

·信息研究·

惠州汉族女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成还原酶的基因多态性分布

高利洁¹, 鲁衍强^{2*}, 芮欣忆², 林小兵¹

(1.惠州市第二妇幼保健院,广东 惠州 516008; 2.上海靶向分子医学研究所,上海 200433)

摘要:【目的】研究广东省惠州市汉族女性亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T、A1298C及甲硫氨酸合成还原酶(MTRR)A66G基因多态性的分布特征。【方法】采用横断面调查研究方法,以惠州市359例汉族女性为对象,采集口腔黏膜上皮细胞,提取基因组DNA,采用Taqman-MGB技术,进行MTHFR和MTRR基因多态性检测。统计分析基因多态性的分布特征,并与已报道的其他地区的数据进行比较。【结果】惠州市汉族女性的MTHFR 677TT纯合突变基因型频率为10.9%,高于四川德阳的8.6%,低于山东潍坊的41.8%和河南郑州的34.5%($P < 0.05$);MTHFR 1298CC纯合突变基因型频率为7.2%,高于潍坊的1.2%和郑州的2.7%($P < 0.05$);MTRR 66GG纯合突变基因型频率为5.6%,低于海南地区的9.1%($P < 0.05$)。【结论】惠州市汉族女性有不同于其他地区的MTHFR和MTRR基因多态性分布特征。

关键词:亚甲基四氢叶酸还原酶;甲硫氨酸合成还原酶;基因多态性

中图分类号:R71

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)01-0140-04

Polymorphism Distribution of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Methionine Synthase Reductase among the Han Women in Huizhou

GAO Li-Jie¹, LU Yan-qiang^{2*}, RUI Xin-yi², LIN Xiao-bing¹

(1. Huizhou No.2 Women's and Children's Healthcare Hospital, Huizhou 516008, China; 2. Shanghai Institute of Targeted Therapy and Molecular Medicine, Shanghai 200433, China)

Abstract: 【Objective】To explore the gene polymorphisms distribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, A1298C and methionine synthase reductase (MTRR) A66G among the Han female in Huizhou, Guangdong. 【Methods】A cross-sectional study was used. A total of 359 oral epithelial cells samples from recruited Han women in Huizhou were collected. The detections of MTHFR and MTRR gene polymorphisms were conducted with Taqman-MGB technology. The distribution of gene polymorphisms was analyzed and compared with partial regions of China, which are Weifang, Zhengzhou, Deyang City and Hainan Province. 【Results】The frequencies of MTHFR C677T CC, CT and TT genotypes among the Han women in Huizhou were 51.8%, 37.3%, and 10.9%. The frequencies of the MTHFR A1298C AA, AC and CC genotypes in Huizhou Han women were 61.6%, 31.2%, and 7.2% and the frequencies of the MTRR A66G AA, AG and GG genotypes were 54.6%, 39.8%, and 5.6%. Compared with partial regions, the study found that the genotype of MTHFR C677T among the Han women in Huizhou showed statistical difference from that in Weifang, Zhengzhou, and Deyang ($P < 0.05$). The genotype of MTHFR A1298C in Huizhou Han women showed statistical difference from that in Weifang and Zhengzhou ($P < 0.01$). The genotype of MTRR A66G in Huizhou Han women showed statistical difference from that in Hainan ($P < 0.05$) while no difference was found when compared with other regions ($P > 0.05$). 【Conclusions】The gene polymorphisms distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G among the Han women in Huizhou were found to be statistically different from partial regions of China.

Key words: methylenetetrahydrofolate reductase; methionine synthase reductase; single nucleotide polymorphisms

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 34(1): 140-143]

收稿日期:2012-03-29

基金项目:国家妇幼保健中心妇幼保健分子遗传医学研究专项计划(FY-ZX-ZD-0051)

作者简介:高利洁,主任医师, E-mail: gao928@21cn.com; * 通信作者: 鲁衍强, E-mail: luyanqiang@genechina.com

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平升高与神经管缺陷^[1]、唇腭裂^[2]、先天性心脏病^[3]等出生缺陷及复发性流产^[4]、妊娠期高血压综合征^[5]等孕期疾病密切相关。Hcy 水平升高主要是遗传因素和营养因素共同作用的结果。5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)和甲硫氨酸合成还原酶(methionine synthase reductase, MTRR)是叶酸代谢通路中的关键酶。MTHFR C677T 和 A1298C、MTRR A66G 等基因位点多态性影响着其编码的酶的活性^[6]、血清和红细胞叶酸浓度^[7]以及血浆 Hcy 浓度^[8]。基因多态性与叶酸、Hcy 代谢以及以上多种疾病的关系是近年研究的热点。然而由于研究对象和研究方法等差异,各研究结果不尽一致,不同种族和地区人群的分布也不尽相同。本文对惠州市汉族女性的 MTHFR 和 MTRR 分子流行病学进行研究,旨在阐明相关遗传标记在惠州市汉族女性中的分布特征,为针对出生缺陷和心脑血管疾病预防制定针对性的干预措施和相关卫生政策提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

依据知情同意原则,选择 2011 年 3 月至 2012 年 3 月在广东省惠州市第二妇幼保健院进行孕前或孕期检查的女性,纳入标准为同意进行口腔黏膜细胞采样并进行遗传检验的汉族女性,排除 DNA 抽提不符合要求者,共获取有效样本 359 例,平均年龄 27.6(S = 4)岁。

1.2 样本 DNA 采集与基因分型

采集受检者的口腔黏膜上皮细胞,利用柱式抽提试剂盒抽提样本 DNA。采用 Taqman-MGB 技术,检测 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 的基因多态性^[9]。相关仪器、试剂均购自美国 ABI 公司。对三个位点分别进行荧光定量 PCR 反应,所用 Taqman-MGB 探针信息见表 1。每个反应体系总体积 10 μ L,包含浓度为 20 ng/ μ L 的 DNA 模

板 1 μ L,2 $\times$ Taqman Universal MasterMix 5 μ L,20 $\times$ Taqman-MGB 探针 0.5 μ L,去离子水 3.5 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min,随后进行 20 个循环的扩增(92 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min),再进行 30 个循环的扩增(89 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 90 s)。反应结束后在 ABI 7900 型荧光定量 PCR 仪上读取样品孔中的终点荧光,利用分析软件确定各个样本的基因分型结果:野生纯合、杂合、突变纯合。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,基因频率采用基因计数法计算,Hardy-Weinberg 遗传平衡检验、基因型及等位基因频率组间比较均采用 R $\times$ C χ^2 检验方法,以 95%可信区间(CI)表示相对风险度,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 惠州市汉族女性 MTHFR、MTRR 基因多态性的分析

对检测到的 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 位点分别进行 H-W 遗传平衡检验,均符合 H-W 平衡,证明样本具有本区域群体代表性。惠州市 359 例汉族女性的基因型及等位基因频率统计结果见表 2、3。

2.2 惠州市汉族女性 MTHFR、MTRR 基因多态性分布与其他地区的比较

贺宪民等^[9]和劳海红等^[10]之前报道了山东潍坊、河南郑州、四川德阳以及海南省汉族女性的 MTHFR、MTRR 基因多态性分布,以本研究的惠州数据与这些数据数据进行两两比较以及多重比较,结果如表 2、3 所示。

五地区的 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 基因型构成以及等位基因频率分布整体比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。两两比较,惠州市汉族女性 MTHFR C677T 基因型构成与潍坊、郑州和德阳市的差异有统计学意义($P < 0.05$),与海南地区的差异无统计学意义($P > 0.05$);纯合

表 1 Taqman-MGB 探针所在位置
Table 1 Detection sequences of gene MTHFR and MTRR

SNP	Location of detection probe
MTHFR C677T	GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG[G/A]CTCCCGCAGACACCTTCTCCTCAA
MTHFR A1298C	AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCCCA
MTRR A66G	AGGCAAAGCCATCGCAGAAGAAAT[A/G]TGTGAGCAAGCTGTGTTACATGGAT

表 2 不同地区汉族女性 MTHFR、MTRR 基因型频数和频率分布比较

Table 2 Comparison of MTHFR and MTRR genotype distribution and frequencies by areas [n(%)]

Area	MTHFR C677T				MTHFR A1298C				MTRR A66G			
	CC	CT	TT	P	AA	AC	CC	P	AA	AG	GG	P
Huizhou(Our Study)	186(51.8)	134(37.3)	39(10.9)	<0.001 ¹⁾	221(61.6)	112(31.2)	26(7.2)	<0.001 ¹⁾	196(54.6)	143(39.8)	20(5.6)	0.005 ¹⁾
Weifang ^[9]	24(14.5)	72(43.6)	69(41.8)	<0.001 ²⁾	118(71.5)	45(27.3)	2(1.2)	0.007 ²⁾	98(59.4)	56(33.9)	11(6.7)	0.422 ²⁾
Zhengzhou ^[9]	46(17.8)	123(47.7)	89(34.5)	<0.001 ²⁾	188(72.9)	63(24.4)	7(2.7)	0.004 ²⁾	146(56.6)	96(37.2)	16(6.2)	0.788 ²⁾
Deyang ^[9]	55(39.6)	72(51.8)	12(8.6)	0.013 ²⁾	75(54.0)	56(40.3)	8(5.8)	0.153 ²⁾	79(56.8)	54(38.8)	6(4.3)	0.812 ²⁾
Hainan ^[10]	6004(57.0)	3543(33.6)	986(9.4)	0.144 ²⁾	6017(57.1)	3794(36.0)	722(6.9)	0.172 ²⁾	5246(49.8)	4330(41.1)	957(9.1)	0.039 ²⁾

1) Multiple comparison within groups; 2) compared with Huizhou

突变基因型 TT 的频率显著低于潍坊和郑州,高于德阳。MTHFR A1298C 基因型构成与潍坊和郑州地区的差异有统计学意义($P < 0.01$);与德阳和海南地区的差异没有统计学意义($P > 0.05$),纯合突变基因型 CC 的频率高于潍坊和郑州。MTRR A66G 的基因型构成与潍坊、郑州和德阳市的差异没有统计学意义($P > 0.05$);与海南地区的差异有统计学意义($P < 0.05$),纯合突变基因型 GG 的频率低于海南地区。等位基因频率比较结果类似(表 3)。惠州市汉族女性的 MTHFR 677T 突变等位基因频率显著低于潍坊和郑州($P < 0.01$),高于海南($P < 0.05$),与德阳市的差异无统计学意义($P > 0.05$)。MTHFR 1298C 突变等位基因频率高于潍坊和郑州($P < 0.01$),与德阳和海南地区的差异无统计学意义($P > 0.05$)。MTRR 66G 突变等位基因频率低于海南($P < 0.05$),与潍坊、郑州和德阳市的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

3.1 主要发现

之前未见针对惠州市出生缺陷的分子流行病

学调查报告。我们首次研究了 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 基因多态性在惠州市汉族女性中的分布情况,并与已报道的其他地区的数据进行比较,结果显示不同的遗传分布特征。潍坊、郑州、德阳、惠州和海南地区的 MTHFR 677T 突变等位基因频率分别为 63.6%、58.3%、34.5%、29.5%和 26.2%,由北到南呈现递减趋势;MTHFR 1298C 突变等位基因频率分别为 14.8%、14.9%、25.9%、22.8%和 24.9%,由北到南基本呈现递增趋势。

3.2 意义与应用

出生缺陷是我国严重的公共卫生问题和社会问题。1997 年 10 月至 2003 年 9 月,针对 0~5 岁儿童的出生缺陷调查数据显示,惠州市出生缺陷发生率为 90.91/万^[11]。MTHFR、MTRR 作为叶酸代谢和 Hcy 代谢过程中的关键酶,其基因多态性与出生缺陷的发生密切相关。MTHFR 677C 被 T 取代后,氨基酸发生错译,位于催化区域的丙氨酸被缬氨酸代替,导致 MTHFR 的耐热性和活性下降。Goyette 等^[12]研究发现,与 CC 型酶活性相比,CT 型酶活性为 56%,TT 型酶活性只有 22%,将严重影响叶酸在体内的有效利用,增加神经管畸形、先

表 3 不同地区 MTHFR、MTRR 等位基因频数和频率分布比较

Table 3 Comparison of MTHFR and MTRR allele frequencies by areas [n(%)]

Area	MTHFR C677T			MTHFR A1298C			MTRR A66G		
	C	T	P	A	C	P	A	G	P
Huizhou(Our Study)	506(70.5)	212(29.5)	<0.001 ¹⁾	554(77.2)	164(22.8)	<0.001 ¹⁾	535(74.5)	183(25.5)	<0.001 ¹⁾
Weifang ^[9]	120(36.4)	210(63.6)	<0.001 ²⁾	281(85.2)	49(14.8)	0.003 ²⁾	252(76.4)	78(23.6)	0.52 ²⁾
Zhengzhou ^[9]	215(41.7)	301(58.3)	<0.001 ²⁾	439(85.1)	77(14.9)	0.001 ²⁾	388(75.2)	128(24.8)	0.786 ²⁾
Deyang ^[9]	182(65.5)	96(34.5)	0.125 ²⁾	206(74.1)	72(25.9)	0.309 ²⁾	212(76.3)	66(23.7)	0.568 ²⁾
Hainan ^[10]	15551(73.8)	5515(26.2)	0.045 ²⁾	15828(75.1)	5238(24.9)	0.217 ²⁾	14822(70.4)	6244(29.6)	0.016 ²⁾

1) Multiple comparison within groups; 2) compared with Huizhou

天性心脏病、唇腭裂等出生缺陷的发病风险。

MTHFR和MTRR的分子流行病学调查将推动我国出生缺陷病因学的深入研究。基因多态性的地域分布差异在一定层面和程度上解释了我国出生缺陷发病率北高南低的事实。当然南北方的饮食差异导致叶酸摄入水平的不同也是重要原因。遗传因素如何与营养因素、环境因素综合作用导致出生缺陷的发生,仍需深入研究。

3.3 结论

本研究显示惠州汉族女性有不同于其他地区的MTHFR和MTRR基因多态性分布特征。由于不同地区人群的遗传特征差异,我们在制定相关健康干预方案时应该因地制宜、因人而异,而不能使用统一模式、执行统一标准。通过开展MTHFR和MTRR的分子流行病学研究,了解不同地区人群的遗传特征,将为我国深入开展《增补叶酸预防神经管缺陷项目管理方案》、进一步完善出生缺陷一级预防措施提供科学依据。

参考文献:

- [1] 保睿,吴建新.人类神经管缺陷分子遗传学研究进展[J].中国优生与遗传杂志,2009,17(5):1-4.
Bao R, Wu JX. Research progresses of molecular genetics in human neural tube defects[J]. Chin J Birth Health Heredity, 2009, 17(5): 1-4.
- [2] 王苏梅,王建华,贾颐舫,等.山东地区非综合征性唇腭裂患者MTHFR基因C677T的多态性研究[J].中国优生与遗传杂志,2011,19(5):6-8.
Wang SM, Wang JH, Jia YF, et al. Genetic Polymorphism of MTHFR C677T with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Shandong Area[J]. Chin J Birth Health Heredity, 2011, 19(5): 6-8.
- [3] 石建,李芬.同型半胱氨酸、亚甲基四氢叶酸还原酶及叶酸与先天性心脏病的关系[J].中国全科医学,2005,8(18):1551-1553.
Shi J, Li F. Study on homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and the relationship between folate and congenital heart disease [J]. Chin Gener Pract, 2005, 8(18): 1551-1553.
- [4] 宋绿茵,戚潜辉,余达贤,等.同型半胱氨酸代谢相关酶基因多态性与习惯性流产关系的研究[J].中华围产医学杂志,2005,8(3):160-164.
Song LY, Qi QH, She DX, et al. Relationship between genetic polymorphism of homocysteine metabolism enzyme and unexplained repeated spontaneous abortion [J]. Chin J Perinat Med, 2005, 8(3): 160-164.
- [5] 左金玲,易建平,陈宝丽.妊娠高血压综合征基因遗传学研究进展[J].中国妇幼保健,2011,26(24):3822-3824.
Zuo JL, Yi JP, Chen BL. Advances in research of genes related to pregnancy induced hypertension [J]. Matern Child Health Care Chin, 2011, 26(24): 3822-3824.
- [6] Eskes TK. Open or closed? A world of difference: a history of homocysteine research [J]. Nutr Rev, 1998, 56(8): 236-244.
- [7] Nishio K, Goto Y, Kan do T, et al. Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake [J]. J Epidemiol, 2008, 18(3): 125-131.
- [8] Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations [J]. Circulation, 1996, 93(1): 7-9.
- [9] 贺宪民,张群,杨琦,等.亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性研究[J].中国计划生育学杂志,2010,18(1):13-18.
He XM, Zhang Q, Yang Q, et al. Study on the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase polymorphism[J]. Chin J Fam Plann, 2010, 18(1): 13-18.
- [10] 劳海红,贺宪民.海南省汉族和黎族妇女亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究[J].中国计划生育学杂志,2011,19(11):655-657.
Lao HH, He XM. Study on methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase gene polymorphism among the Han and Li women in Hainan Province[J]. Chin J Fam Plann, 2011, 19(11): 655-657.
- [11] 田佩玲,陈平乐,郑立新,等.广东地区0~5岁儿童出生缺陷现况调查分析[J].广东医学杂志,2004,25(3):323-325.
Tian PL, Chen PL, Zheng LX, et al. The analysis of 0~5 years old children's birth defects in Guangdong area [J]. Guangdong Med J, 2004, 25(3): 323-325.
- [12] Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, et al. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenol type correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency [J]. Am J Hum Genet, 1995, 56(5): 1052-1059.

(编辑 刘清海)