

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.07.008

H 型高血压患者 MTHFR C677T 基因多态性 及其与血压、HCY 水平的关系*

韦宝敏¹, 潘兴寿¹, 李天资¹, 梁 烨¹, 李近都^{2△}

1. 右江民族医学院附属医院心血管内科, 广西百色 533000; 2. 广西医科大学
附属肿瘤医院肝胆外科, 广西南宁 530012

摘 要:目的 探讨 H 型高血压患者亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 位点碱基的分布特征及其与血压、同型半胱氨酸(HCY)水平的关系。方法 检测 2019 年 1—8 月该院收治的 135 例 H 型高血压患者(观察组)的收缩压、舒张压、HCY 水平和 MTHFR 基因 C677T 位点碱基分布特征,并与 134 例非 H 型高血压者(对照组)比较。结果 观察组 MTHFR 基因 C677T 位点 TT 纯合子突变频率较对照组高($P<0.01$),T 等位频率较对照组高($P<0.01$)。TT 纯合子突变型收缩压和 HCY 水平较 CC 型高($P<0.01$)。观察组 CC、CT 和 TT 型 HCY 水平高于对照组($P<0.05$);在观察组中,TT 型 HCY 水平高于 CC 型($P<0.05$),也高于 CT 型($P<0.05$);在对照组中,TT 型 HCY 水平高于 CC 型($P<0.05$),TT 型 HCY 水平与 CT 型比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 H 型高血压患者 MTHFR 基因 C677T 位点 TT 纯合子突变频率高,MTHFR 基因 C677T 位点碱基突变对收缩压和 HCY 水平有影响,MTHFR 基因 C677T 碱基突变型携带者 HCY 和总胆固醇水平升高。

关键词: H 型高血压; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因突变; 同型半胱氨酸

中图法分类号: R544.1; R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)07-0889-04

Polymorphism of MTHFR C677T gene and its relationship with blood pressure homocysteine levels in patients with H type hypertension*

WEI Baomin¹, PAN Xingshou¹, LI Tianzi¹, LIANG Ye¹, LI Jindu^{2△}

1. Affiliated Hospital of Youjiang National Medical University, Baise, Guangxi 533000,
China; 2. Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China

Abstract: **Objective** To investigate the distribution characteristics of methyltetrahydrofolic acid reductase (MTHFR) gene C677T site nucleotide base in patients with H hypertension and its correlation with blood pressure, homocysteine (HCY) levels. **Methods** From January to August 2019, 135 patients with type H hypertension (observation group) in our hospital were compared with 134 patients with non-type H hypertension (control group) in their systolic pressure, diastolic pressure, HCY and MTHFR gene C677T site nucleotides. **Results** The MTHFR gene C677T site TT homozygous mutation frequency was significantly higher in the observation group than that in the control group ($P<0.01$), while T isometric frequency is significantly higher than that of the control group ($P<0.01$). The levels of systolic pressure and HCY in TT homozygous mutant were higher than those in CC type ($P<0.01$). The HCY levels of CC, CT and TT type in observation group were higher than those in control group ($P<0.05$). In the observation group, the level of HCY in TT type was higher than that in CC type and CT type ($P<0.05$). In the control group, the level of HCY in TT type was higher than that in CC type ($P<0.05$), and there was no statistical significance in the level of HCY in TT type compared with CT type ($P>0.05$). **Conclusion** The frequency of TT homozygous mutation at C677T site of MTHFR gene is high in patients with H type hypertension, and the base mutation at C677T site of MTHFR gene has influence on systolic pressure and HCY levels. Carriers of the C677T base mutation at

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81060028); 广西壮族自治区百色市科学技术基金项目(20140923、20180038)。

作者简介: 韦宝敏, 男, 副主任医师, 主要从事高血压、冠心病的基础与临床研究。△ 通信作者, E-mail: www5554e@163.com。

本文引用格式: 韦宝敏, 潘兴寿, 李天资, 等. H 型高血压患者 MTHFR C677T 基因多态性及其与血压、HCY 水平的关系[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(7): 889-892.

MTHFR gene have elevated HCY and total cholesterol.

Key words: H type hypertension; methylene tetrahydrofolic acid reductase; gene mutation; homocysteine

亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是甲硫氨酸在分解代谢中产生的活性甲基供体循环代谢重要的限速酶^[1],其主要作用是在叶酸代谢通路中将没有生物学功能的 5,10-亚甲基四氢叶酸转化为具有生物学功能的 5-甲基四氢叶酸。后者进入甲基传递通路,通过同型半胱氨酸(HCY)的重新甲基化过程间接为 DNA 甲基化和蛋白质甲基化提供甲基,并且使血液中的 HCY 水平保持在较低水平^[2-5]。研究表明,MTHFR 基因 C677T 位点碱基变异可以造成 MTHFR 的活性变化,从而影响 HCY 在循环体内的代谢,造成血浆 HCY 升高,在高血压患者中伴有 HCY 升高者称为 H 型高血压,此类患者出现明显的血管内皮细胞损伤,血管平滑肌细胞增殖,低密度脂蛋白的氧化功能低下,血小板激活,血栓形成等临床特征,危害患者的生命健康^[6]。本课题组以本院接受诊疗 H 型高血压患者 135 例与非 H 型高血压者 134 例为研究对象,了解 H 型高血压患者 MTHFR 基因 C677T 位点碱基的分布特征及其与血压、HCY 水平的关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)选取 2019 年 1—8 月在本院接受诊疗的 H 型高血压(观察组,HCY>10 $\mu\text{mol/L}$)患者 135 例和非 H 型高血压(对照组,HCY $\leq$ 10 $\mu\text{mol/L}$)患者 134 例为研究对象。观察组男 83 例,女 52 例,年龄 24~84 岁,平均(46.1 $\pm$ 13.0)岁;对照组男 70 例,女 64 例,年龄 23~77 岁,平均(46.3 $\pm$ 12.3)岁。两组年龄及性别比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究按照伦理规范设计研究方案,经医院伦理委员会批准,所有受检者对本研究知情同意。

1.2 仪器与试剂 PTC-200 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),3730XL 测序分析仪和 POP-7TM 高分子聚合物(Applied BiosystemsTM 公司),Gel Doc XR+BIORAD 全自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),超微量分光光度计 Nano Vue(GE Healthcare 公司),DY-CP-34A 琼脂糖水平电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。ABI 3100 全自动序列分析仪(美国 ABI 公司)。主要试剂:QIAamp DNA Blood Maxi 血液基因组 DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司),Premix Ex TaqTM Version 2.0>Loading dye mix 公司),Tris-硼酸盐-乙二胺四乙酸(Tris-borate-EDTA,日本 TAKARA 公司),HCY 检测试剂盒(德国 BAYER

公司)。

1.3 方法

1.3.1 调查方法 调查受检者年龄、性别、病史、身高、体质量、血压。受检者先测身高、体质量,后测量血压。测量血压用汞柱血压计,受检者测量前不吸烟、饮酒,不饮浓茶或咖啡,不做剧烈运动,保持安静休息 ≥ 30 min。受检者取坐位,平坐 5 min 后行血压测量,每例受检者连续测量 3 次,每次间隔 ≥ 120 s,取 3 次血压计数的平均值作为受检者血压。平均收缩压 ≥ 140 mm Hg 或平均舒张压 ≥ 90 mm Hg 确诊为高血压^[7]。

1.3.2 标本的采集与处置

1.3.2.1 用于 PCR 的标本采集 (1)抗凝剂用柠檬酸抗凝液(右旋葡萄糖 1.47 g,柠檬酸 0.48 g,枸橼酸钠 1.32 g,加 H₂O 至 100 mL)。采集受检者外周静脉血 3 mL,置于存有 0.5 mL 柠檬酸抗凝液的冻存管中,置于 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 40 h 后转 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存。(2)基因组 DNA 提取:用 EDTA 抗凝管采集受检者外周静脉血 3 mL,置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 室温 2 h,严格按照 QIAamp DNA Blood Maxi 试剂盒说明书操作。

1.3.2.2 用于 HCY 检测的标本采集 受检者禁食 ≥ 10 h,于早晨 6:30—9:30,采取坐位,用 EDTA 抗凝管抽肘静脉血 5 mL,3 000 r/min 离心 10 min,取血浆置 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备查。HCY 采用化学发光法测定。

1.4 基因扩增与鉴定 基因型鉴定采用 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法^[8]。引物由杭州联川生物技术有限公司合成。MTHFR 基因 C677T 的单核苷酸多态性(SNP)上游引物序列为 5'-CCGAAGCAGGGAGCTTTG-3',下游引物序列 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,共 30 个循环扩增,随后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。4% 琼脂糖凝胶电泳判断酶切结果:纯合野生型 C/C(CC 型)仅有一条 198 bp 条带;纯合突变型 T/T(TT 型)可被酶切为 175 bp 和 23 bp 2 个条带;杂合子 C/T(CT 型)应包括 198 bp、175 bp 和 23 bp 3 个条带。

1.5 统计学处理 应用 SPSS20.0 软件进行数据处理,应用 Haplo View 4.2 软件进行 SNP 的 Hardy-Weinberg 平衡分析。对全血和基因组 DNA 的

MTHFR C677T 基因型检测方法进行 Kappa 一致性检验。计量资料呈正态或近似正态分布时以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者血压和 HCY 水平比较 观察组收缩压和 HCY 水平高于对照组 ($P < 0.05$),舒张压水平与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者血压和 HCY 水平比较($\bar{x} \pm s$)				
分组	<i>n</i>	收缩压 (mm Hg)	舒张压 (mm Hg)	HCY ($\mu\text{mol/L}$)
观察组	135	159.55 $\pm$ 16.11	97.99 $\pm$ 9.17	22.96 $\pm$ 9.12
对照组	134	154.54 $\pm$ 13.37	96.75 $\pm$ 8.06	7.60 $\pm$ 1.32
<i>t</i>		2.620	1.183	18.753
<i>P</i>		0.009	0.238	<0.001

2.2 两组患者 MTHFR 基因 C677T 位点碱基频率和等位基因分布 观察组 MTHFR 基因 C677T 位点 CC、CT、TT 基因型频率和等位基因频率与对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 两组患者 MTHFR 基因 C677T 位点不同碱基与血压、HCY 水平的关系 观察组 CC、CT 和 TT 型收缩压水平与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在观察组中,TT 型收缩压水平高于 CC 型 ($P < 0.05$),也高于 CT 型 ($P < 0.05$)。在对照组中,

TT 型收缩压水平高于 CC 型 ($P < 0.05$),TT 型收缩压水平与 CT 型比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 MTHFR 基因 C677T 位点 TT 纯合子突变患者收缩压水平比较高。观察组 CC、CT 和 TT 型的舒张压水平与对照组比较,差异无统计意义 ($P > 0.05$)。在观察组和对对照组中,CC、CT 和 TT 型的舒张压水平比较,差异无统计意义 ($P > 0.05$)。提示 MTHFR 基因 C677T 位点 TT 纯合子突变对舒张压水平没有太大的影响。观察组 CC、CT 和 TT 型 HCY 水平高于对照组 ($P < 0.05$);在观察组中,TT 型 HCY 水平高于 CC 型 ($P < 0.05$),也高于 CT 型 ($P < 0.05$);在对对照组中,TT 型 HCY 水平高于 CC 型 ($P < 0.05$),TT 型 HCY 水平与 CT 型比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 MTHFR 基因 C677T 位点变异对 HCY 水平有明显的影 响,表现为 TT 型 HCY 水平高。见表 3。

表 2 两组患者 MTHFR 基因 C677T 位点碱基频率和等位基因频率[<i>n</i> (%)]						
分组	<i>n</i>	基因型			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
观察组	135	15(11.1)	59(43.7)	61(45.2)	44.5(33.0)	90.5(67.0)
对照组	134	38(28.4)	68(50.7)	28(20.9)	72(53.7)	62(46.3)
χ^2			22.851			11.713
<i>P</i>			<0.001			0.001

表 3 两组患者 MTHFR C677T 不同基因型血压、HCY 水平比较($\bar{x} \pm s$)					
分组	分型	<i>n</i>	收缩压(mm Hg)	舒张压(mm Hg)	HCY($\mu\text{mol/L}$)
观察组	CC	15	153.40 $\pm$ 14.06	95.6 $\pm$ 5.62	13.45 $\pm$ 2.55 ^a
	CT	59	156.27 $\pm$ 17.43	97.00 $\pm$ 9.04	21.63 $\pm$ 6.58 ^a
	TT	61	163.23 $\pm$ 14.07 ^{bc}	99.54 $\pm$ 9.84	26.59 $\pm$ 10.24 ^{abc}
对照组	CC	38	150.55 $\pm$ 10.66	94.68 $\pm$ 6.46	7.21 $\pm$ 1.18
	CT	68	155.65 $\pm$ 13.66	97.40 $\pm$ 7.84	7.60 $\pm$ 1.31
	TT	28	157.29 $\pm$ 15.12 ^b	97.96 $\pm$ 10.10	7.99 $\pm$ 1.42 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 CC 型比较,^b $P < 0.05$;与 CT 型比较,^c $P < 0.05$ 。

3 讨 论

有研究表明,高血压是由遗传因素和环境因素共同作用而导致,其中环境因素的比例约占 70%,遗传因素的比例约占 30%,通过对高血压患者的易感性基因检测,明确患者基因的特征,针对患者基因情况制订防治方案,是新兴的解码健康的个性医疗实践^[7]。研究认为,MTHFR 基因第 4 外显子第 677 个核苷酸位点碱基变异是最常见的突变位点,C677T 是编码蛋白质的密码子,位于 MTHFR 的活性区域,TT 纯合子突变其碱基 C 被 T 置换,使 MTHFR 基因编码蛋

白质的第 222 个氨基酸丙氨酸被缬氨酸替代,影响 MTHFR 的活性和耐热性。有报道称 CT 杂合子突变型患者 MTHFR 酶活性仅为 CC 野生型的 65%,TT 纯合子型突变患者其酶活性仅为 CC 野生型的 30%,其对患者全身代谢的影响可以想象^[8]。有学者从遗传性同型半胱氨酸尿症死亡儿童尸检中发现,其体循环内存在广泛的动脉血栓形成及动脉粥样硬化的病理表现,由此提出高同型半胱氨酸血症(HHCY)可导致动脉粥样硬化性血管性疾病的假说,掀起了 HHCY 与血管疾病相关研究的浪潮^[9]。HCY 是一

种含巯基的氨基酸,其前身主要来源于饮食摄取的甲硫氨酸,是甲硫氨酸和半胱氨酸代谢过程中的中间代谢产物,其本身并不参加蛋白质的合成。在体内,约一半的 HCY 和甲基四氢叶酸在甲硫氨酸合成酶的作用下生成甲硫氨酸和四氢叶酸,四氢叶酸在 MTHFR 的作用下生成甲基四氢叶酸;其余约一半的 HCY 通过转硫基途径与丝氨酸在胱硫醚 β 合成酶作用下形成胱硫醚,在胱硫醚裂解酶的作用下形成半胱氨酸,最后生成丙酮酸、硫酸和水^[10]。TT 纯合子型突变产生的代谢障碍,可导致血浆 HCY 升高。HHCY 导致血管内皮细胞损伤,促进血管平滑肌细胞增殖,影响低密度脂蛋白的氧化,增强血小板功能,促进血栓形成,但其相互作用的机制还不完全清楚^[11]。本研究结果显示,MTHFR 基因 C677T 位点突变对收缩压和 HCY 水平有影响,H 型高血压组 MTHFR 基因 C677T 位点 TT 基因型频率高于非 H 型高血压组($P<0.01$),MTHFR 基因 C677T TT 纯合子突变患者其收缩压水平较其他基因类型高($P<0.05$),其舒张压水平与其他基因类型比较,差异无统计学意义($P>0.05$),MTHFR 基因 C677T 位点 TT 纯合子突变的 HCY 水平较 CC 野生基因型高,较 CT 杂合子型高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

本研究提示,MTHFR 基因 C677T 位点 TT 纯合子突变是血浆 HCY 水平增高的原因之一,而血浆 HCY 水平增高是动脉粥样硬化发病的独立的危险因素之一。虽然 HCY 确切的致病机制尚未完全明了,但临床资料显示,H 型高血压患者动脉损害的速度加快,强度加大,发生心肌梗死、脑卒中等血管事件的概率较高,对患者生命健康的危害倍增^[12-13]。因此,在高血压等慢性血管疾病的防治过程中,应当从国家制订的全民健身实施计划纲要出发,重视了解患者的基因情况。对于 MTHFR 基因 C677T 位点 TT 纯合子突变的携带者,调整防治方案,选取高度敏感性的药物,同时强化健康生活方式,养成有益于健康的习惯化的行为方式,调节膳食和适量运动^[14]。

参考文献

[1] BENINCASA G, DI SPIGNA G, CAPPELLI C, et al. High incidence of MTHFR, CBS, and MTRR polymorphisms in vitiligo patients. Preliminary report in a retro-

spective study[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23 (2): 471-478.

[2] 梁焯, 邹才华, 李近都, 等. 石斛药用次生代谢产物及其基因克隆研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (12): 5511-5514.

[3] 蓝家富, 李近都, 李天资. 甲硫氨酸腺苷转移酶基因与临床研究进展[J]. 临床医学进展, 2020, 10 (3): 165-171.

[4] STAJNKO A, SLEJKOVEC Z, MAZEJ D, et al. Arsenic metabolites; selenium; and AS3MT, MTHFR, AQP4, AQP9, SELENOP, INMT, and MT2A polymorphisms in Croatian-Slovenian population from PHIME-CROME study[J]. Environ Res, 2019, 170: 301-319.

[5] LIANG Y, ZOU C H, LI J D, et al. Research progress of medicinal secondary metabolites and gene cloning of den-drobium officinale[J]. Med Plant, 2019, 10 (3): 16-18.

[6] AL-BATAYNEH K M, ZOUBI M S A, SHEHAB M, et al. Association between MTHFR 677C>T polymorphism and vitamin B₁₂ deficiency: a case-control study [J]. J Med Biochem, 2018, 37 (2): 141-147.

[7] 蓝家富, 李天资. 颈动脉粥样硬化斑块超声诊断研究进展[J]. 医学理论与实践, 2010, 23 (9): 1061-1063.

[8] 农茜, 陆文权, 潘兴寿, 等. 彝族高血压患者 MTHFR C677T 基因多态性及其与血压、同型半胱氨酸水平的关系[J]. 中国医药科学, 2019, 9 (19): 9-13.

[9] 潘兴寿, 梁焯, 曾德创, 等. 野芭蕉多糖对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及其与胆固醇调节元件结合蛋白表达的关系[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34 (7): 3026-3030.

[10] 陈祥文, 梁焯, 李天资, 等. 凤山县壮族居民生活习惯及高血压患病情况调查[J]. 中国公共卫生, 2013, 29 (9): 1363-1365.

[11] 农茜, 陆文权, 梁焯, 等. 同型半胱氨酸与甲基代谢及其胱硫醚酶基因研究进展[J]. 临床医学进展, 2020, 10 (7): 1277-1284.

[12] 潘兴寿, 李天资. 动物模型蛋白质组学技术在高血压疾病的研究进展[J]. 医学与哲学, 2016, 37 (12): 53-55.

[13] 李鸿翔, 梁焯, 李天资, 等. 原发性高血压危险因素的易感基因及其非编码 RNA 研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12 (7): 879-881.

[14] 程世亮, 戴永刚, 李萌, 等. MTHFR 基因在高血压患者中的多态性分布及风险评估价值[J]. 检验医学与临床, 2019, 16 (14): 1976-1977.