

• 基础实验研究论著 •

桂东南地区 2 型糖尿病肾病与 MTHFR 基因 C677T 多态性的相关性

刘康海^{1,2}, 庞大志¹, 邹超世¹, 吴世凤¹, 张 萍¹, 曾麒燕^{2△}

(1. 广西玉林市第一人民医院, 广西玉林 537000; 2. 广西医科大学

生物化学与分子生物学教研室, 广西南宁 530021)

摘要:目的 研究亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性与 2 型糖尿病肾病(DN)的关系。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性的方法,检测桂东南地区 2 型糖尿病患者 163 例 MTHFR 基因 C677T 多态性,其中 DN 82 例、单纯糖尿病(DM)81 例和健康对照组(CON)77 例。同时检测血清同型半胱氨酸(Hcy)水平,并比较各组间 MTHFR 基因型频率、等位基因频率和 Hcy 水平。结果 DN 组 MTHFR 基因纯合基因型(TT)、杂合基因型(CT)及 T 等位基因频率(分别为 4.9%、37.8% 和 23.8%)均明显高于 DM 组(分别为 2.5%、28.4% 和 16.7%)和 CON 组(分别为 0.0%、29.8% 和 14.9%),基因型和等位基因频率分布差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 DM 组和 CON 组之间的分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。单因素 Logistic 回归分析结果显示,MTHFR 基因型 C677T 多态性与 DN 的发生密切相关(OR 值及其 95%CI 分别为 1.660、1.038 和 2.655)。携带 T 等位基因患者血中 Hcy 水平显著高于未携带 T 等位基因患者,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 MTHFR 基因 C677T 多态性与桂东南地区 2 型糖尿病患者 DN 相关,MTHFR T 等位基因可能是该地区 DN 的易感基因。

关键词:糖尿病肾病; 多态现象,遗传; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 聚合酶链反应; 多态性,限制性片段长度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)13-1670-03

Relationship of C677T polymorphisms of MTHFR gene with diabetic nephropathy in southeast Guangxi

Liu Kanghai^{1,2}, Pang Dazhi¹, Zou Chaoshi¹, Wu Shifeng¹, Zhang Ping¹, Zeng Qiyann^{2△}

(1. Yulin Municipal First People's Hospital, Yulin, Guangxi 537000, China; 2. Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Naning, Guangxi 530021, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between the C677T polymorphisms of N5, N10-methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene and type 2 diabetic nephropathy(T2DN). **Methods** By using PCR-RFLP method, the C677T polymorphisms of MTHFR was analyzed in 163 cases of type 2 diabetes mellitus(T2DM), which included diabetic nephropathy(DN group, $n=82$) and diabetes without complications(DM group, $n=81$), and 77 cases of healthy people as the control group(CON). Plasma total Hcy levels were also measured for all the subjects. **Results** The frequencies of MTHFR TT and CT homogenetic type and allele T(4.9%, 37.8%, 23.8%) in the DN group were significantly higher than those in the DM(2.5%, 28.4%, 16.7%) group or the CON group(0.0%, 29.8%, 14.9%). However, there was no significant difference in MTHFR genotype and allele frequency between the DM group and the CON group. Moreover, plasma Hcy levels were markedly higher in the patients with allele TT and CT genotype than those in the patients with CC genotype, the difference showing statistical significance ($P < 0.01$). The univariate logistic regression analysis showed that the C677T polymorphism of MTHFR gene was closely associated with the development of DN. The odds ratio was 1.660 and the 95% confidence interval was 1.038 and 2.655 respectively. **Conclusion** The C677T polymorphisms of MTHFR gene is associated with T2DN in Southeast Guangxi and the allele T might be the susceptibility gene for DN.

Key words: diabetic nephropathies; polymorphism, genetic; methylenetetrahydrofolate reductase; polymerase chain reaction; polymorphism, restriction fragment length

据统计,中国是世界上糖尿病患者最多的国家,糖尿病患者中,以 2 型糖尿病为主,占糖尿病的 90% 以上。糖尿病肾病(DN)是糖尿病常见的慢性血管并发症之一,是终末期肾病的首要原因,逐步进展为肾功能衰竭,对患者的生命和生活质量威胁极大^[1]。DN 的病因及发病机制十分复杂,涉及到遗传、代谢、生长因子、细胞因子、血液动力学改变、环境等多种因素。研究表明,DN 是一种多基因遗传异质性疾病,遗传因素可通过影响肾脏对环境因素的反应性来增加其易感性,其在 DN 发生中的作用不可忽视,同时与人群的种族和地域有关。为了解桂东南地区 DN 患者 MTHFR 基因多态性与 DN 的相关性,为本地区单纯糖尿病(DM)人群通过筛选达到早期干预、减少或延缓 DN 的发生提供理论依据,也为进一步研究 DN 的发生、发展提供研究方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按 1999 年 WHO 的糖尿病诊断和分型标准,

选择桂东南地区 2012 年 7 月至 2013 年 1 月在广西玉林市第一人民医院内分泌科住院的 2 型 DN 患者 82 例(DN 组),尿清蛋白排泄率(UAER) > 30 mg/d; DM 患者 81 例(DM 组),尿清蛋白排泄率(UAER) < 30 mg/d; 同时排除其他疾病引起的蛋白尿。同期体检中心健康体检者 77 例作为对照组(CON 组)。

1.2 方法

1.2.1 血液基因组 DNA 提取和 PCR 反应 入选的病例,全部空腹抽取静脉血 2 mL, EDTA 抗凝,进行血液基因组 DNA 的提取,严格按说明书操作(上海生工提供 DNA 提取试剂盒)。引物参照文献[2]设计,上游引物:5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3',下游引物:5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'; PCR 反应总体积 25 μ L, 含基因组 DNA 2 μ L, 各引物 20 pmol, MgSO₄ 1 mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, Taq 酶 1 U。反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 8 min, 变性 94

℃ 1 min,退火 63 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,共 35 个循环;终末延伸 72 ℃ 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳凝胶成像系统鉴定。

1.2.2 Hcy 检测 对纳入研究者空腹抽取静脉血 3 mL,分离血清,于当天用罗氏生化分析仪酶法检测 Hcy。

1.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组定量资料均数的比较用 t 检验,计数资料用率或构成比表示,组间的比较采用 χ^2 检验进行分析。应用非条件 Logistic 回归对危险因素进行单因素分析,计算 OR 及其 95% CI。分析应用 SPSS 19.0 和 SAS 统计软件包完成。

2 结 果

2.1 各组基本特征分布 各组病例的性别、年龄分布,经统计学检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡性检验 本研究 CON 组人群基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($\chi^2=2.239, P=0.326, P>0.05$),说明达到遗传平衡,因此研究对象具有群体代表性。

2.3 MTHFR 基因型分析 MTHFR 基因扩增的片段大小为 198 bp,用限制性内切酶 Hinf I 酶切。酶切条件:PCR 产物 8 μ L, Hinf I (40 U/ μ L) 0.25 μ L, 10 \times Buffer 2 μ L, 水 9.75 μ L, 混匀,于 37 ℃ 水浴箱过夜,然后进行聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。MTHFR 基因扩增的片段经酶切后可产生 3 种基因型:正常野生型(CC 型),无酶切位点,仅见 1 条 198 bp 片段电泳带;纯合子突变型(TT 型)酶切后产生 175 bp 和 23 bp 两片段,凝胶显示 175 bp 一条带,23 bp 片段已泳出胶外;杂合子突变型(CT 型)既有 198 bp 片段,又有 175 bp 和 23 bp 片段,凝胶上显示 198 bp 和 175 bp 两条电泳带(图 1)。

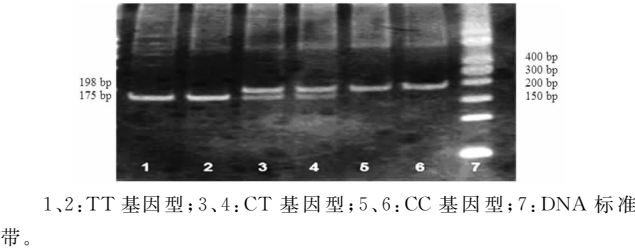


图 1 MTHFR 基因的 PCR-RFLP 分析

2.4 MTHFR PCR 扩增产物测序及比对 选取上述 3 种不同基因型样本的 PCR 扩增产物送测序,测序结果进行 BLAST 比对,结果见图 2~4。

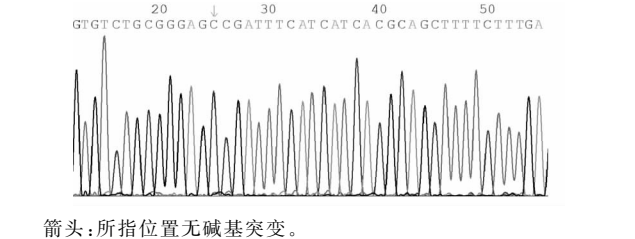


图 2 MTHFR C677T 基因 PCR 产物正常野生型 (CC 型) 测序图

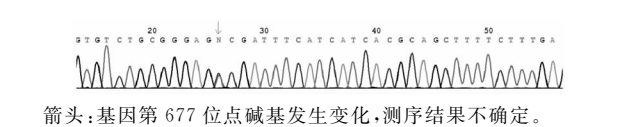


图 3 MTHFR C677T 基因 PCR 产物杂合子 (CT 型) 突变测序图

2.5 MTHFR 基因 C667T 基因型频率和等位基因频率比较

DN 组与 CON 组比较, MTHFR 基因 C677T 基因型频率和 T 等位基因频率分布差异均有统计学意义($P<0.05$); DM 组与 CON 组比较两者差异均无统计学意义($P>0.05$), 结果见表 1。单因素 Logistic 回归分析结果显示, MTHFR 基因型与 DN 之间差异有统计学意义($P<0.05$), 但从分析结果中并未发现 TT 为 DN 的危险基因型, 这可能与 TT 基因型的样本量不够大有关。MTHFR T 等位基因与 DN 有关联, 携带 MTHFR T 等位基因的 T2DM 患者发生 DN 的危险性是 C 等位基因患者的 1.660 倍, 结果见表 2。

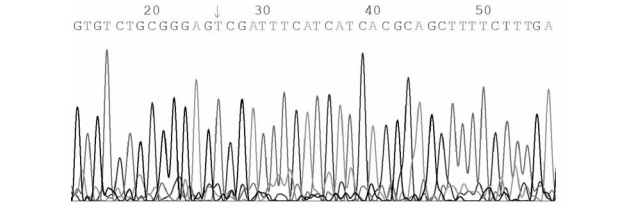


图 4 MTHFR C677T 基因 PCR 产物纯合子突变 (TT 型) 测序图

| 表 1 MTHFR C677T 基因型和基因型频率及比较结果[n(%)] | | | | | |
|--------------------------------------|----|-----------|----------|---------|---------------------|
| 组别 | n | MTHFR 基因型 | | | MTHFR 等位基因 |
| | | CC | CT | TT | C T |
| DN | 82 | 47(57.3) | 31(37.8) | 4(4.9)★ | 125(76.2) 39(23.8)★ |
| DM | 81 | 56(69.1) | 23(28.4) | 2(2.5)▲ | 135(83.3) 27(16.7)▲ |
| CON | 77 | 54(70.1) | 23(29.8) | 0 | 131(85.1) 23(14.9) |

★: $P<0.05$; ▲: $P>0.05$, 与 CON 组比较。

| 表 2 MTHFR 基因 C677T 及其等位基因与 DN 关系 Logistic 回归分析结果 | | | | | |
|--|---------|---------|----------|---------|---------------------|
| 项目 | β | SE | χ^2 | P | OR(95%CI) |
| MTHFR 基因型 | | | | | |
| CC | — | — | — | — | 1.000 |
| CT | 0.455 7 | 0.290 5 | 2.461 3 | 0.116 7 | 1.577(0.893~2.787) |
| TT | 1.543 5 | 0.883 4 | 3.052 8 | 0.080 6 | 4.681(0.829~26.440) |
| 基因型(1=CC, 2=CT, 3=TT) | 0.547 3 | 0.251 9 | 4.722 7 | 0.029 8 | 1.729(1.055~2.832) |
| 等位基因(0=C, 1=T) | 0.506 7 | 0.239 6 | 4.473 7 | 0.034 4 | 1.660(1.038~2.655) |

—: 无数据。

2.3 携带不同等位基因患者血中 Hcy 水平比较 携带 T 等位基因患者与未携带 T 等位基因患者比较, 血中 Hcy 水平差异有统计学意义($t=9.346, P=0.003<0.01$), 结果见表 3。

| 表 3 携带 T 与未携带 T 等位基因患者生化指标结果及比较($\bar{x} \pm s$) | | |
|--|-----|-------------------|
| 基因型 | n | Hcy(μ mol/L) |
| CC | 103 | 13.09 \pm 3.22 |
| CT+TT | 60 | 15.57 \pm 5.41 |

3 讨 论

MTHFR 基因位于 1 号染色体(1p36.3)。人体内的 Hcy 通过 S-腺苷蛋氨酸代谢过程产生, 而 MTHFR 是该代谢过程

的限速酶,因此 MTHFR 酶活性降低将引起血中同型半胱氨酸(Hcy)水平升高。目前认为,高 Hcy 血症是糖尿病微血管并发症的危险因素,高 Hcy 血症造成肾血管的损伤而导致肾病临床进展加速。

MTHFR 基因具有多态性,其主要类型是 C677T,即 MTHFR 基因的 677 位碱 T 替换了碱基 C,其编码的氨基酸也由缬氨酸(GUU)代替了丙氨酸(GCU)。MTHFR 基因 C677T 含有一个限制性内切酶 Hinf I 位点,经酶切后可产生 3 种基因型,即正常野生型(CC 型)、杂合子型(CT 型)和纯合子型(TT 型)。

MTHFR 基因突变,其结构和功能相应发生改变,从而影响同型半胱氨酸的代谢。研究表明^[3],MTHFR 基因 C677T 对热敏感,MTHFR 杂合子(CT 型)酶活性为野生型的 65%,而纯合子酶(TT 型)活性仅为野生型(CC 型)的 30%~50%,因而纯合子酶活性较低,导致 Hcy 浓度较杂合子及野生型明显升高。可见,MTHFR 基因 C677T 单核苷酸多态性是否与 DN 关联,是通过提高血中的 Hcy 水平来起作用的。

有研究结果^[4]显示,在中国汉族 2 型 DM 人群中,MTHFR 基因与 DN 之间差异有统计学意义,携带 T 等位基因的 DM 者发生 DN 的危险性高于无此等位基因的患者($OR=1.97,95\%CI:1.71\sim2.28$)。MTHFR 基因 T 等位基因是其并发肾病的一个危险因素。MTHFR 基因 C677T 突变可能是加重糖尿病肾微血管损伤,加速 DN 发展的遗传因素,MTHFR 基因 T 等位基因可能是 DN 发生的易感基因。国外的部分研究也得到相似的结论^[5-9]。但是,与此相反,也有人认为 MTHFR 基因 C677T 的 T 等位基因与 DN 无关,或者其仅在 DN 的发展恶化中起一定的作用^[10-11]。这些结果说明 MTHFR 基因 C677T 多态性与 DN 的相关性在人类的不同种族、不同地区间有差异。

本研究对桂东南地区 163 例 2 型 DM 患者进行研究,DN、DM、CON 组的 MTHFR T 等位基因频率分别为 23.8%、16.7%和 14.9%,DN 组与 CON 组比较,MTHFR 基因 C677T 基因型频率分布和 T 等位基因频率差异均有统计学意义($P<0.05$);DN、DM、CON 组结果表明,MTHFR 基因 C677T 多态性与桂东南地区 2 型 DN 相关。

经单因素 Logistic 回归分析,MTHFR T 等位基因与 DN 有关联,携带 MTHFR T 等位基因的 2 型 DM 患者发生 DN 的危险性是 C 等位基因患者的 1.660 倍($P=0.0344,OR=1.660,95\%CI:1.038\sim2.655$),说明,MTHFR 基因 C677T 基因型也与 DN 有关联($P<0.05$),MTHFR T 等位基因可能是 DN 的易感基因。但本研究未能证实 TT 是 DN 的危险基因型,这可能与 TT 基因型的样本量不够大有关。

本研究还分析了 T 等位基因的携带与血中 Hcy 含量的关系,结果表明携带 MTHFR T 等位基因的患者血中 Hcy 水平明显升高($P<0.05$),进一步证实 MTHFR 基因 C677T 单核苷酸多态性与 DN 关联,是通过提高血中的 Hcy 水平来起作用的。

DN 作为糖尿病全身性微血管病变的一部分,从遗传学的角度进行 MTHFR 基因多态性与 DN 关系研究;因 MTHFR 基因 C677T 导致的高同型半胱氨酸血症,促进 DN 的发生、发展,从而对 DM 患者进行 MTHFR 检测和筛选;应用叶酸、维生素 B₆、维生素 B₁₂ 治疗降低血浆 Hcy 水平^[12],实施防止 DN 的发生、延缓其进展的干预性治疗等提出了新的思路和方法。

本次研究仅从一个侧面初步探讨了 MTHFR 基因多态性和 DN 的关系,在后续的研究中,尚需进一步加大样本量,如能同时检测 MTHFR 基因上的其他突变位点,同时更深入考虑高血糖、高血压、高脂血症、吸烟等传统性危险因素的作用,以及民族、人种等差异,将对进一步分析探索 MTHFR 基因多态性与 2 型 DN 的关系有更大的帮助,从而为寻找 DN 治疗方法,在 DN 不同阶段采取更有针对性的治疗措施提供依据。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南[M]. 北京: 北京大学医学出版社,2010:1.
- [2] Sun J, Xu Y, Xue J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005,229(1/2):95-101.
- [3] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease; a common mutation in methylenetetrahydrofolic acid reductase[J]. Nat Genet, 1995,10(2):111-113.
- [4] Cui WP, Du B, Jia Y, et al. Is C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for diabetic nephropathy or diabetes mellitus in a Chinese population? [J]. Arch Med Res, 2012,43(1):42-50.
- [5] Kumar R, Sharma RK, Agarwal S, et al. Genetic predisposition for development of nephropathy in type 2 diabetes mellitus[J]. Biochem Genet, 2013,12(6):865-875.
- [6] El-Baz R, Settini A, Ismaeel A, et al. MTHFR C677T, A1298C and ACE I/D polymorphisms as risk factors for diabetic nephropathy among type 2 diabetic patients[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2012,13(4):472-477.
- [7] Ukinc K, Ersoz HO, Karahan C, et al. ethyltetrahydrofolate reductase C677T gene mutation and hyperhomocysteinemia as a novel risk factor for diabetic nephropathy[J]. Endocr, 2009,36(2):255-261.
- [8] Rahimi M, Hasanvand A, Rahimi Z, et al. Synergistic effects of the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms on the increased risk of micro-and macro-albuminuria and progression of diabetic nephropathy among Iranians with type 2 diabetes mellitus[J]. Clin Bio Chem, 2010,43(12):1333-1339.
- [9] Jafari Y, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, et al. Interaction of eNOS polymorphism with MTHFR variants increase the risk of diabetic nephropathy and its progression in type 2 diabetes mellitus patients[J]. Mol Cell Biochem, 2011,353(1):23-34.
- [10] Sireesha M, Ravindra VA, Venkatasubramanian S, et al. Association of Methylene Tetrahydrofolate Reductase C677T Genotype With Type 2 Diabetes Mellitus Patients With and Without Renal Complications[J]. Genet Test Mol Biomark, 2011,5(4):257-261.
- [11] Nemr R, Salman R, Lamees H, et al. Differential contribution of MTHFR C677T variant to the risk of diabetic nephropathy in Lebanese and Bahraini Arabs[J]. Clin Chem Lab Med, 2010,48(8):1091-1094.
- [12] Messika AH, Kaluski DN, Lev E, et al. Nutritional impact of daily folate intake on plasma homocysteine and folate levels in patients with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes[J]. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2010,17(6):701-705.