

山西太原地区 MTHFR 和 MTRR 基因多态性与高同型半胱氨酸脑卒中的相关性

李瑞蓉 李玉串 韩惠萍 赵爱明 柴里京

作者单位: 030006 山西太原, 山西省针灸医院检验科(李瑞蓉、韩惠萍、赵爱明、柴里京)

030032 山西太原, 山西白求恩医院检验科(李玉串)

通信作者: 李瑞蓉, Email: sxslrr@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.03.013

【摘要】 目的 分析山西太原地区亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)、甲硫氨酸合成酶还原酶(MTRR)基因多态性与高同型半胱氨酸脑卒中的相关性。方法 选择 2019 年 1—8 月山西省针灸医院和山西白求恩医院收治的 300 例脑卒中患者作为脑卒中组, 另外选择 310 名同期健康体检者作为对照组。采用聚合酶链反应(PCR)检测 MTHFR C677T、MTHFR 1298C 和 MTRR 66AG 基因型。脑卒中患者的同型半胱氨酸(Hcy)检测采用循环酶法。将携带 MTHFR C677 基因多态性不同基因型的 300 例脑卒中患者根据血清 Hcy 水平分组, 分析 Hcy 为 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 与 Hcy>20 $\mu\text{mol/L}$ 脑卒中患者的人数与基因型差异。结果 对照组携带 MTHFR C677T 位点高度风险 TT 基因型的受检者比例明显低于脑卒中组[32.6% (101/310) 比 49.0% (147/300), $P<0.05$], 对照组携带 MTHFR 1298C 位点高度风险 CC 基因型的受检者比例明显低于脑卒中组[1.9% (6/310) 比 2.3% (7/300), $P<0.05$], 对照组携带 MTRR 66AG 位点高度风险 GG 基因型的受检者比例明显低于脑卒中组[7.1% (22/310) 比 12.3% (7/300), $P<0.05$]。对 MTHFR C677T 基因多态性不同基因型的 300 例脑卒中患者的血浆 Hcy 水平进行统计分析, Hcy 为 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 的人数为 142 人(占 46.67%), Hcy>20 $\mu\text{mol/L}$ 的人数为 158 人(占 52.67%)。Hcy>20 $\mu\text{mol/L}$ 的脑卒中患者中, 携带 TT 基因型患者的 Hcy 水平高于携带 CT 和 CC 基因型的患者。结论 脑卒中患者 MTHFR 基因的高度风险基因型与高水平 Hcy 有关, 检测 MTHFR 基因型, 了解山西太原地区的高度风险基因型分布规律, 可为临床上指导患者合理补充叶酸, 预防脑卒中发生提供一定参考。

【关键词】 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性; 同型半胱氨酸; 脑卒中

基金项目: 山西省卫生计生委科研课题(2017112)

Association of MTHFR and MTRR gene polymorphism with hyperhomocysteinemic stroke in Taiyuan area, Shanxi Province

Li Ruirong, Li Yuchuan, Han Huiping, Zhao Aiming, Chai Lijing. Department of Clinical Laboratory, Shanxi Acupuncture Hospital, Taiyuan 030006, Shanxi, China (Li RR, Han HP, Zhao AM, Chai LJ); Department of Clinical Laboratory, Shanxi Bethune Hospital, Taiyuan 030032, Shanxi, China (Li YC)

Corresponding author: Li Ruirong, Email: sxslrr@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) gene polymorphism and stroke with hyperhomocysteinemia in Taiyuan area of Shanxi Province. **Methods** The 300 patients with stroke admitted to Shanxi Acupuncture Hospital and Shanxi Bethune Hospital from January to August 2019 were selected as stroke group, and 310 healthy subjects in the same period were selected as control group. The genotypes of MTHFR C677T, MTHFR 1298C and MTRR 66AG were detected by polymerase chain reaction (PCR). The level of homocysteine (Hcy) in 300 patients with stroke was detected by circulating enzyme method. The 300 stroke patients with different genotypes of MTHFR C677 polymorphism were grouped according to plasma Hcy level, and the number and genotypes of patients with Hcy of 5–20 $\mu\text{mol/L}$ and > 20 $\mu\text{mol/L}$ were analyzed. **Results** The proportion of MTHFR C677T gene high-risk TT genotype in control group was lower than that of stroke group [32.6% (101/310) vs. 49.0% (147/300), $P < 0.05$]. The proportion of MTHFR 1298C gene high-risk CC genotype in control group was lower than that of stroke group [1.9% (6/310) vs. 2.3% (7/300), $P < 0.05$]. The proportion of MTRR 66AG gene high-risk genotype GG in control group was lower than that of stroke group [7.1% (22/310) vs. 12.3% (7/300), $P < 0.05$]. The plasma Hcy level of 300 stroke patients with different genotypes of MTHFR C677T polymorphism was statistically analyzed, and the

number of patients with Hcy of 5–20 $\mu\text{mol/L}$ was 142 (accounting for 46.7%), that of patients with Hcy > 20 $\mu\text{mol/L}$ was 158 (52.7%). Among the patients with Hcy > 20 $\mu\text{mol/L}$, the Hcy level of patients carrying TT genotype was higher than those of patients carrying CT and CC genotypes. **Conclusions** The high-risk genotype of MTHFR gene in stroke patients is related to high level of Hcy. Detecting MTHFR genotype and understanding the distribution of folic acid in Taiyuan, Shanxi Province, can provide a reasonable dose of folic acid for clinicians to provide a reference for the prevention of stroke.

【Key words】 Methylenetetrahydrofolatereductase; Gene polymorphism; Homocysteine; Stroke

Fund Program: Scientific Research Project of Shanxi Health and Family Planning Commission (2017112)

根据 2020 年中国脑卒中报告,脑卒中已成为我国居民死亡的首位原因^[1]。国家卫生健康委卒中防治工程委员会 2020 年中国卒中高危人群筛查干预工作调查表明,中国 40 岁以上人群脑卒中患者约有 1 780 万名,新发现卒中患者 340 万名,卒中相关死亡患者 230 万名^[2]。全世界 90% 的脑卒中患者发病与高血压、糖尿病、血脂异常等 10 项可改变危险因素有关,其中高血压位居榜首,另外血清同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平升高也是影响高血压发病的重要危险因素之一。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolatereductase, MTHFR)以及甲硫氨酸合成酶还原酶(methionine synthase reductase, MTRR)是人体内参与叶酸代谢的关键酶,能够介导清除人体中的 Hcy,促进 DNA 甲基化反应。常进等^[3]研究表明, MTHFR 基因 C677T 位点多态性与高血压的风险有关,是高血压发病的主要危险因素。MTHFR 和 MTRR 基因多态性会造成酶活性下降,引发叶酸代谢障碍,从而导致 DNA 的低甲基化,以及高同型半胱氨酸血症,引起脑卒中的发生。宋俊丽等^[4]研究山西地区 MTHFR C677T 基因多态性及其与 Hcy 的关系,但 MTHFR C677T、MTHFR 1298C 和 MTRR A66G 位点与高同型半胱氨酸脑卒中的相关性研究尚未见报道。本研究选择脑卒中患者和同期体检者作为研究对象,了解山西太原地区 MTHFR 基因多态性与高同型半胱氨酸脑卒中的相关性,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2019 年 1—8 月在山西白求恩医院和山西省针灸医院就诊的 300 例脑卒中患者作为脑卒中组,另外选择 310 名同期健康体检者作为对照组。

1.1.1 纳入标准 ① 年龄 > 18 岁; ② 脑卒中患者经头颅磁共振成像检查,符合脑卒中的诊断标准。

1.1.2 排除标准 ① 严重心、肝、肾功能不全; ② 自身免疫性疾病; ③ 恶性肿瘤; ④ 颅脑创伤、外伤。

1.1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,经山西省针灸研究所生物医学研究伦理委员会批准(审批号:ZYLS2018005),所有受试者均自愿参与研究,并签署临床研究知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 仪器与试剂 使用日立 7180 全自动生化分析仪,采用循环酶法检测 Hcy,试剂盒购自南京威特曼生物试剂有限公司。基因多态试剂盒和全血 DNA 提取试剂盒购自武汉友芝友医疗科技股份有限公司。PQD-96A 荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪购自杭州博日科技股份有限公司。

1.2.2 血清 Hcy 检测 采用无抗凝剂真空采集管,采集受检者外周静脉血 3 mL,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱至血样凝固,以 3 500 r/min(离心半径 13.5 cm)离心 5 min,取上层血清检测 Hcy,正常参考值范围 0 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 。血清 Hcy $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 定义为高同型半胱氨酸血症。

1.2.3 叶酸代谢基因多态性检测 采集受检者空腹外周静脉血 2 mL,采用抗凝真空采血管进行人全血 DNA 提取,试剂盒提取总 DNA 后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。采用 PCR 方法,检测 MTHFR、MTRR 基因(MTHFR C677T、MTHFR 1298C 和 MTRR A66G)多态性。以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,流程为尿嘧啶-N-糖基化酶(uracil-N-glycosylase, UNG 酶)处理 37 $^{\circ}\text{C}$ 105 min,预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s(40 个循环),在此阶段结束时采集荧光信号,设置阳性对照和阴性对照,与标本一起扩增。根据检测结果判读基因型,包括 MTHFR C677T 位点(CC、CT、TT)和 MTHFR A66G 位点(AA、AG、GG)。

1.3 检测原理 针对 MTHFR、MTRR 基因的不同多态性位点,设计与探针结合的特异性引物,反应体系中通过两种通道对一个位点的基因多态性进行监测。在反应体系中含有不同基因模板时,PCR 反应开始,并释放不同的荧光信号。PCR 过程中相应通道的信号强度可通过仪器进行实时监测和输出,对检测结果进行定性分析。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件处理数据。计数资料以例(%)表示,采用 χ^2 检验和趋势 χ^2 检验进行组间构成比或率的比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与脑卒中组 MTHFR 基因多态性基因型分布比较 比较对照组与脑卒中组 MTHFR C677T、MTHFR 1298C、MTHFR A66G 位点不同基因型的分布频率,对照组和脑卒中组的 TT、CC、GG 基因型频率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 对照组与脑卒中组的 MTHFR C677T、MTHFR 1298 和 MTRR A66G 位点的基因型分布

组别	例数 (例)	MTHFR C677T [例(%)]			χ^2 值	P 值
		CC	CT	TT		
对照组	310	53 (17.1)	156 (50.3)	101 (32.6)	112.80	0.00
脑卒中组	300	40 (16.9)	113 (37.6)	147 (49.0)		

组别	例数 (例)	MTHFR 1298A [例(%)]			χ^2 值	P 值
		AA	AC	CC		
对照组	310	225 (72.6)	79 (25.5)	6 (1.9)	7.13	0.27
脑卒中组	300	243 (81.0)	50 (16.6)	7 (2.3)		

组别	例数 (例)	MTRR A66G [例(%)]			χ^2 值	P 值
		AA	AG	GG		
对照组	310	150 (48.4)	138 (44.5)	22 (7.1)	6.36	0.41
脑卒中组	300	151 (50.3)	112 (37.3)	37 (12.3)		

注: MTHFR 为亚甲基四氢叶酸还原酶, MTRR 为甲硫氨酸合成酶还原酶

2.2 不同 Hcy 水平脑卒中患者 MTHFR C677 位点的基因型分布特征 根据脑卒中患者血清 Hcy 水平分组, Hcy 为 5 ~ 15 $\mu\text{mol/L}$ 人数为 142 人(占 46.7%)。Hcy > 20 $\mu\text{mol/L}$ 人数为 158 人(占 52.7%)。对不同血清 Hcy 水平脑卒中患者 MTHFR C677T 位点的基因型进行统计分析, CT 基因型在 Hcy 水平为 5 ~ 15 $\mu\text{mol/L}$ 的患者中分布频率较高, 而 TT 基因型在 Hcy > 20 $\mu\text{mol/L}$ 的患者中分布频率较高, 且分布频率随着 Hcy 水平升高而升高($P < 0.05$)。不同 Hcy 水平的脑卒中患者不同基因型频率比较总体差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 不同 Hcy 水平脑卒中患者 MTHFR C677T 位点的基因型分布特征

Hcy 水平	例数 (例)	CC [例(%)]	CT [例(%)]	TT [例(%)]	χ^2 值	P 值
5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$	142	30 (21.1)	62 (43.6)	50 (35.2)	25.31	0.00
> 20 $\mu\text{mol/L}$	158	10 (6.32)	51 (32.3)	97 (61.4)		

注: Hcy 为同型半胱氨酸, MTHFR 为亚甲基四氢叶酸还原酶, MTRR 为甲硫氨酸合成酶还原酶

3 讨论

MTHFR 是叶酸代谢过程中的关键酶,也是 Hcy 重新甲基化的关键酶,可将 5,10- 亚甲基四氢叶酸还原为 5- 甲基四氢叶酸,参与机体的生理生化过程,而编码 MTHFR 的基因存在多种突变,其中最常见的是 MTHFR C677T 位点基因多态性^[5-6]。MTHFR C677T 位点的突变中 677 位点上的 C→T 突变是最常见的一种,这种突变导致丙氨酸被缬氨酸取代,使 MTHFR 基因热稳定性及活性下降。

有研究表明, MTHFR C677T 位点的 CT 杂合突变型 MTHFR 活性为 CC 型 MTHFR 的 65%, 而 TT 纯合突变型的活性仅为正常值的 30%^[7]。还有研究显示,我国 MTHFR 基因的 C677T 位点基因变异频率具有地区差异,从南向北随纬度的增加, TT 型的比例逐渐升高, MTHFR C677T 中 TT 基因型的分布从北方到南方逐渐降低,如山东省(40.8%)、湖北省(16.8%)、海南省(6.4%)^[8]。本研究中山西太原地区脑卒中患者 MTHFR C677T 位点 TT 基因型的分布频率(32.6%)与陕西省(30.4%)相似,有学者调查结果显示, MTHFR C677T 位点基因型对脑卒中的影响与地区和饮食习惯有关,对于膳食摄入叶酸较为充足地区的人群,即使发生 MTHFR C677T 位点基因突变也并未增加脑卒中风险^[9]。

一项涉及 72 个研究,纳入将近 3 万例患者的荟萃分析也显示, MTHFR C677T 位点基因多态性与脑卒中发病有关, T 突变导致增加了至少 30% 的缺血性卒中发生^[10]。MTHFR 的活性降低会导致血清 Hcy 水平升高,从而使缺血性卒中风险增加^[11]。由于 Hcy 浓度是脑卒中一个可改变的危险因素,检测血清 Hcy 水平是判断脑卒中严重程度及预后的简单易行且有意义的重要指标。

本研究显示,山西太原地区健康体检者 MTHFR C677T 位点的高度风险 TT 基因型占比为 32.6%,脑卒中患者的 TT 基因型占比为 49.0%;对照组和脑卒中组 MTHFR 1298C 基因的高度风险 CC 基因型频率比较差异有统计学意义; MTRR A66G 基因型的高度风险基因 GG 对照组占比 7.2%,脑卒中组占比 12.3%;对照组和脑卒中组的 TT、CC、GG 基因型频率比较差异有统计学意义。本研究中血清 Hcy 水平 CT 基因型在低 Hcy 组分布频率较高,而 TT 基因型在高 Hcy 组分布频率较高,且频率随着 Hcy 水平升高而增加。脑卒中患者 MTHFR 基因多态性高风险基因型与高 Hcy 水平有关,但不足之处是回顾

性临床研究混杂选择偏倚、样本量偏少等,还需要前瞻性、大规模随机对照研究以进一步证实^[12-13]。

Hcy 水平高低主要受体内叶酸水平以及叶酸代谢酶活性的影响,尤其是 MTHFR。MTHFR 基因 C677T 位点多态性是导致叶酸利用能力下降, Hcy 水平升高最常见的基因变异原因。有研究证实,脑卒中患者携带 MTHFR C677T 位点高风险 TT 基因型的比例明显高于携带 CC 和 CT 基因型的患者, MTHFR 基因突变合并高同型半胱氨酸血症可使脑卒中的发生风险增加 5.18 倍。除 MTHFR 的影响外,体内 Hcy 水平还受到 MTRR 的影响。MTRR A66G 位点基因多态性可导致 MTHFR 的活性表达出现差异,影响代谢通路,从而导致代谢通路受阻,引发高同型半胱氨酸血症。MTHFR 和 MTHF 基因多态性会影响酶活性,从而改变体内叶酸代谢,导致机体发生多种疾病。中国脑卒中一级预防研究 (Chinese Stroke Primary Prevention Study, CSPPT) 显示,补充叶酸可使高血压患者的首次卒中风险降低 21%,其中 MTHFR C677T 位点携带 CC 和 CT 基因型的患者补充叶酸可使卒中风险降低 15%,TT 基因型风险降低 30%。因此,补充叶酸的合理剂量是降低 Hcy 水平最直接有效的方法。

综上所述,脑卒中发生的遗传因素可能包括多种 Hcy 代谢酶相关基因的突变,而血 Hcy 水平变化也受到遗传因素(如相关代谢酶基因突变)和环境因素共同影响,山西地区居民的饮食主要以富含 B 族维生素和叶酸的谷物为主,占能量摄入的 78%。有研究显示,摄入 B 族维生素能够预防和降低脑卒中的发生概率^[14]。但是由于气候条件和饮食习惯的影响,该地居民对绿色蔬菜水果的摄入不足,因此要重视 MTHFR 基因多态性与 Hcy 水平的检测结果,合理补充和摄入叶酸,才能有效预防脑卒中的发生^[15]。临床应针对基因突变合并高 Hcy 患者从多方面干预,降低脑卒中发生的风险。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

1 KISA A, KISA S, GBD Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20 (10): 795–820. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0.

2 《中国卒中中心报告 2020》编写组.《中国卒中中心报告 2020》概要[J]. *中国脑血管病杂志*, 2021, 18 (11): 737–743. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5921.2021.11.001.

3 常进,葛星,徐嘉纯,等. MTHFR C677T 基因多态性与原发性高血压相关性的荟萃分析[J]. *徐州医科大学学报*, 2019, 39 (1): 21–25. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2019.01.005.

4 宋俊丽,郭茜,赵强,等. 山西地区亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性及其与同型半胱氨酸的相关性研究[J]. *中国药物与临床*, 2020, 20 (17): 2848–2850. DOI: 10.11655/zgywylc.2020.17.007.

5 王亚飞,马良,薄红霞,等. 晋东南地区人群亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性分析[J]. *中国公共卫生管理*, 2019, 35 (1): 135–137. DOI: CNKI:SUN:GGWS.0.2019-01-042.

6 张明杰,苏东越,崔贵虎,等. 赤峰地区育龄女性叶酸代谢相关基因检测分析[J]. *实用检验医师杂志*, 2021, 13 (4): 225–228. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.04.009.

7 LIEW S C, GUPTA E D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases [J]. *Eur J Med Genet*, 2015, 58 (1): 1–10. DOI: 10.1016/j.ejmg.2014.10.004.

8 FAN S, YANG B, ZHI X, et al. Combined genotype and haplotype distributions of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: a cross-sectional descriptive study of 13 473 Chinese adult women [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95 (48): e5355. DOI: 10.1097/MD.0000000000005355.

9 WANG J, OUYANG N, QU L, et al. Effect of MTHFR A1298C and MTRR A66G genetic mutations on homocysteine levels in the Chinese population: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Transl Int Med*, 2017, 5 (4): 220–229. DOI: 10.1515/jtim-2017-0037.

10 廖琴,高静,朱琳,等. 高同型半胱氨酸血症与卒中复发风险关系的 Meta 分析[J]. *护理研究*, 2020, 34 (20): 3561–3571. DOI: 10.12102/j.issn.1009-6493.2020.20.001.

11 ABHINAND P A, MANIKANDAN M, MAHALAKSHMI R, et al. Meta-analysis study to evaluate the association of MTHFR C677T polymorphism with risk of ischemic stroke [J]. *Bioinformatics*, 2017, 13 (6): 214–219. DOI: 10.6026/97320630013214.

12 张洁,宋凤卿,郑光辉,等. 急性缺血性脑卒中溶栓患者二氧化碳结合力与短期预后的关系[J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (5): 529–532. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210902-01310.

13 刘博涵,王舒,郭扬,等. 基于肠-脑轴与针刺治疗急性缺血性脑卒中的价值[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2021, 28 (4): 501–504. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.04.028.

14 WANG J, SUN Z, YANG Y, et al. Association of laboratory parameters and genetic polymorphisms with ischemic stroke in Chinese Han population [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (5): 490. DOI: 10.3892/etm.2021.9921.

15 杨玉芳. 凝血功能指标在脑出血患者预后评估中的应用[J]. *实用检验医师杂志*, 2021, 13 (3): 171–173. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.03.012.

(收稿日期: 2022-03-28)

(本文编辑: 邵文)