

# MTHFR 基因突变位点在脑卒中患病风险中的影响探究

周忠钰, 刘天伟, 雷皓伟, 华昱, 涂强, 魏慧彤, 刘佳萌, 成孟丽\*

湘南学院公共卫生学院, 湖南 郴州 423000

DOI:10.61369/MRP.2025060014

**摘要 :** 目的: 探究 MTHFR 基因 C677T 突变位点对脑卒中患病风险的影响。方法: 采用病例对照设计, 收集郴州地区健康人群和脑卒中患者血样, 运用琼脂凝胶电泳法及基因测序技术进行检测分析。结果: 脑卒中组 MTHFR C677T 的 CC 型、CT 型、TT 型分布频率分别为 67%、28%、5%, T 等位基因频率为 19%。脑卒中组 CT 基因型频率 (28%) 高于对照组 (8%), CC 基因型频率 (67%) 低于对照组 (92%)。结论: 郴州脑卒中病人的 MTHFR C677T 突变的 T 等位基因频率为 19%, CT 基因型人群患脑卒中风险更高。

**关键词 :** 缺血性脑卒中; MTHFR; 基因型频率

## Investigation on the Influence of MTHFR Gene Mutation Sites on the Risk of Stroke

Zhou Zhongyu, Liu Tianwei, Lei Haowei, Hua Yu, Tu Qiang, Wei Huitong, Liu Jiameng, Cheng Mengli\*

School of Public Health, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000

**Abstract :** Objective: To investigate the impact of the MTHFR gene C677T mutation site on the risk of stroke. Methods: A case-control design was adopted to collect blood samples from healthy individuals and stroke patients in Chenzhou region, using agarose gel electrophoresis and gene sequencing techniques for detection and analysis. Results: The frequencies of the CC, CT, and TT genotypes in the stroke group were 67%, 28%, and 5%, respectively, with a T allele frequency of 19%. The CT genotype frequency (28%) was higher in the stroke group than in the control group (8%), while the CC genotype frequency (67%) was lower in the stroke group than in the control group (92%). Conclusion: The T allele frequency of the MTHFR C677T mutation in stroke patients in Chenzhou is 19%, the CT genotype have a higher risk of stroke.

**Keywords :** ischemic stroke; MTHFR; genotype frequency

## 引言

脑卒中分为缺血性和出血性脑卒中, 是全球致死率位居第二的疾病。在中国, 其危害尤为严重, 平均每28秒就有一人因脑卒中离世, 预计到2030年, 脑卒中发生率将比2010年增加50%<sup>[1]</sup>。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因C677T多态性与多种疾病密切相关, 该酶在人体同型半胱氨酸和甲基化反应中发挥关键调节作用, 是叶酸-甲硫氨酸代谢的关键酶。MTHFR C677T基因第677位碱基对发生胞嘧啶被胸腺嘧啶取代的突变, 使突变处于外显子4, 导致密码子222处缬氨酸转变为丙氨酸, 进而降低酶活性, 增加患病风险。研究表明, 纯合突变和杂合突变受试者的患病风险均高于正常对照组。

我国MTHFR基因的C677T位点基因变异频率存在地区差异, 呈现从南向北TT型比例逐渐升高的趋势<sup>[2]</sup>。然而, 由于基因分布频率受种族等因素影响, 这一研究结果存在争议。本研究以郴州地区脑卒中人群为对象, 期望填补国内各地区MTHFR基因分布频率研究的空白, 探索脑卒中发生的风险因素, 为MTHFR基因突变的地域性分布提供参考。

## 一、资料与方法

### (一) 研究对象

选取2024年3月1日至5月10日健康管理中心的体检健康人

群作为对照组, 某三甲医院脑卒中患者作为病例组。病例组需符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2018》《各项脑血管诊断要点》《中国脑出血诊治指南(2019)》等诊断标准, 或有确诊脑卒中病史。排除出血性脑卒中等创伤性疾病、神经管缺陷等先天性疾病。

基金项目: 湖南省教育厅教学改革研究项目: OBE理念下知识图谱在《营养与食品卫生学》课程中的应用探索(编号202401001419), 湘南学院教学改革研究项目: OBE理念下《营养与食品卫生学》课程建设与实践(编号2023-51), 湘南学院实验开放项目: MTHFR基因突变位点对于脑卒中患病风险的影响

作者简介: 周忠钰(2002-), 男, 江苏徐州人, 湘南学院本科生, 研究方向为分子生物学。

通讯作者: 成孟丽(1983-), 女, 湖南郴州人, 讲师, 硕士, 研究方向为行为心理与健康。

病以及抑郁症等可能存在基因位点突变的疾病。所有患者及家属均签署知情同意书，研究符合伦理要求且已通过审核。

## (二) 实验材料

实验材料包括血样，Solarbio全血基因组DNA提取试剂盒(DP1800)，Solarbio PCR MasterMix (PC1150) 以及引物。

## (三) 主要仪器

朗基PCR扩增仪、台式冷冻高速离心机(LC-LX-HR185C)、紫外分光光度计(TU-1810)等仪器。

## (四) 实验方法

### 1.DNA提取

用移液枪吸取100 $\mu$ L紫色EDTA抗凝管中的血样至1.5mL离心管，加入2倍体积(200 $\mu$ L)红细胞裂解液，充分颠倒混匀后12000rpm离心1min，吸去上清。向沉淀中加入500 $\mu$ L白细胞裂解液，吹打混匀，65°C水浴10min，期间多次颠倒离心管。待离心管冷却至室温，加入20 $\mu$ L RNase A (10mg/mL)，混匀后室温放置10min。接着加入500 $\mu$ L蛋白沉淀液，混匀出现白色沉淀，65°C水浴5min，4°C、12000rpm离心5min，吸取下层液体转移至干净离心管，若有沉淀则再次离心。加入0.7倍体积无水乙醇，混匀后将溶液和絮状沉淀加入吸附柱，4°C、12000rpm离心1min，弃废液。依次用600 $\mu$ L漂洗液(使用前加60mL无水乙醇)洗涤两次，每次4°C、12000rpm离心1min，弃废液。最后4°C、12000rpm离心2min，敞口室温放置数分钟去除残余漂洗液，向吸附柱中加入100 $\mu$ L 65°C预热的洗脱液，室温放置5min，12000rpm离心2min，所得洗脱液可再次加入吸附柱离心，从而得到高质量基因组DNA。

### 2. DNA浓度测定

采用紫外分光光度法。先将DNA样品稀释，取5 $\mu$ L样品稀释至5mL，稀释倍数为1:1000。使用双蒸馏水调零，确保紫外分光光度计基线稳定。在260nm波长下测定稀释后DNA样品的吸光度(A260)，根据公式DNA浓度( $\mu$ g/ml)=A260×50×(稀释倍数÷1000)计算浓度，若A260为0.092，则DNA浓度为4.6 $\mu$ g/ml。

### 3. 引物制作

从NCBI数据库下载MTHFR C677T所在DNA序列，利用Primer Premier5.0设计引物，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。MTHFR C677T上游引物为5' - ATGACGATAAAGGCACGGCC - 3'，下游引物为5' - GCCAGGTGCTGCCACTCTCT - 3'。

### 4.PCR扩增

PCR反应体系为50 $\mu$ L，包含模板DNA 20 $\mu$ L，上下引物各2 $\mu$ L，2×MasterMix 25 $\mu$ L，双蒸水1 $\mu$ L。反应条件为：94°C预变性3min；94°C变性30s、55°C退火30s、72°C延伸1min，共30个循环；最后72°C终延伸5min。

## 二、结果

MTHFR C677T基因型检测结果分析 PCR产物经焦磷酸测序后，仪器测得峰高与检测位点结合模板的碱基数量成正比，经软件处理后自动转化为序列信息，确定该样本携带的基因型。



图1 野生纯合型(CC)

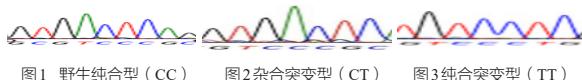


图2 杂合突变型(CT)

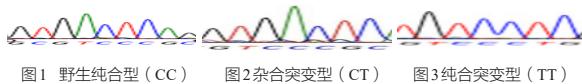


图3 纯合突变型(TT)

MTHFR基因分布频率 对照组与脑卒中组等位基因频率分布符合Hardly-Weinberg遗传平衡定律，对照组( $\chi^2=0.001$ , P=0.976,) 脑卒中组( $\chi^2=0.420$ , P=0.520,) 两组P值均大于0.05，数据来自同一遗传群体。

MTHFR C677T基因型频率及等位基因频率 脑卒中组MTHFR C677T的CC型、CT型、TT型分布频率分别为67%、28%、5%，C、T等位基因频率为81.0%、19.0%。脑卒中组CT基因型频率(28%)高于对照组(8%)，OR值为4.71(95%CI:0.95 – 23.4)，对照组CC基因型频率(92%)高于脑卒中组(67%)，OR值为6(95%CI:1.2 – 30.1)，差异均有统计学意义(P<0.05)。由于对照组TT型为0，期望频数极低(0.8远小于5)，采用Fisher精确检验，P值为0.505>0.05，差异无统计学意义，见表1。

脑卒中组和对照组T等位基因分布频率分别为19%和4%，OR值为5.95(95%CI:1.3 – 27.2)，差异具有统计学意义(P<0.05)。而不同性别的脑卒中病人MTHFR C677T基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义(P>0.05)，见表2。

表1 MTHFR C677T基因型及等位基因的分布频率/例(%)

组别	例数	基因型			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	26	24(92)	2(8)	0(0)	50(96)	2(4)
脑卒中组	39	26(67)	11(28)	2(5)	63(81)	15(19)
$\chi^2$		1.549	4.103	-	6.5	
P		0.213	0.043	-	0.011	

表2 MTHFR C677T基因型在不同性别脑卒中病人中

的分布频率/例(%)

组别	例数	基因型			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
男	25	17(38)	6(24)	2(8)	40(80)	10(20)
女	14	9(64)	5(36)	0(0)	23(82)	5(18)
$\chi^2$		0.056	0.608	1.181	0.53	
P		0.813	0.435	0.277	0.818	

### 三、讨论

本研究纳入的对象符合 Hardy-Weinbrey 遗传平衡定律，能够代表郴州地区人群情况。研究检测出 CC 型、CT 型、TT 型三种 MTHFR 基因型。CT 基因型在病人中的比例是健康人的 4.71 倍 (OR 值为 4.71)，提示其可能与脑卒中发病风险相关。健康组中 CC 基因型是脑卒中病人的 6 倍 (OR=6)，表明 CC 基因型可能是脑卒中发病的保护因素。这与国内相关研究的结果相同，

如翁秋燕等分析发现 TT 型的脑卒中患病风险是 CC 型的 2.717 倍<sup>[3]</sup>。脑卒中组 T 等位基因频率显著高于对照组，OR 值为 5.95 (95%CI:1.3 - 27.2)，说明 T 等位基因携带者的患病风险约为 C 等位基因的 5.95 倍。

从地域上看，郴州脑卒中人群 MTHFR C677T 突变的 T 等位基因频率 (19.0%) 低于安徽铜陵地区 (44.4%)<sup>[4]</sup> 和黑龙江地区 (60.7%)<sup>[5]</sup>。

### 参考文献

- [1] 王拥军, 李子孝, 谷鸿秋等. 中国卒中报告 2019(中文版)(1)[J]. 中国卒中杂志, 2020, 15: 1037 - 1043.
- [2] FAN S, YANG B, ZHI X, et al. Combined genotype and haplotype distributions of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: a cross - sectional descriptive study of 13473 Chinese adult women [J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95 (48): e5355. DOI: 10.1097/MD.00000000000005355.
- [3] 翁秋燕, 查芹, 牛艳芳等. 宁波江北地区汉族青壮年亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性和体力活动与缺血性脑卒中的关系 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31: 4 - 9.
- [4] 朱娟娟, 崇慧峰, 胡志军, 等. 铜陵地区脑卒中病人 MTHFR C677T 基因多态性分布及同型半胱氨酸水平分析 [J]. 安徽医药, 2020, 24(05): 895 - 898.
- [5] 王超, 于莲, 季方茹, 等. MTHFR 基因多态性在黑龙江东部地区脑卒中患者的频率分析 [J]. 黑龙江医药科学, 2017, 40(4): 48 - 50.