

• 论著 •

N⁵,N¹⁰-亚甲基四氢叶酸还原酶基因
与缺血性脑卒中发病的关系

李才明 张成 卢锡林 冯慧宇 苏全喜 曾纭 张鸿炼 邱淑莲

【摘要】 目的 探讨 N⁵,N¹⁰-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因与缺血性脑卒中发病的关系。方法 454 例缺血性脑卒中患者按照 TOAST(Trail of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment)分型分为大动脉粥样硬化型(LAA)、心源性脑梗死型(CE)、小动脉阻塞型(SAA)、其他明确病因的中风型(SOE)和不明原因的中风型(SUE);根据神经功能缺损评分分为轻、中、重型。应用聚合酶链反应(PCR)和变性高效液相色谱(DHPLC)技术筛查脑卒中组和 334 例无高血压病、冠心病、脑血管疾病、糖尿病、癌症、肾功能衰竭等疾病的患者或健康人(对照组)的 MTHFR 基因 C677T 的多态分布,详细记录卒中危险因素。结果 脑卒中组 CC、CT、TT 基因型频率分别为 51.8%、40.5%和 7.7%,对照组分别为 56.9%、38.3%和 4.8%,TT 基因型和 T 等位基因与中、重型缺血性脑卒中、LAA 和 CE 型缺血性脑卒中相关。吸烟、酗酒、伴糖尿病群体 TT 基因型和 T 等位基因频率显著高于对照组(P 均 <0.10),CC 基因型和 C 等位基因频率显著低于对照组(P 均 <0.05),而非吸烟、非酗酒、不伴糖尿病群体的各基因型和等位基因频率与对照组比较差异无显著性。结论 TT 基因型、T 等位基因是缺血性脑卒中的易患因子;MTHFR 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在缺血性脑卒中的发病过程中存在协同作用。

【关键词】 脑卒中;缺血性; N⁵,N¹⁰-亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因; 遗传易感性

Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase gene and ischemic stroke LI Cai-ming*, ZHANG Cheng, LU Xi-lin, FENG Hui-yu, SU Quan-xi, ZENG Ying, ZHANG Hong-lian, QIU Shu-lian. * Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China (LI Cai-ming works in Department of Neurology, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou 516001, Guangdong, China)

Corresponding author: ZHANG Cheng, Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China (Email: czym@gzsums.edu.cn)

【Abstract】 Objective To study the relationship between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and ischemic stroke. **Methods** Four hundred and fifty-four ischemic stroke patients were enrolled in the study. They were divided into large-artery atherosclerosis (LAA), cardioembolism (CE), small-artery occlusion (SAA), stroke of other determined etiology (SOE) and stroke of undetermined etiology (SUE) according to TOAST (Trail of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) criteria; and they were divided into mild, moderate and severe types ischemic stroke according to their scores of neurologic impairment. Three hundred and thirty-four subjects, in whom hypertension, coronary heart disease, cerebral vascular disease, diabetes mellitus, cancer, renal failure etc. were excluded, served as controls in the study. Their C677T polymorphisms of MTHFR gene were determined with polymerase chain reaction (PCR) and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), and their risk factors of ischemic stroke were recorded at the same time. **Results** The frequencies of CC, CT and TT genotype in ischemic stroke were 51.8%, 40.5% and 7.7%, respectively, and they were 56.9%, 38.3% and 4.8% respectively in controls. TT genotype and T allele were associated with LAA and CE, moderate type and severe type of ischemic stroke. The frequencies of TT genotype and T allele in ischemic stroke patients were significantly higher in those with smoking, alcohol abuse or diabetes mellitus than those in controls (all $P < 0.10$), but CC genotype and C allele were significantly lower in them than those in controls (all $P < 0.05$). On the other hand, all of genotypes and alleles in ischemic stroke patients with no history of smoking, alcohol abuse or diabetes mellitus were not significantly different from those in controls. **Conclusion** TT genotype and T allele are risk factors for ischemic stroke. It exists interactions between smoking, alcohol abuse, diabetes mellitus and MTHFR gene in the pathogenesis of ischemic stroke.

【Key words】 ischemic stroke; methylenetetrahydrofolate reductase; gene; genetic predisposition to disease

基金项目:广东省医学科研基金资助项目(2001121, B2002124, B2005134)

作者单位:510080 广州,中山大学第一附属医院神经内科(李才明(现在广东省惠州市中心人民医院神经内科工作),张成,卢锡林,冯慧宇,曾纭);518002 广州,广东药学院第一附属医院神经内科(苏全喜);516001 广东省惠州市中心人民医院(张鸿炼,邱淑莲)

通讯作者:张成,广州,中山大学第一附属医院神经内科(Email: czym@gzsums.edu.cn)

作者简介:李才明(1971-),男(汉族),广东始兴人,副主任医师,主要研究脑血管病和神经遗传病。

目前研究认为, N^5, N^{10} -亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)基因是缺血性脑卒中的主要易感基因, 且与高同型半胱氨酸有关, 但结论不一^[1,2]。我们在既往研究的基础上, 对 MTHFR 基因进行了大规模筛查, 探讨 MTHFR 基因与缺血性脑卒中发病的关系, 以及基因与环境因素在其发病过程中的相互作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象: ①缺血性脑卒中组 454 例选自中山大学第一附属医院、惠州市中心人民医院、广东药学院第一附属医院神经内科和急诊科观察室, 其中男 271 例, 女 183 例; 年龄 27~94 岁, 平均 (65.20 ± 12.75) 岁; 均符合文献^[3]诊断标准, 经临床、CT 和(或)MRI 扫描确诊。根据临床症状、体征及 CT 和(或)MRI 结果, 将患者按文献^[4]标准进行 TOAST (Trail of ORG10172 in Acute Stroke Treatment) 分型, 分为大动脉粥样硬化型(LAA)、心源性脑梗死型(CE)、小动脉阻塞型(SAA)、其他明确病因中风型(SOE)和不明原因中风型(SUE); 根据神经功能缺损评分^[5]将患者分为轻型(0~15 分)、中型(16~30 分)和重型(31~45 分)。按统一标准^[6,7]详细记录患者的高血压、糖尿病、高脂血症、心肌梗死、卒中阳性家族史、酗酒和吸烟等各种危险因素。②对照组为年龄、性别相匹配的 334 例同期其他科住院患者和健康体检者, 其中男 207 例, 女 127 例; 年龄 35~88 岁, 平均 (59.57 ± 16.73) 岁。排除高血压病、冠心病、脑血管疾病、糖尿病、癌症、肾功能衰竭等疾病。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 提取: 取外周静脉血 5 ml, 肝素抗凝, 低速法破坏红细胞, 分离白细胞, 经十二烷基硫酸钠(SDS)和蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, 提取基因组 DNA。

1.2.2 血生化指标测定: 采空腹 12 h 静脉血, 分离血浆, 存于 -20°C 冰箱中待测。血糖(FBS)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)和血尿酸(UA)采用酶法测定; 血脂尿素氮(BUN)采用速率法测定; 载脂蛋白 A(apoA)、载脂蛋白 B(apoB)和肌酐(Cr)采用比色法测定, 试剂盒由北京中生物生物工程高技术公司提供。所有项目测定均有质控血浆(以 Backman 定标液作为标准品), 批内与批间变异系数 $<5\%$ 。

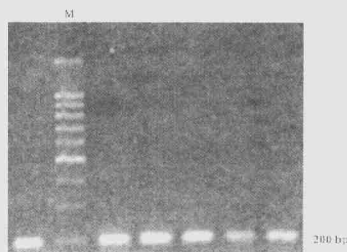
1.2.3 聚合酶链反应(PCR)检测 MTHFR 基因型: 参照文献^[8]设计引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列: P1: 5'-TGAAGGAGAAG-

GTGTCTGCGGGA - 3'; P2: 5'-AGGACGGT-GCGGTGAGAGTG - 3'。反应总体积 30 μl , 常规配制(含 1.5 U 高保真的 Taq DNA 聚合酶)。循环条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ /30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ /45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ /50 s, 45 个循环周期后补加 72 $^{\circ}\text{C}$ /10 min。质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳测 PCR 扩增产物, 扩增片段 198 bp。变性高效液相色谱(DHPLC)法模式鉴定 MTHFR 基因型, 半变性条件下的温度(T_m)为 61.7 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 统计学处理: 采用 SPSS 10.0 统计软件。计量资料比较用 t 检验; 计数资料比较用 χ^2 检验; 基因型及等位基因相对危险率以相对比值比(OR)及 95% 可信区间(CI)表示; Logistic 回归分析确定独立危险因素; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTHFR 基因多态类型: PCR 扩增出 198 bp 的 DNA 片段(图 1)。经 DHPLC 法鉴定, 在群体中可有 CC、CT 及 TT 3 种基因型, CT 基因型显示 2 个峰, 而 CC 和 TT 基因型标本在单独进样时仅出现单峰; 将 CC 和 TT 基因型 PCR 产物混合后再进样, 可出现与 CT 基因型标本类似的双峰(图 2)。



M 为 Marker, 100 bp 梯度标准
图 1 MTHFR 基因 PCR 扩增结果
Figure 1 PCR results of MTHFR gene

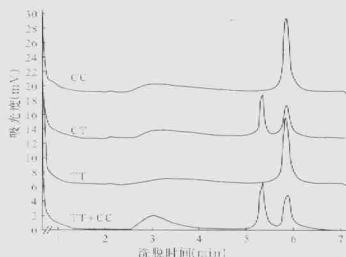


图 2 DHPLC 法鉴定 MTHFR 基因型结果
Figure 2 Identification results of MTHFR genotypes by DHPLC

表 1 脑卒中组和对照组血压及血生化指标比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of blood pressure and biochemical indexes in ischemic stroke and control groups($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	收缩压(mm Hg)	舒张压(mm Hg)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
对照组	334	120.90±20.70	73.14±12.10	5.01±1.10	1.53±1.03	1.32±0.41	2.72±0.88
脑卒中组	454	157.32±25.24	84.59±15.56	5.08±1.31	1.57±1.00	1.16±0.32	3.08±1.02
t 值		13.195	9.589	0.657	0.558	3.334	2.900
P 值		<0.001	<0.001	0.511	0.557	0.001	0.004

组别	例数(例)	apoA(g/L)	apoB(g/L)	FBS(mmol/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μmol/L)
对照组	334	1.10±0.32	0.80±0.28	4.98±1.12	5.52±2.39	75.82±14.52
脑卒中组	454	1.16±0.32	1.01±0.40	6.62±3.54	5.93±3.41	82.35±17.05
t 值		1.398	4.319	9.004	1.101	2.253
P 值		0.163	<0.001	<0.001	0.271	0.025

注: 1 mm Hg=0.133 kPa

表 3 各组各基因型患病的相对危险度 OR(95%CI)

Table 3 Odds ratio of different genotypes in different groups(95%CI)

群体	例数 (例)	基因型			等位基因	
		TT	CT	CC	T	C
吸烟群体	165	4.393(0.547~35.302)*	2.230(1.071~4.642)	0.353(0.172~0.726)**	2.359(1.192~4.666)**	0.424(0.214~0.839)**
非吸烟群体	623	1.448(0.748~2.802)	0.946(0.685~1.305)	0.967(0.705~1.327)	1.110(0.590~2.088)	0.901(0.479~1.696)
酗酒群体	92	2.097(0.853~5.157)#	0.930(0.866~0.999)	0.360(0.147~0.885)**	2.633(1.296~5.347)**	0.380(0.187~0.771)**
非酗酒群体	696	1.498(0.804~2.793)	1.014(0.746~1.378)	0.894(0.661~1.208)	1.167(0.622~2.188)	0.857(0.457~1.607)
伴糖尿病群体	115	1.893(0.833~4.299)△	1.376(0.897~2.110)	0.626(0.408~0.958)△△	1.272(0.692~2.340)	0.786(0.477~1.446)
不伴糖尿病群体	339	1.582(0.829~3.021)	1.014(0.743~1.383)	0.889(0.656~1.205)	0.786(0.477~1.446)	1.272(0.692~2.340)

注: 与非吸烟群体比较: * $P<0.10$, ** $P<0.05$; 与非酗酒群体比较: # $P<0.10$, ** $P<0.05$; 与不伴糖尿病比较: △ $P<0.10$, △△ $P<0.05$

2.2 血压和血生化指标检测(表 1): 与对照组比较, 脑卒中组收缩压、舒张压、LDL、apoB、FBS 和 Cr 均显著升高, HDL 显著降低, 差异均有显著性(P 均 <0.05); 两组间 TC、TG、apoA 和 BUN 差异均无显著性。

2.3 MTHFR 基因型分布特征(表 2): 与对照组比较, 脑卒中组 TT 基因型频率(7.7%, $OR=1.660$) 较高, 其中 CE 的 TT 基因型频率(11.1%, $OR=2.484$) 较高。SOE 的 TT 基因型频率虽然也较高(16.7%), 但由于病例数太少, 影响了准确性, 本研究中不对其进行分析。如果将 LAA 和 CE 合并, 则 $OR=2.049$; 若将中型和重型合并, 则 TT 基因型频率(9.7%, $OR=2.140$) 显著高于对照组。Logistic 回归分析表明, TT 基因型和 T 等位基因排除年龄、性别、收缩压、舒张压、TC、TG、HDL、LDL、apoA、apoB、FBS、BUN 和 Cr 等因素影响后, 与缺血性脑卒中相关; 进一步分析表明, TT 基因型和 T 等位基因与 LAA、CE 和中、重型缺血性脑卒中相关。脑卒中组和对照组患者 MTHFR 基因型分布, 进行遗传平衡定律检测, 结果符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2.4 MTHFR 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在缺血性脑卒中发病过程中的协同作用: 本研究中按照统一标准^[7,9]将缺血性脑卒中患者和对照组分为吸烟群体和非吸烟群体、酗酒群体和非酗酒群体; 将缺血性

表 2 脑卒中组和对照组 MTHFR 基因型分布特征

Table 2 Genotype distributions of MTHFR genes in ischemic stroke and control group

组别	例数 (例)	基因型(例(%))			等位基因(%)	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	334	190(56.9)	128(38.3)	16(4.8)	76.05	23.95
脑卒中组	454	235(51.8)	184(40.5)	35(7.7)	72.03	27.97
LAA	62	34(54.8)	23(37.1)	5(8.1)	73.39	26.61
CE	45	26(57.8)	14(31.1)	5(11.1)	73.33	26.67
SAA	171	85(49.7)	76(44.4)	10(5.9)	71.93	28.07
SOE	6	2(33.3)	3(50.0)	1(16.7)	58.33	41.67
SUE	170	88(51.8)	68(40.0)	14(8.2)	71.76	28.24
轻型	238	129(54.2)	95(39.9)	14(5.9)	74.16	25.84
中型	141	67(47.5)	61(43.3)	13(9.2)	69.15	30.85
重型	75	39(52.0)	28(37.3)	8(10.7)	70.67	29.33
中型+重型	216	106(49.1)	89(41.2)	21(9.7)*	69.68	30.32

注: 与对照组比较: * $P=0.024$, $OR=2.140$

脑卒中患者分为伴糖尿病群体和不伴糖尿病群体。各基因型患病的 OR 及 95%CI 见表 3。与相应对照群体比较, 吸烟、酗酒、伴糖尿病群体的 TT 基因型和 T 等位基因频率显著升高($P<0.10$), 而 CC 基因型和 C 等位基因频率显著降低($P<0.05$)。相反, 非吸烟、非酗酒群体和不伴糖尿病群体 MTHFR 基因的各基因型和等位基因频率的分布与相应对照群体相比, 差异均无显著性。

3 讨论

3.1 MTHFR 基因多态性与缺血性脑卒中的关系:

研究表明, MTHFR 基因 C677T 突变造成编码的氨基酸由丙氨酸变成缬氨酸, 使 MTHFR 活性大为降低^[10]。TT 基因型突变对 MTHFR 活性影响最大, 酶活性越低, 对同型半胱氨酸再甲基化影响越大, 血浆同型半胱氨酸水平越高, 故 TT 基因型可产生高同型半胱氨酸血症, 而高同型半胱氨酸血症是诱发心脑血管疾病的中度危险因素^[11]。本研究结果表明, TT 基因型和 T 等位基因是缺血性脑卒中的易患因子, 与缺血性脑卒中相关, 尤其是与 LAA 和 CE 有关, 而 CE 主要由冠状动脉粥样硬化导致的冠心病、心房颤动引起。因此推测 TT 基因型和 T 等位基因可能通过动脉粥样硬化而引起缺血性脑卒中。本研究结果亦表明, TT 基因型和 T 等位基因与中、重型缺血性脑卒中中相关, 这与 TT 基因型和 T 等位基因与 LAA、CE 相关的结果是一致的, 因为 LAA 和 CE 多由于较大动脉栓塞所致, 病灶大, 损害重, 这已经被缺血性脑卒中患者的尸检结果所证实^[12]。如果缺血性脑卒中患者的 MTHFR 基因型为 TT 或 CT 型, 其病情可能会进一步加重, 对这类患者应给予积极治疗, 如补充维生素、降血脂等。因此, 对缺血性脑卒中患者进行 MTHFR 基因检查, 可能有助于指导治疗和预后判断。

3.2 MTHFR 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在缺血性脑卒中发病过程中的交互作用:目前关于 MTHFR 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在缺血性脑卒中发病过程中是否存在协同作用的研究不多。本研究结果表明, 与对照组比较, 携带有 TT 基因型和 T 等位基因的吸烟、酗酒和伴糖尿病群体患病的 OR 大于 1, 而携带有 CC 基因型和 C 等位基因 OR 则小于 1。相反, 非吸烟、非酗酒和不伴糖尿病群体 MTHFR 基因的各基因型和等位基因频率的分布与对照组比较, 差异均无显著性, 提示携带有 T 等位基因的吸烟、酗酒群体和伴糖尿病群体易患缺血性脑卒中, 但携带 C 等位基因的吸烟、酗酒和伴糖尿病群体则不易患缺血性脑卒中, MTHFR 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在缺血性脑卒中的发病过程中存在协同作用, 这与既往的研究结果^[7,13,14]一致, 但其机制尚不明确。

本研究结果表明, MTHFR 基因可能通过影响动脉粥样硬化而引起缺血性脑卒中, 吸烟、酗酒可以促使动脉粥样硬化, 糖尿病可以引起血管病变, 吸烟、酗酒和 MTHFR 基因的 C677T 突变均可促使同型半胱氨酸水平升高, 从而引起动脉粥样硬化, 故它们可能在动脉粥样硬化这一环节上起协同作用。具体机制有待进一步研究。另外, 通过戒烟、戒酒, 积

极有效地控制 FBS, 降低血黏度, 改善微循环, 对于携带有危险基因型(如 TT、CT 基因型)的群体, 也许可以降低缺血性脑卒中的发生、发展甚至复发。

参考文献:

- 1 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: 119-122.
- 2 Kostulas K, Crisby M, Huang W X, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischaemic stroke and in carotid artery stenosis [J]. Eur J Clin Invest, 1998, 28: 285-289.
- 3 王新德. 各类脑血管病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29: 379-380.
- 4 Kolominsky-Rabas P L, Weber M, Gefeller O, et al. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study [J]. Stroke, 2001, 32: 2735-2740.
- 5 陈清棠. 脑卒中患者临床神经功能缺损程度评分标准(全国第 4 届脑血管病学术会议通过)[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29: 381-383.
- 6 高血压诊断标准和治疗达标水平: 2004 年《中国高血压防治指南》(实用本)[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12: 422.
- 7 Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, et al. Cumulative effect of predisposing genotypes and their interaction with modifiable factors on the risk of ischemic stroke in young adults[J]. Stroke, 2005, 36: 533-539.
- 8 李才明, 张成, 邱淑莲, 等. 中国南方汉族人 MTHFR 基因多态性与缺血性脑卒中的遗传易感性研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 526-528.
- 9 杨政权, 汪培山. 吸烟、饮酒与脑出血的配对病例对照研究[J]. 疾病控制杂志, 1999, 3: 101-102.
- 10 Notsu Y, Nabika T, Park H Y, et al. Evaluation of genetic risk factors for silent brain infarction [J]. Stroke, 1999, 30: 1881-1886.
- 11 Kristensen B, Malm J, Nilsson T K, et al. Hyperhomocysteinemia and hypofibrinolysis in young adults with ischemic stroke [J]. Stroke, 1999, 30: 974-980.
- 12 吴丽娥, 刘鸣, 张月辉, 等. 缺血性脑卒中 TOAST 病因分型和预后[J]. 中华神经科杂志, 2004, 37: 292-295.
- 13 Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, et al. Evaluation of the modifying effects of unfavourable genotypes on classical clinical risk factors for ischaemic stroke [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003, 74: 1615-1620.
- 14 Sayed-Tabatabaei F A, Schut A F, Hofman A, et al. A study of gene-environment interaction on the gene for angiotensin converting enzyme: a combined functional and population based approach [J]. J Med Genet, 2004, 41: 99-103.

(收稿日期: 2005-08-15 修回日期: 2006-03-17)

(本文编辑: 郭方)

• 广告目次 •

- ① 珠海丽珠: 丽珠血液灌流器 (封二)
- ② 深圳迈瑞: 监护仪 (插页)
- ③ 廊坊爱尔: 炭肾 (插页)
- ④ 恩华药业: 力月西 (插页)
- ⑤ 天津红日药业: 血必净注射液 (封三)
- ⑥ 索诺声有限公司: 便携式彩超 (封底)