

# 脑梗死患者颈动脉斑块与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的关系

林小慧, 陈梅玲, 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(MTHFR)基因多态性与脑梗死患者颈动脉斑块之间的关系。方法 选择颈动脉系统急性脑梗死患者 128 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 MTHFR 基因多态性。应用彩色超声心动仪进行颈动脉超声检查,根据超声结果将患者分为颈动脉粥样硬化斑块组(简称斑块组)和无斑块组,比较两组血浆同型半胱氨酸水平及 MTHFR 基因多态性。结果 斑块组 TT 基因型(35.8%比 17.0%)及 T 等位基因频率(58.6%比 40.4%)均显著高于无斑块组( $P < 0.05$ )。斑块组血浆同型半胱氨酸水平显著高于无斑块组( $22.42 \pm 11.04 \mu\text{mol/L}$ 比  $17.89 \pm 5.96 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ )。各组内 MTHFR 677TT 纯合子同型半胱氨酸水平均显著高于 CT 型和 CC 型者( $P < 0.05$ )。Logistic 回归分析表明,校正性别、年龄、高血压、糖尿病、高脂血症、吸烟、饮酒等危险因素后,血浆同型半胱氨酸水平仍为颈动脉粥样硬化斑块的独立危险因素[OR 1.160 (95% CI 1.034 ~ 1.301),  $P < 0.05$ ]。结论 血浆同型半胱氨酸水平升高是脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块的独立危险因素。MTHFR C677T 基因多态性与血浆同型半胱氨酸水平密切相关。

[中图分类号] R741 [文献标识码] A

## Relationship of Carotid Artery Plaques with Plasma Homocysteine and Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism in the Cerebral Infarction Patients

LIN Xiao-Hui, CHEN Mei-Ling, LI Qing-Hua, LIU Kai-Xiang, and ZENG Ai-Yuan  
(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Methylenetetrahydrofolate Reductase; Gene Polymorphism; Cerebral Infarction; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between plasma homocysteine (Hcy), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and carotid artery plaques in the cerebral infarction patients. **Methods** 128 carotid system cerebral infarction patients were selected. Plasma Hcy was measured by fluorescence polarization immunoassay (FPIA). Polymorphisms of the MTHFR gene were measured by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Carotid arteries were detected by carotid ultrasonography in all patients. According to ultrasonography results, the patients were divided into plaque group having carotid atherosclerotic plaque and non-plaque group. The plasma Hcy levels and MTHFR gene polymorphism were compared between two groups. **Results** The frequencies of TT genotype (35.8% vs 17.0%) and T allele (58.6% vs 40.4%) were significantly higher in plaque group than in non-plaque group ( $P < 0.05$ ). Plasma Hcy levels was significantly higher in plaque group than in non-plaque group ( $22.42 \pm 11.04 \mu\text{mol/L}$  vs  $17.89 \pm 5.96 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ ). The Hcy concentration was significantly higher in TT genotype than CT and CC genotypes ( $P < 0.05$ ). Logistic regression analysis adjusted for gender, age, hypertension, diabetes, hyperlipidemia, smoking, drinking and other risk factors, plasma Hcy levels of carotid atherosclerosis

[收稿日期] 2011-02-13

[基金项目] 广西卫生厅基金资助项目 (Z2010309)

[作者简介] 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 llxxhww@yahoo.com.cn. 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 cmmling@sina.com. 李清华, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病及遗传性疾病, E-mail 为 qhli1999@yahoo.com.cn.

remained an independent risk factor for plaque (OR 1.160 (95% CI 1.034 ~ 1.301),  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Elevated Hcy levels was an independent risk factor for carotid artery plaques in cerebral infarction patients. MTHFR C677T polymorphism was significantly related to plasma Hcy levels.

颈动脉粥样硬化是脑梗死重要的危险因素,动脉粥样硬化的形成是一个多因素参与的复杂过程。遗传及环境、饮食等因素均会通过影响机体代谢在粥样硬化发生发展中起到不同程度的作用。本研究对脑梗死患者颈动脉进行彩色多普勒超声检查,以了解颈动脉粥样硬化斑块的特点,并分析血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平及亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)基因 C677T 多态性与颈动脉粥样硬化斑块之间的关系,以期对脑梗死的防治提供有益的启示。

1 对象与方法

1.1 研究对象

入选对象为颈动脉系统急性脑梗死患者共 128 例,其中男 89 例,女 39 例,平均年龄  $61.87 \pm 9.88$  岁。诊断参照 1995 年第四届全国脑血管病学术会议制定的诊断标准,并经头颅 CT 和/或 MRI 检查证实。排除心源性脑栓塞,腔隙性脑梗塞,有明显的心、肝、肾功能衰竭、肿瘤、严重感染或自身免疫性疾病,近 6 个月有心肌梗死、周围血管闭塞性疾病,近 2 周内服用叶酸、维生素 B12、B6 及影响维生素代谢的药物如甲氨喋呤、烟酸、苯妥英钠等。

1.2 分组方法

根据超声结果将患者分为①有颈动脉粥样硬化斑块组(简称斑块组),81 例,平均年龄  $62.41 \pm 9.33$  岁;②无斑块组,47 例,平均年龄  $60.92 \pm 10.78$  岁。

1.3 危险因素的确定

高血压、糖尿病分别遵照《中国高血压防治指南》及《中国糖尿病防治指南》诊断标准;高脂血症遵照 1997 年《血脂异常防治建议》诊断标准;吸烟指每日吸烟 10 支,烟龄 1 年以上;饮酒指饮酒  $> 2$  次/周,且每次饮酒量  $> 100$  mL(相当于 60 g 乙醇)。

1.4 颈动脉斑块的测量

采用 HP 彩色超声显像仪,探头中心频率为 10.0 MHz。分别观察双侧颈总动脉起始部、主干及分叉部血管内膜有无斑块及斑块性质、数目及大小。在颈动脉窦以下 1 cm 处(无斑块部位)测量内膜中膜厚度(IMT)。按照  $IMT > 1.3$  mm 判断为颈动脉斑块形成,根据超声特点将斑块分为①软斑块:斑块

突出管腔内膜面,局部呈不同的低回声、等回声或混合回声;②硬斑块:局部回声增强,后方伴有明显的声衰减;③混合性斑块:由不均质的软、硬斑块混合组成,或由硬斑合并附壁血栓而成,内部回声杂乱,光点不均匀。

1.5 实验室检查

入院次日采清晨空腹血检测血脂、血糖及血浆 Hcy 水平。其中血浆 Hcy 水平用美国雅培公司 IMX 型全自动快速分析仪及其配套 Hcy 试剂盒采用荧光偏振免疫法(FPIA)测定。

1.6 亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性检测

清晨空腹抽取肘静脉血 2 mL,用 EDTA 抗凝,充分摇匀,1 h 内离心,1000 r/min 离心 10 min,取中层白细胞用于基因组 DNA 提取。提取基因组 DNA 后,PCR 扩增出包含 677 位点长为 198 bp 的目的基因片段。引物由上海生工生物医学有限公司(Sangon)合成。上游引物为 5'-TGAAGGAGA AG-GTGTCTGCGGGA-3',下游引物为 5'-AGGACGGT-GCCG TGACAGTG-3'。反应体系 25  $\mu$ L,含模板 DNA 100 ng, TaqDNA 聚合酶(Takala 公司)1 U,引物 10 pmol,四种 dNTP 各 200  $\mu$ mol/L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 30 次,最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。扩增产物用限制性内切酶 Hinf I 37 $^{\circ}$ C 消化。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。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件处理数据。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析及  $t$  检验。计数资料采用  $\chi^2$  检验。以 Logistic 回归方程排除混杂因素影响。 $P < 0.05$  为差异有显著性。

2 结 果

2.1 一般资料

斑块组和无斑块组年龄、性别、吸烟、饮酒及糖尿病等资料差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。斑块组高血压及高血脂比例高于无斑块组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;表 1)。

表 1. 两组一般资料比较

Table 1. Comparison of two groups of general information		
一般资料	无斑块组 (n = 47)	斑块组 (n = 81)
年龄 (岁)	60. 92 ± 10. 78	62. 41 ± 9. 33
男/女 (例)	37/10	52/29
吸烟 (例)	20 (42. 6%)	32 (39. 5%)
饮酒 (例)	17 (36. 2%)	29 (35. 8%)
高血脂 (例)	20 (42. 6%)	50 (61. 7%) <sup>a</sup>
高血压 (例)	23 (48. 9%)	55 (67. 9%) <sup>a</sup>
糖尿病 (例)	12 (25. 5%)	27 (33. 3%)

a 为  $P < 0. 05$ , 与无斑块组比较。

2. 2 颈动脉彩超结果

观察双侧颈总动脉共 256 条血管, 有 81 例患者检出斑块, 斑块数共 132 个, 分布于 117 支血管, 其中有 13 支血管有多发斑块。斑块性质以硬斑多见, 共 81 个, 软斑 30 个, 混合斑 21 个。斑块部位以颈动脉分叉处最为常见, 其次为颈总动脉和颈内动脉。

2. 3 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 位点酶切结果

C677T 位点目的基因片长 198 bp, 根据酶切后

片长的不同分为三种基因型: TT 纯合型, 包含 175 bp 和 23 bp 两个片段; CT 杂合型, 包含 198 bp、175 bp 和 23 bp 三个片段; CC 野生型, 只含 198 bp 一个片断 (图 1)。

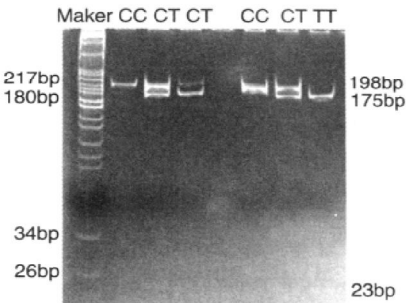


图 1. 亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 突变限制性酶切结果  
Figure 1. Restriction fragment length polymorphism results of MTHFR C677T mutation

2. 4 亚甲基四氢叶酸还原酶基因型分布频率

斑块组 TT 基因型及 T 等位基因频率均显著高于无斑块组 ( $P < 0. 05$ ; 表 2)。

表 2. 两组 MTHFR 基因型分布频率比较 (例)

分 组	n	基因型			等位基因	
		TT	CT	CC	T	C
无斑块组	47	8 (17. 0%)	22 (46. 8%)	17 ( 36. 2%)	38 (40. 4%)	56 (59. 6%)
斑块组	81	29 (35. 8%) <sup>a</sup>	37 ( 45. 7%)	15 (18. 5%)	95 (58. 6%) <sup>a</sup>	67 (41. 4%)

a 为  $P < 0. 05$ , 与无斑块组比较。

2. 5 血浆同型半胱氨酸水平

斑块组血浆 Hcy 水平显著高于无斑块组 ( $22. 42 \pm 11. 04 \mu\text{mol/L}$  比  $17. 89 \pm 5. 96 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0. 05$ )。斑块组和无斑块组 TT 纯合子 Hcy 水平均显著高于 CT 型和 CC 型者 ( $P < 0. 05$ ); 各组内 CT 型与 CC 型 Hcy 水平比较差异均无统计学意义 ( $P > 0. 05$ ; 表 3)。

表 3. MTHFR 基因多态性与血浆 Hcy 水平的关系 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{mol/L}$ )

Table 3. Relationship Between MTHFR gene polymorphism and plasma Hcy levels		
基因型	无斑块组	斑块组
TT	26. 96 ± 6. 72 <sup>a</sup>	33. 22 ± 11. 99 <sup>a</sup>
CT	15. 99 ± 3. 16	18. 11 ± 8. 78
CC	15. 48 ± 3. 17	15. 50 ± 5. 87

a 为  $P < 0. 05$ , 与 CT 及 CC 型比较。

2. 6 Logistic 回归分析

Logistic 回归分析发现, 校正性别、年龄、高血压、糖尿病、高脂血症、吸烟、饮酒等危险因素后, 血浆 Hcy 水平仍为颈动脉粥样硬化斑块的独立危险因素 (表 4)。

表 4. 颈动脉粥样硬化斑块危险因素的 Logistic 回归分析  
Table 4. Logistic regression model of the risk factors in carotid atherosclerosis

变量	B	SE	Wald	P	OR	95% CI
Hcy	0. 148	0. 059	6. 374	0. 012	1. 160	1. 034 ~ 1. 301
高血压	0. 697	0. 328	4. 524	0. 033	2. 008	1. 056 ~ 3. 816
高血脂	0. 670	0. 323	4. 314	0. 038	1. 954	1. 038 ~ 3. 677

3 讨 论

大量研究表明高 Hcy 血症是动脉粥样硬化及

其血管并发症的独立危险因素<sup>[1]</sup>, Hcy 水平升高患者其颈动脉更易于形成斑块, 并容易发生脑梗死<sup>[2]</sup>, 并且血浆 Hcy 水平与脑梗死的严重程度呈负相关<sup>[3]</sup>。本研究表明, 有颈动脉粥样硬化斑块组血浆 Hcy 水平显著高于无斑块组, 校正混杂因素后, Hcy 水平仍然是颈动脉粥样硬化的独立危险因子。Hcy 致动脉粥样硬化的机制包括损伤血管内皮细胞、诱导血管平滑肌细胞增殖、激活血小板、增加血小板黏附聚集性及促进血栓形成。

影响血浆 Hcy 水平的因素包括环境因素及遗传因素。前者如饮食中的叶酸及 B 族维生素。后者指 Hcy 代谢相关酶基因多态性引起相应酶活性及功能改变。MTHFR 是 Hcy 代谢关键酶之一, 该酶 C677T 突变可使其活性下降 60% ~ 70%, 从而引起血浆 Hcy 水平升高, 特别是健康、不吸烟的年轻人血浆 Hcy 水平升高最重要的原因<sup>[4]</sup>。本研究同样显示 677TT 纯合子血浆 Hcy 水平显著高于 CC 型及 CT 型, 提示该突变对血浆 Hcy 水平具有一定影响。

由于 MTHFR C677T 突变可引起血浆 Hcy 水平升高, 推测该突变可能参与了动脉粥样硬化及其血管并发症的形成。但目前的研究结论并不一致。一方面, 研究发现 TT 纯合子的颈动脉 IMT、斑块发生率均高于 CT 型和 CC 型<sup>[5]</sup>; T 等位基因可使糖尿病患者颈动脉 IMT 增加<sup>[6,7]</sup>。潘琦等<sup>[8]</sup>研究表明, 不管对照组还是糖尿病组, MTHFR C677T 突变基因型的血浆 Hcy 水平均高于野生型, 并且具有该突变的糖尿病患者颈动脉 IMT 明显高于无突变者。另一些研究则与之相反, 发现 MTHFR C677T 突变与动脉粥样硬化及颈动脉 IMT 无相关关系<sup>[2,9]</sup>。上述研究结果的不一致, 可能与各个研究样本量不一、研究方法不同及研究对象差异有关。本研究则发现, 有颈动脉斑块组的 677TT 基因型频率及 T 等位基因频率均高于无斑块组, 提示该突变可能是动脉粥样硬化病变的遗传易感因子。

总之, 本研究表明, 高 Hcy 水平参与了动脉粥样硬化的形成, MTHFR C677T 纯合突变可引起 Hcy 水平升高, 间接参与了动脉粥样硬化的发生发展。

[参考文献]

[1] Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk [J]. J Appl Genet, 2008, 49 (3) : 267-282.

[2] Panayiotou A, Nicolaides A, Griffin M, et al. Serum total homocysteine, folate, 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T genotype and subclinical atherosclerosis [J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13 (1) : 1-11.

[3] 王伟平, 杨 卉, 李保华, 等. 脑梗死发病危险性与血同型半胱氨酸水平的相关性 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (3) : 221-223.

[4] Semmler A, Moskau S, Stoffel-Wagner B, et al. The effect of MTHFR c.677C > T on plasma homocysteine levels depends on health, age and smoking [J]. Clin Invest Med, 2009, 32 (6) : E310.

[5] Hamelahti P, Jarvinen O, Sisto T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T mutation is related to the defects in the internal elastic lamina of the artery wall [J]. Eur J Clin Invest, 2002, 2 (17) : 869-873.

[6] Saitou M, Osonoi T, Kawamori R, et al. Genetic risk factors and the anti-atherosclerotic effect of pioglitazone on carotid atherosclerosis of subjects with type 2 diabetes: a retrospective study [J]. J Atheroscler Thromb, 2010, 17 (4) : 386-394.

[7] Gorgone G, Ursini F, Altamura C, et al. Hyperhomocysteinemia, intima-media thickness and C677T MTHFR gene polymorphism: a correlation study in patients with cognitive impairment [J]. Atherosclerosis, 2009, 206 (1) : 309-313.

[8] 潘 琦, 郭立新, 初明峰, 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.

[9] Alioglu E, Turk U, Cam S, et al. Polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase, vascular endothelial growth factor, endothelial nitric oxide synthase, monocyte chemoattractant protein-1 and apolipoprotein E genes are not associated with carotid intima-media thickness [J]. Can J Cardiol, 2009, 25 (1) : e1-5.

(此文编辑 许雪梅)