

[文章编号] 1007-3949(2010)18-09-0733-04

· 临床研究 ·

动脉粥样硬化性脑梗死患者血浆同型半胱氨酸水平及亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性

陈梅玲, 林小慧, 李清华, 刘开祥, 曾爱源

(桂林医学院附属医院神经内科, 广西省桂林市 541001)

[关键词] 同型半胱氨酸; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性; 脑梗死; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨血浆同型半胱氨酸水平、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死之间的关系。方法 选择性别、年龄匹配的动脉粥样硬化性脑梗死患者(脑梗死组)68例及对照组50例,采用荧光偏振免疫法测定血浆同型半胱氨酸水平,聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术检测亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性。结果 脑梗死组TT基因型(36.8%比16.0%)及T等位基因频率(59.6%比38.0%)均显著高于对照组($P < 0.05$)。脑梗死组血浆同型半胱氨酸水平显著高于对照组($P < 0.05$)。脑梗死组和对照组亚甲基四氢叶酸还原酶C677T纯合子血浆同型半胱氨酸水平均显著高于CT型和CC型者($P < 0.05$)。结论 血浆同型半胱氨酸水平升高是动脉粥样硬化性脑梗死的危险因素。亚甲基四氢叶酸还原酶C677T基因多态性与血浆同型半胱氨酸水平密切相关,与动脉粥样硬化性脑梗死显著相关。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Homocysteine Levels and Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms in Atherosclerotic Cerebral Infarction

CHEN MeiLing, LIN XiaoHui, LI QingHua, LU KaiXiang and ZENG AiYuan

(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Methylene-tetrahydrofolate Reductase; Gene Polymorphism; Cerebral Infarction; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between plasma homocysteine (Hcy), polymorphisms of the methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and atherosclerotic cerebral infarction. **Methods** Plasma Hcy polymorphisms of the MTHFR gene in 68 patients with atherosclerotic cerebral infarction (CI) and 50 controls were measured by fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) respectively. **Results** The frequencies of TT genotype and T allele were significantly higher in CI group than in controls ($P < 0.05$). Plasma Hcy levels was significantly higher in CI group than in controls ($P < 0.05$). The homocysteine concentration was significantly higher in TT genotype than CT and CC genotypes both in CI group and in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Elevated Hcy levels is a risk factor for atherosclerotic cerebral infarction. MTHFR C677T polymorphism was significantly related to plasma Hcy levels and atherosclerotic cerebral infarction.

动脉粥样硬化性脑梗死是缺血性中风的一个重要类型,60岁以后该类型发病率显著增高。血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平升高可促进动脉粥样硬化和血栓形成,是缺血性中风的独立危险因素。N5,N10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylene-tetrahydrofolate reductase, MTHFR)是Hcy代谢关键酶之一,其基因多态性可显著影响血浆Hcy水

平。本文旨在探讨血浆Hcy水平及MTHFR基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

68例脑梗死患者符合全国第四届脑血管病会议动脉粥样硬化性血栓性脑梗死诊断标准。排除有心源性栓子来源、冠心病、周围血管病、肝肾功能异常、严重感染及恶性肿瘤,并否认近2周内有叶酸、B族维生素及影响维生素代谢的药物服用史。所有患者均经头颅CT和/或MRI证实存在脑梗死,经经颅多谱勒超声(TCD)、颈动脉彩超和头颅核磁共振成像(MRA)证实存在大血管病变。50名健康体检

[收稿日期] 2010-06-26 [修回日期] 2010-09-02

[基金项目] 广西省卫生厅基金(Z2010309)

[作者简介] 陈梅玲, 硕士, 主治医师, 研究方向为神经变性疾病及脑血管病研究, E-mail为 cmm ling@ sina. com. 林小慧, 硕士, 主治医师, 主要研究方向为脑血管病的防治研究, E-mail为 lxhhlw@ yahoo. com. cn. 李清华, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为神经遗传性疾病及脑血管病发病机制, E-mail为 qhlil999@ yahoo. com. cn.

人员列为对照,与脑梗死组性别、年龄匹配,无血管病病史,并行TCD及颈动脉彩超检查提示不存在动脉粥样硬化及狭窄。所有受试者均测定血压、血脂、血糖。

1.2 标本收集

清晨空腹抽取肘静脉血 5 mL, 2% 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,充分摇匀,1 h内离心,1 000 r/min离心 10 min,吸取上层血浆置于-45℃冰箱冻存待测Hcy水平;中层白细胞置于-70℃冰箱冻存待行基因组DNA提取。

1.3 血浆同型半胱氨酸水平测定

采用美国雅培公司MX型全自动快速分析仪及其配套Hcy试剂盒,用荧光偏振免疫法(FPIA)测定血浆Hcy水平。分别取2.5、7.5、12.5、25和50 μmol/L 5个标准液和空白液(磷酸缓冲液)在MX型自动分析仪上进行标准曲线的制备和测定准确度的校正,校正通过后,取150 μL质控标准品及EDTA抗凝血浆加到相应的样品杯中,仪器将自动进行试剂添加、监测、扫描和定量分析并于50 min后出结果。

1.4 聚合酶链反应-限制性片长多态性技术检测亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性

用酚/氯仿提取基因组DNA,TE溶液溶解后置于-20℃冰箱保存。采用PCR扩增出MTHFR基因中包含677位点长为198 bp的片段。引物^[1]由上海生工生物医学有限公司(Sangon)合成。上游引物5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3',下游引物5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'。反应体系25 μL,其中含模板DNA 100 ng TaqDNA聚合酶(Takala公司)1 u,引物10 pmol,四种dNTP各200 μmol/L。扩增条件为94℃预变性2 min,94℃变性30 s,61℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环,72℃延伸5 min。在PCR扩增仪(Perkin-Elmer公司,2400型)上进行扩增,用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测PCR扩增产物。将扩增产物用限制性内切酶HinfI(Takala公司)消化。反应体系20 μL,含扩增产物10 μL,缓冲液2 μL,HinfI 8 u,去离子水7 μL。37℃消化过夜。产物经15%聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,溴化乙锭染色后紫外灯下观察酶切结果。

1.5 统计学处理

采用SPSS19.0软件完成。正态或近似正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间均数差异比较用t检验;Hcy水平呈正偏态分布(经对数转换后呈正态分布),用几何均数及四分位数间距描述,两组间比

较用非参数Mann-Whitney U检验。计数资料用 χ^2 检验。多因素分析采用非条件性Logistic回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 基线资料

两组平均年龄、性别构成、吸烟等方面差异均无显著性,脑梗死组高血压、糖尿病及高脂血症比例均显著高于对照组($P < 0.05$,表1)。

表1 两组基线资料比较

基线资料	对照组	脑梗死组
男女(例)	33/17	47/21
年龄(岁)	58.70 ± 7.58	60.07 ± 10.02
吸烟(例)	14(28.0%)	24(35.3%)
高血压(例)	19(38.0%)	47(69.1%) ^a
糖尿病(例)	7(14.0%)	21(30.9%) ^a
高脂血症(例)	19(38.0%)	39(57.4%) ^a

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.2 亚甲基四氢叶酸还原酶基因扩增结果及基因型分析

C677T位点目的基因片段长198 bp,根据酶切后片段长度的不同分为三种基因型:TT纯合子,包含175 bp和23 bp两个片段;CT杂合子,包含198 bp、175 bp和23 bp三个片段;CC野生型,只含198 bp一个片段(图1)。

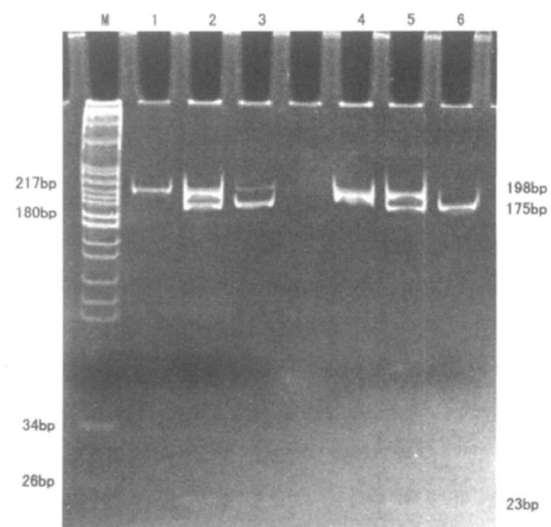


图1 亚甲基四氢叶酸还原酶C677T突变限制性酶切结果

Maker为Pbr322/mSPiv,1、4为CC野生型,2、3、5为CT杂合子,6为TT纯合子。

2.3 亚甲基四氢叶酸还原酶基因型频率分布

脑梗死组 TT 基因型及 T 等位基因频率均显著高于对照组 (36.8% 比 16.0%, $\chi^2 = 9.767$, $P < 0.05$)。

0.05, 59.6% 比 38.0%, $\chi^2 = 10.714$, $P < 0.05$ (表 2)。

表 2 亚甲基四氢叶酸还原酶基因型频率分布 (例)

分 组	基因型 (例)			等位基因频率	
	TT	CT	CC	C	T
对照组	8 (16.0%)	22 (44.0%)	20 (40.0%)	62 (62.0%)	38 (38.0%)
脑梗死组	25 (36.8%) ^a	31 (45.6%)	12 (17.6%)	55 (40.4%)	81 (59.6%) ^a

a为 $P < 0.05$ 对照组比较。

2.4 血浆同型半胱氨酸水平

脑梗死组血浆 Hcy 水平显著高于对照组 (17.91 $\mu\text{mol/L}$ 比 12.66 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$)。脑梗死组和对照组 TT 纯合子 Hcy 水平均显著高于 CT 型者和 CC 型者 ($P < 0.05$); 各组内 CT 型者与 CC 型者 Hcy 水平比较差异均无显著性 ($P > 0.05$, 表 3)。

表 3 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性对血浆同型半胱氨酸水平的影响 ($\mu\text{mol/L}$)

基因型	对照组	脑梗死组
TT	18.14 (7.66) ^a	27.36 (33.84) ^a
CT	12.54 (2.99)	14.17 (5.58)
CC	11.07 (2.61)	13.57 (7.03)

a为 $P < 0.05$ 与本组 CT 及 CC 型比较。

2.5 多因素分析

为了排除混杂因素的影响,以有无脑梗死为因变量,年龄、性别、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症、Hcy 水平及 MTHFR C677T 基因型为自变量进行 Logistic 回归分析,结果表明经校正后, Hcy 水平升高及 MTHFR 677TT 突变基因型仍与脑梗死显著相关 [OR 值分别为 2.76 (95% CI 1.02~7.43, $P < 0.05$) 和 3.70 (95% CI 1.01~13.48, $P < 0.05$)]。

3 讨论

1969年, McCully^[2]对 2例同型半胱氨酸尿症患者尸检发现其体循环存在广泛的动脉粥样硬化及血栓形成,而血浆 Hcy 水平显著升高是其唯一的代谢障碍,从而首次提出了高同型半胱氨酸血症致动脉粥样硬化的理论。大多数研究认为 Hcy 通过损伤内皮细胞、促进平滑肌细胞增殖、影响凝血系统及对低密度脂蛋白的氧化修饰作用导致动脉粥样硬化形成。另外, Hcy 诱导胰岛素因子 1 水平下降和细胞内胆固醇合成增加,可能是动脉粥样硬化发生发展

的另一重要途径^[3]。Boushey 等^[4]通过 Meta 分析证明,血浆 Hcy 浓度升高是脑卒中的独立危险因素,且血浆 Hcy 浓度与发生脑卒中的危险度呈量效关系。另外,近几年的大量研究也进一步奠定了高 Hcy 血症作为动脉粥样硬化及其血管并发症独立危险因素的重要地位^[5,6]。本研究脑梗死组血浆 Hcy 水平显著高于对照组, Logistic 回归分析表明,校正传统危险因素如吸烟、高血压、高血脂及糖尿病之后, Hcy 水平升高与脑梗死密切相关。研究表明,血浆 Hcy 水平可作为急性脑梗死的诊断和疗效观察的辅助指标^[7]。

亚甲基四氢叶酸还原酶是 Hcy 代谢关键酶之一,其基因突变可引起血浆 Hcy 水平轻中度升高。常见的基因突变类型是 C677T 突变,它是指 MTHFR 基因 677 位上的碱基 C 由碱基 T 取代,使编码的氨基酸由缬氨酸变成丙氨酸,对酶的活性及耐热性造成双重的影响。本研究发现,脑梗死组和对照组 TT 纯合子 Hcy 水平均显著高于 CT 型和 CC 型者 ($P < 0.05$); 而 CT 型者 Hcy 水平与 CC 型者相近,说明 TT 纯合子突变可引起血浆 Hcy 水平增高。MTHFR C677T 突变与缺血性脑血管病密切相关。研究表明, MTHFR 677T 等位基因在动脉内弹力层断裂中起到一定作用,后者可使平滑肌细胞迁移到内膜中,促进动脉粥样硬化形成^[8]。677TT 纯合子的颈动脉内膜中膜厚度、斑块发生率均高于 CT 和 CC 型,是动脉粥样硬化发生发展的独立危险因素^[9]。Li 等^[10]对中国人进行的一项大规模多中心研究表明,校正年龄、性别、血压、血糖、甘油三酯、胆固醇、体质指数及吸烟后, MTHFR 677TT 突变基因型可使男性脑血栓形成危险性显著增加 1.45 倍。本研究发现,脑梗死组 TT 基因型及 T 等位基因频率均显著高于对照组, Logistic 回归分析表明,经校正后 TT 突变基因型与动脉粥样硬化性脑梗死显著相关,结果与上述研究基本一致。如前所述, TT 纯合子突变引起血

浆 Hcy 水平增高,提示该基因突变通过影响 Hcy 水平增加脑梗死发病风险。

总之,高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化性脑梗死的一项独立危险因素,MTHFR 677TT 基因型可引起血浆 Hcy 水平显著升高,MTHFR 基因突变可能是动脉粥样硬化性脑梗死的遗传易感因素。Hcy 是一种含硫基的氨基酸,是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中的一个重要中间产物,其代谢需要叶酸、维生素 B6、维生素 B12 作为辅酶参与,它们在体内缺乏时 Hcy 代谢则发生障碍,从而引起高同型半胱氨酸血症,通过补充叶酸^[11]和 B 族维生素,降低血浆 Hcy 水平有可能对抗基因突变带来的不利影响,达到防治动脉粥样硬化及其血管并发症发生和发展的目的。

[参考文献]

- [1] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [J]. *Nat Genet* 1995 **10**: 111-113
- [2] McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis [J]. *Am J Pathol* 1969 **56**: 111-128
- [3] 韦丽华, 邸云峰, 焦玉蓉, 等. 同型半胱氨酸通过下调胰岛素诱导因子 1mRNA 表达增加巨噬细胞胆固醇合成 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010 **18** (1): 52-56
- [4] Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes [J]. *JAMA*, 1995 **274** (13): 1049-057
- [5] 邵燕, 章成国, 胡学强. 血浆同型半胱氨酸及其酶基因多态性与老年脑梗死的关系 [J]. *临床神经病学杂志*, 2006 **19** (1): 22-24
- [6] Huang HW, Guo MH, Lin RJ, et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor of middle cerebral artery stenosis [J]. *J Neurol* 2007 **254** (3): 364-367
- [7] 金梅, 丁蔚. 急性脑梗死患者血浆同型半胱氨酸测定的意义 [J]. *海南医学*, 2010 **21** (11): 91-92
- [8] Friso S, Girelli D, Trabetti E, et al. A1298C methylenetetrahydrofolate reductase mutation and coronary artery disease: relationships with C677T polymorphism and homocysteine/folate metabolism [J]. *Clin Exp Med*, 2002 **2** (1): 7-12
- [9] Hanelahti P, Jarvinen O, Sisto T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T mutation is related to the defects in the intimal elastic lamina of the artery wall [J]. *Eur J Clin Invest* 2002 **32** (17): 869-873
- [10] Li Z, Sun L, Zhang H, et al. Elevated plasma homocysteine was associated with hemorrhagic and ischemic stroke but methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism was a risk factor for thrombotic stroke: a multicenter case-control study in China [J]. *Stroke* 2003 **34** (9): 2085-090
- [11] 景冬樱, 吴越芳, 王树人. 叶酸对同型半胱氨酸损伤内皮细胞的保护作用及可能机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003 **11** (6): 529-532

(此文编辑 许雪梅)