

# 血浆同型半胱氨酸水平及亚甲基四氢叶酸还原酶基因突变与脑卒中关系的病例对照研究

叶辉 严江涛 邵娇梅 张帆 洪茂林 汪道文

**【摘要】** 目的 探讨中国人脑卒中与血浆同型半胱氨酸(Hcy)水平及 N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> 亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因突变的关系。方法 收集脑卒中患者 300 例为病例组,选择 300 名性别、年龄和种族等与病例组相匹配的无脑卒中者作为对照组,采用高效液相色谱的方法检测两组的血浆 Hcy 水平,并通过聚合酶链反应和限制性酶切的方法对其 MTHFR C677T 基因型进行鉴定,统计分析血浆 Hcy 水平与脑卒中的关系,以及 MTHFR C677T 基因突变与脑卒中发生的关系及其对血浆 Hcy 水平的影响。结果 脑卒中组血浆 Hcy 水平显著高于对照组[(16.92 ± 3.43) μmol/L vs. (14.57 ± 2.59) μmol/L, P < 0.05]; MTHFR C677T 基因突变率在脑卒中组与对照组之间差异无统计学意义(P > 0.05),在脑溢血和脑梗死组之间差异也无统计学意义(P > 0.05); MTHFR C677T 基因变异对血浆 Hcy 水平无明显影响[(15.28 ± 2.17) μmol/L vs. (15.11 ± 3.81) μmol/L, P > 0.05]。结论 血浆 Hcy 水平升高在中国人脑卒中的发生中起着重要的作用,而 Hcy 代谢过程中的关键酶 MTHFR 基因的 C677T 突变与血浆 Hcy 水平无明显关系,而且与脑卒中的发生无相关性,因此控制血浆 Hcy 水平在预防心脑血管疾病的发生中有重要意义。

**【关键词】** 脑卒中; 同型半胱氨酸; 亚甲基四氢叶酸还原酶

**A case-control study on the relationship between stroke and plasma homocysteine level and the mutation of MTHFR gene** YE Hui, YAN Jiang-tao, SHAO Jiao-mei, ZHANG Fan, HONG Mao-lin, WANG Dao-wen. Department of Internal Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WANG Dao-wen, Email: dwwang@tjh.tjmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To study the relationship of stroke and plasma homocysteine (Hcy) level and the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. **Methods** Three hundred patients with stroke were included as the case group in this study while 300 subjects without stroke matched with the case group for sex and age were collected as the control group. Plasma Hcy level was measured using HPLC and MTHFR 667 C → T mutant was determined by polymerase chain reaction and restriction fragment analysis. The relationship of stroke and plasma Hcy level and the mutation of MTHFR gene was then analysed. **Results** The plasma Hcy level of the case group was significantly higher than that of the control group (16.92 ± 3.43 μmol/L vs. 14.57 ± 2.59 μmol/L, P < 0.05). There was no significant difference in mutation rate of MTHFR C677T between stroke group and control group (P > 0.05), as well as between ischemic stroke group and hemorrhagic stroke group (P > 0.05). The mutation of MTHFR C677T had no significant influence on the Hcy level (15.28 ± 2.17 μmol/L vs. 15.11 ± 3.81 μmol/L, P > 0.05). **Conclusion** Increased plasma Hcy level played an important role in the occurrence of stroke in Chinese people, and the mutation of MTHFR C677T was not associated with Hcy level or stroke which led to the speculation that plasma Hcy level was important in the prevention of cardio-cerebro-vascular diseases among Chinese people.

**【Key words】** Stroke; Homocysteine; Methylenetetrahydrofolate reductase

基金项目:国家“973”重大基础研究基金资助项目(G2000056901)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科

通信作者:汪道文, Email: dwwang@tjh.tjmu.edu.cn

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是一种含硫氨基酸, 来源于蛋氨酸代谢途径的中间产物<sup>[1]</sup>。遗传因素和环境因素可引起血浆 Hcy 水平的升高, 前者主要见于 Hcy 代谢酶的异常, 如胱硫醚  $\beta$  合成酶 (CBS) 和 N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> 亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 基因异常, 如 MTHFR 667C $\rightarrow$ T 的基因多态性<sup>[2-4]</sup>, 后者见于生活习惯、营养状况以及疾病和药物的影响<sup>[5]</sup>。国外资料显示, 升高的血浆 Hcy 水平是心脑血管疾病发生的独立危险因素<sup>[6]</sup>, 然而中国人的有关脑卒中与血浆 Hcy 水平的研究还鲜有报道, 特别是大样本多因素分析的研究, 因此我们对 300 对脑卒中病例与对照的血浆 Hcy 水平进行了检测并对其 MTHFR 基因型进行分析, 从而探讨中国人脑卒中与血浆 Hcy 水平及 MTHFR 基因突变的关系。

## 对象与方法

### 一、研究人群

1. 病例组来源: 从 2000 年 12 月至 2002 年 6 月在武汉同济医院等 6 家医疗单位连续收集脑卒中病例 300 例, 其中脑溢血患者 100 例, 脑梗死患者 200 例, 入选标准依据 1995 年脑血管疾病分类及诊断标准<sup>[7]</sup>, 仅收集动脉粥样硬化性脑梗死、腔隙性脑梗死及高血压脑出血病例, 所有病例均经 CT 或核磁共振确诊, 不包括出血性脑梗死及无症状腔隙性脑梗死。非血管性脑卒中、先天性和后天性心脏病 (心肌梗死除外)、脑血管畸形、创伤及或血管夹层引起的血管损伤、感染、代谢性疾病 (糖尿病除外)、胶原性疾病和脑肿瘤患者被排除在外。

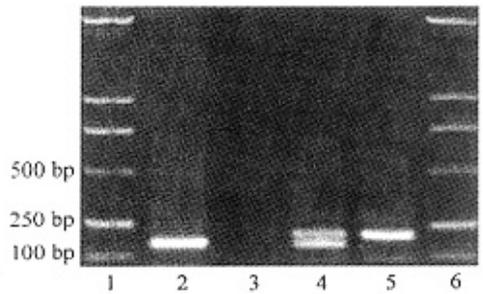
2. 对照来源与标准: 本研究所选对照为未患脑卒中的健康人或医院内其他与脑血管疾病无关的患者, 其性别、种族、居住地与病例相匹配, 年龄差别在 ( $\pm 5$ ) 岁内。在本研究中患有心脏病、感染、胶原病、自身免疫性疾病、肿瘤以及严重的慢性疾病 (如肝硬化、肾功能衰竭等) 被排除在外。

### 二、方法

1. 血浆 Hcy 水平的测定: 采集空腹静脉血 5 ml, EDTA 抗凝, 3000 r/min 离心 15 min, 分离血浆,

-80℃ 保存备用。通过高效液相色谱的方法检测血浆 Hcy 浓度<sup>[8]</sup>。

2. 四氢叶酸还原酶基因 C677T 变异的检测: 分离血浆中的白细胞, 采用酚/氯仿抽提的方法提取白细胞中的 DNA。应用紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 置于 -80℃ 保存备用。取所提取出来的 DNA 作聚合酶链反应 (PCR) 扩增 (上游引物: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTCGGGA-3', 下游引物: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3')。经 PCR 扩增出 198 个碱基对的片段。将反应产物用限制性内切酶 Hinf 酶切消化, 消化产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳。野生型纯合子 CC 基因型不含 Hinf 限制性内切酶的靶序列, 因此形成 198 bp 的条带, TT 型突变纯合子由于两条等位基因均含 Hinf 内切酶序列, 从而酶切形成 152 bp 条带, 突变杂合子 CT 型则形成 152 bp 和 198 bp 两个条带 (图 1)。



1: 2000 bp Marker; 2: MTHFR 基因 677TT 型 152 bp 条带; 3: 阴性对照; 4: MTHFR 基因 677CT 型, 152 bp 条带及 198 bp 条带; 5: MTHFR 基因 677CC 型, 198 bp 条带; 6: 2000 bp Marker

图 1 PCR 产物 MTHFR 基因 C677T 多态性的结果

3. 统计学分析: 本研究采用 SAS 统计软件, 数值变量用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异用  $t$  检验, 计数资料和率的比较用  $\chi^2$  检验。

## 结果

1. 人群特点: 脑卒中组血浆 Hcy 水平显著高于对照组 [(16.92  $\pm$  3.43)  $\mu$ mol/L vs. (14.57  $\pm$  2.59)  $\mu$ mol/L,  $P < 0.05$ ], 提示血浆 Hcy 水平升高与脑卒中的发生有关 (表 1)。

表 1 病例组与对照组基本情况

组别	例数	性 别		年 龄 (岁, $\bar{x} \pm s$ )	高血压史 (%)	高血脂史 (%)	糖尿病史 (%)	血浆 Hcy 水平 ( $\mu$ mol/L, $\bar{x} \pm s$ )
		男	女					
脑卒中组	300	200	100	62 $\pm$ 9	63.00	22.00	11.70	16.92 $\pm$ 3.43
对照组	300	200	100	63 $\pm$ 8	41.00	28.00	5.00	14.57 $\pm$ 2.59
P 值		>0.05		>0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05

2. MTHFR 基因 C677T 多态性与脑卒中患者关系: 病例组 MTHFR C677T 型 84 例, 27 例 677TT 型, 其基因 C677T 突变率为 37%, MTHFR 677T 基因频率为 23%, 在对照组有 87 例 C677T 基因型, 21 例 677TT 型, 其基因 C677T 突变率为 36%, 677T 基因频率为 22%, 脑卒中组与对照组比较, C677T 突变率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。在脑梗死组有 MTHFR 基因 C677T 型 54 例, 677TT 型 14 例, 其基因突变率为 34%, 677T 基因频率为 21%。脑溢血组 MTHFR 基因 C677T 型 27 例, 677TT 型 10 例, 其基因突变率为 37%, 677T 基因频率为 24%, 两组基因突变率比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。

表2 MTHFR 基因 C677T 多态性情况

组别	基因型			基因频率 (%)	
	CC	CT	TT	C	T
病例组	189	84	27	77	23
脑梗死	132	54	14	79	21
脑溢血	63	27	10	76	24
对照组	192	87	21	78	22

3. MTHFR 基因 C677T 多态性与血浆 Hcy 水平的关系: 将人群按 MTHFR 基因 C677T 多态性分为两组, CC 基因型组和 TT 与 CT 基因型组, 比较两组之间血浆 Hcy 水平。结果发现: CC 基因型组血浆 Hcy 为 6.42~82.99  $\mu\text{mol/L}$ , 平均 (15.28  $\pm$  2.17)  $\mu\text{mol/L}$ , TT 与 CT 基因型组血浆 Hcy 为 5.20~117.23  $\mu\text{mol/L}$ , 平均 (15.11  $\pm$  3.81)  $\mu\text{mol/L}$ , 两组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 讨 论

高 Hcy 水平升高是心脑血管疾病发生的独立危险因素, Boushey 等<sup>[6]</sup>通过对已有的流行病学资料总结分析发现, 血浆 Hcy 水平每增加 5  $\mu\text{mol/L}$  可能使冠心病发生的危险增加 60%~80%, 使脑血管疾病发生的危险增加 50%, 这一危险程度与胆固醇水平增加 20 mg/dl 相当。本研究对 300 对脑卒中病例对照研究发现, 血浆 Hcy 水平在脑卒中组显著升高, 显示血浆 Hcy 水平与脑卒中的发生相关, 由此可见血浆 Hcy 水平升高在国人脑卒中的发生中起着重要作用。实验研究发现 Hcy 可以直接或间接导致血管内皮细胞损伤<sup>[9]</sup>, 促进血管平滑肌细胞增殖<sup>[10]</sup>, 影响低密度脂蛋白的氧化<sup>[11]</sup>, 增强血小板功能<sup>[12]</sup>, 增强组织因子和 V 因子的活性, 促进血栓

形成, 抑制凝血酶调制素-蛋白 C 途径和肝素样葡萄糖胺聚糖-抗凝血酶 III 反应途径抗凝机制<sup>[12-16]</sup>, 并且与血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1 和纤溶酶原激活物抗原<sup>[17]</sup>等抑制纤维蛋白溶解机制的物质升高有关, 从而使心脑血管疾病发生的危险性增高。

$N^5N^{10}$ MTHFR 在 Hcy 代谢中起着重要的作用, Frosst 等<sup>[18]</sup>于 1995 年描述了 MTHFR 基因 C677T 的变异, 有研究证实这种变异可使血浆 Hcy 的水平增高。然而本研究显示, MTHFR C677T 的变异似乎对血浆 Hcy 水平无明显影响, 而且这一基因多态性与中国人脑卒中的发生无明显关系。血浆 Hcy 水平受到多种因素的影响, 主要为环境因素和遗传因素, Jacques 等<sup>[19]</sup>通过对 365 名研究对象的研究发现, 血浆叶酸在低于 15.4 nmol/L 水平时, MTHFR 基因突变组的血浆 Hcy 水平明显高于正常基因型组, 而在叶酸水平高于 15.4 nmol/L 时, 两组之间差异无统计学意义, 因而提示 MTHFR 基因突变时, 需要更多的叶酸水平来调节体内 Hcy 的代谢, 从而维持其在体内的平衡, 这在另一方面也说明对于 MTHFR 基因突变者, 可通过代偿性的叶酸摄入来防止 Hcy 水平提高。因为血浆 Hcy 受到环境因素和遗传因素的共同作用, 所以单纯的 MTHFR C677T 变异对脑卒中的发生所起的作用可能不大, 国外研究也有相似的结果。Salooja 等<sup>[20]</sup>研究 271 例经 CT 证实的脑血管病患者和 173 名对照, MTHFR C677T 突变两组差别无统计学意义。Lalouschek 等<sup>[21]</sup>对比了 96 例脑卒中患者, 96 名年龄、性别匹配的对照组, 发现病例组血浆 Hcy 水平明显高于对照组, 但 MTHFR C677T 突变差异无统计学意义。

总之, 我们通过对脑卒中病例对照研究发现, 血浆 Hcy 水平升高在国人脑卒中的发生中起着重要的作用, 而 Hcy 代谢过程中的关键酶 MTHFR 基因的 C677T 突变与血浆 Hcy 水平无明显关系, 从而与脑卒中的发生无相关性, 因此控制血浆 Hcy 水平在预防心脑血管疾病的发生中有重要意义, 补充叶酸可能是降低 Hcy 水平的重要手段。

## 参 考 文 献

- 1 Durand P, Prost M, Loreau N, et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest*, 2001, 81: 645-672.
- 2 Lievers KJ, Kluijtmans LA, Heil SG, et al. A 31 bp VNTR in the cystathionine beta-synthase (CBS) gene is associated with reduced

- CBS activity and elevated post-load homocysteine levels. *Eur J Hum Genet*, 2001,9:583-589.
- 3 Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost*, 1997,78:523-526.
  - 4 Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, et al. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997,17:569-573.
  - 5 Schwaninger M, Ringleb P, Winter R, et al. Elevated plasma concentrations of homocysteine in antiepileptic drug treatment. *Epilepsia*, 1999,40:345-350.
  - 6 Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn BS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA*, 1995,274:1049-1057.
  - 7 中华神经学会, 中华神经外科学会. 脑血管疾病分类(1995). *中华神经外科杂志*, 1997,13:2.
  - 8 余意君, 邵娇梅, 张帆, 等. 血浆同型半胱氨酸高效液相色谱法测定. *临床内科杂志*, 2003,20:324-326.
  - 9 Blundell G, Jones BG, Rose FA, et al. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Arteriosclerosis*, 1996,122:201-216.
  - 10 田青平, 刘乃奎, 汤键, 等. 同型半胱氨酸促进平滑肌细胞增殖的信号传递途径. *中华医学杂志*, 2000,80:152-154.
  - 11 Sparrow CP, Olszewski J. Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions. *J Lipid Res*, 1993,34:1219-1228.
  - 12 Stamlen JS, Osborn JA. Adverse affects of homocysteine are modulated by endothelium derived relaxing factor and related oxides of Nitrogen. *J Clin Invest*, 1993,91:308-318.
  - 13 Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, et al. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb*, 1993,13:1327-1333.
  - 14 Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest*, 1986,77:1909-1916.
  - 15 Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest*, 1991,88:1906-1914.
  - 16 Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest*, 1993,92:1381-1386.
  - 17 Tofler GH, D'Agostino RB, Jacques PF, et al. Association between increased homocysteine levels and impaired fibrinolytic potential: potential mechanism for cardiovascular risk. *Thromb Haemost*, 2002,88:799-804.
  - 18 Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase[letter]. *Nat Genet*, 1995,10:111-113.
  - 19 Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 1996,93:7-9.
  - 20 Salooja N, Catto A, Carter A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and stroke. *Clin Lab Haematol*, 1998,20:357-361.
  - 21 Lalouschek W, Aull S, Korninger L, et al. 677C to T mutation in the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and plasma homocysteine levels in patients with TIA or minor stroke. *J Neurol Sci*, 1998,155:156-162.

(收稿日期:2004-01-30)

(本文编辑:尹廉)

## · 消息 ·

## 《中国感染控制杂志》2005 年征订启事

《中国感染控制杂志》(ISSN 1671-9638, CN 43-1390/R, 邮发代号:42-203)是由国家教育部主管,中南大学主办,湘雅医院(卫生部医院感染监控管理培训基地)承办,徐秀华教授主编的国家级感染性疾病专业学术期刊。本刊向国内外公开发行,季刊,逢每季初月 15 日出版。

本刊是以感染疾病学理论、实践、科研、教学和管理为内容的实用性期刊,以普及与实用为原则,指导临床和疾病控制医师实践,为医师综合知识水平及技能水平的提高服务。读者对象为临床各科医师、护士、检验人员、医院感染监控专职人员,从事流行病、消毒灭菌等预防医学专业人员,微生物学与抗微生物治疗专业人员,以及医院管理人员。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。

每期定价 10 元,全年订价 40 元。可通过邮局征订或汇款至编辑部征订,汇款时请注明详细地址、汇款用途及征订份数。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号(湘雅医院)中国感染控制杂志编辑部

联系人:任旭芝 任南 吴安华

邮政编码:410008 电话:(0731)4327658 Email:xyncni@public.cs.hn.cn