一。血清同型半胱氨酸(Hcy)水平轻至中度升高是诱发 IS 的独立危险因素, 亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是 Hcy 代谢过程中的关键酶, 编码 MTHFR 的基因存在多个突变位点, 以 C677T 和 A1298C 最为常见^[1-2]。这 2 种基因突变均会导致 MTHFR 活性显著下降, 从而使 Hcy 代谢障碍, 最终造成血清 Hcy 水平升高, 增大 IS 的发病风险^[3]。本研究通过检测 MTHFR 基因型

及 Hcy 水平, 探讨 MTHFR C677T 及 A1298C 2 个位点基因多态性与缺血性脑卒中发病风险、疾病严重程度的相关性, 评价 Hcy 作为脑卒中危险因子的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 3 月至 2016 年 2 月在解放军总医院第一附属医院神经内科住院治疗的初发 IS 患者 130 例作为病例组, 经临床检查(病史、体征、生化检验、CT 或 MRI)确诊, 诊断标准参照 WHO 制定的各类脑血管疾病诊断要点。

^{*} 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)子课题(2014AA022304)。

作者简介: 赵娇, 女, 技师, 主要从事临床生物化学与分子诊断学研究。 [△] 通信作者, E-mail: 1197131586@qq.com。

排除糖尿病,高血脂,高血压,心源性脑栓死,严重感染,肝肾功能异常,恶性肿瘤,甲状腺,血液系统疾病等。并根据头颅 CT 或 MRI 结果所示病灶大小将病例组进一步分为 3 组:梗死灶直径大于 3 cm 累计 2 个以上脑解剖部位为大梗死组,脑梗死灶直径 1.5~3 cm 累计 1 个以上脑解剖部位为小梗死组,小于 1.5 cm 为腔隙性脑梗死组。另选取该院同期健康体检者 100 例作为健康对照组。

1.2 检测方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采集外周静脉血 2 mL,EDTA 抗凝。使用离心柱法进行血液基因组 DNA 的提取,血液基因

组提取试剂盒(TIANamp Blood DNA Kit,DP318)购自天根生化科技(北京)有限公司;提取所得 DNA 标本置-80℃保存备用,检测前完全恢复至室温。

1.2.2 MTHFR C677T 和 A1298C 位点基因型检测 采用 PCR 荧光探针法,所用相关基因检测试剂盒购自武汉友友医疗科技有限公司。反应条件为 37℃ 10 min,95℃ 5 min,之后进行 40 个循环的扩增(95℃ 15 s,60℃ 60 s),并在每个循环结束时采集荧光信号。根据荧光强度曲线,利用荧光定量 PCR 分析仪(Roche Light Cycler480,德国)分析软件确定各个标本基因分型结果。特异性引物及 Taqman 探针序列,见表 1。

表 1 试剂盒特异性引物及探针序列

基因多态位点	目的基因引物序列		探针序列	
	上游	下游	FAM 荧光探针	VIC 荧光探针
C677T	GAAAAGCTG	TTGAAGGAG	AATCG[G]	AATCG[A]
	CGTGATGATG	AAGGTGTC	CTCCCGC	CTCCCGC
A1298C	AAGAACGAA	TGGGGGGAG	ACACTT[T]	ACACTT[G]
	GACTTCAAA	GAGCTGAC	CTTCACT	CTTCACT

1.2.3 血清 Hcy 水平检测 空腹采集外周静脉血 5 mL,3 500 r/m 离心 20 min,置-80℃保存备用,检测前完全恢复至室温。使用日立 7600 全自动生化分析仪,采用循环酶法完成血清 Hcy 水平检测,试剂购自苏州博源医疗科技有限公司。

1.3 统计学处理 应用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料组间比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组研究对象一般资料结果比较 2 组研究对象的性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表 2。

2.2 2 组不同基因型及等位基因分布频率结果比较 C677T 及 A1298C 位点的 SNP 均可产生纯合野生型、杂合突变型、纯合突变型 3 种基因型,2 组不同基因型及等位基因分布频率结果比较,病例组 C677T 突变型(CT+TT)高达 89.23%,而对照组仅为 56.00%,差异有统计学意义($P < 0.05$);突变型等位基因 T 的分布频率在 2 组之间差异也有统计学意义($P < 0.05$);且随梗死面积增大,T 等位基因分布频率也逐渐增大,

与腔隙性脑梗死组比较,大梗死组和小梗死组的突变基因型(CT+TT)及突变型等位基因 T 的分布频率均显著升高($P < 0.05$)。但各组 A1298C 位点的基因型分布频率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3、4。

表 2 2 组患者一般资料结果比较

组别	例数(<i>n</i>)	年龄 ($\bar{x} \pm s$,岁)	性别[<i>n</i> (%)]	
			男性	女性
病例组	130	66.52±11.80	96(73.85)	34(26.15)
对照组	100	64.39±9.05	72(72.00)	28(28.00)
t/χ^2		$t=1.50$	$\chi^2=0.098$	
P		0.134	0.754	

2.3 各组 Hcy 水平结果比较 病例组平均为(16.15±9.71) $\mu\text{mol/L}$,显著高于健康对照组[(12.68±4.01) $\mu\text{mol/L}$]($P < 0.05$);不同梗死面积的 3 组之间比较,差异也有统计学意义($P < 0.05$),且以大梗死组为最高[(18.28±11.36) $\mu\text{mol/L}$]。见表 5。

表 3 各组 MTHFR C677T 基因型分布频率结果比较[*n*(%)]

组别	例数(<i>n</i>)	基因型频率			CT+TT	等位基因频率	
		CC	CT	TT		C	T
病例组	130	14(10.77)	62(47.69)	54(41.54)	116(89.23)	90(34.62)	170(65.38)
大梗死组	66	4(6.06)	30(45.45)	32(48.49)	62(93.94)	38(28.79)	94(71.21)
小梗死组	36	2(5.56)	18(50.00)	16(44.44)	34(94.44)	22(30.56)	50(69.44)
腔隙性脑梗死组	28	8(28.57)	14(50.00)	6(21.43)	20(71.43)	30(53.57)	26(46.43)
健康对照组	100	44(44.00)	24(24.00)	32(32.00)	56(56.00)	112(56.00)	88(44.00)
χ^2			61.06 ^a		56.92 ^b		38.10 ^c
P			<0.01 ^a		<0.01 ^b		<0.01 ^c

备注:CC、CT、TT 分别表示纯合野生型、杂合突变型、纯合突变型。^a 表示 3 种基因型在各组分布频率的结果比较;^b 表示 CC *vs.* CT+TT;^c 表示等位基因 C *vs.* T

表 4 各组 MTHFR A1298C 基因型分布频率结果比较[n(％)]

组别	例数(n)	基因型频率			AC+CC	等位基因频率	
		CC	CT	TT		C	T
病例组	130	98(75.38)	32(24.62)	0(0)	32(24.62)	228(87.69)	32(12.31)
大梗死组	66	48(72.73)	18(27.27)	0(0)	18(27.27)	114(86.36)	18(13.64)
小梗死组	36	30(83.33)	6(16.67)	0(0)	6(16.67)	66(91.67)	6(8.33)
腔隙性脑梗死组	28	20(71.43)	8(28.57)	0(0)	8(28.57)	48(85.71)	8(14.29)
健康对照组	100	68(68.00)	32(32.00)	0(0)	32(32.00)	168(84.00)	32(16.00)
χ^2			3.64		3.64	3.08	
P			0.457		0.457	0.545	

表 5 各组血清 Hcy 水平结果比较($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol/L}$)

项目	健康对照组	病例组	大梗死组	小梗死组	腔隙性脑梗死组
例数(n)	100	130	66	36	28
Hcy	12.68±4.01	16.15±9.71	18.28±11.36	13.17±6.07	14.85±8.11
t/F	t=3.352 ^a			F=3.662 ^b	
P	0.001 ^a			0.028 ^b	

注：^a表示病例组与对照组的结果比较；^b表示大梗死组、小梗死组、腔隙性脑梗死组 3 组的结果比较

表 6 MTHFR 不同基因型血清 Hcy 水平结果比较($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol/L}$)

项目	C677T			A1298C	
	CC	CT	TT	AA	AC
例数(n)	14	62	54	98	32
Hcy	16.33±7.79	15.03±7.26	19.15±13.09	15.22±9.87	18.94±8.78
F/t		F=2.409		t=1.895	
P		0.094		0.06	

表 7 各组 C677T 与 A1298C 联合突变者(即 677CT/ 1298AC 型)结果比较[n(％)]

项目	健康对照组		病例组		大梗死组		小梗死组		腔隙性脑梗死组	
	677CC/ 1298AA	677CT/ 1298AC	677CC/ 1298AA	677CT/ 1298AC	677CC/ 1298AA	677CT/ 1298AC	677CC/ 1298AA	677CT/ 1298AC	677CC/ 1298AA	677CT/ 1298AC
百分率	19(19.00)	9(9.00)	2(1.54)	21(16.15)	0(0.00)	14(21.21)	0(0.00)	5(13.89)	2(7.14)	2(7.14)
χ^2				18.25				6.375		
P				<0.01				0.024		

2.4 病例组不同基因型 Hcy 水平结果比较 C677T 的纯和突变型及 A1298C 的杂合突变型(纯合突变型病例数为 0)血清 Hcy 水平虽然均高于纯合野生型,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 6。

2.5 MTHFR 的 2 个 SNP 位点 C677T 与 A1298C 的协同作用 各组 A1298C 位点的基因型分布频率结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$),且在单一位点的突变与血清 Hcy 也无显著相关性。但 C677T 与 A1298C 联合突变结果显示,2 位点同时发生杂合突变(即 677CT/ 1298AC 型)的个体所占百分比,病例组显著高于对照组(16.15% vs. 9.00%, $P<0.05$),且随梗死面积增大,逐渐增大($P<0.05$)。病例组内 2 位点同时发生杂合突变时血清 Hcy 显著高于仅 C677T 杂合突变[(21.13±8.47) $\mu\text{mol/L}$ vs. (11.52±4.36) $\mu\text{mol/L}$, $P<0.05$]。见表 7、8。

表 8 联合突变与单一突变血清 Hcy 结果比较($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol/L}$)

基因型	CT+AA	CT+AC
例数(n)	42	21
Hcy	11.52±4.36	21.13±8.47
t		5.968
P		<0.01

3 讨 论

中国每年的脑卒中患者 75%~85% 为 IS^[4]。血清 Hcy 水平轻至中度升高是诱发 IS 的独立危险因素,MTHFR 是 Hcy 代谢过程中的关键酶,其主要生理功能是催化 5,10-亚甲基四氢叶酸(5,10-MTHF)转化为 5-甲基四氢叶酸(5-MTHF),后者是体内重要的甲基供体,在 Hcy 复甲基化生成蛋氨酸的过

程中参与其代谢^[5]。当编码该酶的基因发生突变,酶活性下降时引起 Hcy 代谢障碍,导致 Hcy 在体内的水平升高。目前发现 MTHFR 基因至少存在 65 个多态性位点,其中最常见 2 种突变为 C677T 和 A1298C。前者是指 MTHFR 第 4 个外显子第 677 位碱基发生 C 至 T 的突变,丙氨酸被缬氨酸所代替,使酶的热稳定性下降,酶活性降低^[6]。这一突变位点产生的基因型有野生型(CC 型)、杂合突变(CT 型)、纯合突变(TT 型)3 种。纯合和杂合突变的酶活性分别下降为野生型的 32% 和 64%^[7]。A1298C 是指 MTHFR 7 号外显子第 1 298 位碱基 A 至 C 置换,产生 Glu429Alu 错义突变。由于这一突变位点位于酶的 S-腺苷蛋氨酸(SAM) 调节域,SAM 与 MTHFR 结合可通过构象的转变抑制酶活性,同样可使酶活性下降^[8]。当以上 2 个位点同时发生杂合突变时,MTHFR 的酶活性仅为野生型的 36%^[7]。

本研究表明,病例组 C677T 突变型高达 89.23%,而健康对照组仅为 56.00% ($P<0.05$);突变型等位基因 T 的分布频率分别为 65.38% 和 44.00%,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与国内外的研究结果基本一致^[9-10]。表 3 结果显示,随梗死面积增大,T 等位基因分布频率也逐渐增大,与腔隙性脑梗死组比较,大梗死组和小梗死组的突变基因型(CT+TT 型)及突变型等位基因 T 的分布频率均显著升高 ($P<0.05$)。证实 MTHFR C677T 基因发生突变可能是 IS 的独立危险因素,且与疾病严重程度呈正相关。而 A1298C 基因多态性与 IS 的相关性一直存在争议,本研究未发现两者具有显著的相关性。

本研究同时对各组血清 Hcy 水平进行分析,病例组显著升高,并以大梗死组为最高,说明 Hcy 水平的升高是诱发 IS 的独立危险因素。分析基因多态性与血清 Hcy 水平的相关性,未发现单一位点的突变与血清 Hcy 改变存在显著的相关性。但 C677T 与 A1298C 有明显的协同作用,2 位点同时发生杂合突变(即 677CT/1298AC 型)的个体所占百分比,病例组显著高于对照组,且随梗死面积增大,逐渐增大 ($P<0.05$)。病例组内 2 位点同时发生杂合突变时血清 Hcy 显著高于仅 C677T 杂合突变者 ($P<0.05$)。Fekih-Mrissa 等^[11]也曾有类似报道。

本研究还存在一些问题,对病例组不同基因型血清 Hcy 水平的比较发现,突变型患者血清 Hcy 虽然高于纯合野生型,但差异无统计学意义 ($P>0.05$),虽有研究报道 C677T 突变与血清 Hcy 水平不相关,但该结果与以往绝大多数研究不一致^[12]。可能由于中国人群叶酸摄入量普遍偏低,MTHFR 是通过代谢体内的叶酸,间接为 Hcy 的复甲基化提供甲基供体,从而参与 Hcy 代谢。当叶酸摄入不足时,即使 MTHFR 未发生基因突变,酶活性正常,仍有可能造成 Hcy 代谢障碍。另外,本研究存在样本量小、代表性不足等局限性,今后需扩大样本量,综合考虑更多影响因素,进一步探讨 MTHFR 基因多态性、血清 Hcy 水平及缺血性脑卒中三者之间的相关性。

参考文献

[1] Okura T, Miyoshi K, Irita J, et al. Hyperhomocysteinemia

is one of the risk factors associated with cerebrovascular stiffness in hypertensive patients, especially elderly males [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(8): 5663-5665.

[2] Wu W, Guan Y, Xu K, et al. Plasma homocysteine levels predict the risk of acute cerebral infarction in patients with carotid artery lesions [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 53(4): 2510-2517.

[3] Fan SJ, Yang BY, Zhi XY, et al. Are MTHFR C677T and MTRR A66G polymorphisms associated with overweight/obesity risk? from a Case-Control to a Meta-Analysis of 30,327 subjects [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(6): 11849-11863.

[4] Tian X, Liu BJ, Zhang YH, et al. LC-MS/MS analysis and pharmacokinetics of Sodium (+/-)-5-Bromo-2-(alpha-hydroxypentyl) benzoate(BZP), an innovative potent Anti-Ischemic stroke agent in rats [J]. *Molecules*, 2016, 21(4): 501-505.

[5] Long S, Goldblatt J. MTHFR genetic testing: Controversy and clinical implications [J]. *Aust Fam Physician*, 2016, 45(4): 237-240.

[6] Wang XM, Fu JJ, Li QX, et al. Geographical and ethnic distributions of the MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms in Chinese populations; a Meta-Analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152414.

[7] Chango A, Boisson F, Barbé F, et al. The effect of 677C→T and 1298A→C mutations on plasma homocysteine and 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects [J]. *British J Nutr*, 2000, 83(2): 593-596.

[8] Lv Q, Lu J, Wu W, et al. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism with stroke risk based on a meta-analysis [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 6882-6894.

[9] 施梦丽, 弓园芳, 陈淅泠. 同型半胱氨酸浓度及 MTHFR 基因多态性与缺血性脑卒中的相关性 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, 17(17): 53-54.

[10] Simon C, Karen L, Furie-Peter J. Dose-related association of MTHFR 677T allele with risk of ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2005, 36(6): 1581-1587.

[11] Fekih-Mrissa N, Mrad M, Klai S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (C677T and A1298C) polymorphisms, hyperhomocysteinemia, and ischemic Stroke in tunisian patients [J]. *J Stroke Cerebrovas Dis*, 2013, 22(4): 465-469.

[12] 陈云霞, 程红兵, 武延隼, 等. 长治人群 MTHFR C677T 基因多态性分布与血浆 Hcy 水平 [J]. *山西医科大学学报*, 2013, 44(2): 130-133.