

## N5,N10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性及 血浆同型半胱氨酸与冠心病的关系

张良峰, 王新, 李海燕, 陈新, 宋瑛, 孙铃, 张秋  
(南京医科大学附属常州第二人民医院心内科, 江苏省常州市 213000)

[关键词] 亚甲基四氢叶酸还原酶; 同型半胱氨酸; 基因多态性; 冠心病

[摘要] **目的** 研究 N5,N10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 多态性、血浆同型半胱氨酸(Hcy)与冠心病的关系。**方法** 选取 2013 年至 2015 年在我院住院的冠心病患者 256 例,按年龄分为<60 岁组(中青年组)107 例及≥60 岁组(老年组)149 例,选取同期行健康体检的人群 145 例作为对照组,应用聚合酶链反应(PCR)技术和基因芯片分析技术检测 MTHFR 基因 C677T 多态性,应用高效液相色谱法测定血浆 Hcy 水平,分析不同组群之间 MTHFR 基因 C677T 多态性的分布及 Hcy 水平。**结果** MTHFR 基因分布频率:中青年组 CC 型、CT 型、TT 型基因频率分别为 26.2%,43.9%,29.9%,C 等位基因频率为 48.1%,T 等位基因频率为 51.9%。中青年组 CC 型、CT 型、TT 型基因频率分别为 35.6%,42.3%,22.1%,C 等位基因频率为 56.8%,T 等位基因频率为 43.2%。对照组 CC 型、CT 型、TT 型基因频率分别为 37.9%,40.1%,21.4%,C 等位基因频率为 58.3%,T 等位基因频率为 41.7%。中青年组 T 等位基因频率明显高于对照组( $\chi^2=5.10, P=0.015$ ),中青年组 Hcy 浓度明显高于对照组。老年组 T 等位基因频率与对照组比较差异无显著性( $\chi^2=0.147, P=0.382$ ),两组间 Hcy 浓度差异无显著性。各组的 TT 基因型者血浆 Hcy 浓度均明显高于 CC 和 TC 基因型者( $P<0.01$ ),而后两者间差异无显著性。**结论** MTHFR 基因 TT 型可导致 Hcy 水平明显升高,MTHFR 基因 C677T 点突变仅与中青年组冠心病患者相关,与老年组冠心病患者无明显相关,Hcy 水平升高及 MTHFR 基因 T 等位基因频率增高可能为中青年冠心病患者的危险因素,提示不同年龄阶段的冠心病患者发病的机制可能存在差异。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Associations Between Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms, Levels of Plasma Homocystein and Coronary Heart Disease

ZHANG Liang-Feng, WANG Xin, LI Hai-Yan, CHEN Xin, SONG Ying, SUN Ling, and ZHANG Qiu

(Department of Cardiology, Affiliated Second People's Hospital of Changzhou of Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213000, China)

[KEY WORDS] Methylenetetrahydrofolate Reductase; Homocysteine; Gene Polymorphism; Coronary Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the associations of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and levels of plasma homocystein and coronary heart disease. **Methods** A total of 256 patients admitted in our hospital from 2013 to 2015 were divided into two groups according to age: <60 years group (young and middle-aged group,  $n=107$ ) and ≥60 years group (old-aged group,  $n=149$ ). We selected 145 healthy controls as control group. The MTHFR gene C677T polymorphism was detected by polymerase chain reaction (PCR) and gene chip technology. The levels of plasma homocystein were detected by high performance liquid chromatography in all groups. We analyzed distribution of the MTHFR gene C677T polymorphism and the levels of plasma homocystein in all groups. **Results** The frequency of CC (homozygous normal), CT (heterozygous), and TT (homozygous mutant) in group <60 years, ≥60 years, control was individually 26.2%, 43.9%, 29.9%; 35.6%, 42.3%, 22.1% and 37.9%, 40.1%, 21.4%. The frequency of con-

[收稿日期] 2015-11-23

[修回日期] 2016-01-12

[作者简介] 张良峰, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 zhlf100@126.com。王新, 主任医师, 研究方向为冠心病的介入治疗, E-mail 为 19628122@qq.com。通讯作者李海燕, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 Petrol\_lee@126.com。

trol group and T alleles in group <60 years,  $\geq 60$  years, control group was individually 48.1%, 51.9%; 56.8%, 43.2% and 58.3%, 41.7%. There was significant difference in the allele frequency of C677T polymorphism between <60 years group and control group ( $\chi^2 = 5.10, P = 0.015$ ). There was no significant difference between  $\geq 60$  years group and control group ( $\chi^2 = 0.147, P = 0.382$ ). The levels of plasma homocystein in <60 years group were higher than control group.

**Conclusion** There was higher levels of plasma homocystein in TT genotype. There was only associations between the MTHFR gene C677T polymorphism and young and middle-aged CHD patients. There was not relationship in old-aged CHD patients. The higher levels of plasma homocystein and higher T allele frequency maybe were risk factors in young and middle-aged CHD patients. The pathogenesis of CHD was different in different age grades patients.

自从 Wilcken 于 1976 年首先提出高同型半胱氨酸血症是冠心病的一个独立危险因素,以后多项研究均提示 Hcy 水平升高可以增加冠心病的风险<sup>[1-2]</sup>。MTHFR 是 Hcy 代谢途径中的关键酶,它的作用是催化 5,10-亚甲基四氢叶酸生成 5-甲基四氢叶酸,后者可提供甲基给 Hcy 转化为蛋氨酸。MTHFR 基因突变可导致该酶活性降低,以 C677T 位碱基突变最常见,分为 CC、CT、TT 三种基因型,其中 TT 纯合型突变酶活性最低,因而血 Hcy 水平最高<sup>[3]</sup>。MTHFR 基因多态性与冠心病的关系的研究较多,结果有较大差异,多数研究认为两者关系密切,少数研究则提示无明显相关,究其原因,可能与不同地域、民族、种族人群的遗传变异有关,本研究以常州地区的人群为样本,观察到 MTHFR 基因多态性与冠心病的关系受年龄影响,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2013~2015 年间我院住院冠心病患者共 256 例,其中男性 173 例,女性 83 例,年龄 28~89 岁,平均  $61.3 \pm 11.4$  岁。所有患者均行冠状动脉造影检查,至少一支主要血管狭窄程度  $\geq 50\%$  诊断为冠心病<sup>[4]</sup>,临床类型包括心绞痛及心肌梗死。按年龄分为 <60 岁(中青年)组 107 例及  $\geq 60$  岁(老年)组 149 例,选取同期我院行健康体检的人群 145 例作为对照组。所有研究对象均收集临床基础资料:性别、年龄、吸烟史、高血压史、糖尿病史、血脂、肌酐、尿酸。排除标准:严重肝肾功能不全、肿瘤、慢性肺源性心脏病、心脏瓣膜病、先天性心脏病。

### 1.2 方法

所有患者均于入院次日抽取空腹 12 h 静脉血 2 mL,健康体检者于体检当日抽取空腹 12 h 静脉血 2 mL,置入含乙二胺四乙酸抗凝剂的试管中,用于提取 DNA, DNA 的提取采用 PERMEGER 试剂盒,放置于  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱中,集中检测 MTHFR 基因多态性。

同时取静脉血应用高效液相色谱法测定血浆 Hcy 水平。总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、尿酸(UA)测定采用酶法。

### 1.3 MTHFR 基因型检测

采用 MTHFR(C677T)基因检测试剂盒(上海百傲科技有限公司)测定。向全血样本中加入 DNA 抽提液,使细胞裂解,释放出 DNA,将抽提获得的染色体 DNA 作为模板,两条寡聚核苷酸引物为:上游 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3',下游 5'-AGGACGGTTCGCTGAGAGTG-3',聚合酶进行 PCR 扩增,扩增条件:  $50^\circ\text{C}$  5 min,  $94^\circ\text{C}$  5 min;  $94^\circ\text{C}$  25 s,  $56^\circ\text{C}$  25 s,  $72^\circ\text{C}$  25 s,以上三个步骤共 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  5 min。扩增产物用 MTHFR 基因型分析软件及 BaiO 基因芯片图像分析软件进行图像扫描及数据分析。

### 1.4 统计学处理

所有数据均应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料应用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两组间数据比较采用 Dunnett-t 检验,各组之间的基因频率及等位基因频率比较用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 冠心病各组与对照组之间临床基础资料及生化指标的比较

冠心病中青年组在高血压病、糖尿病、吸烟、尿酸、Hcy 均较对照组有明显升高,而血压、血脂及肌酐之间无明显差异,老年组在年龄、血压、高血压病、糖尿病、吸烟、肌酐、尿酸方面较对照组明显升高,而血脂及 Hcy 之间无明显差异(表 1)。

### 2.2 MTHFR 基因多态性检测结果

应用基因扩增产物与基因芯片已知序列的核酸探针杂交,可得三种结果图像,仅有 C 位点结合的图像为 CC 型,仅有 T 位点结合的图像为 TT 型,

两位点均有结合的为 CT 型(图 1)。

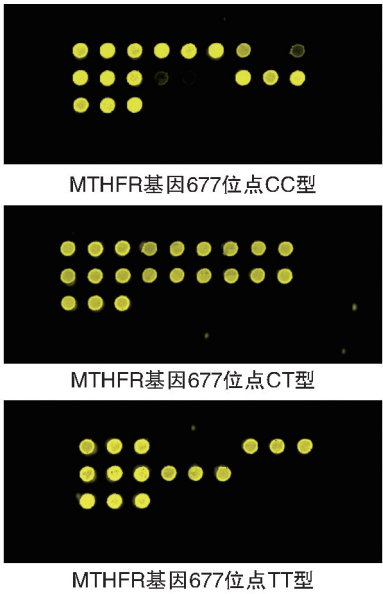


图 1. MTHFR 基因 677 位点各基因型的芯片图像  
Figure 1. The chip image of MTHFR C677T genotypes

2.3 冠心病各组与对照组之间 MTHFR 基因分布

冠心病中青年组 T 等位基因频率明显高于对照组 ( $\chi^2=5.10, P=0.015$ ), 而老年组 T 等位基因频率与对照组相比未见显著差异 ( $\chi^2=0.147, P=0.382$ )。中青年组 CC 基因型明显低于对照组 ( $\chi^2=3.857, P=0.033$ ), TT 基因型高于对照组, 但差异未达统计学意义 ( $\chi^2=2.388, P=0.081$ )。老年组各基因型与对照组相比差异无显著性 ( $P>0.05$ ; 表 2)。

表 1. 冠心病各组与对照组之间临床基础资料及生化指标的比较

Table 1. Comparison of clinic data and biochemical indexes in patients with CHD and controls

项 目	中青年组 (107 例)	老年组 (149 例)	对照组 (145 例)
男性( 例)	76( 71.0%)	97( 65.1)	89( 61.4%)
年龄( 岁)	52.67±12.63 <sup>b</sup>	68.31±11.34 <sup>b</sup>	57.36±15.42
收缩压( mmHg)	125.32±12.78	134.91±11.37 <sup>a</sup>	121.41±16.47
舒张压( mmHg)	74.37±10.77	70.65±9.14 <sup>a</sup>	76.64±11.72
高血压病( 例)	29( 27.1%) <sup>b</sup>	67( 45.0%) <sup>b</sup>	17( 11.7%)
糖尿病( 例)	14( 13.1%) <sup>b</sup>	31( 20.8%) <sup>b</sup>	8( 5.5%)
吸烟史( 例)	26( 24.3%) <sup>b</sup>	29( 19.5%) <sup>b</sup>	17( 11.7%)
TC( mmol/L)	4.11±0.98	4.37±1.16	4.01±1.05
TG( mmol/L)	2.42±2.37	2.18±1.93	2.01±1.07
HDLc( mmol/L)	1.02±0.32	1.13±0.29	1.21±0.27
LDLC( mmol/L)	2.91±0.69	2.85±0.93	2.45±0.71
肌酐( umol/L)	82.92±17.34	92.33±18.57 <sup>a</sup>	78.82±15.38
尿酸( umol/L)	307.77±105.84 <sup>a</sup>	345.75±125.69 <sup>a</sup>	280.47±110.34
Hcy( mmol/L)	14.26±6.96 <sup>a</sup>	13.02±6.57	12.91±5.37

a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与对照组比较。

表 2. 冠心病各组与对照组之间 MTHFR 基因型分布

Table 2. Genotype distributions of MTHFR genes in patients with CHD and controls

分 组	CC 基因型	CT 基因型	TT 基因型	C 等位 基因	T 等位 基因
中青年组 (n=107)	28 (26.2%)	47 (43.9%)	32 (29.9%)	103 (48.1%)	111 (51.9%)
老年组 (n=149)	53 (35.6%)	63 (42.3%)	33 (22.1%)	169 (56.8%)	129 (43.2%)
对照组 (n=145)	55 (37.9%)	59 (40.1%)	31 (21.4%)	169 (58.3%)	121 (41.7%)
冠心病组 (n=256)	81 (31.6%)	110 (43.0%)	65 (25.4%)	272 (51.3%)	240 (48.7%)

2.4 冠心病各组与对照组之间不同基因的 Hcy 浓度

冠心病中青年组 Hcy 浓度与对照组相比明显升高 ( $P<0.05$ ), 而冠心病老年组 Hcy 浓度与对照组相比差异无显著性。以各组之间不同基因型的 Hcy 浓度分析, 同组内 TT 基因型的 Hcy 浓度明显高于 CC 基因型及 CT 基因型 ( $P<0.01$ ), 而 CC 基因型与 CT 基因型之间差异无显著性。不同组别的同一基因型之间 Hcy 浓度差异无显著性(表 3)。

表 3. 冠心病各组与对照组不同 MTHFR 基因型的 Hcy 浓度 ( $\bar{x}\pm s$ , mmol/L)

Table 3. The Hcy concentration of various MTHFR genotype in patients with CHD and controls

分 组	n	CC 基因型	CT 基因型	TT 基因型
中青年组	107	11.35±4.62 <sup>a</sup>	12.67±5.92 <sup>a</sup>	19.14±6.39
老年组	149	10.76±5.07 <sup>a</sup>	11.93±5.37 <sup>a</sup>	18.76±7.71
对照组	145	10.63±4.98 <sup>a</sup>	12.21±4.67 <sup>a</sup>	18.27±7.13

a 为  $P<0.01$ , 与同组 TT 基因型比较。

3 讨 论

Hcy 为体内的一种含硫氨基酸, 由 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)脱甲基后生成, 而 SAM 提供的甲基在体内可以合成多种含甲基的重要生理活性物质。MTHFR 成为甲硫氨酸代谢中的关键酶。人类的 MTHFR 基因位于染色体 1P36.3 上, 该基因有十余种变异, 其中在 677 位的碱基 C 被 T 取代最常见, 产生限制型内切酶识别序列, 该变异可以导致丙氨酸被缬氨酸取代, 使 MTHFR 对热不稳定而降低酶活性, 从而使 Hcy 合成甲硫氨酸减少, 最终使血 Hcy 浓度明显增加<sup>[4]</sup>。本研究中每组 TT 基因型的 Hcy 水平明显高于 CT 及 CC 基因型, 而 CT 及 CC 基

因型之间 Hcy 水平无明显差异,表明纯合型 TT 突变对 Hcy 影响最大,与以上结论近似。

MTHFR 基因 C677T 多态性及高 Hcy 水平与脑血管病的关系较明确,明显增加了脑血管病的风险,TT 基因型甚至认为是其独立的危险因素<sup>[5]</sup>。MTHFR 基因 C677T 多态性与冠心病的关系的研究较多,结果存在很大分歧,多数研究认为两者关系密切,Pereira 等的研究结果表明<sup>[6]</sup>,TT 基因型的个体患冠心病的风险是 CT 及 CC 型个体的 4.4 倍。其具体机制与升高的 Hcy 有关,过高的 Hcy 对凝血系统和动脉系统有直接毒性作用<sup>[7]</sup>,它可以促进氧自由基生成,损伤血管内皮细胞及血管基质,刺激血管平滑肌细胞增殖,促进内膜吞噬脂蛋白并形成泡沫细胞,加速动脉粥样硬化形成,导致冠心病的发生。Hcy 还可以通过影响多种凝血因子和抗凝血因子的表达和活性而增强促凝作用,使机体处于高凝的状态,并激活血小板的粘附和聚集,导致血栓和栓塞事件<sup>[8]</sup>。有研究显示,在冠状动脉造影正常的人群中,MTHFR 基因 C677T 多态性及过高的 Hcy 水平可以导致冠状动脉慢血流现象,这在男性患者身上表现尤其明显<sup>[9]</sup>。此外,MTHFR 基因 C677T 多态性还可以增加患代谢综合征的风险<sup>[10]</sup>,而代谢综合征成为冠心病的危险因素,可能是该基因多态性增加冠心病发病的又一机制。本研究中冠心病中青年组的 Hcy 水平均明显高于对照组,而冠心病老年组 Hcy 水平较对照组无明显差异,提示高 Hcy 在中青年冠心病发病中的作用可能要强于老年患者。

在有些研究中,MTHFR 基因 C677T 多态性与冠心病无明显相关,或者不是主要致病因素,吴晓芬等对中国武汉地区汉族人群进行的较大样本量的研究显示,MTHFR 基因 C677T 多态性与冠心病之间无明显相关<sup>[11]</sup>。究其原因,可能与不同研究者的样本量及样本选择方法有关,也可能与不同地域、民族、种族人群的遗传变异有关。Nilsson 等<sup>[12]</sup>的研究显示,MTHFR 基因 C677T 多态性增加血浆 Hcy 水平有年龄及性别的差异,仅在年轻男性身上观察到 Hcy 明显增加,而女性增加不明显,我们的研究结论与此研究有部分相似,仅在中青年冠心病患者观察到阳性结果,我们曾对所有资料根据性别分组做亚组的分析,未见有统计学意义。

本研究的结果提示,可能不同年龄阶段的冠心病患者发病的机制也有差异,中青年患者遗传因素所起的作用似乎要超过老年患者,因此,在中青年

人群中预防和治疗冠心病关注 MTHFR 基因 C677T 多态性和 Hcy 水平具有重要意义。MTHFR 基因的其他位点多态性及相关的其他基因多态性与冠心病的关系有无类似的年龄差异尚不明确,另外,本研究样本量偏小,增大样本量这种差异是否会有所不同也不知晓,这些均可成为继续研究的切入点。

#### [参考文献]

- [1] Petramala L, Acca M, Francucci CM, et al. Hyperhomocysteinemia: a biochemical link between bone and cardiovascular system diseases [J]. J Endocrinol Invest, 2009, 32(4 Suppl): 10-14.
- [2] Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians[J]. JAMA. 1992, 268(7): 877-881.
- [3] Cortese C1, Motti C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease [J]. Public Health Nutr, 2001, 4(2B): 493-497.
- [4] Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase[J]. Nat Genet, 1995, 10(1): 111-113.
- [5] Zhang MJ1, Li JC, Yin YW, et al. Association of MTHFR C677T polymorphism and risk of cerebrovascular disease in Chinese population: an updated meta-analysis [J]. J Neurol, 2014, 261(5): 925-935.
- [6] Pereira AC, Miyakawa AA, Lopes NH, et al. Dynamic regulation of MTHFR mRNA expression and C677T genotype modulate mortality in coronary artery disease patients after revascularization [J]. Thromb Res, 2007, 121(1): 25-32.
- [7] Kohara K, Fujisawa M, Ando F, et al. MTHFR gene polymorphism as a risk factor for silent brain infarcts and white matter lesions in the Japanese general population: The NILS-LSA Study [J]. Stroke, 2003, 34(5): 1130-1135.
- [8] Outinen PA, Sood SK, Liaw PC, et al. Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine [J]. Biochem J, 1998, 332: 213-221.
- [9] Tang O, Wu J, Qin F. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and the coronary slow flow phenomenon [J]. Coron Artery Dis, 2014, 25(8): 653-657.
- [10] Yang B, Fan S, Zhi X, et al. Associations of MTHFR C677T and MTRR A66G gene polymorphisms with metabolic syndrome: a case-control study in Northern China [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(12): 21687-702.
- [11] 吴晓芬,程龙献,何美安. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与冠心病的关联性研究 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2009, 38(3): 296-300.
- [12] Nilsson TK1, Böttiger AK2, Henríquez P, et al. MTHFR polymorphisms and serum cobalamin affect plasma homocysteine concentrations differentially in females and males [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5): 2706-712.

(此文编辑 李小玲)