

## Relationship of ultrasonic manifestations with homocysteine and polymorphism of MTHFR gene in patients with carotid atherosclerosis

LI Zhen-zhou<sup>1</sup>, XIAO Liang<sup>2</sup>, REN Li-jie<sup>3</sup>, WU Wei-qing<sup>4</sup>, CHEN Sheng-hua<sup>1</sup>,  
LUO Chang-rui<sup>1</sup>, LI Quan-shui<sup>1\*</sup>

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Central Laboratory, 3. Department of Neurology, 4. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the relationship of ultrasonic manifestations, plasma homocysteine (Hcy) and polymorphism of MTHFR C677T gene in patients of carotid atherosclerosis (CAS). **Methods** Totally 143 CAS patients were included as CAS group, and were further divided into increased intima-media thickness (IMT) subgroup (75 patients) and carotid plaque subgroup (68 patients). Ninety-one subjects had no increased IMT nor carotid plaque were enrolled in the control group. Plasma Hcy level were measured and MTHFR C677T genotype were detected. **Results** Plasma Hcy level in groups with CC, CT or TT genotype increased gradually ( $P < 0.05$ ). Hcy was an independent factor to CAS ( $P < 0.05$ ). Polymorphism of MTHFR C677T gene did not enter into the regression equation. **Conclusion** Plasma Hcy level increasing is an independent factor to carotid atherosclerosis. Polymorphism of MTHFR C677T gene is different in carotid atherosclerosis patients and normal population, which is associated with plasma Hcy level, but is not an independent factor to carotid atherosclerosis.

**[Key words]** Carotid artery diseases; Ultrasonography; Homocysteine; Methylenetetrahydrofolate reductase

## 颈动脉粥样硬化超声表现与同型半胱氨酸及 MTHFR 基因多态性的相关性

李振洲<sup>1</sup>, 肖亮<sup>2</sup>, 任力杰<sup>3</sup>, 吴伟清<sup>4</sup>, 陈胜华<sup>1</sup>, 罗长锐<sup>1</sup>, 李泉水<sup>1\*</sup>

(1. 深圳市第二人民医院超声科, 2. 中心实验室, 3. 神经内科, 4. 检验科, 广东 深圳 518035)

**[摘要]** **目的** 探讨颈动脉粥样硬化超声表现与血浆同型半胱氨酸(Hcy)及 MTHFR C677T 基因多态性之间的相关性。**方法** 143 例颈动脉粥样硬化患者作为动脉硬化组, 再进一步细分为内膜增厚亚组(75 例)与斑块亚组(68 例), 选择 91 名无颈动脉内膜增厚及斑块形成者作为对照组。对所有研究对象均进行血浆 Hcy 及 MTHFR C677T 基因多态性检测。**结果** MTHFR C677T 基因 CC、CT 及 TT 型血浆 Hcy 水平依次逐渐升高, 各组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。血浆 Hcy 是颈动脉粥样硬化的独立危险因素( $P < 0.05$ ), 而 MTHFR C677T 基因多态性未进入回归方程。**结论** 血浆 Hcy 升高是颈动脉粥样硬化的独立危险因素; MTHFR C677T 基因多态性在颈动脉粥样硬化与正常人群中分布不同, 并与血浆 Hcy 水平相关, 但不是颈动脉粥样硬化的独立危险因素。

**[关键词]** 颈动脉疾病; 超声检查; 高半胱氨酸; 亚甲基四氢叶酸还原酶

**[中图分类号]** R543.5; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2013)08-1276-04

**[基金项目]** 深圳市医学重点专科建设经费(2005CD6)。

**[作者简介]** 李振洲(1978—), 男, 江西赣州人, 博士, 主治医师。研究方向: 心血管超声。E-mail: lizhenzhou2004@gmail.com

**[通讯作者]** 李泉水, 深圳市第二人民医院超声科, 518035。E-mail: liquanshui@126.com

**[收稿日期]** 2013-01-18 **[修回日期]** 2013-05-02

临床研究<sup>[1]</sup>表明,血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平升高是颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)的危险因素。N5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(N-5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是 Hcy 代谢的关键酶之一,基因突变引起该酶的活性减低可导致高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy),其中最常见的是 C677T 突变<sup>[2]</sup>。本研究探讨 CAS 超声表现与血浆 Hcy 及 MTHFR C677T 基因多态性之间的相关性。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 2—2012 年 8 月在我院门诊接受颈动脉超声筛查的 234 例患者,均无血缘关系,其中男 127 例,女 107 例,年龄 29~88 岁,平均(57.1±13.8)岁;排除有严重肝肾功能不全、恶性肿瘤、血液病史及近 3 个月服用叶酸、B 族维生素等药物者。对所有入选者均进行血 Hcy 测定及 MTHFR C677T 基因多态性检测。依据颈动脉超声筛查结果将其分为 2 组: CAS 组 143 例,颈动脉内膜增厚或斑块形成;对照组 91 例,无颈动脉内膜增厚及斑块形成。两组患者的年龄、性别构成相匹配。CAS 组又根据有无斑块形成分为内膜增厚亚组(75 例,仅有内膜增厚而无斑块形成)和斑块亚组(68 例,有斑块形成)。

## 1.2 研究内容与方法

1.2.1 临床资料 详细询问所有入选者病史,行相关实验室检查,记录有无高血压、高血脂、糖尿病、脑卒中家族史等。高血压诊断标准依据《中国高血压防治指南 2010》<sup>[3]</sup>: 非同日 3 次测量血压,收缩压  $\geq 140$  mmHg 和(或)舒张压  $\geq 90$  mmHg;或既往有高血压史,目前正在使用降压药物者。糖尿病诊断标准依据《中国 2 型糖尿病防治指南(2010 年版)》<sup>[4]</sup>: 空腹血糖  $\geq 7.0$  mmol/L,口服葡萄糖耐量试验 2 h 血糖  $\geq 11.1$  mmol/L。高血脂诊断标准依据《中国成人血脂

异常防治指南》<sup>[5]</sup>: 入院前有明确高脂血症病史,或本次诊疗过程中血浆总胆固醇(TC)  $\geq 6.22$  mmol/L 或甘油三酯(TG)  $\geq 2.26$  mmol/L 或低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)  $\geq 4.14$  mmol/L。

1.2.2 超声检测颈动脉 采用 Philips iU22 超声诊断仪, L9-3 线阵探头,频率 3~9 MHz。嘱患者平卧,充分暴露颈部。按照中国医师协会超声医师分会《血管和浅表器官超声检查指南》<sup>[6]</sup>推荐的检查方法,对双侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉、椎动脉和锁骨下动脉进行全面检查,以纵切及横切面相结合,综合应用二维、彩色及频谱多普勒等方法,评价上述血管有无内膜增厚、有无斑块形成及其位置、大小、形态、管腔有无狭窄及程度等。于颈总动脉远段、颈动脉球部、颈内动脉近段测量局部管壁内中-膜厚度(intimal medial thickness, IMT)。IMT  $\geq 1$  mm 为内膜增厚,局限性增厚  $\geq 1.5$  mm 定义为斑块<sup>[6]</sup>(图 1)。

1.2.3 血浆 Hcy 测定 采用循环酶法,取空腹外周静脉血 3 ml,1 h 内分离血清,血清标本  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备检。采用 Hitachi 7600 全自动生化分析仪,试剂盒采用浙江强盛生物科技有限公司生产的同型半胱氨酸检测试剂盒,荧光检测器检测波长 340 nm,进样量 18  $\mu\text{l}$ 。

1.2.4 MTHFR C677T 基因多态性检测 采用多态性聚合酶链反应法(PCR-RFLP)。简要步骤如下:①取空腹外周静脉血 2 ml,提取 DNA,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存;②向配好的 PCR 反应管中加入待检 DNA 样品 3  $\mu\text{l}$ ,离心后将反应管置于 PCR 扩增仪中,采用上海生物技术公司合成的引物: P1: 5'-TGAAGGAGAAGGT-GTCTGCGGGA-3'; P2: 5'-AGGACGGTGCGGT-GAAGAGTG-3';反应体系 25  $\mu\text{l}$ ,常规配制,含模板 DNA 100 ng, Taq 酶 1  $\mu\text{l}$ ,引物 10 pmol。经  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,  $94^{\circ}\text{C}$  解链 30 s,退火  $61^{\circ}\text{C}$  30 s,延伸  $72^{\circ}\text{C}$  30 s,30 个循环后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min;取 5  $\mu\text{l}$  酶切反应混

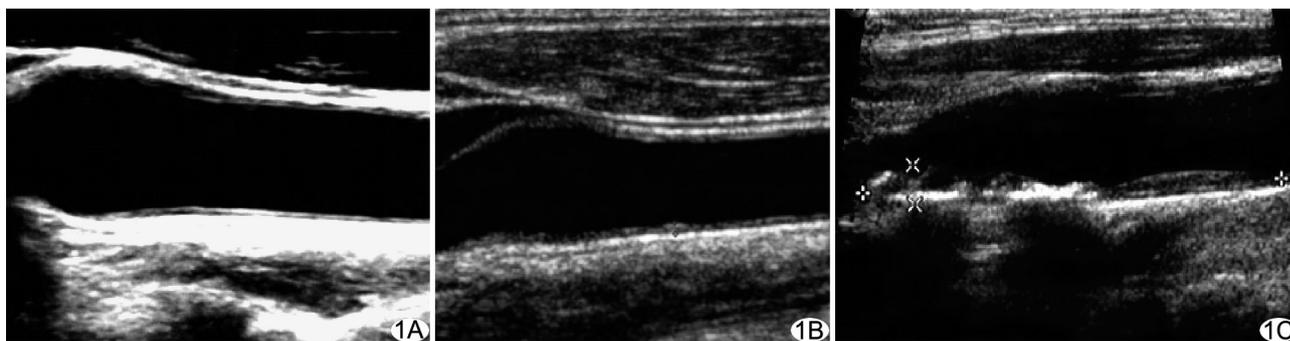


图 1 正常颈动脉(A)、颈动脉内膜增厚(B)及斑块形成(C)声像图

表 1 CAS 组与对照组临床资料比较

组别	年龄(岁)	男/女(例)	高血压(例)		高血糖(例)		高血脂(例)		脑卒中家族史(例)		血浆 Hcy (μmol/L)	MTHFR C677T 基因型(例)		
			无	有	无	有	无	有	无	有		CC	CT	TT
CAS 组(n=143)	58.9±13.6	81/62	40	103	87	56	54	89	84	59	21.49±7.32	46	60	37
对照组(n=91)	56.6±12.9	46/45	57	34	74	17	55	36	70	21	13.87±5.95	40	41	10
t 值或 χ <sup>2</sup> 值	-1.270	0.832	27.535		10.866		11.493		8.171		-8.549	7.354		
P 值	0.205	0.362	<0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.004	<0.001	<0.001	0.025			

合液加入 25 μl PCR 反应产物,混匀并短暂离心,37℃ 温育 1 h。用 2%琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物。  
 1.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 t 检验或方差分析进行比较;对计数资料采用  $\chi^2$  检验比较。多因素分析采用二分类的非条件 Logistic 回归法,模型筛选采用逐步回归法,模型评价采用 ROC 曲线。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAS 组与对照组临床资料、血浆 Hcy 及 MTHFR C677T 基因多态性分布比较见表 1。两组间高血压(103/143, 72.03%)、高血糖(56/143, 39.16%)、高血脂发病率(89/143, 62.24%)、脑卒中家族史(59/143, 41.26%)发生率、血浆 Hcy、MTHFR C677T 基因型差异均有统计学意义(P 均<0.05)。

2.2 不同 MTHFR C677T 基因型血浆 Hcy 水平比较见表 2。CC、CT 及 TT 型血浆 Hcy 水平呈递增趋势,各组间差异均有统计学意义(P<0.05)。

表 2 不同基因型血浆 Hcy 水平比较

基因型	例数	血浆 Hcy(μmol/L)
CC	86	13.74±5.59
CT	101	16.94±6.60*
TT	47	25.18±7.97**

注: \* :与 CC 基因型比较, P<0.05; # :与 CT 基因型比较, P<0.05

2.3 内膜增厚亚组与斑块亚组 MTHFR C677T 基因型 CC、CT、TT 分布分别为 25、28、22 例和 21、32、15 例。两亚组间 MTHFR C677T 基因型分布差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.600, P=0.449$ )。

2.4 以是否有动脉硬化为因变量,将表 1 中有统计学差异的指标作为自变量进行 Logistic 回归分析,结果见表 3。高血压、高血糖、高血脂、脑卒中家族史等均是颈动脉粥

样硬化的独立危险因素。在校正了传统危险因素后,血浆 Hcy 仍是颈动脉粥样硬化的独立危险因素(P<0.01),而 MTHFR C677T 基因多态性未进入回归方程。采用 ROC 曲线评价预测模型效果(图 2),ROC 曲线下面积为 0.862(95%CI:0.814~0.910),表明所建立的 Logistic 回归模型效果好。

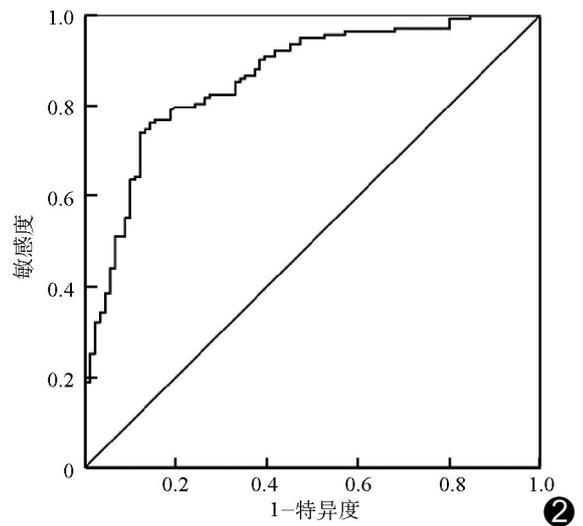


图 2 Logistic 回归模型的 ROC 曲线图

3 讨论

CAS 是引起缺血性脑卒中的重要原因之一<sup>[7-8]</sup>。早期诊断及合理评估 CAS、早期发现并有效控制其致病危险因素对预防缺血性脑卒中的发生有重要意义。

超声不仅可以观察颈动脉的解剖结构,有无内膜

表 3 多因素 Logistic 回归分析结果

指标	回归系数	标准误	Wald $\chi^2$ 值	P 值	OR 值	95%CI	
						下限	上限
高血压	1.224	0.412	7.731	<0.01	3.412	1.463	8.242
高血糖	1.087	0.405	7.209	<0.01	2.966	1.341	6.559
高血脂	1.645	0.406	16.418	<0.01	5.179	2.337	11.473
脑卒中家族史	1.209	0.438	7.632	<0.01	3.352	1.421	7.905
血浆 Hcy	0.194	0.033	35.239	<0.01	1.214	1.138	1.294

增厚、斑块形成、管腔狭窄等,还可评价管腔血流动力学,是目前评估 CAS 的主要方法。本研究严格按照中国医师协会超声医师分会《血管和浅表器官超声检查指南》<sup>[6]</sup>推荐的检查方法,全面系统地检查颈部动脉。颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉、椎动脉和锁骨下动脉是一个有机整体,任何一支病变都可能引起颅内血流异常变化或导致缺血性脑卒中的发生。本研究斑块亚组 68 例中,9 例仅在锁骨下动脉起始部出现斑块,而其他颈部动脉尚未有斑块;对于此类患者,如果仅检查颈总、颈内及颈外动脉,将造成对病情的低估,不能做到早期预防。另外,在检查过程中应将二维和彩色多普勒结合使用,对于回声较低的斑块或新鲜血栓,二维增益如果太低可能会漏诊,而彩色多普勒出现局部血流信号充盈缺损可以提示在局部寻找斑块。

HHcy 已被证明为 CAS 的重要致病因素<sup>[9]</sup>。血浆 Hcy 浓度升高是遗传因素与环境因素共同作用所致。遗传因素主要是影响 Hcy 代谢的关键酶,编码该酶的基因突变导致该酶活性下降<sup>[10]</sup>。目前研究较多的是 MTHFR,其 677 位点上的胞嘧啶被胸腺嘧啶替代,导致该酶结构中相应的丙氨酸被缬氨酸替代,使 MTHFR 活性降低,从而导致 HHcy。本研究中 CC、CT 及 TT 基因型的血浆 Hcy 水平呈递增趋势,组间差异有统计学意义,表明 MTHFR C677T 基因多态性与血浆 Hcy 浓度升高关系密切;在校正了传统危险因素后,血浆 Hcy 仍然是颈动脉粥样硬化的独立危险因素。除 MTHFR 外,维生素 B6、维生素 B12 或叶酸也作为辅酶参与 Hcy 代谢,这几种因子缺乏都可以导致 HHcy,因此对于 HHcy 患者建议补充叶酸及 B 族维生素<sup>[11]</sup>。

关于 MTHFR C677T 基因型是否为 CAS 的独立危险因素尚存在争议。Cronin 等<sup>[10]</sup>认为 MTHFR 是 CAS 及缺血性脑卒中的独立危险因素;另有研究<sup>[12]</sup>结果显示,血浆 Hcy 水平升高是 CAS 斑块形成的独立危险因素,但与 MTHFR C677T 基因多态性无关。本研究中对照组 MTHFR C677T 基因 TT 型比例为 10.99%(10/91),而 CAS 组中该比例提高到 25.87%(37/143),差异有统计学意义;但在内膜增厚亚组(22/75,29.33%)与斑块亚组(15/68,22.06%)间差异无统计学意义,表明 MTHFR C677T 基因 TT 型与 CAS 的发生有关,但与病变的严重程度无相关;Logistic 回归分析显示 MTHFR C677T 基因多态性未进入回归方程,因此可认为 MTHFR C677T 基因多态性对 CAS 无直接致病作用。

本研究的局限性:未对 CAS 患者斑块的大小、分布、稳定性及管腔的狭窄程度等进一步细分,有待今后进一步深入研究。另外对照组患者仅接受颈动脉超声扫查,未对其余部位如上肢、下肢或腹主动脉进行扫查,可能有少数入选对象虽然颈动脉尚未出现硬化表现,但其他部位动脉可能已经出现硬化。本研究样本量不大,有待于今后扩大样本量,并更加严格、细化入选对象后进一步深入研究。

### [参考文献]

- [1] Kim SJ, Choe YH, Bang OY, et al. Are stroke biomarkers seeing brain vessels in patients with ischemic stroke?: A C-reactive protein and homocysteine study. *Stroke*, 2011, 42(5):1464-1468.
- [2] Gorgone G, Ursini F, Altamura C, et al. Hyperhomocysteinemia, intima-media thickness and C677T MTHFR gene polymorphism: A correlation study in patients with cognitive impairment. *Atherosclerosis*, 2009, 206(1):309-313.
- [3] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010. *中华心血管病杂志*, 2011, 39(7):579-616.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2010 年版). *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(1):1-37.
- [5] 中国成人血脂异常防治指南制定联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南. *中华心血管病杂志*, 2007, 5(5):390-419.
- [6] 中国医师协会超声医师分会. 血管和浅表器官超声检查指南. 北京:人民军医出版社, 2011:23-28.
- [7] Li GW, Zheng GY, Li JG, et al. Relationship between carotid atherosclerosis and cerebral infarction. *Chin Med Sci J*, 2010, 25(1):32-37.
- [8] 穆玉明, 韩伟, 吴伟春, 等. 颈动脉结构及血流动力学变化与缺血性脑血管病的相关性研究. *中国医学影像技术*, 2003, 19(11):1499-1501.
- [9] Kelemen LE, Anand SS, Hegele RA, et al. Associations of plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with carotid intima media thickness among South Asian, Chinese and European Canadians. *Atherosclerosis*, 2004, 176(2):361-370.
- [10] Cronin S, Furie KL, Kelly PJ. Dose-related association of MTHFR 677T allele with risk of ischemic stroke: Evidence from a cumulative meta-analysis. *Stroke*, 2005, 36(7):1581-1587.
- [11] Panayiotou A, Nicolaides A, Griffin M, et al. Serum total homocysteine, folate, 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C->T genotype and subclinical atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(1):1-11.
- [12] Huang Y, Zhao YI YI, Li S, et al. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase gene, and other risk factors in ischemic stroke. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2002, 82(2):119-122.