DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.024

宁夏回、汉族亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的分布特点及其与原发性高血压的关系

马 萍[1]，覃 数[1]，刘海燕[2]，徐清斌[2]
（1. 重庆医科大学附属第一医院心内科，重庆 400016；2. 宁夏医科大学总医院心脏中心，银川 750004）

【摘 要】目的：研究 N5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因（Methylenetetrahydrofolate reductase，MTHFR）C677T 多态性在宁夏回、汉族高血压人群中的分布差异及其与原发性高血压（Essential hypertension，EH）之间的关系。方法：收集回、汉族 EH 患者 146 例和 155 例以及回、汉族健康体检正常血压者（Normal tensive，NT）112 例和 140 例，采用聚合酶链反应-限制性片段长度（Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism，PCR-RFLP）多态性技术分析检测 MTHFR 基因多态性。结果：回、汉族 EH 组间比较基因型频率及等位基因频率均无统计学差异（$P>0.05$）。回、汉族 NT 组间比较基因型频率和等位基因频率亦无统计学差异（$P>0.05$）。回族 EH 组 TT 基因型频率及 T 等位基因频率均高于回族 NT 组（$P<0.05$）。汉族 EH 组变异型 TT+CT 及 T 等位基因频率均高于汉族 NT 组（$P<0.05$）。二项逐步 *Logistic* 回归结果显示，TT 基因型为 EH 的独立危险因素（OR=2.34，95% CI 为 1.363~4.016，$P=0.002$）。结论：MTHFR 基因 C677T 多态性在回、汉族人群之间无种族差异；该位点多态性与宁夏地区回、汉族人群 EH 发病具有相关性，T 等位基因有可能是 EH 的遗传易感基因。

【关键词】N5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶；多态性；宁夏；民族；高血压
【中国图书分类法分类号】R544.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-22

A study of gene ploymorphism of N5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) between Hui and Han nationalities in Ningxia and the relationship with essential hypertension

MA Ping[1], QIN Shu[1], LIU Hai-yan[2], XU Qing-bin[2]
(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Cardiac Center, General Hospital, Ningxia Medical University)

【Abstract】*Objective*: To comparatively study distributional characteristics of gene ploymorphism of N5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) between Hui and Han nationalities in Ningxia and the relationship between the polymorphism and essential hypertension. *Methods*: The study was performed in 146 Hui patients and 155 Han patients with essential hypertensive (EH) and was performed in 112 Hui peoples and 140 Han peoples with normal tensive (NT). MTHFR gene polymorphism was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Results*: The frequencies of TT genotype and T allele in Hui patients with hypertension were of no difference with those in Han patients ($P>0.05$). There were also no significant differences between Hui NT group and Han NT group ($P>0.05$). The frequencies of 677TT genotype and T allele in Hui patients with EH were higher than those of Hui NT group ($P<0.05$). The frequencies of CT+TT genotype and T allele in Han patients with EH were both higher than those of control ($P<0.05$). Binary stepwise logistic regression analysis showed that TT genetype (OR=2.34, 95%CI 1.363~4.016, $P=0.002$) was independent risk factor for essential hypertension. *Conclusion*: There does not exist racial difference between Hui and Han nationalities with MTHFR C677T gene polymorphism. The polymorphism has a correlation with EH between Hui and Han nationalities in Ningxia. T allele maybe a susceptible gene for EH in Ningxia people.

【Key words】N5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR); polymorphism; Ningxia; nationality; hypertension

原发性高血压（Essential hypertension，EH）是多种易感基因与环境因素相互作用所致的疾病。近年来，高同型半胱氨酸（Homocysteine，Hcy）血症被认为是心血管疾病的危险因素，并且可能参与了高血压的病理生理过程[1]。亚甲基四氢叶酸还原酶（Methylenetetrahydrofolate reductase，MTHFR）是 Hcy 代谢的关键酶，MTHFR 基因 677 碱基 C/T 突变，产生 MTHFR酶的不耐热性变化，导致酶活性下降，使血浆同型半胱氨酸浓度升高[2]，从而产生一系列的病理变化。MTHFR 基因

作者介绍：马 萍（1973-），女，副主任医师，博士，研究方向：心血管病及介入治疗。
通信作者：覃 数，男，教授，Email：liuhaiyan49@sohu.com。
基金项目：宁夏回族自治区自然科学基金资助项目（编号：NZ10134）。

C677T 点突变，其频率分布受人种、地域等因素的影响较大，其多态性与原发性高血压的关系目前国内外研究结果尚有争议且在民族间进行研究的报道较少。本研究旨在探讨 N5，10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性在宁夏回、汉族高血压人群的频率分布差异及其与原发性高血压的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象来自 2009 年 12 月-2010 年 10 月在宁夏医科大学附属医院门诊体检及住院的、且长期居住于宁夏的回汉族个体（相互间无血缘关系、3 代血亲无异族通婚）。本研究共收集病例 575 例，剔除信息不全及不完全符合标准的病例后，入选 553 例，有效率 96.17%，其中高血压组（EH 组）：回族 146 例（男 74 例，女 72 例），平均年龄（48.28±16.03）岁；汉族 155 例（男 115 例，女 40 例），平均年龄（44.06±11.31）岁。入选标准：符合《2005 年 WHO/ISH 高血压治疗指南》分类标准：收缩压≥140 mmHg（1 mmHg=0.133 kPa）和（或）舒张压≥90 mmHg 者，既往确诊的高血压患者或在 2 周内服用过降压药者，排除肝肾、甲状腺、糖尿病等疾病和药源性等引起继发性高血压的对象。正常对照组（NT 组）：回族 112 例（男 63 例，女 49 例），平均年龄（45.1±16.16）岁；汉族 140 例（男 90 例，女 50 例），平均年龄（41.69±11.38）岁。选择我院门诊健康体检者，且收缩压< 140 mmHg，舒张压< 90 mmHg，无服用降压药史，无高血压病家族史，排除肝肾和甲状腺疾病、糖尿病等。

1.2 方法

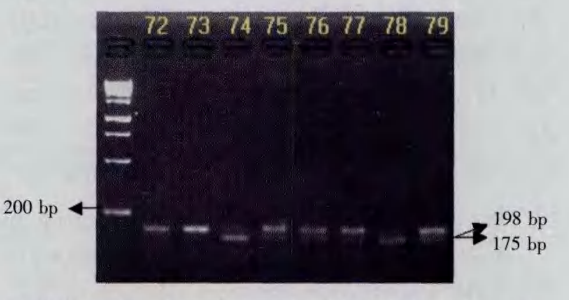
1.2.1 一般临床资料的收集 如姓名、性别、年龄、民族、既往史、家族史、有无异族通婚史、近期有无服药情况等。测量心率、身高、体重，并计算体重指数[体重指数=体重/身高 2 (kg/m^2)]。

1.2.2 生化指标 清晨空腹 12 h 抽外周静脉血 10 ml，5 ml 行生化检查，采用本院 Olypuse 公司 2700 型全自动生化分析仪检测空腹血糖（GLU）、甘油三酯（TG）、总胆固醇（TC）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、血尿酸（UA）、尿素氮、肌酐等。5 ml 静脉血 EDTA-Na 抗凝，-70 ℃ 冰箱保存备用（用以基因组 DNA 的提取）。

1.2.3 外周血白细胞抽提 DNA 使用血液基因组 DNA 小量抽提试剂盒（天根生化科技北京有限公司）提取基因组DNA。

1.2.4 PCR扩增及检测 （1）PCR扩增：引物设计使用Primer3 InPut 网络软件，上游引物：5'-TGAAGGAGAAGGTGTCT-GCGGGA-3'，下游引物：5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'。反应体系 20 μl：10×buffer(Mg^{2+})2 μl，dNTP(2.5 mmol/L) 1.6 μl，上游引物（10 μmol/L）0.4 μl，下游引物（10 μmol/L）0.4 μl，DNA 模板 1 μl，TaqDNA 聚合酶 0.1 μl，ddH_2O 14.5 μl。PCR 反应条件：94 ℃预变性 3 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，循环次数 30~35 个，72 ℃延伸 10 min。（2）酶切及电泳：对 PCR 扩增产物理想的样品进行酶切分析。10 μl 酶切体系包括 PCR 产物 3 μl，*Hinf* Ⅰ内切酶 0.2 μl，10×buffer 1 μl，ddH_2O 5.7 μl，BSA 0.1 μl，37 ℃水浴过夜。酶切产物经 2%琼脂糖凝胶电泳（溴化乙啶染色），室温下恒压 100 V 电泳 30 min 后取出凝胶，在凝胶成像仪中观察基因诊断结果。

1.2.5 PCR-RFLP 分析结果 MTHFR 基因 677 位原有的 C 为 T 代替，产生 *Hinf* Ⅰ限制性内切酶酶切位点。本组 PCR 扩增产物经酶消化，产生 3 种基因型：野生型（C/C 型）仅见 198 bp 片段；纯合突变型（T/T 型）酶切后产生 175 bp 和 23 bp 2 个片段，凝胶显示 175 bp 一条带（后者已泳动至胶外）；杂合突变型（C/T 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（见图 1）。



注：左侧为 marker，74、78 为 TT 型，75、76、77、79 为 CT 型，72、73 为 CC 型

图 1 MTHFR 基因经 *Hinf* Ⅰ酶切后电泳结果

1.3 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行数据分析，基因型和等位基因频率采用直接计数法统计。研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、基因型和等位基因频率的组间比较采用 χ^2 检验。计量资料用（均数 ± 标准差）表示，组间均数比较用 t 检验，方差不齐采用近似 t 检验。二项逐步 *Logistic* 回归分析基因型等与高血压病易感性的关联关系，计算出 P 值、比值比及 95%的可信区间。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 宁夏回、汉族 EH 组及 NT 组的 MTHFRC677T 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg

平衡（P>0.05），表明研究对象来自同一群体，具有较好的代表性。

2.2 回族 EH 组和汉族 EH 组一般临床资料对比（表 1）

回族 EH 组和汉族 EH 组在脉压、体重指数、尿素氮、肌酐、尿酸、甘油三酯、HDL-C 上无统计学差异（P>0.05）；在年龄、性别、收缩压、舒张压、平均动脉压、血糖、总胆固醇、LDL-C 指标上均有差异（P<0.05），其中回族 EH 组除了年龄较汉族EH 组高外，其余各指标均低于汉族 EH 组。

表 1　回族 EH 组与汉族 EH 组一般资料比较（均数 ± 标准差）

一般资料	回族 EH 者 (n=146)	汉族 EH 者 (n=155)	P
年龄(岁)	48.28±16.03	44.06±11.31	0.009
性别(男/女)*	74/72	115/40	0.000
收缩压(mmHg)	149.75±16.55	154.01±15.67	0.023
舒张压(mmHg)	91.83±11.3	94.5±9.84	0.029
脉压(mmHg)	57.92±14.57	59.51±14.4	0.343
平均动脉压(mmHg)	111.14±11.37	114.34±10.02	0.010
体重指数(kg/m^2)	26.19±3.83	26.05±3.41	0.744
尿素氮(mmol/L)	5.83±1.89	5.87±1.26	0.826
肌酐(umol/L)	87.22±17.14	86.85±12.96	0.833
血糖(mmol/L)	3.91±1.08	5.25±0.76	0.000
尿酸(umol/L)	317.42±94.93	324.52±87.91	0.501
甘油三酯(mmol/L)	2.11±1.16	2.1±1.08	0.937
总胆固醇(mmol/L)	5.06±1.13	5.75±1.06	0.000
HDL-C(mmol/L)	1.18±0.25	1.21±0.29	0.260
LDL-C(mmol/L)	3.18±0.82	3.63±0.98	0.000

注：*，比较 2 组之间男、女构成比的差异用四格表 χ^2 检验（P<0.05）

2.3　回、汉族 EH 组间及 NT 组间基因多态性的分布比较(表 2)

回、汉族 EH 组间比较基因型频率(χ^2=1.413，P=0.493)和等位基因频率(χ^2=0.489，P=0.484)分布差异无统计学意义。另外，回、汉族 NT 组间在基因型频率(χ^2=0.471，P=0.79)和等位基因频率(χ^2=0.299，P=0.585)分布亦无统计学意义。

2.4　回、汉族 EH 与 NT 组间基因多态性的分布比较(表 2)

回族 EH 组与 NT 组基因型频率分布有统计学差异(χ^2=10.001，P<0.05)，EH 组 TT 基因型频率高于 NT 组(χ^2=6.221，P<0.05)；EH 组 T 等位基因高于 NT 组，有统计学差异(χ^2=11.8，P<0.05)。汉族 EH 组与 NT 组比较 3 种基因型总体分布频率有统计学差异（χ^2=7.108，P<0.05)，2 组 TT 基因型比较无显著性差异(χ^2=0.828，P>0.05)，但 EH 组变异型 TT+CT 较 NT 组为高，有显著性差异(χ^2=7.091，P<0.05)；EH 组 T 等位基因高于 NT 组，差异有统计学意义(χ^2=5.98，P<0.05)。

2.5　MTHFR 基因 C677T 多态性与高血压相关性的二项逐步 *Logistic* 回归分析(表 3)

将所有研究对象以是否患有高血压为应变量，将基因型(分设两个哑变量 TT 型、CT 型)、民族、性别、年龄、体重指数引入模型。采用逐步 *Logistic* 回归方法结果显示：TT 型、CT 型、年龄、体重指数与 EH 有关(P<0.05)，调整了其他因素后 TT 基因型相对于 CC 基因型的 OR 值为 2.34，95% *CI* 为 1.363~4.016，提示 MTHFR 基因 TT 型患 EH 相对危险度是 CC 基因型的 2.34 倍。此外，民族因素未进入回归方程，提示回汉两族的民族因素与 EH 无关(P>0.05)。

3　讨　论

Hcy 是蛋氨酸代谢过程中形成的一种含硫氨基酸。血浆 Hcy 水平升高使血浆一氧化氮水平降低，内皮素-1 水平升高，造成血管内皮损伤[3]，血管平滑肌增生[4]，并抑制一氧化氮合酶和前列环素的合成，这些损害被认为与高血压的发病密切相关[5]。MTHFR 是影响 Hcy 代谢的关键酶，其基因 677 位密码子胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)置换，可导致活性和耐热性降低，从而使血浆 Hcy 浓度升高。因此，MTHFR 基因成为高血压研究的候选基因，其突变与血压值的关系得到了研究者的重视。

MTHFR 基因 C677T 点突变频率分布存在种族、地域差异。有报道蒙古族 EH 人群突变纯合子 TT 频率为 15%，T 等位基因频率为 32%[6]；高原原等[7]研究上海城市社区 EH 人群 TT 基因型频率为 11.8%，T 等位基因频数为 38.5%。本研究发现宁夏回族 EH 组 TT 基因型频率为 22.6%，T 等位基因频数在为 42.8%；汉族 EH 组 TT 基因型频率为 17.4%，T 等位基因频数在为 40%，2 组 TT 基因型频率及 T 等位基因频率差异均无统计学意义(P>0.05)，但略高于蒙古族及上海城市社区 EH 人群。在正常人群 MTHFR 基因 C677T 突变频率亦有

表 2　回、汉族 EH 组与 NT 组基因型及等位基因分布比较（例数/频率）

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
回族EH组	146	54/0.37	59/0.404	33/0.226*	167/0.572	125/0.428*
汉族EH组	155	58/0.374	70/0.452	27/0.174	186/0.6	124/0.4
回族NT组	112	61/0.545	39/0.348	12/0.107	161/0.719	63/0.281
汉族NT组	140	74/0.529	47/0.336	19/0.136	195/0.696	85/0.304

注：回族 EH 组与回族 NT 组比，*，P<0.05；汉族 EH 组与汉族 NT 组比，TT 型 P>0.05，但变异型 CT+TT 以及 T 等位基因则 P<0.05

表 3　MTHFR 基因型与高血压相关性的非条件 Logistic 回归分析结果

自变量	β	*SE*	*Wald*	P	*OR*	OR95%*CI*
TT型	0.85	0.276	9.509	0.002	2.34	1.363~4.016
CT型	0.55	0.206	7.106	0.008	1.734	1.157~2.598
年 龄	0.214	0.086	6.267	0.012	1.239	1.048~1.465
体重指数	0.955	0.112	72.826	0.000	2.599	2.087~3.236

注：β 为回归系数，*SE* 为标准误，*Wald* 为卡方值，*OR* 为比值比，*CI* 为可信区间

不同报道，T 纯合型突变频率爱尔兰人约为 6.1%、荷兰人约为 5.2%、法籍加拿大人约为 12%[8]、欧洲人约为 35%[9]、泰国人约 1.4%[10]，国内邢绣荣等[11]研究北京城区汉族人群 TT 纯合子占 20.6%，吴华彰等[12]分析了安徽蚌埠地区汉族人群 T 纯合型突变频率为 11.5%，本研究发现宁夏回族正常人群和汉族正常人群 T 纯合型突变频率分别为 10.7%和 13.6%，两组比较无统计学差异（$P>0.05$），与法籍加拿大人接近，低于北京城区汉族人群。由此可见，MTHFR 基因在人群分布呈遗传多态性，本研究中 EH 人群和 NT 人群未显示回、汉族的种族差异性。

以往 MTHFR 基因 C677T 位点多态性与 EH 的关系研究结果报道不一，Lwin 等[13]人在研究日本男性 MTHFR 基因 C677T 多态性与高血压和高尿酸血症时，发现 MTHFR 基因 C677T 多态性与尿酸水平相关，而与高血压无关。2005 年波兰 Tylicki 报道基因型频率在原发性高血压和健康人群中的分布没有差异，即此基因多态性与 EH 无关[14]。然而，Golledge 等[15]人对土耳其人研究发现 MTHFR 基因 C677T 多态性是高血压的独立危险因素。同样，国内唐仪等[16]人对南方省级两家医院高血压病研究发现 MTHFR 基因 C677T 多态性在高血压病的发生发展中可能有较大的临床意义。本研究结果显示回族 EH 组 TT 基因型频率及 T 等位基因频率均高于回族 NT 组（$P<0.05$）；汉族 EH 组变异型 TT+CT 基因型频率及 T 等位基因频率均高于汉族 NT 组（$P<0.05$）。*Logistic* 回归显示，TT 基因型是 EH 的独立危险因素（OR 值为 2.34，95%*CI* 为1.363~4.016），提示 MTHFR 基因 TT 型患 EH 相对危险度是 CC 基因型的 2.34 倍，民族因素未进入回归方程，提示回汉两族的民族因素与 EH 无关（$P>0.05$）。以上研究结果的不同，可能是血压水平受基因因素和环境因素的共同影响。不同种族、人群的遗传背景差异很大，基因多态性位点的作用强度不同，以及饮食习惯、居住环境、疾病、样本量大小、统计方法选择等都可能影响研究的结果，亦有可能是病人对医院存在选择性而产生入院偏倚造成的结果差异，因此 MTHFR 基因多态性与 EH 的关系仍需要进一步探讨。

综上所述，宁夏回汉人群中存在 MTHFR 基因 677 多态性；该位点多态性分布在回、汉族 EH 之间无种族差异；该位点多态性与宁夏地区回、汉人群 EH 存在相关性；T 等位基因可能是宁夏地区人群 EH 的易感基因。

参 考 文 献

[1] Boers G H.Mild hyperhomocysteinemia is an independent risk factor of arterialvascular disease[J].Semin Thromb Homost,2000,26(3):291-295.

[2] Frosst P,Blom H J,Milos R,et al.A candidate genetic risk factor for vascular disease:a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase[J].Nat Genet,1995,10(1):111-113.

[3] 张向阳，加娜提，爱 华.高同型半胱氨酸血症大鼠血浆一氧化氮和内皮素 1 水平的变化：血管内皮功能损伤验证[J].中国组织工程研究与临床康复，2007，11(41)：8242-8246.

[4] 徐志红，陆国平，吴春芳.同型半胱氨酸对大鼠血管平滑肌细胞增殖及胶原生成的影响[J].中国组织工程研究与临床康复，2007，11(2)：226-229.

[5] 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)：203-206.

[6] 呼日勒，牛广明，赵世刚，等.N5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与蒙古族原发性高血压病的关系[J].高血压杂志，2006，14(4)：228.

[7] 高原原，詹思延，尹香君，等.亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与原发性高血压的关系[J].北京医科大学学报，1999，31(4)：371.

[8] 许海燕，陈在嘉，汤 健，等.冠心病患者同型半胱氨酸代谢相关酶基因多态性的研究[J].中华医学杂志，1999，79(6)：414-415.

[9] Rees D C,Liu Y T,Cox M J,et al.Factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in extreme in old age[J].Tromb Haemost,1997,78(5):1357-1360.

[10] Angchaisuksiri P,Pingsat B S,Sura T,et al.Prevalence of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation in Thai patients with deep vein thromobosis[J].Acta Haematol,2000,103(4):191-192.

[11] 邢绣荣，华 琦.亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与高血压及心脏结构功能的相关性[J].解放军医学杂志，2007，32(7)：741-743.

[12] 吴华彰，赵云利，王玉珏，等.安徽蚌埠地区汉族人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性[J].包头医学院学报，2011，27(2)：4-6.

[13] Lwin H,Yokoyama T,Yoshiike N,et al.Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene(C677T MTHFR) is not a confounding factor of the relationship between serum uric acid level and the prevalence of hypertension in Japanese men[J].Circ J,2006,70(1):83-87.

[14] Tylicki L,Fodinger M,Puttinger H,et al.Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in essential hypertension relation:with the development of hypertentive end-stage renal disease[J].Am J Hypertens,2005,18(11):1442-1448.

[15] Golledge J,Norman P E.Relationship between two sequence variations in the gene for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and plasma homocysteine concentration.Health in men study[J].Hum Genet,2008,123(1):35-40.

[16] 唐 仪，陈 慧，吴小盈，等.N5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与原发性高血压病的关系研究[J].中国分子心脏病学杂志，2007，7(4)：205-207.

（责任编辑：关蕴良）