

[文章编号] 1007-3949(2006)14-11-0979-04

•临床研究•

亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与原发性高血压患者动脉顺应性的关系

邢绣荣, 华琦, 杨峥, 刘荣坤

(首都医科大学宣武医院心内科, 北京市 100053)

[关键词] 内科学; 动脉顺应性相关的分子机制; 聚合酶链反应—限制片长多态性分析; 原发性高血压; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性

[摘要] 目的 研究亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与原发性高血压及动脉顺应性的关系。方法 对 695 例原发性高血压患者和 509 例年龄匹配的正常对照者采用聚合酶链反应和限制片长多态性分析方法进行基因多态性分析, 电泳判断基因型及测序, 并测定颈动脉—桡动脉脉搏波速度和颈动脉—股动脉脉搏波速度。结果 高血压组 TT 基因型频率和 T 等位基因频率显著高于正常对照组 (26.5% 比 20.6% 及 48.7% 比 42.4%, $P=0.015$ 和 0.002)。T 等位基因携带者的颈动脉—股动脉脉搏波速度显著高于 CC 基因型者 ($P<0.05$), 高血压组颈动脉—桡动脉脉搏波速度在 T 等位基因携带者也显著高于 CC 基因型者 ($P=0.001$)。携带 T 等位基因的高血压患者颈动脉—股动脉脉搏波速度及非单纯收缩期高血压患者颈动脉—桡动脉脉搏波速度均显著高于 CC 基因型者 ($P<0.05$)。结论 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性可能与原发性高血压发病危险性增加有关, 并且 677T 等位基因可能是高血压动脉硬化的遗传因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationships Between Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene C677T Polymorphism and Arterial Compliance in Patients with Essential Hypertension

XING Xiurong, HUA Qi, YANG Zheng, and LIU Rong-Kun

(Department of Cardiovascular, Xuan Wu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

[KEY WORDS] Essential Hypertension; Methylenetetrahydrofolate Reductase; Gene Polymorphism; Arterial Compliance; Pulse Wave Velocity

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationships of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism with essential hypertension and arterial compliance. **Methods** Genotype of MTHFR gene C677T polymorphism was detected by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis and characterized by electrophoresis and sequencing in 695 patients with essential hypertension and 509 age-matched normal controls. Carotid-radial pulse wave velocity (C-R PWV) and carotid-femoral pulse wave velocity (C-F PWV) was performed. **Results** In essential hypertension group, the frequencies of TT genotype and T allele were significantly higher than those of control group (26.5% vs 20.6% and 48.7% vs 42.4%, $P=0.015$ and 0.002). The C-F PWV of people with T allele was markedly higher than that of people with CC genotype ($P<0.05$), and the C-R PWV of hypertensive patients with T allele was also higher than that of with CC genotype ($P=0.001$). The C-F PWV of isolated systolic hypertension (ISH) patients with T allele and the C-R PWV and C-F PWV of no isolated systolic hypertension (NISH) patients with T allele were significantly higher than those of patients with CC genotype ($P<0.05$). **Conclusion** MTHFR C677T gene polymorphism may be related to increased risk of essential hypertension, and the 677T allele in MTHFR may be a genetic factor of arterial stiffness in hypertensive patients.

原发性高血压 (essential hypertension, EH) 是心、脑、肾等器官损害的主要危险因素。随着对高血压研究的不断深入, 高血压时大动脉结构和功能的改变也日益受到重视。动脉顺应性与遗传因素有关,

遗传因素比血压状态更能决定血管的顺应性^[1], 但迄今为止动脉顺应性与基因多态性的相关研究尚很少报道。血浆同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平的升高被认为是心血管疾病的危险因素, 并且可能参与了高血压的病理生理过程^[2]。亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 是影响 Hcy 代谢的关键酶, 其基因 C677T 多态性与该酶的活性及血浆 Hcy 水平密切相关^[3]。本研究旨在探讨北京市汉族人群 MTHFR 基因 C677T 多态性与原发性高血压及动脉顺应性的相关性。

[收稿日期] 2006-09-21 [修回日期] 2006-11-02

[基金项目] 首都医学发展基金(2002-2007)资助

[作者简介] 邢绣荣, 博士, 主治医师, 主要从事心血管病的基础和临床研究, E-mail 为 xingxr@126.com。通讯作者华琦, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病的基础和临床研究。杨峥, 主管技师, 主要从事心血管病的基础研究。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选择原发性高血压患者 695 例, 均符合 2003 年 WHO/ISH 的高血压诊断标准^[4]。其中男 393 例, 女 302 例, 年龄 48.9 ± 12.6 岁, 病程 6.5 ± 6.1 年, 排除继发性高血压、糖尿病、冠心病、急性心力衰竭及肝肾功能障碍等。正常对照组 509 例, 男 196 例, 女 313 例, 年龄 48.5 ± 13.1 岁。为来自同一地区的健康体检者。所有受试者均为汉族人群, 研究个体之间无血缘关系。

1.2 血压及心率的测量

使用标准水银柱血压计, 患者休息 15 min 后测量右上臂坐位血压, 连测 3 次, 间隔 2 min, 取 3 次血压的均数, 并计算脉压。心电图观察心率变化。

1.3 亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因分型

所有受试者清晨空腹采肘静脉血 5 mL 置于含 2% EDTA- Na_2 的抗凝管中, 3 000 r/min 离心 15 min, 下层血细胞用于 DNA 提取。采用盐析法提取 DNA。以聚合酶链反应—限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术分析 MTHFR 基因型, 方法参照文献^[5]。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 上游引物 5'-CAA AGG CCA CCC CGA AGC-3', 下游引物 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'。PCR 反应体系 25 μL : 10 \times buffer 2.5 μL , 4 \times dNTP 2 μL , 引物各 0.5 μL (5 $\mu\text{mol/L}$), Taq DNA 聚合酶 0.4 μL , DNA 模板 2 μL 。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 34 个循环扩增 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 61.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s), 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 扩增仪为英国 Hybaid Express, Taq 酶购自天根生化科技 (北京) 有限公司。取 PCR 产物 5 μL 加入 5 u 限制性内切酶 Hinf iv (Promega 公司), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下酶切 4 h。酶切产物行 3% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察电泳结果及照相。

1.4 动脉顺应性测定

采用自动脉搏波速度 (pulse wave velocity, PWV) 测定仪 (Complior, France) 测量颈动脉—股动脉 PWV 作为评估中心大动脉顺应性指标, 测量颈动脉—桡动脉 PWV 作为评估肌性动脉顺应性指标。测定前 60 min 受检者无吸烟、饮酒或咖啡。静息 10 min 后, 取仰卧位, 将压力敏感探头分别置于右侧颈动脉、股动脉和桡动脉搏动最明显部位, 微调探头使波形显示清晰, 测量颈动脉—股动脉和颈动脉—桡动脉的体表距离 (D), 输入计算机, 仪器自动测量两点间的脉搏波传导时间 (T), $\text{PWV} = \text{D}/\text{T}$, 连续记录 16 个压

力波形, 去掉 3 个最大值和 3 个最小值, 取剩余 10 个数值的均值作为 PWV 的最后测定值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件。所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以频数表示, 两样本均数的比较采用 *t* 检验。Hardy-Weinberg 遗传平衡、基因频率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般情况比较

高血压组与正常对照组的年龄、心率无显著性差异。高血压组的收缩压、舒张压、脉压及男女性别比显著高于正常对照组 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 正常对照组与高血压组一般情况比较

指 标	正常对照组 ($n = 509$)	高血压组 ($n = 695$)
年龄 (岁)	48.5 ± 13.1	48.9 ± 12.6
男/女 (例)	196/313	393/302 ^a
收缩压 (mmHg)	114.7 ± 11.0	149.1 ± 15.5^a
舒张压 (mmHg)	74.4 ± 7.6	96.9 ± 10.1^a
脉压 (mmHg)	40.4 ± 8.8	52.2 ± 16.1^a
心率 (次/分)	71.0 ± 10.4	70.1 ± 11.6

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

2.2 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性

MTHFR 基因 677 位点酶切后分为 3 种基因型: 纯合子 CC 仅有 245 bp 片段; 纯合突变子 TT 产生 173 bp 和 72 bp 两种片段; 杂合子 CT 产生 245 bp、173 bp 和 72 bp 三种片段, 由于 72 bp 碱基数相对较少, 该条带显示较暗 (图 1)。

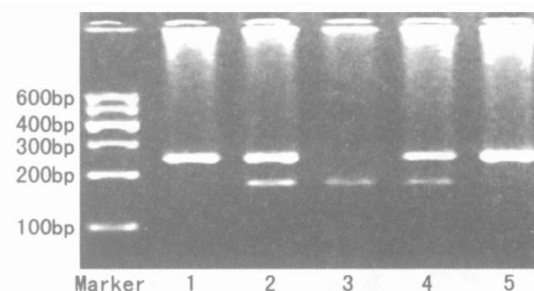


图 1. 亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因分型电泳图 1 为 PCR 产物, 2 和 4 为 CT 基因型, 3 为 TT 基因型, 5 为 CC 基因型。

2.3 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与高血压的关系

正常对照组和高血压组 MTHFR 基因 C677T 多态性 CC、CT 与 TT 基因型分布均符合 Hardy-Wein

berg 平衡, 具有群体代表性。高血压组 TT 基因型频率和 T 等位基因频率显著高于正常对照组 ($P = 0.015$ 和 0.002 ; 表 2)。两组性别构成比虽有显著差异, 但按性别分组后, 不同性别的基因型及等位基因频率均无显著差异 ($P = 0.949$ 和 0.922)。校正性别得出的 T 等位基因标准化率比较的 $P = 0.000$, $OR = 1.300$, $95\% CI$ 为 $1.166 \sim 1.450$, 提示携带 T 等位基因患高血压的风险增加。

2.4 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与单纯收缩期高血压及诊室血压的关系

将原发性高血压组分为单纯收缩期高血压 (isolated systolic hypertension, ISH) 组和非单纯收缩期高

血压组 (no isolated systolic hypertension, NISH), ISH 组和 NISH 组 TT 基因型和 T 等位基因频率均显著高于对照组 (表 2)。T 等位基因对 ISH、NISH 的 OR 值分别为 1.622 ($95\% CI$ 为 $1.213 \sim 2.170$) 和 1.254 ($95\% CI$ 为 $1.058 \sim 1.485$)。ISH 组与 NISH 组间多态性分布差异无统计学意义。

T 等位基因携带者的收缩压和舒张压均显著高于 CC 基因型者 ($P < 0.05$)。具有 TT 基因型的高血压患者在 ISH 组中收缩压和脉压高于 CC 基因型者 ($P < 0.05$), 而在 NISH 组中舒张压显著高于 CC 基因型者 ($P < 0.05$; 表 3)。

表 2. 高血压组与正常对照组亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 基因型与等位基因频率比较 (例)

分 组	n	基因型			等位基因	
		CC	TT	CT	C	T
正常对照组	509	182 (35.8%)	105 (20.6%)	222 (43.6%)	586 (57.6%)	432 (42.4%)
高血压组	695	202 (29.1%)	184 (26.5%) ^a	309 (44.4%)	713 (51.3%)	677 (48.7%) ^b
ISH 组	112	28 (25.0%)	36 (32.1%) ^b	48 (42.9%)	104 (46.4%)	120 (53.6%) ^b
NISH 组	583	174 (29.8%)	148 (25.4%) ^a	261 (44.8%)	609 (52.2%)	557 (47.8%) ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

表 3. 亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 不同基因型的诊室血压和脉压 (mmHg)

分 组	基因型	收缩压	舒张压	脉压
正常对照组 (n = 509)	CC	113.8 ± 10.4	73.4 ± 6.8	40.2 ± 8.4
	TT	117.9 ± 9.0 ^b	77.0 ± 6.5 ^b	40.9 ± 8.3
	CT	116.5 ± 10.1 ^a	75.4 ± 7.2 ^a	40.8 ± 8.7
ISH 组 (n = 112)	CC	150.6 ± 12.3	82.4 ± 7.2	68.0 ± 14.5
	TT	159.2 ± 14.7 ^a	83.4 ± 7.4	76.6 ± 15.7 ^a
	CT	156.7 ± 9.5	84.2 ± 6.4	72.5 ± 9.0
NISH 组 (n = 583)	CC	146.2 ± 14.7	98.5 ± 9.0	47.6 ± 10.5
	TT	149.2 ± 16.0	101.1 ± 7.8 ^a	48.1 ± 10.7
	CT	147.8 ± 14.9	99.6 ± 7.6	48.2 ± 9.7

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 CC 基因型相比。

2.5 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性对动脉顺应性的影响

高血压组颈—桡动脉和颈—股动脉 PWV 均显著高于正常对照组, 且 T 等位基因携带者颈—桡动脉和颈—股动脉 PWV 显著高于 CC 基因型者; 正常对照组 T 等位基因携带者颈—股动脉 PWV 也显著高于 CC 基因型者 (表 4)。ISH 组 T 等位基因携带者颈—股动脉 PWV 与 CC 基因型者相比显著增高, 而

NISH 组颈—桡动脉和颈—股动脉 PWV 均显著增高 (表 5)。

表 4. 两组不同基因型脉搏波速度比较 (m/s)

分 组		CC	TT+ CT
正常对照组 (n = 509)	颈—桡动脉	9.66 ± 1.48	9.88 ± 1.43
	颈—股动脉	9.04 ± 1.47	9.65 ± 1.42 ^a
高血压组 (n = 695)	颈—桡动脉	10.21 ± 1.64	10.88 ± 1.69 ^b
	颈—股动脉	10.15 ± 1.69	10.67 ± 2.03 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 CC 基因型相比。

表 5. ISH 组和 NISH 组不同基因型脉搏波速度比较 (m/s)

分 组		CC	TT+ CT
ISH 组 (n = 112)	颈—桡动脉	9.79 ± 1.15	10.10 ± 1.42
	颈—股动脉	10.44 ± 1.55	11.73 ± 2.15 ^a
NISH 组 (n = 583)	颈—桡动脉	10.21 ± 1.76	11.02 ± 1.68 ^b
	颈—股动脉	10.02 ± 1.84	10.54 ± 1.94 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 CC 基因型相比。

3 讨论

大动脉顺应性减退是高血压大动脉病变的主要特征。高血压发生之前, 血管顺应性已经降低, 动脉

壁结构和功能的改变可能是原发性高血压的早期征象。目前 PWV 已被广泛用于评价动脉弹性, 速度增高表示动脉弹性降低^[6]。动脉弹性功能明显减退使收缩压升高, 舒张压维持正常或轻度升高, 因此动脉顺应性降低对单纯收缩期高血压影响更明显。原发性高血压是遗传与环境因素共同作用的结果, 动脉顺应性也与遗传因素有关, 在血压正常的高血压后代中发现有血管顺应性降低的现象^[1]。

血浆 Hcy 水平升高可以损伤血管内皮细胞, 破坏血管舒缩因子的平衡, 参与高血压的发生、发展^[7]。血浆 Hcy 水平升高刺激血管平滑肌细胞增殖, 引起胶原纤维合成增加, 弹力纤维溶解、断裂, 从而降低动脉壁的顺应性。大量的流行病学研究证明血浆 Hcy 水平增高与动脉硬化独立相关^[8], 因此以大动脉弹性减退为主要病理改变的 ISH 患者血浆 Hcy 水平有明显增高^[9]。MTHFR 是 Hcy 再甲基化代谢途径的关键酶, 对维持体内正常的 Hcy 水平起重要作用^[10]。已发现 MTHFR 基因有 10 种变异型, 其中最常见的是 677 位胞嘧啶 (C) 被胸腺嘧啶 (T) 置换, 该突变位于第 4 外显子催化区域, 直接导致 MTHFR 活性和耐热性降低, 从而使 Hcy 转化为蛋氨酸的能力下降, 血中 Hcy 浓度升高^[3]。

以往关于此基因多态性与原发性高血压的关系报道不一。Nishio 等^[11]对 129 例日本中年男性研究得出, 尽管 MTHFR677 基因 TT 纯合突变者的平均舒张压明显增高, 但高血压组与正常对照组的 T 等位基因和基因型频率均无差异。然而对澳大利亚高加索人群进行的研究得出, MTHFR 677T 等位基因可显著增加高血压的危险性^[12]。国内学者对北方汉族高血压患者的对照研究显示, 高血压患者与正常对照相比, MTHFR 677 基因型和等位基因频率无显著差异, 但 MTHFR 677 纯合突变可能与 ISH 的发病密切相关^[13]。在本研究中高血压组 TT 基因型和 T 等位基因频率显著高于正常对照组。校正性别因素后, 仍表明 MTHFR 677T 等位基因可能是北京城区汉族人群发生高血压的危险因素。虽然 T 等位基因对 ISH 的 OR 值高于对 NISH 的 OR 值, 但 ISH 组与 NISH 组间基因频率无显著差异, 故未能得出该多态性与 ISH 的关联更密切。

MTHFR 677 基因多态性可能通过升高血浆 Hcy 水平而对动脉顺应性产生影响。本研究中, 高血压组颈—桡动脉 PWV 和颈—股动脉 PWV 均显著高于正常对照组, 两组中的颈—股动脉 PWV 在 T 等位基因携带者均显著高于 CC 基因型者, 而只有高血压

组的颈—桡动脉 PWV 在 T 等位基因携带者显著高于 CC 基因型者。说明无论是在高血压患者还是血压正常者, MTHFR 677 基因突变均伴有中心大动脉顺应性的降低, 而只有在高血压人群该突变与肌性大动脉的顺应性降低相关, MTHFR 677T 可能是高血压前期大动脉顺应性降低的危险因素。单纯收缩期高血压大部分是由于大动脉顺应性下降而产生。本研究显示, ISH 组中 T 等位基因携带者的颈—股动脉 PWV 显著高于 CC 基因型者, 而携带 T 等位基因的 NISH 患者颈—桡动脉 PWV 和颈—股动脉 PWV 均显著高于 CC 基因型者, 提示 ISH 与动脉硬化的关系更密切, MTHFR 677T 可能是高血压病发生动脉硬化的一个易感因素。

[参考文献]

- [1] Brinton TJ, Kailasam MT, Wu RA, Cervenka JH, Chio SS, Parmer RJ, et al. Arterial compliance by cuff sphygmomanometer. Application to hypertension and early changes in subjects at genetic risk[J]. *Hypertension*, 1996, **28** (4): 599-603
- [2] Boers GH. Mild hyperhomocysteinemia is an independent risk factor of arterial vascular disease[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2000, **26** (3): 291-295
- [3] Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5, 10- methylenetetrahydrofolate reductase[J]. *J Nephrol*, 2000, **13** (1): 20-33
- [4] Whitworth JA. World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension[J]. *J Hypertens*, 2003, **21** (11): 1983-992
- [5] 潘琦, 郭立新, 初明峰, 满永, 孙明晓, 李铭, 等. 糖尿病患者同型半胱氨酸及其代谢相关酶基因多态性与颈动脉内膜—中膜厚度的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (2): 195-198
- [6] Asmar R, Topouchian J, Pannier B, Benetos A, Safar M. Scientific, Quality Control, Coordination and Investigation Committees of the Complier Study. Pulse wave velocity as endpoint in large-scale intervention trial[J]. *J Hypertens*, 2001, **19** (4): 813-818
- [7] Virdis A, Ghiadoni L, Cardinali H, Favilla S, Duranti P, Birindelli R, et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocysteinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension[J]. *J Am Coll Cardio*, 2001, **38** (4): 1106-1115
- [8] Selhub J, D' Angelo A. Relationship between homocysteine and thrombotic disease[J]. *Am J Med Sci*, 1998, **316** (2): 129-141
- [9] Suttorn-Tyrell K, Boston A, Selhub J, Zeigler-Johnson C. High homocysteine levels are independently related to isolated systolic hypertension in older adults[J]. *Circulation*, 1997, **96** (6): 1745-749
- [10] Meleady R, Ueland PM, Blom H, Whitehead AS, Refsum H, Daly LE, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European Concerted Action Project[J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, **77** (1): 63-70
- [11] Nishio H, Lee MJ, Fujii M, Kario K, Kayaba K, Shimada K, et al. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population[J]. *Jpn J Hum Genet*, 1996, **41** (2): 247-251
- [12] Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study[J]. *Hypertension*, 2002, **39** (1): 10-15
- [13] 孙晓楠, 李玉明, 郭虹. 单纯收缩期高血压患者同型半胱氨酸代谢关键酶基因多态性相关因子研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2003, **31** (4): 269-273

(此文编辑 文玉珊)