

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0239-03

•临床研究•

## $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平与心肌梗死的关系

朱铁兵, 杨志健, 钱卫冲, 王 琿, 王海燕, 张馥敏, 曹克将, 马文珠

(南京医科大学附属第一医院心脏科, 南京市 210029)

[主题词] 心肌梗死; 基因; 多态性; 同型半胱氨酸

[摘要] 研究  $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平与心肌梗死的关系, 运用多聚酶链反应-限制片段多态性技术检测 178 例心肌梗死患者及 178 例正常人  $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶基因多态性, 用高效液相色谱仪和荧光检测仪测定血浆总同型半胱氨酸水平。结果发现,  $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶有 3 种基因型, 即纯合子突变型(TT)、杂合子突变型(TC)及正常型(CC)。心肌梗死组 TT 型频率为 35.4%, TC 型频率为 53.8%, CC 型频率为 10.8%, T 等位基因频率为 62.3%, C 等位基因频率为 37.7%。正常组中 TT 型频率为 20.1%, TC 型频率为 55.8%, CC 型频率为 24.1%, T 等位基因频率为 32.1%, C 等位基因频率为 67.9%, 且心肌梗死组 TT 高于正常组。正常人群中 TT 基因型者血浆总同型半胱氨酸水平明显高于(TC+CC)基因型者。心肌梗死患者血浆总同型半胱氨酸水平显著高于正常组。多因素分析显示,  $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶基因突变型 TT 可能是心肌梗死发病的一个危险因素。结论提示,  $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶 TT 基因型突变可能升高个体血浆总同型半胱氨酸水平;  $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶基因可能是心肌梗死的易感基因之一;  $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶基因突变型 TT 及高同型半胱氨酸血症可能是心肌梗死发病的一个危险因素。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Relationship of Polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate (MTHFR) Gene and Plasma Homocysteine Levels with Myocardial Infarction

ZHU Tie-Bin, YANG Zhi-Jian, QIAN Wei-Chong, WANG Hui, WANG Hai-Yan, ZHANG Fu-Min, CAO Ke-Jiang, and MA Wen-Zhu

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[MeSH] Myocardial Infarction; Gene; Polymorphism; Homocysteine

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship of polymorphisms of methylenetetrahydrofolate (MTHFR) gene and plasma homocysteine (Hcy) levels with myocardial infarction. **Methods** 178 myocardial infarction patients and 178 normal subjects were recruited in the study. Their polymorphisms of MTHFR gene were analyzed using PCR-RFLP and their plasma total Hcy levels were measured using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Results** There were three kinds of genotype: TT (homozygous mutation), TC (heterozygous mutation) and CC (wild-type). The frequencies of the three genotypes were as follows: TT, 35.4%; TC, 53.8%; CC, 10.8% in myocardial infarction patients and TT, 20.1%; TC 55.8%; CC, 24.1% in normal subjects, respectively. The frequency of T alleles was significantly higher in myocardial infarction patients than that in normal controls (62.3% and 37.7%, respectively). Mean total plasma homocysteine concentrations were significantly higher in myocardial infarction patients than in the normal subjects. **Conclusions** These results suggest that polymorphisms of MTHFR gene and hyperhomocysteinemia may be an independent risk factor for myocardial infarction.

研究发现, 高同型半胱氨酸血症与心肌梗死的发生可能有一定关系<sup>[1,2]</sup>。蛋氨酸代谢中酶或辅助因子缺乏均可引起高同型半胱氨酸血症,  $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate, MTHFR)为蛋氨酸代谢中的一个关键酶。MTHFR 基因错义突变是引起此酶缺乏或活性降低的主要机制, 其

中 C677T 位碱基突变最常见<sup>[3,4]</sup>。我们运用多聚酶链反应-限制片段多态性技术(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)检测 MTHFR 基因 C677T 位突变, 用高效液相色谱仪和荧光检测仪测定血浆总同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平, 初步探讨中国人 MTHFR 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平与心肌梗死发生的关系。

### 1 对象与方法

#### 1.1 对象

[收稿日期] 2001-11-12 [修回日期] 2002-04-30

[作者简介] 朱铁兵, 男, 1965 年 1 月出生, 江苏淮阴人, 博士研究生, 副主任医师, 主要研究方向为冠病脂质代谢异常。杨志健, 男, 1965 年 4 月出生, 江苏宝应人, 博士研究生, 主任医师, 主要研究方向为冠心病介入治疗。钱卫冲, 男, 1963 年 8 月出生, 江苏盱眙人, 硕士研究生, 副主任医师, 主要研究方向为冠心病的流行病学。

急性心肌梗死患者 178 例, 平均年龄  $65 \pm 13.5$  岁。按 1:1 选择性别相同、年龄相差不超过 2 岁的健康人作对照。

## 1.2 聚合酶链反应体外基因扩增

抽取周围静脉血 5 mL, EDTA- $\text{Na}_2$  抗凝, 用低渗溶血法分离白细胞, 用酚/氯仿常规方法提取 DNA。引物序列<sup>[3]</sup>为 P1: 5'-TCAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'; P2: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3' (美国赛百盛生物工程公司合成)。特异性扩增 MTHFR 基因含 Hinf I 多态性位点片段。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{L}$ , 循环周期为 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 62  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增片段大小为 198 bp。

## 1.3 限制性内切酶片段长度多态性分析

在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中加入缓冲液 2  $\mu\text{L}$ 、Hinf I 10 u 及 PCR 扩增产物 2  $\mu\text{L}$ , 用去离子水补足至 20  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  消化 24 h, 3% 消化 24 h, 3% 琼脂糖凝胶电泳判断酶切结果。

## 1.4 血浆同型半胱氨酸水平测定

空腹抽取周围静脉血 5 mL, 置含有 2% 乙二胺四乙酸二钠 100  $\mu\text{L}$  的一次性试管中, 4  $^{\circ}\text{C}$  3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, -70  $^{\circ}\text{C}$  保存。参照文献[5, 6]等并稍作改良, 测定血浆总 Hcy, 采用惠普 HP1100 型高效液相色谱仪、ODSC185  $\mu\text{m}$  反相分析柱及惠普 HP1046A 荧光检测仪, 激发波长为 390 nm, 反射波长为 470 nm, 流动相为 0.1 mol/L 乙酸缓冲液 (pH 4.0), 含 2% 甲醇。质控指标: 批内变异系数 3.5%, 批间变异系数 3.67%。

## 1.5 统计学处理

结果以均数  $\pm$  标准差表示, 用 SAS 统计软件进行  $t$  检验、 $\chi^2$  检验及相关分析。

# 2 结果

## 2.1 限制性内切酶片段长度多态性分析结果

MTHFR 共有 3 种基因型: -/- 仅为 198 bp 片段; +/+ 为 175 bp 片段, 为纯合子突变; +/- 既有 198 bp 片段, 又有 175 bp 片段, 为杂合子突变 (图 1, Figure 1)。

## 2.2 基因型及等位基因频率比较

心肌梗死组 CC 基因型和 TC 基因型明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 见表 1 (Table 1)。



图 1. MTHFR 基因型。

Figure 1. MTHFR genotypes. 1, 7: CC contains 198 bp; 2, 6: TC contains 198 bp and 175 bp; 3, 5: TT contains 175 bp; 4: PCR Markers.

表 1. MTHFR 基因型及等位基因频率比较。

Table 1. The frequency of MTHFR genotypes and alleles in MI compared to control (% ,  $n = 178$ )

Groups	Genotypes			Alleles	
	CC	TC	TT	T	C
Control	24.1	55.8	20.1	32.1	67.9
MI	10.8	53.8	35.4	62.3	37.7

## 2.3 血浆总同型半胱氨酸水平比较

正常人群中 TT 基因型者血浆总 Hcy 水平明显高于 (TC+ CC) 基因型者 (12.36  $\mu\text{mol/L}$  比 10.12  $\mu\text{mol/L}$ ); 心肌梗死组血浆总 Hcy 水平 [(29.48  $\pm$  6.34)  $\mu\text{mol/L}$ ] 明显高于正常对照组 [(11.32  $\pm$  2.92)  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ ]。

## 2.4 多因素条件 Logistic 回归分析

回归分析显示, T 等位基因突变可能是心肌梗死的独立危险因素。

# 3 讨论

1969 年 McCully 从尸检发现两个血浆 Hcy 浓度高并伴有 Hcy 尿的儿童, 存在着广泛的动脉血栓和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)。此后, 国际上大量前瞻性研究、国内一些动物试验和少量临床报道评价了血浆 Hcy 浓度升高与 As 的关系。

人 MTHFR 基因定位于染色体 1P<sup>36.3</sup> 上, cDNA 全长 2.2 kb。Hinf I 位点限制性内切酶片段长度多态性系 cDNA 序列上第 677 位核苷酸 C  $\rightarrow$  T 突变, 从而产生一个 Hinf I 限制性内切酶识别序列, 即 T 等位

表 2. 多因素条件 Logistic 回归分析.

Table 2. Multivariate conditioned logistic regression analysis.

exposed factor (Y, N)	Regression coefficient	Standard error	Ratio	95% confidence	P
Smokers (Y, N)	1.732	0.421	5.94	2.85~13.46	< 0.001
Smoke index	1.312	0.369	3.48	1.71~7.03	< 0.001
Hypertension (Y, N)	1.327	0.382	3.61	1.71~7.54	< 0.001
TC (mmol/L)					
( $\geq 5.70$ , < 5.70)	0.712	0.325	2.11	1.19~4.23	0.032
HDL-C					
( $\geq 1.01$ , < 1.01)	-1.063	0.367	0.35	0.17~0.72	0.004
APO A/B Ratio					
( $\geq 1.30$ , < 1.30)	-1.973	0.438	0.14	0.06~0.33	< 0.001
MTHFR Genotypes					
(TT, 非 TT)	1.213	0.564	3.43	1.11~10.12	0.044
MTHFR Alleles					
(TT, 非 TT)	1.052	0.391	2.83	1.41~6.67	0.005

基因,这一变化造成编码的氨基酸由丙氨酸变成缬氨酸,这种突变造成 MTHFR 活性下降,从而导致 Hcy 水平增高<sup>[5,6]</sup>。本研究发现,在心肌梗死患者 TT 基因型及等位基因频率均高于正常人,多因素分析显示 MTHFR 基因突变型 TT 可能是心肌梗死发病的一个独立危险因素。这与 Schwartz 等<sup>[7]</sup>的研究一致。本研究还发现,TT 基因突变者易导致个体血浆总 Hcy 水平升高,与理论推导基本相符,可以部分解释 TT 基因突变者易发生 As。

动物实验发现,血浆 Hcy 增加到一定水平可引起血小板聚集功能增高,血浆血栓素 B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)水平也随之升高,6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub> 水平则下降,这表明其机制是通过破坏内皮致血小板功能活化,PGI<sub>2</sub>-TXA<sub>2</sub> 失衡,促脂质在动脉壁沉积;Hcy 自动氧化过程中还产生过氧化物(代有羟基根),即高 Hcy 血症引起血管毒性的物质。羟基根启动脂质过氧化,在内皮原浆膜水平和脂蛋白微粒内起作用,过氧化阴离子根促发低密度脂蛋白氧化。Hcy 还是一种强烈的血管平滑肌细胞的促细胞分裂剂,体外试验表明与 Hcy 接触可引起明显的血管平滑肌细胞增殖。Hcy 通过影响血管细胞的生化和生物合成直接损伤血管基质,Hcy 巯基内脂与低密度脂蛋白结合形成集合体,再由内膜吞噬形成泡沫细胞,构成新生的 As 斑块<sup>[8~10]</sup>。

根据本研究结果,我们认为 MTHFR 基因突变是产生高 Hcy 血症的一个重要遗传因素,MTHFR 基因

突变可能是心肌梗死的易感基因,MTHFR 基因突变 TT 型及高 Hcy 血症是心肌梗死发病的一个独立危险因素。

#### [参考文献]

- [1] Ridker PM, Shih J, Cook TJ, et al. Plasma homocysteine concentration, statin therapy, and the risk of first acute coronary events. *Circulation*, 2001, **105**: 1776-779
- [2] Sclinger MC, Tsao PS. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, 2001, **104**: 2569-575
- [3] Hidemi Nonaka, Takeshi Tsujino, Yasuhiro Watari. Prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation*, 2001, **104**: 1165-170
- [4] Ranjana Poddar, Natarajan Sivasubramanian, Patricia M, et al. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*, 2001, **103**: 2717-723
- [5] Chambers JC, Ueland PM, et al. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation*, **102**: 2479-483
- [6] Appel LJ, Miller ER, Jee SH. Effect of dietary patterns on serum homocysteine: results of a randomized, controlled feeding study. *Circulation*, 2001, **102**: 852-857
- [7] Schwartz SM, David S. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation*, 1997, **96**: 412-417
- [8] Stubbs PJ, Al-Obeidi MK. Effect of plasma homocysteine concentration on early and late events in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001, **102**: 605-610
- [9] Hiroyuki Morita, Hiroki Kurihara, Shigetaka Yoshida, et al. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Circulation*, 2001, **103**: 133-139
- [10] Tai Kosokabe, Kenji Okumura, Takahito Sone, et al. Relation of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation and plasma homocysteine with intimal hyperplasia after coronary stenting. *Circulation*, 2001, **103**: 2048-054

(此文编辑 文玉珊)