

2 型糖尿病肾病患者血清同型半胱氨酸、叶酸和亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的关系

俞刚 陆峰泉 沈静 蔡辉

南京医科大学附属江苏盛泽医院检验科, 苏州 215228

通信作者: 陆峰泉, Email: 550545669@qq.com

【摘要】 目的 探究 2 型糖尿病肾病(DN)患者血清同型半胱氨酸(HCY)、叶酸(FOL)与亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR) C677T、A1298C 基因多态性的关系。方法 回顾性分析 2017 年 1 月至 2018 年 12 月于江苏盛泽医院确诊的 2 型糖尿病患者 161 例, 其中 DN 患者 81 例[男 41 例, 女 40 例, 年龄(61.5±14.2)岁]、糖尿病无肾病(DM)患者 80 例[男 42 例, 女 38 例, 年龄(57.7±10.8)岁]; 另纳入健康对照(NC)者 77 名[男 39 名, 女 38 名, 年龄(58.2±16.3)岁]。分别用酶循环法和电化学发光法检测血清 HCY 和 FOL; 采用 TaqMan 基因分型技术分析 MTHFR C677T&A1298 基因多态性。利用单因素方差分析及最小显著差异 *t* 检验比较组间血清 HCY、FOL 水平, 应用 χ^2 检验分析各组间 MTHFR 基因分布差异。结果 DN 组 HCY 水平[(19.76±7.81) $\mu\text{mol/L}$]与 DM 组[(15.62±5.01) $\mu\text{mol/L}$]、NC 组[(8.09±3.74) $\mu\text{mol/L}$]差异具有统计学意义($F=81.738, P<0.001$); DN 组 FOL 水平[(12.18±3.01) $\mu\text{g/L}$]与 DM 组[(13.50±2.71) $\mu\text{g/L}$]、NC 组[(15.43±2.95) $\mu\text{g/L}$]差异具有统计学意义($F=26.978, P<0.001$)。DN 组 677T 等位基因频率[51.2%(83/162)]、677TT/1298AA 纯合突变型频率[25.9%(21/81)]均高于 DM 组[33.1%(53/160); 11.2%(9/80)]和 NC 组[33.8%(52/154); 10.4%(8/77)](χ^2 值: 10.821, 9.099, 均 $P<0.05$); 1298C 等位基因频率在 DN 组[21.6%(35/162)]、DM 组[16.9%(27/160)]和 NC 组[18.2%(28/154)]组间差异无统计学意义($\chi^2=1.269, P>0.05$)。677TT/1298AA 纯合突变型个体 HCY 水平、FOL 水平与其他基因型的差异均具有统计学意义(F 值: 12.955、15.504, 均 $P<0.05$)。结论 MTHFR C677T&A1298C 基因多态性所致 HCY 与 FOL 代谢异常可能为 2 型 DN 的遗传风险因素。

【关键词】 糖尿病肾病; 半胱氨酸; 叶酸; 亚甲基四氢叶酸还原酶(NADPH); 多态现象, 遗传

基金项目: 吴江区“科教兴卫”项目(WWK201620)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20200104-00006

Relationship of serum homocysteine, folic acid and genetic polymorphism of methyltetrahydrofolate reductase in patients with type 2 diabetic nephropathy

Yu Gang, Lu Fengquan, Shen Jing, Cai Hui

Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Shengze Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215228, China

Corresponding author: Lu Fengquan, Email: 550545669@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between serum homocysteine (HCY), folic acid (FOL) and methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, A1298C gene polymorphism in patients with type 2 diabetic nephropathy (DN). **Methods** A total of 161 patients with type 2 diabetes diagnosed in Jiangsu Shengze Hospital between January 2017 and December 2018, including 81 DN (41 males, 40 females; age: (61.5±14.2) years), 80 diabetic mellitus without nephropathy (DM; 42 males, 38 females, age: (57.7±10.8) years), and 77 normal controls (NC; 39 males, 38 females, age: (58.2±16.3) years) were retrospectively analyzed. The serum levels of HCY and FOL were detected by enzyme circulation and electrochemiluminescence respectively. TaqMan genotyping technique was used to detect MTHFR C677T&A1298 gene polymorphism. The serum levels of HCY and FOL were compared with one-way analysis of variance (the least significant difference *t* test), and the distribution differences of MTHFR gene were analyzed by χ^2 test. **Results** The difference of HCY level among DN, DM and NC groups was significantly different ((19.76±7.81), (15.62±5.01) and (8.09±3.74) $\mu\text{mol/L}$; $F=81.738, P<0.001$). The FOL level among the 3 groups was also significantly different ((12.18±3.01), (13.50±2.71) and (15.43±2.95) $\mu\text{g/L}$; $F=26.978, P<0.001$). The frequencies of 677T allele (51.2%, 83/162), 677TT/1298AA genotype (25.9%, 21/81) in DN group were significantly higher than those in DM (33.1%, 53/160; 11.2%, 9/80) and NC (33.8%, 52/154; 10.4%, 8/77) groups (χ^2 values: 10.821, 9.099, both $P<0.05$), but the

1298C allele frequency was not significantly different among the 3 groups (21.6% (35/162, DN) vs 16.9% (27/160, DM) vs 18.2% (28/154, NC); $\chi^2 = 1.269$, $P > 0.05$). The levels of HCY and FOL in individuals with 677TT/1298AA genotype were significantly higher than those in individuals with other genotypes (F values: 12.955, 15.504, all $P < 0.05$). **Conclusion** The abnormal metabolism of HCY and FOL caused by MTHFR C677T&A1298C gene polymorphism may be the genetic risk factor of DN.

【Key words】 Diabetic nephropathies; Cysteine; Folic acid; Methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH2); Polymorphism, genetic

Fund program: Wujiang District's Science and Education Program (WWK201620)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20200104-00006

亚甲基四氢叶酸还原酶(methyltetrahydrofolate reductase, MTHFR)是叶酸代谢途径的关键酶^[1],其基因多态性与2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)并发症的关系逐渐引起关注。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)起病隐匿,可进展为终末期肾病,是T2DM常见且严重的并发症^[2]。本回顾性研究拟分析DN患者血清同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)、叶酸(folate, FOL)与MTHFR基因C677T、A1298C多态性间的关系。

资料与方法

1.研究对象。回顾性纳入2017年1月至2018年12月在江苏盛泽医院确诊的T2DM患者161例,其中DN患者81例[男41例,女40例,年龄(61.5±14.2)岁],糖尿病无肾病(diabetic mellitus without nephropathy, DM)患者80例[男42例,女38例,年龄(57.7±10.8)岁]。DN诊断标准^[3]:T2DM患者尿白蛋白肌酐比(albumin creatinine ratio, ACR) > 300 mg/g; 或 30 mg/g ≤ ACR ≤ 300 mg/g 伴糖尿病视网膜病变。此外,依据眼底检查、活组织检查(简称活检)及尿沉渣等检查结果剔除存在其他肾病可能的对象。相关诊断指标至少检测2次并间隔3个月以上。选取同期健康体检者77名[男39名,女38名,年龄(58.2±16.3)岁]作为对照(normal control, NC)。本研究经本院伦理委员会批准(JSSZYY-LLSC-201736),纳入受试者签署知情同意书。

2.血清HCY、FOL水平测定。空腹抽取静脉血2~3 ml,4℃下以4 000 r/min离心4 min(离心半径8 cm)分离血清。采用酶循环法在P800全自动生化仪(瑞士Roche公司)上检测血清HCY,采用电化学发光法于Cobas e601全自动发光分析仪(瑞士Roche公司)上测得血清FOL,配套试剂盒均由瑞士Roche公司提供。

3.基因分型检测。采用荧光定量PCR技术检测MTHFR基因C677T和A1298C位点多态性。引物序列参考文献[3]设计:C677T位点上游引物5'-AGCACTTGAAGGAGAAGGTG-3',下游引物5'-

TTCACAAAGCGGAAGAATG-3'; A1298C位点上游引物5'-AAGGAGGAGCTGCTGAAG-3',下游引物5'-TGTTCTCCCGAGAGG-3',MTHFR引物及探针购自上海百力格生物技术有限公司。每个反应体系10 μl,包含DNA模板1.5 μl(质量浓度20 ng/μl)、TaqMan探针(上海百力格生物技术有限公司)1 μl、PCR混合液(上海百力格生物技术有限公司)4 μl和去离子水3.5 μl。PCR反应条件:95℃预变性15 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环;反应完成后用ABI7900型荧光定量PCR仪(美国ABI公司)进行终点荧光判读,利用PCR仪自带分析软件确定各样本的基因分型结果。

4.统计学处理。采用IBM SPSS 22.0软件进行统计学分析,符合正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。2组间比较采用两独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用最小显著差异 t 检验;采用 χ^2 检验比较组间频数(百分比)差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.一般临床资料(表1)。DN组HCY水平较DM、NC组升高($F = 81.738$, $P < 0.001$),而FOL水平降低($F = 26.978$, $P < 0.001$)。DN组677T等位基因频率高于DM、NC组($\chi^2 = 10.821$, $P = 0.001$),而1298C等位基因频率组间差异无统计学意义($\chi^2 = 1.269$, $P > 0.05$)。DN组和DM组空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、糖化血红蛋白(hemoglobin A1C, HbA1C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2. MTHFR基因多态性分析。所有研究对象中均未发现677TT/1298AC、677TT/1298CC和677CT/1298CC 3种复合基因型存在。复合基因型分布频率(表2)显示, DN组677TT/1298AA纯合突变型和677CT/1298AC双突变杂合型携带率高于DM、NC组(χ^2 值:9.099和6.211,均 $P < 0.05$);而677CC/

表 1 糖尿病肾病(DN)、糖尿病无肾病(DM)患者及健康对照(NC)者一般临床资料比较($\bar{x}\pm s$)^a

组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁)	病程 (年)	BMI (kg/m ²)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	FBG (mmol/L)	HbA1C (%)	TC (mmol/L)
NC 组	77	39/38	58.2±16.3	-	23.32±3.13	120.92±11.74	81.90±6.21	4.78±0.75	5.14±0.79	4.79±0.90
DM 组	80	42/38	57.7±10.8	12.1±2.4	23.14±3.34	135.26±15.07 ^e	81.98±9.00	8.51±3.25 ^e	8.74±2.81 ^e	4.98±0.94
DN 组	81	41/40	61.5±14.2	12.3±3.2	24.66±4.18 ^{d,e}	139.46±16.12 ^{d,e}	81.21±10.29	8.99±3.62 ^d	9.12±2.28 ^d	4.88±1.38
检验值		0.074 ^b	2.030	3.430 ^c	5.482	35.266	0.180	50.722	81.287	0.607
P 值		0.964	0.134	0.126	0.005	<0.001	0.835	<0.001	<0.001	0.546

组别	例数	TC (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)	Hcy (μmol/L)	FOL (μg/L)	677T	1298C
NC 组	77	1.17±0.76	1.29±0.33	2.73±0.74	4.91±1.10	65.1±13.63	8.09±3.74	15.43±2.95	33.8%(52/154)	18.2%(28/154)
DM 组	80	1.25±0.83 ^e	1.27±0.42	2.99±0.82	5.42±1.51	65.56±15.84	15.62±5.01	13.50±2.71	33.1%(53/160)	16.9%(27/160)
DN 组	81	1.69±1.37 ^{d,e}	1.18±0.37	2.97±0.98	6.72±2.86 ^{d,e}	87.49±17.48 ^{d,e}	19.76±7.81 ^{d,e}	12.18±3.01 ^{d,e}	51.2%(83/162) ^{d,e}	21.6%(35/162)
检验值		5.911	1.779	2.261	15.068	52.819	81.738	26.978	10.821 ^b	1.269 ^b
P 值		0.003	0.171	0.107	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.530

注:^a除性别、677T、1298C 外,余均以 $\bar{x}\pm s$ 表示;^b为 χ^2 值,^c为 *t* 值,余为 *F* 值;^d为与 DM 组比较, $P<0.05$;^e为与 NC 组比较, $P<0.05$;-表示无数据;BMI 为体质指数,BUN 为尿素氮,Cr 为肌酐,DBP 为舒张压,FBG 为空腹血糖,FOL 为叶酸,HbA1C 为糖化血红蛋白,Hcy 为同型半胱氨酸,HDL 为高密度脂蛋白,LDL 为低密度脂蛋白,SBP 为收缩压,TC 为总胆固醇,TG 为三酰甘油;1 mmHg=0.133 kPa;括号内数字为例数比

表 2 DN、DM 患者及 NC 者 MTHFR C677T 和 A1298C 基因型频率分布及性别分布

组别	例数	677CC/1298AA		677CC/1298AC		677CC/1298CC		677CT/1298AA		677CT/1298AC		677TT/1298AA	
		频率分布	男/女	频率分布	男/女	频率分布	男/女	频率分布	男/女	频率分布	男/女	频率分布	男/女
NC 组	77	20.8%(16/77)	9/7	19.5%(15/77)	8/7	2.6%(2/77)	2/0	35.1%(27/97)	10/17	11.7%(9/77)	5/4	10.4%(8/77)	5/3
DM 组	80	26.2%(21/80)	10/11	16.2%(13/80)	6/7	2.5%(2/80)	1/1	31.2%(25/80)	14/11	12.5%(10/80)	5/5	11.2%(9/80)	5/4
DN 组	81	6.2%(5/81)	1/4	13.6%(11/81)	6/5	3.7%(3/81)	2/1	28.4%(23/81)	12/11	22.2%(18/81)	9/9	25.9%(21/81)	12/9
χ^2 值		11.932		1.005		0.251		0.818		6.211		9.099	
P 值		0.003		0.605		0.882		0.664		0.042		0.011	

注: MTHFR 为亚甲基四氢叶酸还原酶;括号内数字为例数比

1298AA 野生型携带率低于 DM 和 NC 组($\chi^2 = 11.932$, $P<0.05$)。此外,各组复合基因型的性别构成差异均无统计学意义(χ^2 值:0.084~2.102,均 $P>0.05$)。

3.各复合基因型血清 Hcy 和 FOL 水平的比较(表 3)。677TT/1298AA 纯合突变型 Hcy、FOL 水平与其他基因型的差异均有统计学意义(*F* 值:12.955、15.504,均 $P<0.05$);677CT/1298AC 双突变杂合型 Hcy、FOL 水平与单突变杂合型(677CT/1298AA、677CC/1298AC)的差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。

表 3 各复合基因型血清 Hcy 和 FOL 水平的比较($\bar{x}\pm s$)

MTHFR	例数	Hcy(μmol/L)	FOL(μg/L)
677CC/1298AA	42	10.35±5.37	14.63±2.82
677CC/1298AC	39	11.90±5.17	15.07±2.12
677CC/1298CC	7	13.49±4.79	13.54±1.72
677CT/1298AA	75	13.80±7.54	14.67±2.94
677CT/1298AC	37	17.64±7.05	12.09±3.27
677TT/1298AA	38	20.85±7.65	10.79±2.61
<i>F</i> 值		12.955	15.504
P 值		<0.001	<0.001

讨 论

人 MTHFR 基因位于 1 号染色体(1P36.3),对酶活性影响较大的多态性位点出现于 C677T 和 A1298C^[4]。本研究一般临床资料比较发现, DN 组年龄、病程与 DM 组差异无统计学意义(均 $P>0.05$),且糖脂代谢指标(FBG、HbA1C、TC、HDL、LDL)差异亦不明显,但 MTHFR 基因多态性分布却各有特征。DN 组 677T 等位基因频率(51.2%)明显高于 DM 组(33.1%)和 NC 组(33.8%)($\chi^2 = 10.821$, $P<0.05$);而 1298C 等位基因频率(21.6%)与 DM 组(16.9%)和 NC 组(18.2%)差异不明显($\chi^2 = 1.269$, $P>0.05$),提示 DN 与 MTHFR C677T 基因多态性密切相关。相比 A1298C,C677T 与 DN 的关联更明显的原因可能与基因座位有关;C677T 突变位于 MTHFR 基因第 4 外显子,参与编码酶 N 末端的催化结构域,直接影响酶催化活性;而 A1298C 位于第 7 外显子,编码酶 C 末端的调控域。

Hcy 是 MTHFR 代谢中间产物,大量研究证实 Hcy 是心血管疾病的独立危险因素^[5-6]。本研究显

示, DN 组 HCY 水平 $[(19.76 \pm 7.81) \mu\text{mol/L}]$ 明显高于 DM $[(15.62 \pm 5.01) \mu\text{mol/L}]$ 和 NC 组 $[(8.09 \pm 3.74) \mu\text{mol/L}]$; 均 $P < 0.05$; DN 组 677TT/1298AA 纯合突变型(25.9%)和 677CT/1298AC 双突变杂合型(22.2%)携带率显著高于 DM(11.2%和 12.5%)和 NC 组(10.4%和 11.7%; 均 $P < 0.05$), 且 677TT/1298AA 纯合突变型 HCY $[(20.85 \pm 7.65) \mu\text{mol/L}]$ 蓄积最为严重, 提示 MTHFR C677T 与 DN 发生发展的机制可能是: 突变 MTHFR 酶活性下降致 HCY 代谢异常蓄积, 而高 HCY 血症削弱血管内皮细胞正常生物学功能, 激活血管平滑肌细胞异常增殖, 使血管处于持续炎症反应状态^[6], 肾小球微血管基底膜受损是 DN 的主要病理改变^[7]。DN 组 FOL 水平明显降低($P < 0.05$), 677TT/1298AA 纯合突变型 FOL 最为匮乏, 表明 MTHFR 基因多态性与体内 HCY 蓄积及叶酸营养状态联系紧密。有研究发现高 HCY 血症补充 FOL 和维生素 B12 能够有效降低血浆 HCY, 并改善血管内皮功能^[8]。Huang 等^[9]发现携带 677TT 型的心血管疾病患者补充 FOL 可能更为受益。目前, 对 DN 患者补充 FOL 是否受益尚乏研究, 而根据 MTHFR 基因制定个体化的 FOL 增补方案, 可能是预防和延缓 DN 的新策略。

本研究未发现 677TT/1298AC、677TT/1298CC 和 677CT/1298CC 这 3 种复合基因型个体存在。国外学者通过对双突变杂合型样本反复测序发现 2 种突变(677T 和 1298C)从未出现在同一条等位片段上, 并作出推断: 如果 2 种突变同时出现在顺式构型中会产生较为严重的临床表型^[4], 该弱势基因可能被自然淘汰。本研究中 6 种复合基因型的性别构成差异均无统计学意义(χ^2 值: 0.084 ~ 2.102, 均 $P > 0.05$), 提示性别对研究结果无显著影响。此外, 双突变杂合型(677CT/1298AC)血清 HCY、FOL 水平与单突变杂合型(677CT/1298AA、677CC/1298AC)相比差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Weisberg 等^[10]认为, A1298C 突变也减少 MTHFR 活动, 但影响程度低于 C677T 突变。本研究推测, 1298C 突变本质上并不降低酶活性, 但当个体同时伴有 677T 突变时可能发挥调节作用, 具体机制有待进一步研究。

由于受地域、种族及混杂因素等影响, 目前有关 MTHFR 基因多态性与 DN 相关性的结论尚不统一。本研究显示 MTHFR C677T 和 A1298C 基因多态性所致的 HCY 与 FOL 代谢异常可能为 DN 的遗传风

险因素。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Stover PJ. One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies [J]. J Nutr, 2009, 139(12): 2402-2405. DOI:10.3945/jn.109.113670.
- [2] 冯雪凤, 李爱梅, 许守林, 等. 肾小球滤过率、尿微量白蛋白、血 β_2 -微球蛋白和胱抑素 C 诊断糖尿病肾病的临床价值 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(6): 331-336. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.06.003.
Feng XF, Li AM, Xu SL, et al. Diagnostic value of glomerular filtration rate, microalbuminuria, β_2 -microglobulin and cystatin C for renal function in patients with diabetic nephropathy [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 37(6): 331-336. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.06.003.
- [3] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation [J]. Diabet Med, 1998, 15(7): 539-553. DOI:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S.
- [4] Goyette P, Pai A, Milos R, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) [J]. Mamm Genome, 1998, 9(8): 652-656. DOI:10.1007/s003359900838.
- [5] Rong D, Liu J, Jia X, et al. Hyperhomocysteinaemia is an independent risk factor for peripheral arterial disease in a Chinese Han population [J]. Atherosclerosis, 2017, 263: 205-210. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.006.
- [6] Miwa K, Tanaka M, Okazaki S, et al. Increased total homocysteine levels predict the risk of incident dementia independent of cerebral small-vessel diseases and vascular risk factors [J]. J Alzheimers Dis, 2016, 49(2): 503-513. DOI:10.3233/JAD-150458.
- [7] 袁杰, 张光明, 刘从进, 等. Gates 法测定 2 型糖尿病肾病患者肾小球滤过率 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(5): 355-357. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.05.010.
Yuan J, Zhang GM, Liu CJ, et al. Evaluation of $^{99}\text{Tc}^m$ -DTPA glomerular filtration rate by the Gates method in patients with type 2 diabetes [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2013, 33(5): 355-357. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.05.010.
- [8] van Dijk SC, Enneman AW, Swart KM, et al. Effects of 2-year vitamin B12 and folic acid supplementation in hyperhomocysteinemic elderly on arterial stiffness and cardiovascular outcomes within the B-PROOF trial [J]. J Hypertens, 2015, 33(9): 1897-1906. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000647.
- [9] Huang X, Qin X, Yang W, et al. MTHFR gene and serum folate interaction on serum homocysteine lowering: prospect for precision folic acid treatment [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(3): 679-685. DOI:10.1161/ATVBAHA.117.310211.
- [10] Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, et al. The 1298A \rightarrow C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): *in vitro* expression and association with homocysteine [J]. Atherosclerosis, 2001, 156(2): 409-415. DOI:10.1016/s0021-9150(00)00671-7.

(收稿日期: 2020-01-04)