

文章编号:1005-6947(2008)12-1192-04

· 基础研究 ·

急性肠系膜静脉血栓形成与 MTHFR 基因 C677T 突变的相关性研究

李志文¹, 胡新华¹, 杨军¹, 张强¹, 何家安¹, 范玥尧¹, 张志深², 刘程伟³,
杨德华¹, 辛世杰¹, 段志泉¹

(1. 中国医科大学附属第一医院 普通外科教研室血管甲状腺外科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 中国医科大学附属盛京医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110003; 3. 佳木斯大学附属第一医院 普通外科, 黑龙江 佳木斯 154002)

摘要:目的 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 突变在急性肠系膜静脉血栓形成(AMVT)发病中的意义。方法 采用高效液相色谱法测定 63 例 AMVT 患者和 128 名健康对照者血浆的同型半胱氨酸(Hcy)水平,放射免疫法测定血浆叶酸浓度;应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法进行 MTHFR C677T 基因多态性分析,并进行基因型及等位基因频率的计数。结果 AMVT 组和对照组血浆 Hcy 水平分别为(23.5 ± 8.8) μmol/L 和(12.7 ± 6.9) μmol/L, 差异有统计学意义(P < 0.01)。Hcy 水平与叶酸呈负相关(AMVT 组: r = -0.42, P < 0.01; 对照组: r = -0.39, P < 0.01)。MTHFR C677T TT 基因型在 AMVT 组的分布频率为 33.3%, 高于对照组的 17.2%, 差异有统计学意义(χ² = 6.31, P < 0.05)。结论 血浆 Hcy 水平升高是 AMVT 形成的危险因素之一。MTHFR C677T 多态性中 TT 基因型可能是 AMVT 形成的一个重要遗传风险因子。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(12):1192-1195]

关键词:肠系膜血管闭塞/外科学; 静脉血栓形成, 肠系膜静脉; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 多态性
中图分类号: R 657.2 **文献标识码:** A

Study on the association of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase with acute mesenteric venous thrombosis

LI Zhiwen¹, HU Xinhua¹, YANG Jun¹, ZHANG Qiang¹, HE Jiaan¹, FAN Yueyao¹,
ZHANG Zhishen², LIU Chengwei³, YANG Dehua¹, XIN Shijie¹, DUAN Zhiquan¹

(1. Department of General Surgery and Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of General Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110003, China; 3. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002, China)

Abstract: Objective To explore the significance of gene mutation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in the development of acute mesenteric venous thrombosis (AMVT). **Methods** Sixty-three cases of AMVT (AMVT group) and 128 healthy controls (control group) were recruited in the study. The concentrations of plasma Hcy and folic acid were respectively measured by reverse phase high performance liquid chromatography and radioimmunity method. The polymorphism of MTHFR C677T was detected by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The plasma Hcy level

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30600631; 30672048; 30872527)。

收稿日期:2008-10-07; **修订日期:**2008-11-26。

作者简介:李志文,男,中国医科大学附属第一医院硕士研究生,主要从事血管外科的基础和临床方面的研究。

通讯作者:胡新华 E-mail:xinhua@126.com

of the AMVT patients was $(23.5 \pm 8.8) \mu\text{mol/L}$, Which differed significantly from that of the controls, Which was $(12.7 \pm 6.9) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). There was obvious negative correlation between the plasma Hcy and folic acid levels (AMVT: $r = -0.42$, $P < 0.01$, control: $r = -0.39$, $P < 0.01$). The prevalence of TT genotypes of MTHFR (C677T) between AMVT group and normal control group had significant difference (33.3% vs. 17.2%, $\chi^2 = 6.31$, $P < 0.05$). **Conclusions** The higher plasma Hcy level might be a risk factor in the onset of AMVT. The homozygote of MTHFR C677T (TT) may be an important risk factor of AMVT. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(12):1192-1195]

Key words: Mesenteric Vascular Occlusion/surg; Venous Thrombosis, Mesenteric Veins; Methylenetetrahydrofolate Reductase; Polymorphism

CLC number: R 657.2

Document code: A

研究表明,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia)是人体静脉血栓形成的独立危险因素^[1]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢酶的基因多态性可通过影响酶的活性而影响血 Hcy 水平。5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是蛋氨酸代谢中的关键酶,其基因第 677 位 C→T 突变(MTHFR C677T)可导致血浆 Hcy 水平的改变^[2]。有报道, Hcy 代谢酶相关基因—MTHFR 的突变可能是急性肠系膜静脉血栓形成(acute mesenteric venous thrombosis, AMVT)的致病因素^[3]。本研究旨在探讨血 Hcy 水平及 MTHFR C677T 基因多态性与中国北方汉族人 AMVT 发病的关系。

1 对象与方法

1.1 分组及一般资料

(1)AMVT 组:为 1999 年 1 月—2007 年 12 月在中国医科大学附属第一医院和附属盛京医院住院的 AMVT 患者 63 例,55 例经增强 CT 确诊,有 29 例经手术进一步证实;另有 8 例经腹部探查手术证实。入选条件:排除肝硬化性门静脉高压症、脾切除术后、肾病综合征及真性红细胞增多症等有明确高凝状态疾病患者。(2)对照组:为 128 名辽宁省血液中心的健康献血者。两组均为汉族人群,个体之间无血缘关系;两组性别、年龄及危险因素的差异见表 1。

表 1 AMVT 组和对照组危险因素的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	年龄(岁)	性别		吸烟	饮酒	糖尿病	口服避孕药	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	叶酸 (nmol/L)	维生素 B ₁₂ (pmol/L)
			男	女							
AMVT	63	49.3 ± 16.8	49	14	18	9	1	2/14	23.58.8	3.7 ± 1.8	365 ± 88
对照	128	43.2 ± 13.2	95	33	34	19	2	8/33	12.7 ± 6.9	7.6 ± 2.6	408 ± 108
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05

1.2 实验方法

1.2.1 血浆 Hcy, 叶酸, 维生素 B₁₂ 浓度的测定

采用放射免疫法测定叶酸和维生素 B₁₂ 浓度;采用高效液相色谱法测定 Hcy 水平。

1.2.2 DNA 提取 抽取 AMVT 患者与对照组静脉血 3 mL, EDTA 抗凝, 常规酚—氯仿法提取基因组 DNA, 其含量用紫外分光光度计测定。

1.2.3 多聚酶链反应(PCR)扩增目的片段 MTHFR C677T 引物序列:上游:为 5' TGAAGGAG AAGGTGTCTGCGGA3', 下游为 5' AGGACGGTCCG-GTGAGAGTG3'; PCR 反应体系为 25 μL : STR 缓冲液(包含 MgCl₂, dNTP, 10 × 缓冲液) 2.5 μL ,

上、下游引物各 2 μL , Taq 酶 1U, 模板 DNA 1.5 μL , ddH₂O 补至 25 μL 。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s; 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。3% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增产物。

1.2.4 限制性内切酶酶切 取 PCR 扩增产物 10 μL , 加 10 × 缓冲液 2 μL , Hinf I 限制性内切酶 5U, 加去离子水补至 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h。3% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 凝胶成像仪上观察并照相。

1.3 统计学处理

数据资料应用 SPSS10.0 统计软件进行分

析。对各组间的基因型频率及等位基因频率的差异进行 χ^2 检验, 均数组间比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组血浆 Hcy、叶酸、维生素 B₁₂ 的浓度

AMVT 组血浆 Hcy 显著高于对照组, 而叶酸浓度显著低于对照组, 两组比较差异均有显著意义 ($P < 0.01$)。Hcy 与叶酸水平呈负相关 (AMVT: $r = -0.42$, $P < 0.01$; 对照组: $r = -0.39$, $P < 0.01$)。AMVT 组与对照组血浆维生素 B₁₂ 浓度比较差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.2 MTHFR C677T 基因多态分型

PCR 扩增出 198 bp 长的 DNA 片段, 经 Hinf I 限制性内切酶消化后可产生 3 种基因型: 野生型 (CC 型) 无酶切位点, 仅见 1 条 198 bp 片段电

泳带; 纯合突变型 (TT 型) 酶切后产生 175 bp 和 23 bp 2 片段, 凝胶显示 175 bp 1 条带; 杂合子突变 (CT 型) 既有 198 bp 片段, 又含有 175 bp 和 23 bp 片段, 凝胶上显示 198 bp 和 175 bp 2 条电泳带。

2.3 两组人群基因型分布的 Hardy - Weinberg 检验

两组人群基因型分布经 χ^2 检验均符合 Hardy - Weinberg 平衡, 因此具有人群代表性。

2.4 MTHFR C677T 基因型及等位基因频率分布

AMVT 组 TT 基因型频率和 T 等位基因频率与对照组比较均显著增高, 有统计学意义 ($\chi^2 = 6.31$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 6.07$, $P < 0.05$)。与 CC 基因型相比, 携带 TT 基因型的人群与 AMVT 显著相关, 比值比 (odds ratio, OR) 为 2.80 (表 2)。

表 2 两组 MTHFR C677T 基因型和等位基因频率的分布

基因分型	AMVT 组 ($n=63$) 例数 (%)	对照组 ($n=128$) 例数 (%)	χ^2 值 (P 值)	OR (95 % CI)
基因型				
CC	15 (23.8)	44 (34.4)	$\chi^2 = 2.21 (>0.05)$	1.0
CT	27 (42.9)	62 (48.4)	$\chi^2 = 0.53 (>0.05)$	
TT	21 (33.3)	22 (17.2)	$\chi^2 = 6.31 (<0.05)$	2.80 (1.254 ~ 6.251)
等位基因				
C	57 (45.2)	150 (58.6)	-	-
T	69 (54.8)	106 (41.4)	$\chi^2 = 6.07 (<0.05)$	1.713 (1.116 ~ 2.629)

2.5 3 种 MTHFR 基因型血浆 Hcy 水平的比较

AMVT 组 CT 型与 CC 型, TT 型与 CC 型相比, 血浆 Hcy 水平均明显升高 ($P < 0.05$); 而对照组只有 TT 型与 CC 型差异有显著意义 ($P < 0.05$)。无论是 CC 型, CT 型, TT 型, AMVT 组的 Hcy 水平均高于对照组 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 MTHFR 不同基因型血浆 Hcy 水平比较 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

分组	例数	CC 型		CT 型		TT 型	
		例数	Hcy	例数	Hcy	例数	Hcy
AMVT	63	15	16.9 ± 6.6	27	24.0 ± 7.2 ¹⁾	21	28.6 ± 9.5 ¹⁾
对照	128	44	10.9 ± 5.8	62	12.8 ± 6.0	22	18.6 ± 5.4 ¹⁾
P 值			<0.05		<0.05		<0.05

注: 1) 与本组 CC 型比较, $P < 0.05$

3 讨论

AMVT 是一种起病隐匿、患病率低、病死率高、早期无特异症状和体征的缺血性肠疾病, 临床上误诊误治率极高, 可高达 90% ~ 95%, 许多患者是在剖腹探查术中才得以确诊, 往往失去最佳治疗时机^[4]。AMVT 的病因并不清楚, 目前认为影响凝血状态的疾病或因素均可导致 AMVT 发病^[5]。Hcy 作为体内的含硫氨基酸, 是甲硫氨酸代谢的中间产物。血浆 Hcy 的浓度受到遗传因素、营养状况、肝肾功能、药物及某些疾病状况的影响, 基因突变也可以引起 Hcy 代谢酶的缺陷或活性下降, 从而导致 Hcy 升高^[6]。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, 使损伤性的内

皮素-1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,甚至使细胞DNA链断裂,氧化应激反应和细胞凋亡,从而引发血栓形成及心脑血管疾病^[7]。MTHFR基因定位于常染色体1p36.3上,如677位的碱基C被T置换,使其编码的丙氨酸被缬氨酸取代,则可引起MTHFR活性下降,高半胱氨酸转化为蛋氨酸的能力下降。这是血浆Hcy升高的重要分子机制之一^[8]。

本研究结果表明,AMVT组Hcy水平明显高于健康对照组($P < 0.01$),提示Hcy与AMVT关系密切。研究发现,两组人群的血浆Hcy水平与MTHFR基因型有关:AMVT组中CT型与CC型相比、TT型与CC型相比Hcy水平均升高,差异有显著意义;而在对照组中只有TT型与CC型相比较差异有显著意义($P < 0.05$)。提示TT型基因突变与高Hcy血症有密切关系;TT型MTHFR基因突变可能是引起AMVT患者高Hcy血症的重要遗传因素。本实验进一步研究发现,无论是CC型、CT型或TT型,AMVT组的Hcy水平均明显高于健康对照组。提示高Hcy血症可能是导致AMVT发病的重要因素之一。笔者推测,MTHFR基因通过TT基因突变引起血浆Hcy水平增高,从而参与AMVT的发病过程,即TT基因型可能是AMVT形成的一个重要遗传风险因子。有研究表明,中国人MTHFR的TT基因突变与血栓性疾病关系密切^[9]。

本研究还表明:血浆Hcy浓度与叶酸水平呈负相关,提示叶酸缺乏可能是诱发高Hcy的另一重要因素。这可能是由于叶酸与维生素B₁₂可作为辅酶参与Hcy的还原和代谢反应有关。因此,高Hcy血症可能不仅与MTHFR基因突变的遗传因素有关,而且还与营养因素、尤其是叶酸和维生素B₁₂水平有关。这一因素在AMVT的发病中的确切作用尚需进一步证实和评价。我国北方地区冬季相对漫长,新鲜蔬菜和水果相对缺乏,

如能通过检测MTHFR基因型,对于基因突变的患者采用补充叶酸和维生素B₁₂,对于降低AMVT的发病率及改善预后均可能大有裨益。AMVT发病是多因素参与的病理过程,尚需进一步深入研究其发病的其他机制,才能提高这类疾病的诊治水平,以及改善其预后。

参考文献:

- [1] Gatt A, Makris M, Gatt A, *et al.* Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis [J]. *Semin Hematol*, 2007, 44(2): 70-76.
- [2] Gemmati D, Serino ML, Trivellato C, *et al.* C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients [J]. *Haematologica*, 1999, 84(9): 824-828.
- [3] Elhajj II, Salem ZM, Birjawi GA, *et al.* Heterozygous prothrombin 20210G/A mutation, associated with hyperhomocysteinemia, and homozygous methylenetetrahydrofolate reductase 677C/T mutation, in a patient with portal and mesenteric venous thrombosis [J]. *Hematol J*, 2004, 5(6): 540-542.
- [4] 郭书芹, 孙云川, 徐福芹. 急性肠系膜静脉血栓形成的诊治 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(5): 369-371.
- [5] Morasch MD, Ebaugh JL, Chiou AC, *et al.* Mesenteric venous thrombosis: a changing clinical entity [J]. *J Vasc Surg*, 2001, 34(4): 680-684.
- [6] Ho CH. The influence of age, sex, vitamin B(12), folate levels and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic mutations on plasma homocysteine in the Chinese population [J]. *Haematologica*, 2000, 85(10): 1051-1054.
- [7] Lee R, Frenkel EP. Hyperhomocysteinemia and thrombosis [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2003, 17(1): 85-102.
- [8] Strandhagen E, Zetterberg H, Aires N, *et al.* The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is a major determinant of coffee-induced increase of plasma homocysteine: a randomized placebo controlled study [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 13(6): 811-815.
- [9] 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(12): 560-565.