

· 调查报告 ·

## 贵州 3 个民族亚甲基四氢叶酸还原酶基因的遗传多态性\*

张 婷, 谢 渊, 李 毅, 单可人, 官志忠<sup>△</sup>

(贵阳医学院分子生物学重点实验室 550004)

**摘要:**目的 对贵州侗族、布依族、苗族亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性进行研究。方法 应用 TaqMan-MGB 探针基因分型方法检测贵州 3 个民族 MTHFR 基因两个 SNP(677 及 1 298 位)多态位点的基因频率及基因型频率,并构建单倍型。结果 MTHFR 677C/T 位点 3 个民族之间基因型和等位基因频率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中布依族与苗族间基因型和布依族与侗族、苗族间等位基因频率差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。MTHFR 1298A/C 位点 3 个民族之间基因型和等位基因频率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。677CC/1298AA 双野生型频率以布依族最低,3 个民族中均未见 677TT/1298CC 双纯和突变及 677TT/1298AC 组合。3 个民族中以 677C-1298A(54.3%)单倍型所占率最高。布依族和苗族两位点间存在 677C/T 和 1298A/C 连锁不平衡现象。结论 MTHFR 基因 677C/T 和 1298A/C 位点在不同民族、不同地区间的分布存在明显差异。

**关键词:**亚甲基四氢叶酸还原酶;基因多态性;少数民族

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.031

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3413-03

## Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in three nationality in Guizhou\*

Zhang Ting, Xie Yuan, Li Yi, Shan Keren, Guan Zhizhong<sup>△</sup>

(Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyan Medical College, Guiyan, Guizhou 550004, China)

**Abstract:** Objective To identify the distribution feature of methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene polymorphism of Buyi, Dong, Miao nationality in Guizhou. **Methods** The MTHFR(677 and 1 298) genotypes of Buyi, Miao and Dong healthy individuals were determined by TaqMan-MGB probe genotyping method and constructed haplotypes. **Results** There were significant difference of MTHFR 677C/T genotype and allele frequencies among 3 groups( $P < 0.05$ ), There was significant difference of genotype between Buyi and Miao nationality, and there were significant differences of genotype frequencies in Buyi nationality and Dong and Miao nationality( $P < 0.01$ ). There were no differences of MTHFR 1298A/C genotype frequencies among Buyi, Dong and Miao nationality( $P > 0.05$ ). Buyi nationality had the lowest frequency in double wild homozygous type(677CC/1298AA), 677TT/1298CC double mutation homozygous and 677TT/1298AC combination in above three minorities was not found. There were linkage disequilibrium between 677C/T and 1298A/C in Buyi and Miao nationality. **Conclusion** The genotypes frequencies of MTHFR 677TT/1298AC are significant differences among different regions and different ethnic groups.

**Key words:** methylenetetrahydrofolate reductase; polymorphism; minority groups

亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)蛋白普遍存在于人、动物及原核生物中,其生化功能是催化 5,10-亚甲基四氢叶酸到 5-甲基四氢叶酸的还原反应。MTHFR 酶活性的改变会导致 5-甲基四氢叶酸的生成障碍,从而导致同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)复甲基化障碍,使得血浆 Hcy 浓度升高<sup>[1-2]</sup>,从而导致多种疾病的发生。目前研究较为广泛的是该酶基因的 677C/T 和 1298A/C 多态位点,已有研究表明其不同国家、同一国家不同地区、不同民族或种族中的分布有显著差异性<sup>[3-5]</sup>。布依族、侗族、苗族是贵州省人口较多的少数民族,本研究所选标本采自封闭的自然群体。通过了解贵州布依族、侗族及苗族人群中 MTHFR 基因 677C/T 和 1298A/C 的遗传多态性,获取相关群体遗传数据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 根据知情同意的原则,随机选取贵州世居布依族、侗族、苗族隔离自然人群,样本总量 597 例,其中布依族 201 例,男 100 例,平均(46.5±14.1)岁,女 101 例,平均(47.9±14.0)岁;侗族 198 例,男 106 例,平均(46.5±18.2)

岁,女 92 例,平均(45.8±17.2)岁;苗族 198 例,男 112 例,平均(48.3±12.9)岁,女 86 例,平均(45.0±10.3)岁。研究对象彼此间无直接血缘关系,采集受试对象外周静脉血血样,ED-TA-K2 抗凝后,-20℃保存。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 采用常规酚-氯仿抽提法从全血中提取 DNA,并将样品 DNA 标化为 20 ng/μL 作为模板,-20℃存放备用。

**1.2.2 TaqMan-MGB 探针基因分型** 采用 ABI 公司的 TaqMan SNP Genotyping Assays 对 MTHFR 677C/T,1298A/C 进行基因分型。反应体系 10 L,包含 5 L TaqMan Universal PCR Master Mix,0.25 L TaqMan Genotyping Assay,1 μL DNA(20 ng/μL),加双蒸水至 10 μL。反应条件为 60℃ 30 s;95℃ 10 min;92℃ 15 s;60℃ 60 s,共 40 个循环;60℃ 30 s。所扩增的目的基因片段由于 SNPs 位点的碱基不同,标记呈不同的荧光,利用荧光发光特点,通过 Applied Biosystems StepOne™ 基因分析仪检测,StepOne™ 软件分析基因分型结果。

\* 基金项目:“十二五”国家科技支撑计划(2013BAI05B03);贵州省社会发展攻关项目(黔科合 SY[2010]3001 号);贵州省科技厅科技计划课题资助项目(黔科合 LG[2011]024)。作者简介:张婷(1980~),硕士,副教授,主要从事少数民族疾病基因多态性的研究。△ 通讯作者,Tel:(0851)6761697;E-mail:zhizhongguan@yahoo.com。

表 1 贵州 3 个民族 MTHFR 677C/T, 1298A/C 基因型及等位基因频率分布[n(%)]

SNP 位点	民族	n	基因型频率			等位基因频率	
			C/C	C/T	T/T	C	T
677C/T rs1801133	布依族	201	114(56.7)	77(38.3)	10(5.0)	305(75.9)	97(24.1)
	侗族	198	138(69.7)	55(27.8)	5(2.5)	331(83.6)	65(16.4)
	苗族*	198	146(73.7)	48(24.2)	4(2.0)	340(85.9)	56(14.1)
			$\chi^2=14.98, P=0.005$			$\chi^2=14.68, P=0.001$	
1298A/C rs1801131			A/A(%)	A/C(%)	C/C(%)	A(%)	C(%)
	布依族	201	101(50.2)	85(42.3)	15(7.5)	287(71.4)	115(28.6)
	侗族	198	104(52.5)	81(40.9)	13(6.6)	289(73.0)	107(27.0)
	苗族	198	106(53.5)	77(38.9)	15(7.6)	289(73.0)	107(27.0)
			$\chi^2=0.672, P=0.955$			$\chi^2=0.336, P=0.845$	

\* :  $P < 0.01$ , 与布依族比较。

**1.2.3 测序** 用 ABI 310 型全自动 DNA 测序仪对两基因型进行测序验证。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 应用 HaploView 4.1 软件进行 SNPs 的 Hardy-Weinberg 平衡、LD 水平和单倍型结构分析, 两位点 LD 水平以  $D' = 1$  为判断标准。计数资料采用率表示, 对基因型及等位基因频率进行  $\chi^2$  检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 基因分型结果** 贵州布依族、侗族、苗族人群 MTHFR 677C/T(rs 1801133), 1298A/C(rs 1801133) 基因型、等位基因频率分布见表 1。在受检人群中 MTHFR 677C/T 和 1298A/C 位点在 3 个民族之间基因型 ( $\chi^2 = 14.98, P = 0.005$ ) 和等位基因频率 ( $\chi^2 = 14.68, P = 0.001$ ) 差异有统计学意义, 其中布依族与苗族间基因型 ( $\chi^2 = 13.22, P = 0.001$ ) 和布依族与侗族、苗族等位基因频率 ( $\chi^2 = 7.34, P = 0.007$ ;  $\chi^2 = 12.84, P = 0.000$ ) 差异有统计学意义, 而布依族与侗族间基因型 ( $\chi^2 = 7.60, P = 0.022$ ), 侗族与苗族间基因型、等位基因频率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 1298A/C 位点在 3 个民族之间基因型 ( $\chi^2 = 0.672, P = 0.955$ ) 和等位基因频率 ( $\chi^2 = 0.336, P = 0.845$ ) 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

**2.2 贵州 3 个民族 MTHFR 677C/T, 1298A/C 位点组合情况** 677CC/1298AA 双野生型频率以布依族最低, 分别为布依族 21.9%, 侗族 33.3%, 苗族 35.4%; 677CT/1298CC 组合仅存在于侗族; 3 个民族中均未见 677TT/1298CC 双纯和突变及 677TT/1298AC 组合。见表 2。

表 2 677C/T 与 1298A/C 各基因型在 3 个民族中的分布[n(%)]

基因连锁型	布依族(n=201)	侗族(n=198)	苗族(n=198)
CC/AA	44(21.9)	66(33.3)	70(35.4)
CC/AC	55(27.4)	60(30.3)	61(30.8)
CC/CC	15(7.5)	12(6.1)	15(7.6)
CT/AA	47(23.4)	33(16.7)	31(15.7)
CT/AC	30(14.9)	21(10.6)	17(8.6)
CT/CC	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)
TT/AA	10(5.0)	5(2.5)	4(2.0)
TT/AC	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
TT/CC	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

**2.3 MTHFR 基因 677C/T 与 1298A/C 两位点连锁情况及单倍型分析结果** 将 3 个民族样本 MTHFR 基因 677C/T 和 1298A/C 两位点构建单倍型, 发现主要以 3 种组合的存在, 分别是: 677C-1298A(54.3%), 677C-1298C(27.4%) 及 677T-

1298A(18.0%)。677C/T 和 1298A/C 连锁不平衡分析发现, 布依族和苗族两位点间存在连锁不平衡现象 ( $D' = 1$ )。见表 3。

表 3 677C/T 与 1298A/C 在 3 个民族中单倍型分布频率(%)

单倍型	布依族(n=201)	侗族(n=198)	苗族(n=198)
CA	47.3	57.3	58.6
CC	28.6	26.3	27.3
TA	24.1	15.7	14.1
TC	0.0	0.8	0.0
	$D' = 1.00$	$D' = 0.83$	$D' = 1.00$

## 3 讨论

MTHFR 基因定位于染色体 1p36.3<sup>[6]</sup>, 该基因最常见的 SNP 位点是 677C/T 及 1298A/C。据报道他们的突变将导致酶的耐热性和活性减低<sup>[7-8]</sup>, 血浆 Hcy 水平升高, 成为心血管病和神经管缺损的独立风险因素。现有资料表明, MTHFR 677C/T 的等位基因和基因型分布具有较强的地域和人种特征, 突变型 T 等位基因频率由低到高依次为非洲人 (<10%)、欧洲白人 (25.1%~46.0%)、中东人 (17.4%~25.7%)、中国汉族人 (21.0%~44.8%, 由南向北呈增加趋势) 和墨西哥人 (57.0%)。基因型分布在各地区或民族均以 CC 和 CT 为主<sup>[9-11]</sup>。本次研究发现仅有侗族 677T 等位基因频率与上述结论相一致, 而侗族和苗族突变频率相对较低。1298A/C 多态性也同样存在种族和民族差异性。C 等位基因的频率亚洲为 17%~38%, 西欧为 27%~36%。非洲和北美约 30%, 中国北方汉族为 20%<sup>[11-13]</sup>。本次研究结果显示 1298C 等位基因频率与报道相符。

上述两位点组合情况研究发现(表 2), 677CT/1298CC 组合仅存在于侗族; 677CC/1298AA 双野生型频率以布依族最低; 3 个民族中均未见 677TT/1298CC 双纯和突变及 677TT/1298AC 组合, 这与已报道文献一致<sup>[14]</sup>; 单倍型主要以 677C-1298A(54.3%) 出现; 同时侗族未见已报道的两位点连锁不平衡现象<sup>[15-16]</sup>。

综上所述, MTHFR 基因 677C/T 和 1298A/C 位点在不同民族的分布存在明显差异。分子生物学与遗传学研究发现, 个体对疾病的易感性不仅与环境有关更与不同等位基因导致的表达改变有关。而 MTHFR 与多种疾病的发生相关, 因此对人群 MTHFR 基因多态性的研究有助于进一步弄清人群中突变等位基因频率, 对基因多态与疾病的关系做更明确探讨提供理论依据, 本研究为此提供有意义的的数据积累。

## 参考文献:

- [1] Moyers S, Bailey LB. Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence[J]. *Nutr Rev*, 2001, 59(7): 215-224.
- [2] Reeves SG, Meldrum C, Groombridge C, et al. MTHFR 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms and the age of onset of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(5): 629-635.
- [3] 谭利娜, 赵春澎, 张永红, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与精神分裂症关系的 Meta 分析[J]. *重庆医学*, 2012, 41(16): 1595-1597.
- [4] Weger W, Hofer A, Stanger O, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T gene polymorphism is not associated with chronic plaque psoriasis [J]. *Exp Dermatol*, 2008, 17(9): 748-751.
- [5] Serý O, Sramkova T, Klempova J, et al. The relationship between the C677T polymorphism of the MTHFR gene and serum levels of luteinizing hormone in males with erectile dysfunction[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2012, 33(5): 499-504.
- [6] Toffoli G, De Mattia E. Pharmacogenetic relevance of MTHFR polymorphisms[J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(9): 1195-1206.
- [7] Spiroski I, Kedev S, Antov S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR-677 and MTHFR-1298) genotypes and haplotypes and plasma homocysteine levels in patients with occlusive artery disease and deep venous thrombosis[J]. *Acta Biochim Pol*, 2008, 55(3): 587-594.
- [8] 王晓琼, 仇小强. 同型半胱氨酸代谢酶基因与心脏发育关系的研究进展[J]. *广东医学*, 2010, 31(17): 2319-2321.
- [9] 刘娟娟, 高英堂, 杜智, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与 HBV 感染后疾病转归的关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(15): 1555-1562.
- [10] Bhargava S, Ali A, Parakh R, et al. Higher incidence of C677T polymorphism of the MTHFR gene in North Indian patients with vascular disease[J]. *Vascular*, 2012, 20(2): 88-95.
- [11] Jakovljevic K, Malisic E, Cavic M, et al. Association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and risk of chronic myeloid leukemia in Serbian population[J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(7): 1327-1330.
- [12] Han Y, Pan Y, Du Y, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility in a southern Chinese population[J]. *DNA Cell Biol*, 2011, 30(12): 1063-1068.
- [13] 张成森, 潘旭东, 刘翠薇. 中国青岛汉族人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分布研究[J]. *齐鲁医学杂志*, 2005, 20(4): 310-312.
- [14] Ulrich CM, Curtin K, Samowitz W, et al. MTHFR variants reduce the risk of G:C->A:T transition mutations within the p53 tumor suppressor gene in colon tumors [J]. *J Nutr*, 2005, 135(10): 2462-2467.
- [15] Li H, Xu WL, Shen HL, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and haplotypes associated with susceptibility to colorectal Cancer in an eastern Chinese Han population[J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(4): 3738-3746.
- [16] Semmler A, Moskau S, Lutz H, et al. Haplotype analysis of the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) c. 1298A>C(E429A) polymorphism [J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4(4): 439.

(收稿日期: 2013-05-29 修回日期: 2013-06-10)

(上接第 3412 页)

项目。由此也对超声医生提出更高要求, 检查一定要细致、全面, 以最大限度减少漏误诊。

## 参考文献:

- [1] Rago T, Vitti P, Chiovato L, et al. Role of conventional ultrasonography and color flow-doppler sonography in predicting malignancy in 'cold' thyroid nodules[J]. *Eur J Endocrinol*, 1998, 138(1): 41-46.
- [2] 韩治宇, 李俊来, 安力春, 等. 超声检查难以定性的甲状腺结节的临床与病理特征分析[J/CD]. *中华医学超声杂志: 电子版*, 2008, 5(5): 750-756.
- [3] Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2006, 16(2): 109-142.
- [4] Yeung MJ, Serpell JW. Management of the solitary thyroid nodule[J]. *Oncologist*, 2008, 13(2): 105-112.
- [5] Kim MJ, Kim EK, Kwak JY, et al. Differentiation of thyroid nodules with macrocalcifications: role of suspicious sonographic findings[J]. *J Ultrasound Med*, 2008, 27(8): 1179-1184.
- [6] 杨洁瑾, 陆雷群, 陈玲. 超声显示钙化灶对甲状腺良恶性结节鉴别的临床意义[J]. *上海医学*, 2011, 34(5): 364-366.
- [7] 龙丽娟, 胡蓉, 邵波, 等. 超声探测钙化灶在甲状腺结节诊断中的临床价值[J]. *中国医学影像学杂志*, 2009, 17(4): 286-288.
- [8] 李逢生, 冯海波, 徐荣, 等. 甲状腺微小乳头状癌 36 例超声回顾分析[J]. *中国超声医学杂志*, 2012, 28(4): 317-320.
- [9] 何庆兰, 谭瑶, 李世樱, 等. 超声对甲状腺癌的诊断价值探讨[J]. *西部医学*, 2011, 23(9): 1782-1783.
- [10] Miseikyte-Kaubriene E, Trakymas M, Ulys A. Cystic lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma [J]. *Medicina(Kaunas)*, 2008, 44(6): 455-459.
- [11] 夏爱君, 韩超, 周世胜, 等. 超声对胶东沿海地区 1415 例体检人群甲状腺结节的筛查[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(3): 903-904.
- [12] 李泉水, 张家庭, 邹霞, 等. 甲状腺微小癌超声显像特征的研究[J]. *超声医学杂志*, 2009, 25(10): 940-943.

(收稿日期: 2013-05-04 修回日期: 2013-06-27)