

• 论 著 •

II b 型高血脂症患者 MTHFR C677T 基因多态性研究

莫和国¹, 尹志农², 王俊文², 王红敏²

(1. 南方医科大学附属小榄医院检验科, 广州 528415;

2. 北京市垂杨柳医院/上海同济大学附属北京微创医院实验中心 100022)

摘要:目的 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性与 II b 型高血脂症的相关性。方法 采用 TaqMan 探针法检测 101 例 II b 型高血脂症患者和 150 健康体检者 MTHFR C677T 基因多态性, 同时检测血脂和同型半胱氨酸水平。结果 II b 型高血脂症组 TC、TG、LDL-C、HCY 水平均高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 同时 II b 型高血脂症组 CT、TT 基因型频率明显高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.597, P = 0.01$)。携带 CT、TT 基因型个体发病风险是 CC 基因型的 2.4 倍 (95%CI: 1.216 1~4.685)。结论 MTHFR C677T 基因多态性与 II b 型高血脂症发病风险相关联。

关键词: 亚甲基四氢叶酸还原酶(NADPH); 高血脂症; 基因多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0040-02

Study on MTHFR C677T gene polymorphism in patients with II b hyperlipidemia

Mo Heguo¹, Yin Zhinong², Wang Junwen², Wang Hongmin

(1. Department of Clinical Laboratory; the Affiliated Xiaolan Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 528415, China; 2. Department of Laboratory, Chui Yangliu Hospital of Beijing/Peking Minimally Invasive Hospital, Beijing 100022, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between MTHFR C677T gene polymorphism and II b hyperlipidemia and assess serum lipid and plasma homocysteine levels. **Methods** MTHFR C677T gene polymorphism of 101 cases with II b hyperlipidemia and 150 normal control were detected by TaqMan probe. **Results** The TC, TG, LDL-C, HCY levels with II b hyperlipidemia group were significantly higher than that in control group ($P < 0.01$), and at the same time the frequencies of CT, TT genotypes with II b hyperlipidemia group were also significantly higher than that in control group ($\chi^2 = 6.597, P = 0.01$). The CT, TT individual risk with II b hyperlipidemia group is 2.4 times of the CC genotype. **Conclusion** These findings supported the hypothesis that genetic polymorphism in MTHFR C677T contributed to the development of II b hyperlipidemia.

Key words: methylenetetrahydrofolate reductase(NADPH2); hyperlipidemias; gene polymorphism

II b 型高血脂症是指血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平升高。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)在叶酸代谢中发挥重要作用, 已发现编码 MTHFR C677T 基因存在多态性, 可导致酶活性改变。目前国内、外尚未见 MTHFR C677T 基因多态性与 II b 型高血脂症相关联的文献报道, 本研究采用 TaqMan 荧光探针法检测 II b 型高血脂症患者 MTHFR C677T 基因多态性, 以了解该位点基因多态性与 II b 型高血脂症的相关性, 为从遗传学角度探讨该病病因提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 入选标准参照 1970 年 WHO 的标准, II b 型高血脂症患者 101 例; 来自 2008 年 2~12 月本院患者, 年龄为 37~55 岁, 平均年龄 40~45 岁; 男 47 例, 女 54 例。健康体检者 150 例, 男 70 例, 女 80 例; 年龄 40~56 岁, 平均年龄 42~56 岁; 无冠心病、糖尿病、高血压病史, 心电图检查均正常。

1.2 方法 (1)标本采集和指标检测: 空腹 12 h, 静脉采集未抗凝血 3 mL, 分离血清用于 TC、TG、LDL-C、HDL-C 检测; EDTA-K₂ 抗凝血 3 mL 用于检测 HCY 水平; 碘化钠法提取 DNA。(2)指标检测: TC、TG 采用酶法, HDL-C、LDL-C 采用免疫比浊法, HCY 采用荧光偏振免疫法(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)进行检测。仪器(AU640)和试剂均由北京九强医疗器械有限公司提供。(3)基因型检测: 参照文献[2]设计引物, 序列 P1, 5'-GAA GCA GGG AGC TTT GAG GC-3'; P2, 5'-CCC ATG TCG GTG GAT GCC TT-3'。采用

TaqMan 荧光探针法检测 MTHFR C677T 基因多态性, 仪器(PE7000)和试剂由广州安达生物有限公司提供。(4)基因序列测定: 其 PCR 产物使用循环测序法, 在 ABI3100DNA 测序仪上直接测序, 以证实该法检测结果的准确性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS12.0 软件进行统计学处理。基因型和等位基因频率用基因计数法统计。基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡及组间等位基因频率的差异比较采用 χ^2 检验。计量资料均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组间比较采用两样本 t 检验。所有统计资料均为双侧概率检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。非正态分布数据转化为对数后处理。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 溶点曲线及结果分析 见图 1。

2.2 MTHFR 基因多态性与 II b 型高血脂症的关联性分析 健康对照组的 CC、CT 及 TT 基因型频率分别为 38.7%、38.7%、22.6%, 其分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$); II b 型高血脂症组分别为 20.8%、47.5%、31.7%, 其 CT、TT 基因型频率明显高于健康对照组 ($\chi^2 = 6.597, P = 0.01$), 携带 CT、TT 个体发病风险是 CC 基因型的 2.4 倍 (95%CI: 1.216 1~4.685)。见表 1。

2.3 II b 型高血脂症组与健康对照组血脂水平比较 II b 型高血脂症组的血清 TG、TC、LDL-C、HCY 水平明显高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); HDL-C 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

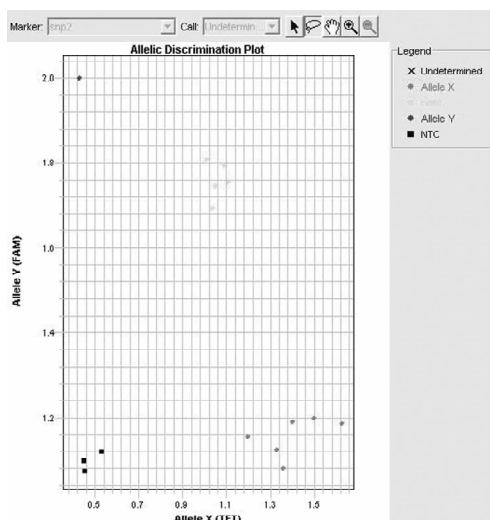
2.4 MTHFR C677T 的 CT、CC、TT 基因型测序结果 见图 2~4。

表 1 MTHFR C677T 基因型和等位基因在 2 组的频率分布及与 II b 型高血脂症风险的关联性

基因类型	Ⅱ b 型高脂血症[n(%)]	健康对照[n(%)]	P 值	OR 值	95%CI
CC 基因型	21(20.8)	58(38.7)	0.010	0.419	0.213~0.822
CT 基因型	48(47.5)	58(38.7)	0.234	1.450	0.811~2.593
TT 基因型	32(31.7)	34(22.6)	0.181	1.558	0.819~2.961
C 等位基因	90(44.6)	174(58.0)	0.012	0.587	0.389~0.885
T 等位基因	112(55.4)	126(42.0)	0.011	1.703	1.130~2.568

表 2 2 组 TC、TG、HDL-C、LDL-C、HCY 水平结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HCY (μmol/L)
Ⅱ b 型高血脂症组	101	7.40±0.3	2.23±1.28	1.41±0.33	4.06±0.72	14.2
健康对照组	150	4.20±0.4	1.28±1.03	1.21±0.34	2.40±0.57	9.8



注:横坐标为 TET 信号强度,纵坐标为 FAM 信号强度。NTC 为 No Template Control,黑点为空白对照。Undetermined 为无法识别,红色点为 AlleleX 纯合子,蓝色点为 AlleleY 纯合子,绿色点为杂合子。

图 1 荧光定量 PCR 溶点曲线

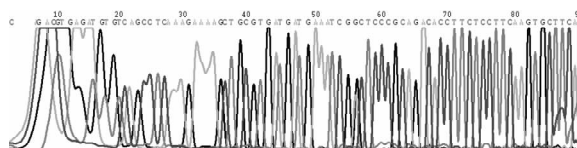


图 2 CT 基因型测序结果

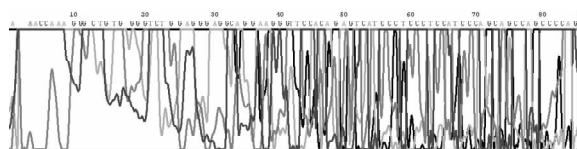


图 3 CC 基因型测序结果

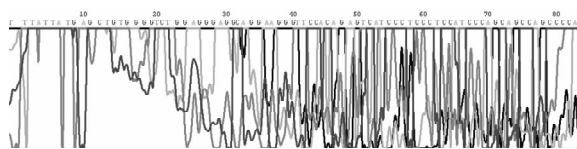


图 4 TT 基因型测序结果

3 讨 论

II b 型高血脂症是常见的代谢和内分泌疾病之一,主要是血清中 TC、TG 和 LDL-C 水平升高,此时血管内皮细胞对 LDL-C 的通透性增加,胆固醇聚集于血管内膜,脂质沉淀,引起动脉粥样硬化、冠心病等心血管疾病的发生^[2-4]。该病的病

因既有遗传易感性的因素,也有环境因素作用的结果。随着人类基因组计划(human genome project, HGP)的实施和完成,该病与基因多态性的相关性也越来越受到关注。

MTHFR 主要存在于肝脏中,是叶酸-甲硫氨酸和血浆同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)代谢中的 1 个关键酶,催化 5,10-亚甲基叶酸还原成 5-甲基四氢叶酸,提供 1 个碳单位参与 HCY 甲基化,是体内最主要的甲基供体,与体内嘌呤、嘧啶的合成有关^[5-7]。因此,它既维持体内正常的 HCY 水平,也影响正常 DNA 的代谢^[8]。

人 MTHFR 基因定位于 1p36.3, 全长 17 kb, 由 11 个外显子组成。1995 年, Frosst 等首次发现了 MTHFR C677T 突变位点, 属常染色体隐性遗传, 具有遗传多态性。C677T 有 3 种基因型, 即 TT 型、TC 型、CC 型。MTHFR 基因 C677T 位于 MTHFR 与叶酸的结合区, 此突变使第 677 位点的丙氨酸被缬氨酸取代, 导致酶活性降低^[9-10]。由于不同基因型热敏感性的差异, 杂合子基因突变使 MTHFR 酶活性降至正常的 75% 以下, 而 T 纯合子基因突变使酶活性下降更明显。II b 型高血脂组 CT、TT 基因型频率明显高于健康对照组 ($\chi^2 = 6.597$, $P = 0.01$), 携带 CT、TT 个体发病风险是 CC 基因型的 2.4 倍 (95%CI: 1.216 1 ~ 4.685)。T 等位基因频率的增加造成了 MTHFR 酶活性的降低, 影响了 DNA、RNA 的合成及 DNA 的甲基化, 致血液中 HCY 富集, 形成 N-同型半胱氨酸化 LDL-C, 最后导致 II b 型高血脂症的发生^[11]。由此推测, MTHFR 基因 C677T 基因多态性与 II b 型高血脂症发生风险相关联, HCY 水平的改变增加 II b 型高血脂症发病的危险性。另外, 其他研究已证实, T 纯合型是心血管疾病的风险因子, 它的突变与 CHD 发病以及冠状动脉病变程度有关。

参考文献

- [1] 罗丹, 鄢盛恺. 2 型糖尿病合并冠心病患者的同型半胱氨酸水平及代谢关键酶基因多态性特点[J]. 卫生研究, 2009, 38(1): 39-42.
- [2] Posey DL, Khoury MJ, Mulinare J, et al. Is mutated MTHFR a risk factor for neural tube defects[J]. Lancet, 1996, 347(8): 338-339.
- [3] Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. Beneficial effects of cholesterol lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 1995, 32(6) 160-162.
- [4] 鄢盛恺, 周新, 哈黛文. 聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测载脂蛋白 E 基因型[J]. 中华检验医学杂志, 1997, 20(1): 28-31.
- [5] Weinbaum S, Chien S. Lipid transport aspects(下转第 43 页)

(上接第 41 页)

- of atherogenesis[J]. ASME J Biomech Eng, 1993, 115(7):602-610.
- [6] Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review [J]. Am J Epidemiology, 2004, 159(5):423-443.
- [7] Cicek MS, Nock NL, Li L, et al. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotypes and haplotypes and prostate cancer risk and aggressiveness[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(18):1331-1336.
- [8] Prasmusinto D, Skrablin S, Hofstater C, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T polymorphism and preeclampsia in two populations [J]. Obstet Gynecol,

2002, 99(6):1085-1092.

- [9] Andrcassi MG, Botto N, Cocci F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene 677 C-T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and damage in coronary artery disease[J]. Hum Genet, 2003, 112(2):171-177.
- [10] Morita H, Taguchi J, Kurihara H, et al. Genetic polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease[J]. Circulation, 1997, 95(10):2032-2036.
- [11] Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(4):470-487.

(收稿日期:2010-02-01)