

• 实验研究 Experimental research •

MTHFR C677T 多态性、血浆 Hcy 及青年肝静脉型布-加综合征的相关性研究

田 浩, 徐 浩, 祖茂衡, 裴冬生

【摘要】目的 研究 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR) C677T 基因多态性、血浆高同型半胱氨酸(Hcy)及青年肝静脉型布-加综合征(BCS)的相关性。方法 研究组青年肝静脉型 BCS 患者 60 例,对照组为健康志愿者 60 名,免疫荧光法测空腹血浆 Hcy 浓度。全血提取 DNA 基因组,聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性技术(PCR-RFLP)检测 MTHFR 基因第 677 位点基因多态性。结果 BCS 组血浆 Hcy 浓度为 $(20.38 \pm 8.40) \mu\text{mol/L}$, MTHFR 677 位点多态性纯合子(TT 型)突变率为 35.0%(21/60),明显高于对照组的 $(16.64 \pm 5.16) \mu\text{mol/L}$ 和 16.7%(10/60),两组间差异均有统计学意义($P = 0.001$, $P = 0.03$)。结论 青年肝静脉型 BCS 血浆存在高 Hcy 浓度状态, MTHFR C677T 基因的纯合子突变与高 Hcy 血症有相关性。

【关键词】布-加综合征; 同型半胱氨酸血症; 亚甲基四氢叶酸还原酶

中图分类号: R543.6 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2012)-01-0062-04

Correlation of MTHFR C677T gene polymorphism plasma and Hcy levels in young patients with hepatic vein obstruction TIAN Hao, XU Hao, ZU Mao-heng, PEI Dong-sheng. Department of Oncology, Xinyi Municipal People's Hospital, Xinyi, Jiangsu Province 221400, China

Corresponding author: XU Hao, E-mail: xuhao585@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphisms and plasma homocysteine (Hcy) level in young patients with Budd-Chiari syndrome (BCS) complicated by hepatic vein obstruction. Methods Sixty young patients of BCS with hepatic vein obstruction were collected as study group, while other 60 healthy volunteers were enrolled in this study as control group. Laboratory tests were examined in all subjects. Serum homocysteine was measured by fluorescence polarization immunoassay. Genomic DNA was extracted from whole blood and the MTHFR C677T gene polymorphism was analyzed by combination of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The results were analyzed and compared between the two groups. Results In the study group, the serum homocysteine level was $(20.38 \pm 8.40) \mu\text{mol/L}$ and homozygous mutation (T/T) of MTHFR C677T was 35.0% (21/60). In the control group, the serum homocysteine level was $(16.64 \pm 5.16) \mu\text{mol/L}$ and homozygous mutation (T/T) of MTHFR C677T was 16.7% (10/60). The differences in both serum homocysteine level and homozygous mutation between the two groups were statistically significant ($P = 0.001$ and $P = 0.03$, respectively). Conclusion In young patients of BCS with hepatic vein obstruction, the Hcy level of plasma is in a high concentration state, and the high Hcy level bears a close relationship to the homozygous MTHFR C677T gene mutation. (J Intervent Radiol, 2012, 21: 62-65)

【Key words】 Budd-Chiari syndrome; homocysteine; methylenetetrahydrofolate reductase

Budd-Chiari 综合征(BCS)是肝静脉或下腔静脉肝后段阻塞导致肝静脉血液回流受阻,引起门脉高

压的一组症候群。青年 BCS 以肝静脉型为多见,起病急,临床症状严重,自然预后差,病因不明确。文献报道其病因与血栓形成有关^[1-2],高同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)血症是血栓形成的独立危险因素之一,本文研究 MTHFR C677T 基因多态性、血浆 Hcy 浓度及青年肝静脉阻塞型 BCS 间的相关性。

基金项目:国家十一五科技计划支撑课题(2006038073024)

作者单位:221400 江苏省新沂市人民医院肿瘤科(田 浩);徐州医学院附属医院介入科(徐 浩、祖茂衡);徐州医学院肿瘤实验室(裴冬生)

通信作者:徐 浩 E-mail: xuhao585@126.com

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2007 年 4 月至 2008 年 7 月就诊于徐州医学院附属医院介入科的青年原发性肝静脉闭塞型 BCS 患者 60 例,男性 33 例,女性 27 例,年龄 15 ~ 35 岁,平均年龄(23.4 ± 8.3)岁。其中膜性肝静脉阻塞 21 例,节段性肝静脉阻塞 39 例。对照组为同期正常体检志愿者 60 名,男 28 例,女 32 例,年龄 18 ~ 35 岁,平均年龄(26.4 ± 8.5)岁。所有病例均排除有其他血管性疾病及近 1 个月内服用影响 Hcy 水平的药物,如维生素、苯妥英钠、卡马西平等。

1.2 方法

1.2.1 Hcy 测定 德国 Bayer 公司自动免疫分析仪,采用免疫荧光法检测血浆中 Hcy 的浓度。

1.2.2 DNA 提取 采用全血基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根)提取 BCS 组及对照组外周血基因组 DNA,采用紫外分光光度法测定 DNA 含量。

1.2.3 引物设计 引物序列为:上游引物 TGAAGC-ACATCCGAAGTGAG,下游引物 CCAGCTCGATGC-CATAGTTG,扩增片段 368 bp。

1.2.4 MTHFR 基因组的 PCR 扩增 在 50 μ l 的反应体系中加入 5 μ l PCR 反应液,dNTPs 1 μ l,模板 DNA 2 μ l 及上、下游引物各 1 μ l,反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,58 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,循环 35 次,继续 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.2.5 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)检测 在总体积 12 μ l 的酶切反应系中加入 PCR 扩增产物 6 μ l,Hinf I 1 μ l,10 \times 缓冲液 1 μ l,37 $^{\circ}$ C 消化 3 h。酶切产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(交联度:29:1)进行电泳分离,常规硝酸银染色,记录基因型。

1.2.6 PCR 产物测序 根据酶切结果纯化 PCR 产

物送上海英骏生物技术有限公司基因组测序。

1.3 统计学分析

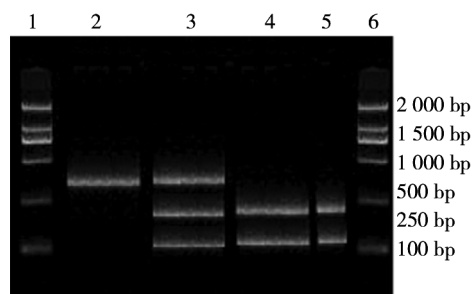
采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料组间比较用 t 检验,计数资料组间比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

BCS 组血浆 Hcy 水平为(20.38 ± 8.40) μ mol/L,明显高于对照组的(16.64 ± 5.16) μ mol/L,两组间差异有统计学意义($P = 0.001$)。PCR 扩增产物为 368 bp 片段,经 Hinf I 酶切位点位于 130 bp 处,酶切后产生三种片段(图 1),PCR 产物纯化后测序 130 bp 点基因表型为野生型(C/C)(图 2a)、纯合子(T/T)突变型(图 2b)、杂合型(C/T)(图 2c)。基因型纯合子(T/T)突变型 BCS 组高于对照组,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。两组间纯合子(T/T)突变及 T 等位基因频率差异亦有统计学意义($P = 0.018$, $P = 0.001$)。

表 1 两组 MTHFR C677T 基因型分布比较 [例, (%)]

组别	MTHFR C677T 基因型			等位基因频率	
	C/C	C/T	T/T	C	T
BCS 组(60 例)	13(21.7)	26(43.3)	21(35.0)	52(43.3)	68(56.7)
对照组(60 例)	27(45.0)	23(38.3)	10(16.7)	77(64.2)	43(35.8)



泳道 1,6 为 DL-2000 标志;泳道 2 为 C/C,泳道 3 为 C/T 突变,泳道 4,5 为 T/T 突变

图 1 BCS 组 MTHFR 基因 PCR 产物酶切图

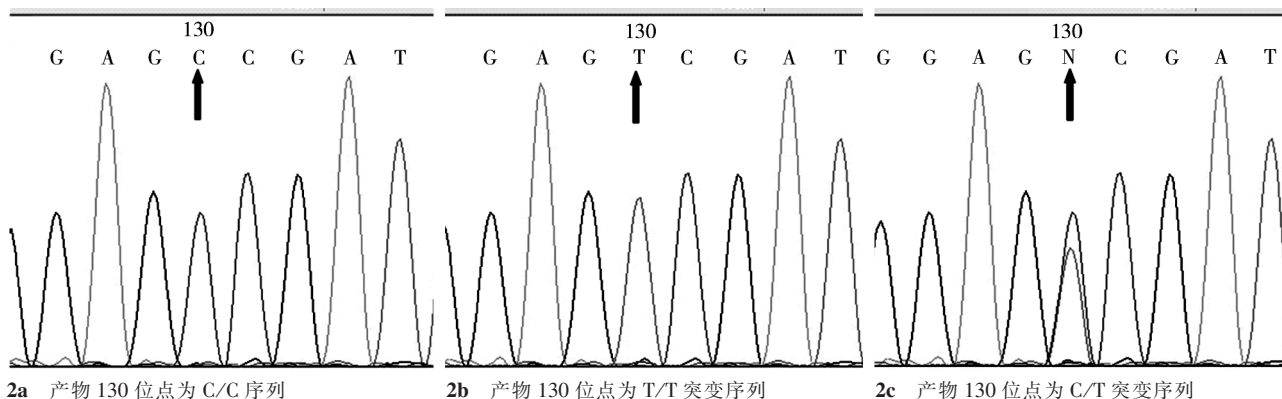


图 2 PCR 扩增产物基因测序结果

3 讨论

Hcy 是人体内的含硫氨基酸, 为甲硫氨酸代谢的中间产物, 其浓度受到遗传因素、营养状况、肝肾功能、药物及某些疾病代谢因素的影响, 据报道, 在去除各种环境营养因素, 蛋氨酸代谢过程中的限速酶 MTHFR 677 位点基因多态性会引起 MTHFR 活性下降, 是导致血浆 Hcy 水平升高的主要原因^[3]。研究认为血浆 Hcy 水平升高, 可引起同型半胱氨酸在金属离子介导下自身氧化生成过氧化物及氧自由基, 致血管损伤内皮素的分泌增加, 血管内皮衍生松弛因子及前列腺素分泌减少, 导致血管舒缩因子平衡紊乱, 从而引发血栓形成及心脑血管疾病, 并可导致 DNA 链的断裂, 增加氧化应激反应和细胞凋亡, 易造成血管内皮损伤, 导致血栓形成, 是动静脉栓塞性疾病的独立危险因素之一^[45], 被认为是静脉血栓发病的独立危险因素^[69]。BCS 作为静脉系统性疾病一类, 国内外众多学者认为其病因与后天血栓形成有一定的相关性^[1-2,10]。

MTHFR 是 S-腺苷蛋氨酸代谢途径中的关键限速酶, 目前研究认为 MTHFR 基因第 677 位点上 C→T 的突变是引起 Hcy 血症的主要原因之一。MTHFR 的功能为催化 5,10 亚甲基四氢叶酸还原为 5-甲基四氢叶酸, 从而为 Hcy 向蛋氨酸转化提供甲基。Frosst 等^[11]发现, 在 MTHFR 基因第 677 位点上 C→T 的多态性, 将直接导致其表达产物蛋白质分子第 223 位氨基酸残基由丙氨酸转变为缬氨酸, 使 MTHFR 对热不稳定, 其活性降低, 并产生一个限制性内切酶 (Hinf I) 酶切位点, 即 T 等位基因。MTHFR 基因杂合子突变型使其酶活性降至正常活性的 65% 左右, 而纯合子突变型 MTHFR 活性下降更显著, 可至正常活性的 30% 左右或更低。MTHFR 活性降低, 使其在半胱氨酸向蛋氨酸转化过程中的催化作用降低, 从而使 Hcy 在体内蓄积, 血液中 Hcy 水平升高。文献报道 MTHFR 基因第 677 位点 C→T 的突变在全球的分布差异显著, 突变的发生率在亚洲最高, T 等位基因频率可高达 50% 左右; 非洲突变的发生率最低, T 等位基因频率为 7.3%; 我国该突变的发生率较高, T 等位基因频率为 37.5% 左右^[12]。

在本研究中, MTHFR 677 位点的基因表型主要有 3 种: 野生型 (C/C)、纯合子 (T/T)、杂合子 (C/T), 对照组的 T 等位基因频率的检测率与文献报道一致^[12-14], BCS 组 MTHFR 677 位点纯合子 (T/T) 突变

及 T 等位基因频率均明显高于对照组 (35.0% 比 16.7%; 56.7% 比 35.8%), 差异均有统计学意义。在 MTHFR C677T 多态性与 Hcy 水平关系中发现两组中 677 位点纯合子 (T/T) 突变的患者血浆 Hcy 水平明显高于 C/T 型及 C/C 型, BCS 组平均 Hcy 水平明显高于对照组 [$(20.38 \pm 8.40) \mu\text{mol/L}$ 比 $(16.64 \pm 5.16) \mu\text{mol/L}$], 差异有统计学意义 ($P = 0.001$)。根据结果分析, BCS 组体内静脉血 Hcy 水平明显高于正常对照组, MTHFR 677 位点纯合子 (T/T) 突变与 BCS 患者体内的高 Hcy 状态可能有一定相关性。677 位点杂合子 (C/T) 突变导致 MTHFR 活性减低之程度可能不足以使血浆 Hcy 水平升高。MTHFR 677 纯合子 (T/T) 突变对 Hcy 水平的影响较显著。

综上所述, 青年肝静脉型 BCS 患者体内存在高 Hcy 状态, MTHFR C677T 基因的纯合子 (T/T) 突变与青年肝静脉型 BCS 患者血浆高 Hcy 水平有一定相关性。

〔参考文献〕

- [1] 李麟荪. 评布加综合征定义与分型[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 75 - 78.
- [2] Aydinli M, Bayraktar Y. Budd-Chiari syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 2693 - 2696.
- [3] Ho CH, Kuo BI, Kong CW, et al. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism, B vitamins and other factors on plasma homocysteine and risk of thromboembolic disease in Chinese [J]. J Chin Med Assoc, 2005, 68: 560 - 565.
- [4] 王 杨, 王金和, 程佩兰. 同型半胱氨酸的致病机理及临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27: 137 - 139.
- [5] 孙 娟, 谭红梅, 程 超, 等. 高同型半胱氨酸诱导血管内皮功能障碍促进微循环障碍和微血栓形成[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23: 2336 - 2340.
- [6] Zamani A, Omrani GR, Lankarani KB. Hyperhomocysteinemia, hyperlipidaemia and risk of venous thromboembolism in Shiraz [J]. East Mediterr Health J, 2003, 9: 935 - 943.
- [7] 王美堂, 胡秋敏, 李 强, 等. 高同型半胱氨酸血症与肺血栓栓塞症和(或)深静脉血栓形成的关系[J]. 中国急救医学, 2004, 24: 625 - 627.
- [8] Oger E, Lacut K, Le Gal G, et al. Hyperhomocysteinemia and low B vitamin levels are independently associated with venous thromboembolism: results from the EDITH study: a hospital-based case-control study[J]. Thromb Haemost, 2006, 4: 793 - 799.
- [9] Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism [J]. Semin Thromb Hemost, 2006, 32: 716 - 723.
- [10] 韩新巍, 马 波, 吴 刚, 等. Budd-Chiari 综合征下腔静脉阻

- 塞区钳夹活检病理学探讨[J]. 介入放射学杂志, 2006, 15: 530 - 532.
- [11] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase[J]. Nat Genet, 1995, 10: 111 - 113.
- [12] Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, et al. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase [J]. J Hum Genet, 1998, 63: 917 - 920.
- [13] den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, et al. Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? [J]. Lancet, 1995, 345: 882 - 885.
- [14] Couturaud F, Oger E, Abalain JH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and venous thromboembolic disease[J]. Respiration, 2000, 67: 657 - 661.
- (收稿日期:2011-09-17)
- (本文编辑:侯虹鲁)