

文章编号 1006-8147(2016)02-0093-04

论 著

## 同型半胱氨酸代谢关键酶基因多态性与单纯收缩期高血压关系的初步研究

麻仕利<sup>1</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 梁蓉<sup>3</sup>

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市泰达国际心血管病医院心内五科, 天津 300457; 3.天津市胸科医院综合病房, 天津 300222)

**摘要** 目的:探讨亚甲基-四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T、蛋氨酸合成酶还原酶(MTRR)基因 A66G、蛋氨酸合成酶(MS)基因 A2756G 3种同型半胱氨酸代谢相关酶基因多态性与单纯收缩期高血压(ISH)患者发病的关系。方法:以220例单纯收缩期高血压患者作为试验组对象,选择同期就诊的无高血压患者130例作为对照组,检测其血中同型半胱氨酸水平,并应用分子生物学方法对MTHFR C677T、MTRR A66G、MS A2756G 3个基因位点进行多态性检测。结果:(1)ISH组患者血中同型半胱氨酸水平 $[(14.81 \pm 5.88) \mu\text{mol/L}]$ 高于对照组 $[(12.71 \pm 4.32) \mu\text{mol/L}]$ ,有统计学意义( $P < 0.05$ );(2)ISH组患者MTHFR T/T及C/T基因型分布频率和T等位基因频率(分别为19.5%、60%、49.5%)均高于对照组(分别为15.4%、45.4%、38.1%)( $P < 0.05$ )。 (3)MS基因A2756G的各型基因型分布频率及等位基因频率与对照组比较差异无明显统计学意义。(4)ISH组患者MTRR基因A/G及G/G基因型分布频率和G等位基因分布频率低于对照组,但无统计学意义。结论:同型半胱氨酸对ISH的影响可能一部分是通过其关键酶基因的突变造成的;MTHFR基因C677T位点的突变可能是ISH的遗传危险因素;而MTRR基因A66G、MS基因A2756的多态性改变与ISH的发生可能无明显关系。

**关键词** 同型半胱氨酸;单纯收缩期高血压;蛋氨酸合成酶还原酶;蛋氨酸合成酶;亚甲基-四氢叶酸还原酶

中图分类号 R544.1

文献标志码 A

### Preliminary study on the relationship between the gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes and isolated systolic hypertension

MA Shi-li<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>2</sup>, LIANG Rong<sup>3</sup>

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. The Fifth Department of Cardiology, TEDA International Cardiovascular Hospital, Tianjin 300457, China; 3. General Ward, Chest Hospital of Tianjin, Tianjin 300222, China)

**Abstract Objective:** To study the relationship between the isolated systolic hypertension (ISH) and the gene polymorphisms of homocysteine (Hcy) metabolism-related enzymes. **Methods:** Two hundred and twenty patients with isolated systolic hypertension were collected as the experimental group and 130 patients without high blood pressure were recruited as the control group. The levels of homocysteine in their blood were detected and the gene polymorphisms of MTHFR C677T (methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T), MTRR A66G (methionine synthase reductase gene A66G), MS A2756G (methionine synthase gene A2756G) were tested by using the methods of molecular biology. **Results:** (1) The levels of Hcy in experimental group were higher than those in controls ( $P < 0.05$ ). (2) The T/T, T/C genotype frequency and allele T frequency of MTHFR in experimental group were significantly higher than that in controls ( $P < 0.05$ ). (3) There were no significant differences in the genotype frequency of MS among the experimental group and control group. (4) The A/G, G/G genotype frequency and allele G frequency of MTRR in experimental group were lower than that in the control group, but with no statistical significance ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** The mutation of C677T in MTHFR gene may be associated with the incidence of ISH while the MTRR A66G gene and the MS A2756G gene polymorphism may be not the correlated genes for ISH.

**Key words** homocysteine; isolated systolic hypertension; methionine synthase reductase; methionine synthase; methylenetetrahydrofolate reductase

大量研究表明,血浆中同型半胱氨酸(Hcy)水平高低与心脑血管疾病的发生关系密切,高水平的同型半胱氨酸血症是导致心脑血管疾病发生的重要独立的危险因素之一<sup>[1]</sup>。而导致血浆Hcy水平升

高的因素很多,包括遗传因素、环境因素以及二者之间的相互作用。一方面,叶酸、维生素B12等B族维生素的缺乏可引起Hcy浓度的变化,另一方面,Hcy代谢通路中的一些关键酶基因的遗传性改变,能导致其编码的相应酶蛋白活性的变化,进而影响到血浆的Hcy水平。亚甲基-四氢叶酸还原酶(MTHFR)、蛋氨酸合成酶(MS)、蛋氨酸合成酶还原

基金项目 天津市卫生局科技基金资助项目(2013KZ081)

作者简介 麻仕利(1989-),女,硕士在读,研究方向:心血管疾病;通信作者:王伟, E-mail: greatwhlm@yahoo.com。

酶(MTRR)均为 Hcy 代谢过程中的关键酶,本研究旨在探讨单纯收缩期高血压(ISH)患者以上 3 种关键酶基因的多态性与其发病的关联性。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 选取近年在我院门诊就诊的 220 例 ISH 患者为 ISH 组,选取同期就诊的 130 例无高血压患者为对照组,入选者均为北方汉族人,经流行病学问卷调查和体格检查后,按照 2013 年中国高血压防治指南制定的高血压诊断标准,并除外肝、肾、自身免疫性疾病及继发性高血压。

## 1.2 方法

1.2.1 测量血压 采用符合计量标准的台式水银柱血压计,所有入选对象至少休息 15 min 后,坐位由专业人员测量右侧肱动脉血压,取 Korotkoff 第 1 和第 5 音为收缩压(SBP)和舒张压(DBP),连续测量 3 次,每隔 2 min 测量 1 次,取 3 次平均值为个体血压值。

1.2.2 DNA 样品的制备 采用百泰克离心柱法 DP5802 提取全血 DNA。

1.2.3 血浆 Hcy 水平及其他生化指标测定 分别抽取研究对象空腹外周血 4 mL,0.5 h 内离心,分离出血浆,用荧光偏振免疫分析法检测血浆 Hcy,应用全自动生化仪检测血脂、尿酸等指标。

1.2.4 MTHFR 基因 C677T、MS 基因 A2756G、MTRR 基因 A66G 基因多态性检测(PCR-RFLP 法)

1.2.4.1 MTHFR 基因片段 PCR 扩增: MTHFR 基因 C677T 引物序列 P1,5'-CCTTGAACAGGTGGAGGC C-3';P2,5'-CAAAGAAAAGCTGCGTGAT-3'。PCR 反应条件:94℃预变性 8 min,94℃ 60 s,62℃ 60 s,72℃ 60 s,共 35 个循环,最后于 72℃再延伸 7 min (PCR 扩增仪为 Biometra Tgradient)。反应结束, MTHFR 基因扩增产物经限制性内切酶 *Hinf* 酶切,行 PAGE 凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外透射灯上显像并拍照以确定基因型。

1.2.4.2 MTRR 基因片段 PCR 扩增: MTRR 基因 A66G 引物序列 P1,5'-CAGGCAAAGGCCATCGCAG AAGACAT-3';P2,5'-CACTTCCCAACCAAAATTCT TCAAAG-3'。PCR 反应条件:94℃预变性 4 min,94℃ 60 s,60℃ 60 s,72℃ 60 s,共 35 个循环,最后于 72℃再延伸 5 min。反应结束,MTRR 基因扩增产物经限制性内切酶 *NdeI* 酶切,行凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外透射灯上显像并拍照以确定基因型。

1.2.4.3 MS 基因片段 PCR 扩增:MS 基因 A2756G 引物序列 P1,5'-CATGGAAGAATATGAAGATATTAGA C-3';P2,5'-GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA-3'。

PCR 反应条件:94℃预变性 8 min,94℃ 50 s,58℃ 60 s,72℃ 90 s,共 35 个循环,最后于 72℃再延伸 7 min。反应结束,MS 基因扩增产物经限制性内切酶 *HaeIII* 酶切,行凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外透射灯上显像并拍照以确定基因型。

1.3 统计学处理 按 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检测样本的群体代表性。基因型及基因频率比较采用 $\chi^2$ 检验。计量资料间比较采用成组资料的 *t* 检验;计数资料以  $\bar{x} \pm s$  表示;多组间样本均数的比较采用单因素方差分析;多因素分析采用 Logistic 回归分析;连锁不平衡模式(LD)及单体型分析分别采用 DataAnalyser0.34 和 Phase2.1 软件。连锁不平衡系数 ( $D'$ ) $<0.2$  被认为不具有 LD, $D'>0.5$  具有 LD, $D'>0.8$  具有强 LD, $D'=1$  处于完全 LD。使用 SPSS17.0 统计软件, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 ISH 组及对照组基本资料及相关生化指标的比较 见表 1。ISH 组与对照组一般资料比较,性别、年龄、吸烟比例均未见明显差异( $P>0.05$ ),但 ISH 组患者糖尿病的患病率(28.2%)较对照组(14.6%)明显升高,两组差异比较有统计学意义( $P<0.05$ );从表中还可以看出 ISH 组患者的同型半胱氨酸水平及超敏 C 反应蛋白(hs-CPR)水平高于对照组,两组比较有统计学意义( $P<0.05$ ),而两组患者总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、尿酸均值水平比较虽 ISH 组 $>$ 对照组,但无统计学意义( $P>0.05$ )。以是否患 ISH 为应变量,性别、年龄、同型半胱氨酸水平、糖尿病患病与否为自变量进行 Logistic 回归分析,得出同型半胱氨酸及糖尿病为其发病的危险因素。

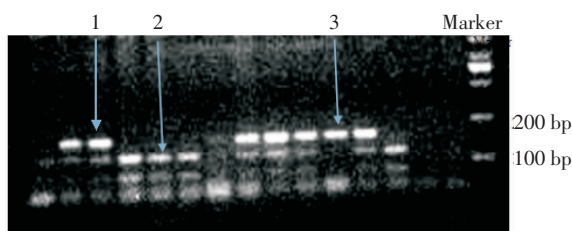
表 1 ISH 组与对照组患者的一般资料及相关生化指标比较

Tab 1 Comparison of general data and some biochemical indicators between hypertension group and control group

组别	<i>n</i>	年龄/岁	男性/例(%)	吸烟/例(%)	糖尿病/例(%)	Hcy/( $\mu$ mol/L)
ISH 组	220	62.90 $\pm$ 8.42	118(53.6)	115(52.3)	62(28.2)	14.81 $\pm$ 5.88
对照组	130	58.49 $\pm$ 8.72	75(57.7)	68(52.3)	19(14.6)	12.71 $\pm$ 4.32
<i>t</i> 或 $\chi^2$		4.64	0.54	0.00	8.45	3.51
<i>P</i>		0.95	0.46	0.99	0.004	0.37
组别	<i>n</i>	LDL/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	TG/( $\mu$ mol/L)	hs-CPR/(mg/L)	尿酸/( $\mu$ mol/L)
ISH 组	220	2.94 $\pm$ 0.99	4.47 $\pm$ 1.11	1.71 $\pm$ 1.32	3.11 $\pm$ 5.04	325.98 $\pm$ 89.08
对照组	130	2.88 $\pm$ 0.96	4.40 $\pm$ 1.22	1.44 $\pm$ 0.85	2.42 $\pm$ 3.38	297.82 $\pm$ 81.10
<i>t</i> 或 $\chi^2$		0.54	0.56	2.07	1.35	2.94
<i>P</i>		0.80	0.35	0.16	0.01	0.45

## 2.2 Hcy 3 个关键酶基因型的确定

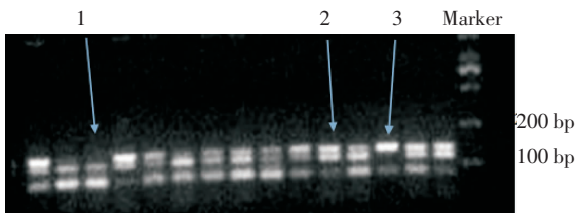
2.2.1 MTHFR 基因酶切后可产生 3 种基因型:无突变野生 C/C 型产生 195 bp 片段,突变杂合子 C/T 型产生 175 bp、130 bp、20 bp 片段,突变纯合子 T/T 型产生 130 bp 片段。MTRR 基因酶切后产生:无突变野生 AA 型 (126 bp、31 bp), 突变杂合子 AG 型 (126 bp、157 bp、31 bp) 片段,突变纯合子 GG (157 bp)。MS 基因酶切后产生:无突变野生 A/A 型 (239 bp), 突变杂合子 A/G 型 (239 bp、159 bp、80 bp), 突变纯合子 G/G 型 (130 bp)。由于 28 bp、31 bp 的条带分子量小,泳动速率快,琼脂糖凝胶电泳未显示 (图 1~3)。



1. 突变杂合子 C/T 型;2. 突变野生型 T/T;3. 无突变纯合子 C/C 型

图 1 MTHFR C677T PCR 产物酶切图

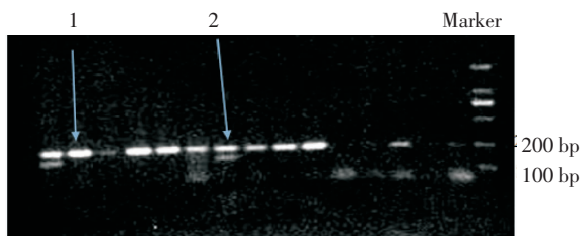
Fig 1 The enzyme digested map for MTHFR C677T PCR products



1. 无突变野生型 A/A;2. 突变杂合子 A/G 型;3. 突变纯合子 G/G 型

图 2 MTRR 基因 A66G PCR 产物酶切图

Fig 2 The enzyme digested map for MTRR A66G PCR products



1. 无突变野生型 A/A;2. 突变杂合子 A/G 型

图 3 MS 基因 A2756G PCR 产物酶切图

Fig 3 The enzyme digested map about MS A2756G products

2.2.2 本试验中,ISH 组及对照组 MTHFR 基因 C677T、MTR 基因 A66G、MS 基因 A2756G 的各种基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡检验 ( $P < 0.05$ ), 表明 ISH 组及对照组属于遗传平衡体, 有群体代表性。从表 2 中可看出 MTHFR 基因 C677T ISH 组的 C/T、T/T 基因型频率均大于对照组, 统计结果亦显示 ISH 的基因型频率分布与对照组存在差异 ( $\chi^2 = 14.487, P = 0.001 < 0.05$ ), 且 T 等位基因频率 ISH

组 > 对照组 ( $\chi^2 = 8.675, P = 0.003 < 0.05$ )。表 3 中 MTRR 基因 A66G ISH 组的 A/G、G/G 及 G 等位基因频率均低于对照组, 但由于样本量小, 统计学差异无明显意义 ( $P > 0.05$ ), 表 4 中 MS 基因型中几乎未见 G/G 突变纯合子, 对照组与 ISH 组中的基因型频率及等位基因频率无明显差异性 ( $\chi^2 = 0.002, P = 0.960 > 0.05$ )。

表 2 两组 MTHFR C677T 基因型频率及等位基因频率分布

Tab 2 The distribution of MTHFR C677T genotype frequency and allele frequency in the two groups

组别	n	基因型分布频率/n(%)			等位基因分布频率/%	
		C/C	C/T	T/T	C	T
ISH 组	220	45(20.5)	132(60)*	43(19.5)*	222(50.5)	218(49.5)*
对照组	130	51(39.2)	59(45.4)	20(15.4)	161(61.9)	99(38.1)

与对照组比较 \* $P < 0.05$

表 3 两组 MTRR 基因 A66G 基因型频率及等位基因频率分布

Tab 3 The distribution of MTRR A66G genotype frequency and allele frequency in the two groups

组别	n	基因型分布频率/n(%)			等位基因分布频率/%	
		A/A	A/G	G/G	A	G
ISH 组	220	51(23.2)	134(60.9)	35(15.9)	236(53.6)	204(46.4)
对照组	130	21(16.2)	83(63.8)	26(20.0)	125(48.1)	135(51.9)

表 4 两组 MS 基因 A2756G 基因型频率及等位基因频率分布

Tab 4 The distribution of MS A2756G genotype frequency and allele frequency in the two groups

组别	n	基因型分布频率/n(%)			等位基因分布频率/%	
		A/A	A/G	G/G	A	G
ISH 组	220	195(88.6)	25(11.4)	0(0)	415(94.3)	25(5.7)
对照组	130	115(88.5)	15(11.5)	0(0)	245(94.2)	15(5.8)

## 3 讨论

高同型半胱氨酸血症 (HHcy) 目前已被大量研究证实是心脑血管病发病的危险因素之一<sup>[2]</sup>, 2006 年美国高血压协会发布合并升高同型半胱氨酸水平的原发性高血压称之为 H 型高血压, 《中国高血压防治指南 2010》中将血浆同型半胱氨酸  $\geq 10 \mu\text{mol/L}$  列入影响高血压患者心脑血管预后的重要危险因素<sup>[3]</sup>。ISH 作为高血压的一个重要亚型, 主要是由于血管壁顺应性的下降、僵硬度的升高以及血管内皮功能的紊乱造成的<sup>[4-5]</sup>, 而 HHcy 也是通过影响体内氧化应激反应、促进血管中层平滑肌细胞增殖和分化、减少 NO 的生成等机制使血管的顺应性和扩张功能下降及血管外周阻力的上升, 从而造成血压升高<sup>[6-7]</sup>, 本试验结果亦表明 ISH 组的同型半胱氨酸水平高于对照组, 且 HHcy、糖尿病是 ISH 发病的危险因素。进一步论证了高同型半胱氨酸血症在 ISH 发病中的重要作用。



血中 Hcy 水平主要受环境和遗传等因素的影响<sup>[8]</sup>, MTHFR 编码 Hcy 代谢通路中的关键酶 N5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶, 它是 Hcy 再甲基化转化为蛋氨酸的关键酶, 该基因的 C677T 单核苷酸多态性位点的 C→T 等位基因的突变引起其编码的缬氨酸代替了丙氨酸产生 MTHFR 酶的不耐热性变化, 从而降低了该酶的活性, 使催化 5, 10-亚甲基四氢叶酸反应并提供甲基给 Hcy 进行转甲基代谢的能力下降, 导致 Hcy 代谢障碍、血浆 Hcy 水平增高<sup>[9]</sup>。国内相关研究表明, MTHFR 基因多态性与 ISH 发病关系密切, 可能是 ISH 的易感基因<sup>[10]</sup>。国外研究亦表明 Hcy 在 MTHFR C677T 的不同基因型之间有显著差异<sup>[11]</sup>, MTHFR C677T 不仅是中国男性原发性高血压病的危险因素, 也与其肾小球滤过率的降低关系密切<sup>[12]</sup>。本研究结果显示: ISH 组患者 MTHFR T/T 及 C/T 基因型频率和 T 等位基因频率均高于对照组 ( $P<0.05$ ), 表明 MTHFR 基因可能介导了 ISH 与 Hcy 水平之间的关系, MTHFR 基因 C677T 位点 C 到 T 的突变导致了 Hcy 水平的升高, 从而使 ISH 的发病率增加。

MTRR 基因 A66G 及 MS 基因 A2756G 亦是 Hcy 的关键酶基因, 近年来研究表明 MTRR 基因 A66G 多态性与心脑血管疾病及一些出生缺陷发病相关<sup>[13-14]</sup>, MS 是一种维生素 B12 依赖酶, 催化 Hcy 复甲基化变成甲硫氨酸, 目前已发现的 8 种突变中以 D919 突变多见, 即 2756A→G 导致天冬氨酸取代了甘氨酸残基, 它将引起相应的酶缺乏或活性发生改变, 从而导致 Hcy 代谢异常。MTRR 基因定位于 5p15.2-15.3, 包含 15 个外显子和 14 个内含子。其编码的 MTRR 主要功能是维持钴胺素的活性, 而钴胺素是 MS 的辅酶, 参与 MS 活性的恢复<sup>[15]</sup>, 本研究未发现以上两种基因的多态性与 ISH 的发病有明显关系, 虽 ISH 组患者 MTRR 基因 A/G 及 G/G 基因型频率和 G 等位基因频率低于对照组, 但无统计学意义, 不能推断出 G 等位基因对 ISH 的发病有保护作用。而 MS 基因中突变的 G 等位基因在所有患者中只有 6% 左右, 两组数据在本研究中无统计学差异, 未发现 MS 基因与 ISH 的发病有联系。

本研究初步结果提示 MTHFR C677T 基因 C-T

的突变似乎与 ISH 的发病有一定的关系, 可能通过影响 Hcy 的水平, 进而促使 ISH 发病, 而 MTRR 及 MS 基因与 ISH 的关系尚需大样本进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 王玉蓉. 同型半胱氨酸与心脑血管疾病的相关性分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(6): 738
- [2] Ganguly P, Alam S F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease[J]. Nutr J, 2015, 14: 6
- [3] 陶国枢. 关注 H 型高血压的防治[J]. 保健医苑, 2013, 5(5): 9
- [4] 何莉, 曾朝荣. 单纯收缩期高血压[J]. 中华高血压杂志, 2007, 15(11): 961
- [5] 朱光照, 雷梦觉. 单纯收缩期高血压大动脉中层钙化形成机制[J]. 中华高血压杂志, 2008, 16(4): 300
- [6] 吴绍燕, 左中. 同型半胱氨酸与高血压相关性的 Meta 分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(23): 2920
- [7] Fu H J, Zhao L B, Xue J J, et al. Elevated serum homocysteine (Hcy) levels May contribute to the pathogenesis of cerebral infarction[J]. J Mol Neurosci, 2015, 56(3): 553
- [8] Zhu Y, Zhu R X, He Z Y, et al. Association of MTHFR C677T with total homocysteine plasma levels and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis[J]. Neurol Sci, 2015, 36(6): 945
- [9] 宗永华, 李小鹰, 陈光亮, 等. 同型半胱氨酸水平与 N5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2011, 27(3): 203
- [10] 孙晓楠, 李玉明, 郭虹. 单纯收缩期高血压患者同型半胱氨酸代谢关键酶基因多态性相关因子研究[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(4): 269
- [11] Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, et al. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults[J]. Cell Biochem Funct, 2014, 32(1): 1
- [12] Dong Q1, Tang G, He M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with estimated glomerular filtration rate in hypertensive Chinese males[J]. BMC Med Genet, 2012, 13: 74
- [13] Nakaoka H, Takahashi T, Akiyama K, et al. Differential effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: site distribution[J]. Stroke, 2010, 41(8): 1593
- [14] 王淑媛, 鲁衍强, 马少杰, 等. 湘潭市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布及其与血浆 Hcy 水平的关系[J]. 天津医药, 2014, 42(12): 1205
- [15] 王素敏, 沈嵘, 石小燕, 等. 同型半胱氨酸代谢酶基因突变多态性与妊娠高血压综合征遗传易感性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(4): 15

(2015-10-19 收稿)