

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%^[1]。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^[2]。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

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100μl紫色 EDTA 抗凝管中的血样至1.5ml 离心管，加入2倍体积（200μl）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 μL 白细胞裂解液，吹打混匀，65℃水浴10min，期间多次颠倒离心管。待离心管冷却至室温，加入20 μL RNase A（10mg/mL），混匀后室温放置10min。接着加入500 μL 蛋白沉淀液，混匀出现白色沉淀，65℃水浴5min，4℃、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℃、12000rpm 离心1min，弃废液。依次用600 μL 漂洗液（使用前加60ml 无水乙醇）洗涤两次，每次4℃、12000rpm 离心1min，弃废液。最后4℃、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 μL 65℃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 μl 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（μg/ml）=A260×50×（稀释倍数÷1000）计算浓度，若 A260 为 0.092，则 DNA 浓度为 4.6 μg/ml。

3.引物制作

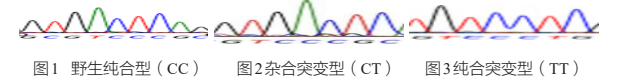
从 NCBI 数据库下载 MTHFR C677T 所在 DNA 序列，利用 Primer Premier5.0 设计引物，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。MTHFR C677T 上游引物为5′ - ATGACGATAAAGGCACGGCC - 3′，下游引物为5′ - GCCAGGTGCTGCCACTCTCT - 3′。

4.PCR 扩增

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



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 Hardy-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)
χ^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

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)
χ^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-Weinbre 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^[3]。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%）^[4]和黑龙江地区（60.7%）^[5]。

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)(I)[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.0000000000005355.
- [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.