

# 同型半胱氨酸水平及MTHFR C677T 基因多态性与脑卒中关系分析

张剑<sup>a</sup>,张娟<sup>b</sup>,鲁凤荣<sup>a</sup>,唐中玉<sup>c</sup>,焦淑芬<sup>c</sup>,程丽娟<sup>d</sup>,韩利<sup>c</sup>

**摘要** 目的:探讨同型半胱氨酸(Hcy)及亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因C677T位点多态性与脑卒中相关性。**方法**:选取2020年10月至2021年4月在某三甲医院住院患者及体检人群,共400例,其中236例脑卒中患者为病例组,164例非脑卒中患者为对照组,通过循环酶法测定Hcy水平,PCR-RFLP方法对MTHFR基因多态性进行基因分型检测。**结果**:MTHFR C677T检测出3种基因型CC型、CT型、TT型。病例组中3种基因频率分别为32.20%、42.37%、25.42%;对照组中3种基因频率分别为42.68%、45.12%、12.20%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。TT型基因Hcy水平与CC型、CT型比较有统计学意义( $P<0.01$ )。**结论**:MTHFR C677T基因呈多态性分布,TT基因型Hcy水平远高于CC、CT基因型。联合MTHFR基因型和Hcy水平可用于脑卒中风险评估。

**关键词** 脑卒中;同型半胱氨酸;MTHFR C677T;多态性

**中图分类号** R741;R743.3 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20210631

**本文引用格式**:张剑,张娟,鲁凤荣,唐中玉,焦淑芬,程丽娟,韩利.同型半胱氨酸水平及MTHFR C677T基因多态性与脑卒中关系分析[J].神经损伤与功能重建,2022,17(11):657-659.

脑卒中是由于血管原因引起的中枢神经系统神经缺陷,具有高发病率、高死亡率、高复发率、高致残率的特点,严重影响人们的生活质量,已成为全球性公共卫生问题<sup>[1]</sup>。近年来,有多项研究指出高同型半胱氨酸血症(hyperhomocystinemia, HHcy)与脑卒中的发生密切相关<sup>[2,3]</sup>。Hcy的浓度取决于遗传因素和环境因素之间的相互作用。浓度升高可导致血管内皮损伤、平滑肌增生和凝血异常,从而引起动脉粥样硬化和血栓形成,可增加脑卒中的风险。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)编码的N5、N10是Hcy代谢的关键控制酶<sup>[4]</sup>,MTHFR多态性是677位的胞嘧啶(C)与胸腺嘧啶(T)被取代,导致丙氨酸在氨基酸222处转化为缬氨酸, C677T多态性与酶活性降低有关,导致Hcy升高<sup>[5]</sup>。目前研究较多的是MTHFR基因突变为C677T点突变,其频率分布受人种、地域等因素的影响较大,并且其多态性与脑卒中的关系目前国内外研究还存在争议。本研究拟调查脑卒中人群和健康人群血清总Hcy水平, MTHFR C677T基因多态性是否存在差异,结合个体Hcy水平及MTHFR C677T基因多态性及对脑卒中中进行风险评估,为脑卒中的防治提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

2020年10月至2021年4月,在某三甲医院神经内科招募脑卒中患者236例为病例组,其中男135例,女81例;平均年龄(63.2±12.8)岁。纳入标准:经临床诊断,头颅MRI或CT扫描确诊为脑卒中,符合1995年第四届全国脑血管会议诊断标准<sup>[6]</sup>。

另选择同期在本院门诊体检的健康人群164例为对照组,其中男90例,女74例;平均年龄(62.6±13.3)岁。2组均排除脑出血、心房颤动、甲状腺功能亢进、心源性卒中、静脉血栓形成、外周血管疾病、肝脏疾病或肾脏疾病患者。本研究方案通过医院伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 血浆Hcy测定** 受试者禁食水12 h,晨起采集空腹血2 mL,置于EDTA抗凝试管中,于4℃下分离血浆,使用Hcy试剂(北京九强生物技术股份有限公司)通过酶循环测定法检测Hcy水平。Hcy正常范围为5~15 μmol/L, >15 μmol/L是HHcy的指征。

**1.2.2 MTHFR的基因分型** 使用苯酚-氯仿法从EDTA抗凝的2 mL外周静脉血中提取基因组DNA。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对MTHFR基因多态性进行基因分型。使用以下引物对扩增DNA:5'-TGAAGGAG AAGGTGTCTGCGGGA-3'(有义)和5'-AGGACGG TGCGGTGAGAGTG-3'(反义)。PCR混合物(25 μL)含有2.5 μL STR缓冲液(MgCl<sub>2</sub>, dNTP和10×缓冲液),有义和反义引物各2.5 μL, 0.4 μL TaqDNA聚合酶(购于上海宝生公司),使用ddH<sub>2</sub>O将1.5 μL基因组DNA总体积调节至25 μL,扩增如下进行:94℃预变性2 min;然后进行40个循环,94℃变性30 s, 62℃变性30 s, 72℃变性30 s;72℃延伸5 min。用限制酶Hinf I(Promega Corp, Madison)消化PCR产物。通过混合10 μL PCR产物, 0.5 μL Hinf I, 2.0 μL缓冲液R和7.5 μL ddH<sub>2</sub>O制备20 μL的反应混合物。将反应混合物在37℃下温育3 h。然后,通过在2%琼脂糖凝胶上在100 V电泳30 min分离PCR

### 作者单位

武汉市精神卫生中心;武汉市心理医院 a.精神科监护病区, b.心身医学病区, c.护理部, d.儿童康复部  
武汉 430000

### 收稿日期

2021-07-02

### 通讯作者

韩利  
893125933@qq.com

片段。没有限制酶位点的野生型(CC)基因型产生 198 bp 片段。杂合(CT)基因型产生 2 个片段:198 bp 和 175 bp,纯合突变体(TT)产生 175 bp 片段。

1.2.3 DNA 测序分析 为验证PCR-RFLP的基因分型结果,随机选择 20 例不同基因型的受试者进行 DNA 测序分析。所有基因型与第一轮PCR-RFLP 基因分型获得的基因型相同。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件分析数据,计量资料以(均数±标准差)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。采用 Hardy-Weinberg 平衡定律计算各等位基因频率数据分布可靠性。

2 结果

2.1 2 组 MTHFR C677T 基因型检测结果

病例组 MTHFR 基因 TT 型及 T 等位基因等位基因频率均高于对照组 ( $P<0.05$ ),CC 型及 C 等位基因均低于对照组 ( $P<0.01$ ),见表 1。

2.2 病例组 MTHFR 基因分布频率

病例组 MTHFR 等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 ( $\chi^2=2.782, P=0.249$ ),数据来自同一遗传群体,见表 2。

2.3 MTHFR C677T 不同基因型和 Hcy 水平关系

不同 MTHFR C677T 基因型中,病例组的 Hcy 浓度显著高于对照组 (均  $P<0.01$ );不同基因人群 Hcy 浓度不同,TT 型最高,CT 型次之,CC 型最低,提示 T 等位基因突变可能会引起 Hcy 升高 ( $P<0.01$ ),见表 3。

3 讨论

脑卒中已成为我国居民首要死亡原因,据预测,2030 年脑卒中发生率比 2010 年增加 50%<sup>[7]</sup>。随着我国人口老龄化的加剧,脑卒中日益成为危害居民健康的问题之一,造成严重的社会经济负担,因此,探索脑卒中预防及治疗新手段至关重要。脑卒中发生与高血压、血脂异常、肥胖、饮食、吸烟、饮酒、缺乏体育锻炼等因素有关。随着精准医学的发展,遗传因素越来越受重视。MTHFR 是叶酸代谢的主要酶之一,将 5,10-亚甲基四氢叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸<sup>[8]</sup>,5-甲基四氢叶酸作用于 Hcy 与甲硫氨酸的再甲基化反应。MTHFR C677T 多态性与血浆 HCY 水平升高有关<sup>[9]</sup>,MTHFR 基因 677 位点上有 C/C、C/T、T/T 3 种分型,其中 TT 酶活性比 CC 酶活性低 55%,酶活性的降低导致 Hcy 浓度的升高。Hcy 浓度增加会导致血管内皮的损伤、血管平滑肌

增殖、凝血因子的激活影响纤溶酶原激活物抑制剂的表达,从而抑制硫酸化肝素,血栓调节蛋白表达和组织型纤溶酶原激活物合成的合成,其可导致血小板聚集引起脑卒中的发生<sup>[10]</sup>。有研究指出 Hcy 浓度增高,是血栓形成的重要因素之一,排除混杂因素后,Hcy 浓度增加 5  $\mu\text{mol/L}$ ,脑卒中风险增加 59%<sup>[11,12]</sup>。

本研究中共检测出 3 种 MTHFR 基因型分别是:CC 型、CT 型、TT 型。卒中组 MTHFR 基因 TT 型及 T 等位基因频率均高于对照组 ( $P<0.05$ ),CC 型及 C 等位基因均低于对照组 ( $P<0.01$ )。说明脑卒中患者中 TT 型基因及 T 等位基因比例高于健康人群,而 CC 型基因及 C 等位基因低于健康人群,提示 TT 型基因人群是可能脑卒中高发人群。国外学者对于 MTHFR C677T 与脑卒中的风险已有研究,Li 等<sup>[13]</sup>纳入 300 例脑卒中患者和 216 例对照者,结果显示 TT 型患者脑卒中发生的风险是 CC 型的 2.15 倍。翁秋燕等<sup>[14]</sup>分析 78 例脑卒中患者和 82 例非卒中人群的基因分型,结果显示 TT 型患者脑卒中脑卒中风险是 CC 型的 2.717 倍。上述结果与本研究结果相一致。但也有研究发现 MTHFR C677T 基因与脑卒中的发生没有相关性<sup>[15]</sup>,这可能与入组人群差异有关。

病例组和对对照组的 MTHFR 基因 C677T 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,表明本研究对象具有人群代表性。本研究中 TT 型基因人群中 Hcy 水平高于 CT 和 CC 基因型 ( $P<0.01$ ),说明 Hcy 与 MTHFR C677T 多态性密切相关,但作用机制尚不明确,可能是 677 位的胞嘧啶(C)与胸腺嘧啶(T)取代导致丙氨酸在氨基酸 222 处转化为缬氨酸,然后降低 MTHFR 酶活性,参与 Hcy 新陈代谢。

本研究证实 Hcy 水平升高与脑卒中相关,MTHFR C677T 多态性可能与遗传因素相关,综合考虑患者 Hcy 水平和基因分型,对脑卒中的防治发生意义重大。本研究由于样本量较小,单中心研究,结果可能存在局限性,将来开展大样本、多中心研究以期得到更为精确的结果。

参考文献

[1] GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. Lancet Neurol, 2019, 18: 439-458.  
[2] 朱娟娟, 崇慧峰, 胡志军, 等. 铜陵地区脑卒中病人 MTHFR C677T 基因多态性分布及同型半胱氨酸水平分析[J]. 安徽医药, 2020, 24: 895-898.  
[3] 孔涛, 蒋华, 信秀娟, 等. 缺血性脑梗死患者血清同型半胱氨酸水平与性别, 高血压, 亚甲基四氢叶酸还原酶基因的关系[J]. 临床神经病学杂志, 2020, 33: 32-34.  
[4] Murali V, Rathika C, Malini RP, et al. MTHFR (C677T) CT genotype and CT-apoE3/3 genotypic combination predisposes the risk of ischemic

表 1 各组 MTHFR 基因及等位基因频率分布[例(%)]

| 组别         | 例数  | MTHFR 基因型 |            |           | 等位基因       |            |
|------------|-----|-----------|------------|-----------|------------|------------|
|            |     | C/C       | C/T        | T/T       | C          | T          |
| 对照组        | 164 | 70(42.68) | 74(45.12)  | 20(12.20) | 214(65.24) | 114(34.76) |
| 病例组        | 236 | 76(32.20) | 100(42.37) | 60(25.42) | 252(53.39) | 220(46.61) |
| $\chi^2$ 值 |     | 4.590     | 0.298      | 10.580    | 10.700     |            |
| P值         |     | 0.032     | 0.585      | 0.001     | 0.001      |            |

表2 病例组MTHFR C677T基因Hardly-Weinberg遗传平衡分析

| 基因   | C/C   | C/T   | T/T   |
|------|-------|-------|-------|
| 实际频数 | 76    | 100   | 60    |
| 预计频数 | 67    | 118   | 51    |
| 基因频数 | 0.322 | 0.424 | 0.254 |

表3 2组不同MTHFRC667T基因型的Hcy水平比较(μmol/L, $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 例数  | CC         | CT         | TT          |
|-----|-----|------------|------------|-------------|
| 对照组 | 164 | 10.49±4.72 | 10.09±3.78 | 17.67±5.06  |
| 病例组 | 236 | 14.59±4.16 | 16.30±4.05 | 26.90±10.37 |
| t值  |     | 5.370      | 10.970     | 5.810       |
| P值  |     | 0.005      | 0.001      | 0.005       |

stroke[J]. Gene, 2016, 591: 465-470.

[5] Jadavji NM, Wieske F, Dirnagl U, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency alters levels of glutamate and γ-aminobutyric acid in brain tissue[J]. Mol Genet Metab Rep, 2015, 3: 1-4.

[6] 张剑. 深圳市某社区人群脑卒中患病危险因素分析及风险预测模型构建[D]. 广州医科大学, 2019.

[7] 王拥军, 李子孝, 谷鸿秋, 等. 中国卒中报告2019(中文版)(1)[J]. 中国

卒中杂志, 2020, 15: 1037-1043.

[8] María CCD, Olivia R, Juan S, et al. Guide to clinical practice for the diagnosis, treatment and rehabilitation of non-syndromic craniosynostosis on 3 levels of care[J]. Cir Cir, 2017, 85: 401-410.

[9] Huang XY, Han LY, Huang XD, et al. Impact of 5A/6A polymorphism of matrix metalloproteinase-3 on recurrent atherosclerotic ischemic stroke in Chinese[J]. Int J Neurosci, 2016, 126: 936-941.

[10] 朱铁楠, 赵永强. 2012版易栓症诊断中国专家共识解读[J]. 临床血液学杂志, 2013, 26: 156-157.

[11] Zhong C, Xu T, Xu T, et al. Plasma Homocysteine and Prognosis of Acute Ischemic Stroke: a Gender-Specific Analysis From CATIS Randomized Clinical Trial[J]. Mol Neurobiol, 2016, 54:1-9.

[12] Wald DS, Wald NJ, Morris JK, et al. Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence[J]. BMJ, 2018, 333: 1114-1117.

[13] Li A, Shi Y, Xu L, et al. A possible synergistic effect of MTHFR C677T polymorphism on homocysteine level variations increased risk for ischemic stroke[J]. Medicine, 2017, 96: e9300.

[14] 翁秋燕, 查芹, 牛艳芳, 等. 宁波江北地区汉族青壮年亚甲基四氢叶酸还原酶基因C677T多态性和体力活动与缺血性脑卒中的关系[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31: 4-9.

[15] Luo H, Liu B, Hu J, et al. Hyperhomocysteinemia and Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism in Cervical Artery Dissection: A Meta-Analysis[J]. Cerebrovasc Dis, 2014, 37: 313-320.

(本文编辑:王晶)

(上接第656页)

表3 3组脑组织中造模后不同时间点Bax和Bcl-2平均灰度值的比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | 只数 | Bax                     |                         |                         |                         | Bcl-2                   |
|------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|      |    | 1 d                     | 3 d                     | 7 d                     | 14 d                    | 1 d                     |
| 假手术组 | 20 | 0.07±0.02               | 0.05±0.02               | 0.07±0.17               | 0.06±0.12               | 0.13±0.01               |
| 对照组  | 20 | 0.48±0.03 <sup>①</sup>  | 0.75±0.07 <sup>①</sup>  | 0.60±0.05 <sup>①</sup>  | 0.34±0.06 <sup>①</sup>  | 0.15±0.03 <sup>①</sup>  |
| 干预组  | 20 | 0.29±0.02 <sup>②③</sup> | 0.56±0.05 <sup>②③</sup> | 0.45±0.02 <sup>②③</sup> | 0.17±0.03 <sup>②③</sup> | 0.53±0.05 <sup>②③</sup> |

| 组别   | Bcl-2                   |                         |                         |
|------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|      | 3 d                     | 7 d                     | 14 d                    |
| 假手术组 | 0.25±0.10               | 0.41±0.38               | 0.41±0.38               |
| 对照组  | 0.08±0.02 <sup>①</sup>  | 0.14±0.03 <sup>①</sup>  | 0.19±0.01 <sup>①</sup>  |
| 干预组  | 0.70±0.06 <sup>②③</sup> | 0.62±0.06 <sup>②③</sup> | 0.39±0.02 <sup>②③</sup> |

注:与假手术组比较,<sup>①</sup> $P<0.01$ ,<sup>②</sup> $P<0.05$ ;与对照组比较,<sup>③</sup> $P<0.05$

long-term post-marketing surveillance study (J-STEP/LT) [J]. J Diabetes Investig, 2019, 10: 1272-1283.

[9] Wei N, Wei Y, Li B, et al. Baicalein Promotes Neuronal and Behavioral Recovery After Brain Bleeding Via Suppressing Apoptosis,Oxidative Stress and Neuroinflammation[J]. Neurochem Res, 2017, 42: 1-9.

[10] Hemphill JC 3rd, Greenberg SM, Anderson CS, et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Brain Bleeding:AG uideline for Healthcare Professionals Fromthe American Heart Association/American Stroke Association[J]. Stroke, 2015, 46: 2032-2060.

[11] Lattanzi S, Brigo F, Trinka E, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in acute cerebral bleeding:a system review[J]. Transl Stroke Res, 2019, 10:

137-145.

[12] Chen M, Lai L, Li X, et al. Baicalein Attenuates Neurological Deficits and Preserves Blood - Brain Barrier Integrity in a Rat Contral of Brain Bleeding[J]. Neurochem Res, 2016, 41: 3095-3102.

[13] 刘芳, 孙增先. 二甲双胍治疗非糖尿病疾病的国外研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29: 3451-3456.

[14] 李飞, 高伟伟, 徐新, 等. 二甲双胍对ICH模型小鼠血肿周围脑组织炎症反应影响[J]. 天津医药, 2017, 45: 485-488.

[15] 孙雅菲, 侯慧清, 刘晓倩, 等. 二甲双胍通过调节Treg细胞反应治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎[J]. 脑与神经疾病杂志, 2018, 10: 595-601.

[16] Morotti A, Goldstein JN. Diagnosis and management of acute brain brain bleeding[J]. Eng Med Clin North Am, 2016, 34: 883-899.

[17] 袁钰萍, 蒋霞, 刘璐, 等. 二甲双胍调节细胞自噬和焦亡发挥脑缺血再灌注损伤保护作用的机制研究[J]. 中国药学杂志, 2021, 5: 359-367.

[18] Ding ML, Ma H, Man YG, et al. Protective effects of green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate against sevoflurane-induced neuronal apoptosis involves regulation of CREB-BDNF-Trk-B and PI3K/Akt/mTOR signalling pathways in neonatal mice[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95: 1396-1405.

(本文编辑:王晶)