

重庆地区脑卒中患者 Hcy 水平及 MTHFR C677T 基因多态性研究*

范超, 陈鸣, 邓少丽[△], 唱凯

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042)

[摘要] **目的** 研究重庆地区脑卒中患者血浆同型半胱氨酸(Hcy)水平及亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T 基因多态性的分布。**方法** 选取 2015 年 4~11 月在该院神经内科住院并诊断为脑卒中的患者共 292 例,其中排除 52 例未检测 Hcy 水平的患者,选取剩余的 240 例(男 116 例,女 124 例)作为本次研究对象。采用酶循环法检测患者 Hcy 水平。提取患者全血 DNA,采用基因芯片技术检测其 MTHFR C677T 基因的多态性。**结果** 共检测出 3 种不同的 MTHFR 基因型:C677C 型、C677T 型、T677T 型,频率分别为 42.9%、44.2%、12.9%,其中 C 等位基因频率为 65%,T 等位基因频率为 35%。CC 基因型在男女之间的分布比较,差异有统计学意义($P=0.003$),C 等位基因在男性患者中的频率明显高于女性患者($P<0.05$)。重庆地区与河南豫北地区脑卒中患者 MTHFR C677C 基因型与 T677T 基因型分布比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。TT 型的 Hcy 水平与 CC、CT 型比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 重庆地区脑卒中患者 MTHFR C677T 基因存在多态性分布,且与河南豫北地区存在差异;MTHFR C677T 基因多态性与 Hcy 水平相关,TT 基因型的 Hcy 水平明显高于 CC、CT 基因型。

[关键词] 卒中;同型半胱氨酸;亚甲基四氢叶酸还原酶;多态性,单核苷酸

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)35-4932-02

The plasma homocysteine levels and polymorphisms of MTHFR gene in brain stroke patients*

Fan Chao, Chen Ming, Deng ShaoLi[△], Chang Kai

(Department of Clinical Laboratory, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, the Third Military University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To study the plasma homocysteine(Hcy) levels and polymorphisms of MTHFR gene in stroke patients of Chongqing area, then compare the result of its polymorphisms with another area. **Methods** Totally 240 brain stroke patients were included in the study. Their polymorphisms of MTHFR gene were analyzed by gene chip method, and their plasma total Hcy levels were measured by using enzymatic cycling method. SPSS19.0 system was used to analyse the data. **Results** There were three kinds of MTHFR genotypes: C677C genotype, C677T genotype, T677T genotype, the frequencies of the three genotypes were as follows: C677C 42.9%, C677T 44.2%, T677T 12.9%. The frequency of C alleles was 65%, while the frequency of T alleles was 35%. According to the statistical analysis, the distribution of CC genotype in male and female was significant($P=0.003$). The frequency of C allele in male patients was significantly higher than that in female patients($P<0.05$). There were significant differences in MTHFR C677C genotype and T677T genotype distribution between stroke patients in Chongqing and Yubei area in Henan province($P<0.01$). The plasma Hcy levels of the three genotypes were as follows: C677C(13.53 ± 6.45) $\mu\text{mol/L}$, C677T(14.26 ± 5.75) $\mu\text{mol/L}$, T677T(19.37 ± 12.01) $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** MTHFR polymorphism indeed exists in stroke patients in Chongqing area, and the polymorphism is different with that of other area, for instance, Yubei area in Henan province. MTHFR C677T polymorphisms and plasma Hcy levels are closely related, the T677T genotype is associated with a higher plasma Hcy level than the other two genotypes.

[Key words] stroke; homocysteine; MTHFR; polymorphism, single nucleotide

脑卒中又叫脑血管意外,是指脑血管疾病的患者因各种诱发因素引起的脑内动脉狭窄、闭塞或破裂,而造成急性脑血液循环障碍,临床上表现为一过性或永久性的脑功能障碍,具有高发病率、高病残率、高病死率和高并发症发生率等特点,严重危害人类健康。据文献报道,我国每年新发脑卒中(1.50~2.00)×10⁶例,病死率为(58~142)/10万,是全国城乡居民首要死亡原因,也是全球第二大死亡原因^[1]。因此,近年来关于脑卒中病因、治疗和预后等方面的研究一直是医学领域的重点。

目前,高同型半胱氨酸血症已被确认为是脑卒中的独立危险因素^[2]。同型半胱氨酸(Hcy)属于含硫氨基酸,是蛋氨酸循环的重要中间产物。蛋氨酸代谢过程中所涉及的酶及因子缺乏发生缺陷时,均可导致高同型半胱氨酸血症。N5,N10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)为蛋氨酸代谢中的一个关键酶。MTHFR 基因突变是引起此酶缺乏或活性降低的主要机制,

其中 C677T 位碱基突变最常见^[3]。目前国内外已有不少关于此研究的文献报导,本文就重庆地区脑卒中患者 Hcy 水平及 MTHFR C677T 基因多态性的分布进行如下研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 4~11 月在本院神经内科住院并诊断为脑卒中的患者共 292 例,脑卒中患者经过头颅磁共振成像(MRI)和(或)CT 扫描明确诊断,符合 1995 年第四届全国脑血管病会议修订的诊断标准,并排除脑出血和占位性病变。排除其中 52 例没有检测 Hcy 水平的患者,选择剩余的 240 例患者作为本次研究对象,其中男 116 例,女 124 例,年龄 28~93 岁。所有患者为无血缘关系的重庆汉族人。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 Hcy 检测仪器与试剂 美国贝克曼 DXC800 全自动生化分析仪, Hcy 诊断试剂盒(循环酶法)。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101199);国家传染病重大专项资助项目(2013ZX10003006-003-002)。 作者简介:范超(1989—),初级检验师,本科,主要从事分子诊断和其他临床检验研究。 [△] 通讯作者, Tel:18696626197; E-mail: dengshaoli@tmmu.edu。

1.2.2 MTHFR C677T 基因检测仪器与试剂 全血基因组 DNA 提取试剂盒、MTHFR C677T 基因检测试剂盒、e-Hyb 全自动杂交仪、BE 2.0 生物芯片识读仪均为上海百傲科技有限公司产品,PCR 仪,干式恒温器,离心机,涡旋振荡器等。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 用紫头管[乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝]采集患者清晨空腹静脉血各 2 mL,充分混匀,1 h 内送本院检验科生化室和分子生物室进行检测。

1.3.2 血浆 Hcy 检测 血浆 Hcy 采用循环酶法,其检测原理为氧化型 Hcy 被转化成游离 Hcy,游离 Hcy 在胱硫醚-β-合成酶(CBS)催化下和丝氨酸反应生成 L-胱硫醚。L-胱硫醚在胱硫醚-β-裂解酶(CBL)催化下又生成 Hcy、丙酮酸和 NH₃。该循环反应生成的丙酮酸可以用乳酸脱氢酶 LDH 和还原型辅酶 I (NADH)检测到,NADH 转变成氧化型辅酶 II (NAD)的速率与样品中 Hcy 水平成正比。

1.3.3 DNA 提取 将紫头管采集好的静脉血 2 mL,按照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作提取基因组 DNA。DNA 样品-20 °C 保存,冻融不超过 3 次。

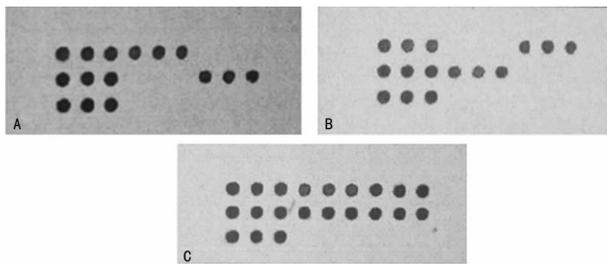
1.3.4 PCR 扩增 将 MTHFR 扩增液分装到 0.2 mL PCR 反应管中,扩增反应体系为 25 μL,包括:MTHFR 扩增液 19 μL、反应液 1 μL、DNA 模板 5 μL。扩增条件:94 °C 预变性 10 min;然后 95 °C 30 s,57 °C 45 s,72 °C 45 s,35 个循环;72 °C 5 min 终止反应。将扩增产物置于 2~8 °C 保存。

1.3.5 杂交显色 取出杂交显色试剂盒,吸取 10 μL 加入杂交缓冲液瓶中混匀。临用前取出 1 支抗体,低速离心,加入 1 mL 抗体稀释液,振荡混匀,制成抗体使用液。取出基因芯片,做好标记,将 MTHFR 基因芯片放入杂交仪片架中,旋紧杂交舱盖。将各试剂按要求分装到 2 mL 离心管中,插入试管架中。取 180 μL 杂交缓冲液于离心管中,再分别加入 10 μL 扩增产物,混匀,放入试管架中。将试管架放入杂交仪中,运行杂交程序。取出芯片,放入生物芯片识读仪中,用百傲基因芯片图像分析软件进行图像扫描和数据分析,输出检测结果。

1.4 统计学处理 用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。用频数计数法计算各基因型及等位基因频率,用 χ^2 检验比较基因型多态性在性别间的差异;各种基因型对应的 Hcy 水平用 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过单因素方差分析进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTHFR C677T 基因型检测结果 MTHFR 扩增产物经基因芯片分析后各种基因型生物芯片识别图,见图 1。



A: C677C 基因型检测结果图; B: T677T 基因型检测结果图; C: C677T 基因型检测结果图。

图 1 MTHFR C677T 基因型检测结果

2.2 各基因型频率及等位基因频率 CC 型(C677C)103 例(42.9%),CT 型(C677T)106 例(44.2%),TT 型(T677T)31 例(12.9%)。其中 C 等位基因频率为 65%,T 等位基因频率为 35%。CC 基因型在男性患者与女性患者之间的分布比较,

差异有统计学意义($P < 0.05$),而 CT 型与 TT 型分布比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);C 等位基因在男性患者的频率明显高于女性患者($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 脑卒中患者 MTHFR C677T 基因多态性的分布[n(%)]

性别	n	基因型频率			等位基因频率	
		CC 型	CT 型	TT 型	C	T
男	116	61(52.6)	44(37.9)	11(9.5)	166(71.6)	66(28.4)
女	124	42(33.9)	62(50.0)	20(16.1)	146(58.9)	104(41.1)
χ^2		8.56	3.54	2.35	9.12	
P		0.003	0.060	0.125	0.003	

2.3 不同地区脑卒中患者 MTHFR C677T 基因多态性的比较 重庆地区与河南豫北地区脑卒中患者 C677C 基因型与 T677T 基因型的分布比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 C677T 基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不同地区脑卒中患者 MTHFR C677T 基因多态性的比较[n(%)]

组别	n	C677C 型	C677T 型	T677T 型
重庆	240	103(42.9)	106(44.2)	31(12.9)
河南豫北 ^[4]	151	32(21.2)	69(45.7)	50(33.1)
χ^2		19.35	0.088	23.02
P		<0.05	>0.05	<0.05

2.4 MTHFR C677T 基因型与血浆 Hcy 水平的关系 TT 型的 Hcy 水平与 CC、CT 型比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 3 种不同 MTHFR C677T 基因型的血浆 Hcy 水平比较($\bar{x} \pm s$)

基因型	n	Hcy(μmol/L)
CC 型	103	13.53 ± 6.45
CT 型	106	14.26 ± 5.75
TT 型	31	19.37 ± 12.01
合计	240	14.61 ± 7.34

3 讨论

脑血管疾病以其高发病率、高病死率、高致残率严重危害着人类的健康,是目前人类最常见的死因之一^[5-6]。因此,探求脑血管病的病因及针对病因的治疗预防措施是国内外研究的重要课题。而基因突变是脑血管病的危险因素之一,因此脑血管疾病基因方面的研究对控制脑血管病的发病水平,探讨基因诊断、治疗及预防的措施都有非常重要的意义^[7-8]。

近年来,高同型半胱氨酸血症作为一种新的卒中中独立危险因素逐渐引起人们的重视。MTHFR 是 Hcy 在人体内代谢途径中的关键酶,其水平不足或活性下降将直接导致 Hcy 在体内的蓄积,引起高同型半胱氨酸血症。有研究表明,C677T 多态性引起的高同型半胱氨酸血症可损伤内皮细胞和血管平滑肌细胞,诱导内皮细胞激活促凝因子,促进纤溶酶原激活物抑制剂的表达,从而促进血小板黏附聚集功能和组织因子活性,激活凝血酶 V、Ⅶ等,使机体处于高凝状态,从而促进血栓形成^[9-10]。本次研究共检测出 3 种不同的 MTHFR 基因型别: C677C 型、C677T 型、T677T 型,频率分别为 42.9%、44.2%、12.9%,其中 C 等位基因频率为 65%,T 等位基因频率为 35%,与其他文献报道结果大体一致。统计(下转第 4937 页)

将 Wip-1 基因特异性沉默。本研究结果显示, Wip-1 siRNA 组 ECC-1 细胞和 KLE 细胞在转染后 24、48、96 h 细胞存活率均低于 siRNA 对照组和空白对照组, 说明特异性沉默 Wip-1 基因可抑制子宫内膜癌 ECC-1 和 KLE 细胞增殖能力。Tan 等^[12]利用 siRNA 技术靶向沉默人子宫颈癌细胞 HeLa 细胞中 Wip-1 基因, 亦发现可减弱细胞增殖能力。本研究显示, Wip-1 siRNA 组 ECC-1 细胞和 KLE 细胞 G₀+G₁ 期比例均高于 siRNA 对照组和空白对照组, 而 S 期和 G₂+M 期比例均低于 siRNA 对照组和空白对照组, Wip-1 siRNA 组 ECC-1 细胞和 KLE 细胞凋亡比率均高于 siRNA 对照组和空白对照组, 说明特异性干扰 Wip-1 基因, 可通过影响细胞周期而加速子宫内膜癌 ECC-1 和 KLE 细胞凋亡。多项研究指出, Wip-1 可能参与了核因子- κ B(NF- κ B)、Wnt 等信号通路过程, 而这些信号通路与细胞增殖、周期改变及凋亡等密切相关^[13-14]。

综上所述, Wip-1 在子宫内膜癌组织中呈高表达, 与病理分期、病理分级、淋巴结转移、p53 阴性有关, 特异性干扰 Wip-1 基因可对子宫内膜癌 ECC-1 和 KLE 细胞增殖、凋亡及细胞周期产生影响, 提示 Wip-1 参与了子宫内膜癌细胞增殖、凋亡等生物学过程。

参考文献

- [1] 代敏, 任建松, 李霓, 等. 中国 2008 年肿瘤发病和死亡情况估计及预测[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(1): 57-61.
- [2] Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer[J]. Biochem J, 2015, 469(3): 325-346.
- [3] Zhu J, Sammons MA, Donahue G, et al. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth[J]. Nature, 2015, 525(7568): 206-211.
- [4] Zhang H, Wang Z, Zhang Z. PP1 α , PP1 β and Wip-1 regulate H4S47 phosphorylation and deposition of histone H3 variant H3.3[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(17): 8085-8093.

- [5] 张文军, 郑立春, 柴连海, 等. Wip-1 在甲状腺癌细胞中表达的临床及生物学意义[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(21): 1348-1352.
- [6] 侯新新, 赵萌, 张贵宇. PPAR γ 基因表达对子宫内膜癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(5): 360-365.
- [7] Kotsinas A, Papanagnou P, Galanos P, et al. MKK7 and ARF; new players in the DNA damage response scenery[J]. Cell Cycle, 2014, 13(8): 1227-1236.
- [8] 彭飞, 孙文靖, 于畅. 丝/苏氨酸磷酸酶 Wip1 的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2014, 37(2): 70-72.
- [9] 罗树春, 白义凤, 兰海涛. 干扰 WIG-1 的表达对小细胞肺癌多药耐药的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(10): 733-738.
- [10] 王鹏, 侯崇显, 詹升全, 等. 靶向沉默 Wip1 基因协同替莫唑胺抑制脑胶质瘤细胞增殖的作用[J]. 临床神经外科杂志, 2015, 12(1): 1-4.
- [11] Yi W, Hu X, Chen Z, et al. Phosphatase Wip1 controls antigen-independent B-cell development in a p53-dependent manner[J]. Blood, 2015, 126(5): 620-628.
- [12] Tan X, Zhang J, Jin W, et al. Wip1 phosphatase involved in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation [J]. J Mol Neurosci, 2013, 51(3): 959-966.
- [13] Lowe JM, Cha H, Yang Q, et al. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is a novel positive transcriptional regulator of the oncogenic Wip1 phosphatase [J]. J Biol Chem, 2010, 285(8): 5249-5257.
- [14] González-Sancho JM, Greer YE, Abrahams CL, et al. Functional consequences of Wnt-induced dishevelled 2 phosphorylation in canonical and noncanonical Wnt signaling[J]. J Biol Chem, 2013, 288(13): 9428-9437.

(收稿日期: 2016-06-26 修回日期: 2016-09-13)

(上接第 4933 页)

结果可见, CC 型在男女之间的分布差异有统计学意义 ($P=0.003$), 男性患者明显多于女性患者, 但其余两种基因型并无明显差异。本文将重庆地区与豫北地区脑卒中患者 MTHFR 基因型的多态性分布做了简单的比较, 结果表明 C677C 与 T677T 两种基因型的分布存在明显差异 ($P<0.05$)。本次研究中 TT 型的 Hcy 水平明显高于 CC、CT 型, 这说明 MTHFR C677T 基因多态性与 Hcy 水平相关。

作者建议脑卒中患者, 尤其是男性患者, 在条件允许的情况下都能同时检测自身 MTHFR C677T 基因类型及 Hcy 水平, 以利于医生更早、更好地采取预防及治疗措施, 制订良好的个体化用药方案, 从而降低疾病带来的不良后果。

参考文献

- [1] 蔡高宇, 卢钟娇, 傅毅. 基因多态性与脑卒中相关性研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2015, 15(2): 92-97.
- [2] 杨立平, 金霖, 包同新, 等. MTHFR 基因多态性与脑卒中的关系[J]. 中国航天医药杂志, 2003, 5(1): 22-24.
- [3] 周宪梁, 胡爱华, 惠汝太, 等. MTHFR 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平与脑卒中的关系[J]. 中华心血管病杂志, 1999, 27(2): 40-42.
- [4] 张海洋, 张金华, 张会敏. MTHFR 基因多态性与脑卒中

的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(4): 690-691.

- [5] 李忠, 陈晓虹, 魏艳花, 等. 青年与老年缺血性卒中危险因素的比较[J]. 中国脑血管病杂志, 2010, 7(3): 150-151.
- [6] Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis[J]. N Eng J Med, 1998, 338(15): 1042-1050.
- [7] 高国栋, 林凯, 黎映兰. 高同型半胱氨酸血症与缺血性脑卒中的关系及成因分析[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(11): 1769-1770.
- [8] Hong YS, Lee MJ, Kim KH, et al. The C677 mutation in methylene tetrahydrofolate reductase gene; correlation with uric acid and cardiovascular risk factors in elderly Korean men[J]. J Korean Med Sci, 2004, 19(2): 209-213.
- [9] Zuo M, Nishio H, Lee MJ, et al. The C677T mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene increases serum uric acid in elderly men[J]. J Hum Genet, 2000, 45(4): 257-262.
- [10] 黄一宁, 赵宇岚, 李舜伟. 同型半胱氨酸和 MTHFR 基因多态性与缺血性脑血管病的关系[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(2): 50-53.

(收稿日期: 2016-07-12 修回日期: 2016-10-15)