

MTHFR 基因多态性与银屑病的遗传易感性

吴杰 粟玉珍 马虹宇 白静 陈峰 傅松滨

【摘要】目的 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase), *MTHFR* 基因单核苷酸多态与中国北方地区银屑病的关系。**方法** 针对 123 例寻常型银屑病患者和 129 名正常对照个体, 分别用 PCR-RFLP 和 AS-PCR 的方法, 分析 C677T、G1793A 和 A1298C 3 个多态位点基因型, 并进行统计分析。**结果** 在病例组中, *MTHFR* 677 C、T 等位基因频率分别为 45.13%、54.87%, 1298A、C 等位基因频率为 88.37%、11.63%, 1793G、A 等位基因频率为 95.12%、4.88%。在正常对照组中, 677 C、T 等位基因频率分别为 44.96%、54.87%, 1298A、C 等位基因频率为 86.44%、13.56%, 1793G、A 等位基因频率为 96.12%、3.88%。经统计学分析, *MTHFR* C677T、A1298C、G1793A 各多态位点基因型、等位基因频率在病例组和对照组中的分布差异无统计学意义, C677T 与 A1298C 基因型联合分析也未发现有统计学意义。**结论** *MTHFR* 基因的 3 个多态位点(C677T、A1298C、G1793A) 与寻常型银屑病的易感性无明显的相关关系。

【关键词】 寻常型银屑病; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性; 疾病易感性

Association Between Single Nucleotide Polymorphisms of *MTHFR* Gene and Susceptibility of Psoriasis

WU Jie¹, LI Yu-zhen², MA Hong-yu³, BAI Jing^{1,4}, CHEN Feng¹, FU Song-bin^{1,5}. (¹Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150081; ²Department of dermatology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081; ³Department of Laboratory Medicine, the Hospital of Heilongjiang Province, Harbin 150001; ⁴Key Laboratory for Medical Genetics of Heilongjiang Higher Education Institutions, Harbin 150081; ⁵Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province, Harbin 150081; , China) Corresponding author: FU Song-bin. E-mail: fusb@ems.hrbnu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the relationship of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and psoriasis vulgaris in north part of China. **Methods** DNA genotyping was performed on peripheral blood leukocytes in 123 patients of psoriasis vulgaris and 129 controls. Three common polymorphisms(C677T, A1298C and G1793A) of *MTHFR* gene were analyzed by PCR-RFLP and AS-PCR. **Results** In affected cases, The allele frequencies of the C677T were as follows: C, 45.13%; T, 54.87%. The allele frequencies of the 1298 C and 1793 G were 11.63% and 4.88%. In controls, the allele frequencies of 677T and 1298C and 1793G were 44.96% and 13.56% and 3.88%. By statistical analysis, there was not significantly difference also in genotype frequencies and allele frequencies of three polymorphic sites between the two groups. The combinative analysis of C677T and A1298C genotypes didn't show significantly different. **Conclusion** *MTHFR* gene polymorphisms are not associated with psoriasis vulgaris susceptibility probably.

【Key words】 Psoriasis vulgaris; Methylenetetrahydrofolate reductase; Gene polymorphism; Disease susceptibility

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划),

2002BA711A08)

作者单位: 150081, 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室(吴杰, 陈峰, 傅松滨); 150081, 哈尔滨医科大学附属第二医院皮肤科(栗玉珍); 150001 哈尔滨, 黑龙江省医院检验科(马虹宇); 150081 哈尔滨, 黑龙江省普通高校医学遗传学重点实验室(白静); 150081 哈尔滨, 黑龙江省生物医药工程重点实验室(傅松滨)

通讯作者: 傅松滨(E-mail: fusb@ems.hrbnu.edu.cn)

MTHFR 是同型半胱氨酸代谢的关键酶。*MTHFR* C677T、A1298C、G1793A 位点的多态性可导致氨基酸的改变。C677T 碱基突变可引起此酶缺乏或活性降低,导致血浆同型半胱氨酸水平增高^[1]。有研究报告 A1298C 位点突变后也影响酶的活性但与热敏感性无关,当以上两种突变位点同时存在时,与 MTHFR 的特异酶活性降低^[2]。近年来研究发现,高同型半胱氨酸血症可促进动脉粥样硬化的形成并且是导致心血管疾病的一个危险因素。Vanizor Kural 等^[3]研究在银屑病患者中,血浆同型半胱氨酸显著增加,并认为高同型半胱氨酸血症在银屑病动脉粥样硬化并发症中起重要作用。且银屑病患者高血压和冠心病的相对危险性分别是正常人群的 1.5 倍和 1.1 倍。杨维玲等^[4]在 *MTHFR* C677T 多态性同型银屑病相关性的研究中,对 39 名患者和 79 名正常对照的等位基因频率及基因型频率比较后,认为银屑病纯合突变 (TT) 同正常对照是不同的,推测 *MTHFR* C677T 多态性与银屑病发病可能相关。

本实验运用 PCR-RFLP、AS-PCR 技术对较大样本银屑病基因组检测 C677T、A1298C、G1793A 3 个位点多态性,并以正常样本组作为对照,旨在探讨 *MTHFR* 多态性同银屑病的关系。

1 材料与方法

1.1 材料:病例样本取自 2005 年 10 月至 2006 年 5 月到哈尔滨医科大学附属一、二院皮肤科门诊就诊

的患者,均为寻常型银屑病,男 61 例,女 62 例,均签署知情同意书。患者中,早发型 (<40 岁发病) 为 101 例,占 82.11%,晚发型 (≥40 岁发病) 为 22 例,占 17.89%。对照样本共计 129 例,根据年龄和性别与病例组进行频数配对。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 对患者进行流行病学调查,并取外周血 4 ~ 5 mL, EDTA 抗凝, -20℃ 保存,常规酚-氯仿提取 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 各位点引物序列和扩增条件见表 1, 对于 A1298C 位点 PCR 扩增后,直接用 2% 琼脂凝胶电泳检测,可见 3 种基因型 (结果见图 2)。

1.2.3 RFLP 分析 C677T、G1793A 位点 PCR 产物经限制性内切酶进行酶切:20 μL 反应体系,PCR 扩增产物 10 μL,限制性内切酶 3 U (MBI), 10 × 缓冲液 2 μL, 37℃ 水浴过夜, C677T PCR 产物片段经 *Hinf*I 消化, G1793A PCR 产物片段经 *Bst*b I 消化,前者产生 3 种基因型,后者仅见 2 种基因型。针对 C677T、G1793A 酶切产物分别用 3% 和 2% 琼脂糖电泳判断酶切结果 (限制性内切酶和基因型见表 2, 酶切结果见图 1、3)。

1.3 统计学分析方法:计算各组各位点基因型频率及等位基因频率,确定是否符合 Hardy-Weinberg 平衡;通过方差分析进行均数间两两比较;利用 χ^2 检验对病例组内性别、家族史、早晚发进行等位基因频

表 1 3 个多态位点的引物序列及扩增条件

多态位点	PCR 引物 5'-3'		扩增条件
	R	F	
C677T	TGAAGCAGAAGCTCTCTCGCGCA	AGGACGGTGCCTGAGACTG	94℃、30 s-64℃、20 s-72℃、20 s, 30 个循环,
	A1298C	TCCTTGTCTTGGAGCGG	
G1793A	CGAAGACTTCAAAGACACTTC	CGAAGACTTCAAAGACACTTT	94℃、30 s-68℃、20 s-72℃、20 s, 30 个循环,
		CTCTGTGTGTGTGCATGTGTGGC	
	GGGACAGGAGTGGCTCCAACCCAGG		

表 2 限制性内切酶和基因型

Table 2 Restriction enzymes and genotypes	
基因多态位点	基因型和酶切结果 (bp)
C677T	<i>Hinf</i> I CC:198 CT:198、175、23 TT:175、23
	G1793A

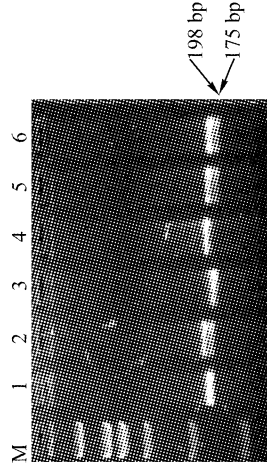


图 1 C677T 多态位点 PCR-RFLP 结果

Fig. 1 RFLP results of C677T PCR production

M 为 DL2000; 2、5、6 为 CT 基因型; 4 为 CC 基因型; 1、3 为 TT 基因型; M: DL2000; 2、5、6: CT genotype; 4: CC genotype; 1、3: TT genotype;

率比较,且进行两组间基因型、基因频率比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以比值比(OR)及95%可信区间(CI)表示各种基因型以及两个多态联合与银屑病风险的相关性。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验:病例组与正常组 *MTHFR* 3 个位点基因型分布经 χ^2 检验,均为 $P > 0.05$,符合 Hardy-Weinberg 平衡,表明两组数据均可代表相应人群。

2.2 病例组内比较:通过对病例组性别、是否有家族史及早晚发进行等位基因频率 χ^2 检验,差异未发现统计学意义。

2.3 病例组与对照组间基因型及等位基因频率比较:在病例组中,*MTHFR* 677 C、T 等位基因频率分别为 45.13%、54.87%,1298A、C 等位基因频率为 88.37%、11.63%,1793G、A 等位基因频率为 95.13%、4.87%。在正常对照组中,677 C、T 等位基因频率分别为 44.96%、55.04%,1298 A、C 等位基因频率为 86.44%、13.56%,1793 G、A 等位基因频率为 96.13%、3.87%。经 χ^2 检验,*MTHFR* C677T、A1298C、G1793A 多态位点等位基因频率在病例和对照中的分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。通过计算比值比(OR)及 95%可信区间(CI),两组各基因型差异也均无统计学意义(见表 3)。

2.4 *MTHFR* C677T 和 A1298C 基因型联合分析:我们进一步分析了 *MTHFR* C677T 和 A1298C 多态位点基因型联合对银屑病风险的影响。就数据分析,677CC/1298 CC 发病风险最高,而 677 CT/1298 AC 风险最低,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 4)。我们还发现在这些研究对象中,677TT/1298AC 变异基因型比较罕见,未发现携带 677TT/1298CC、677CT/1298CC 基因型的个体(见表 4),与

Karen 等^[5]研究的数据情况相似。这两种组合基因型未被发现的原因之一可能因为样本数不足够大,另外可能正如 Van Der Put 和 Weisberg 等^[2,7]认为的一样,C677T 和 A1298C 位点的突变具有明显的连锁不平衡性,突变等位基因 677T 和 1298C 在染色体上呈反式排列,即这两个突变等位基因一般情况下不会同时存在于一条染色体上,并推测如果二者同时存在于一条染色体上,将对酶的活性产生较大影响。

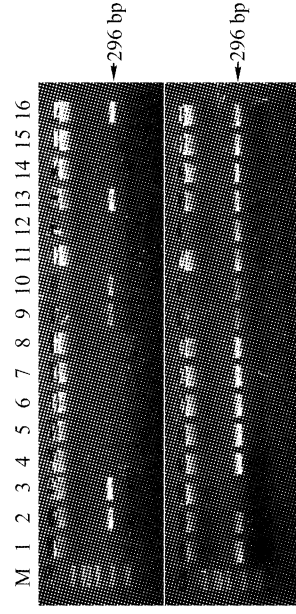


图 2 A1298C 多态位 AS-PCR 结果

Fig.2 AS-PCR production of A1298C

M 为 DL2000;上下两块胶的对应胶孔为同一 DNA 样本 P1/P2PCR 产物、P1/P3 PCR 产物。1、4、5、6、7、8、11、12、14、15 为 AA 基因型;2、9、10、13、16 为 AC 基因型;3 为 CC 基因型。

M: DL2000;1、4、5、6、7、8、11、12、14、15: AA genotype;2、9、10、13、16 :AC genotype;3: CC genotype;

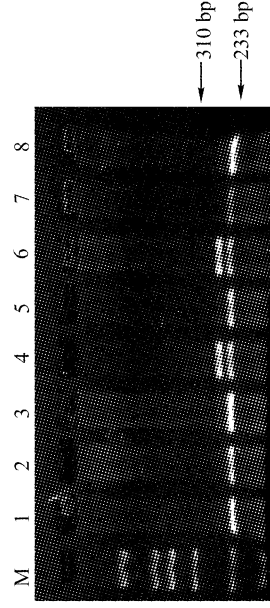


图 3 G1793A 多态位点 PCR-RFLP 结果

Fig.3 RFLP results of G1793A PCR production

M 为 DL2000;1、2、3、5、7、8 为 GG 基因型;4、6 为 GA 基因型;

M: DL2000;1、2、3、5、7、8: GG genotype;4、6 :GA genotype;

表 3 *MTHFR* 基因 3 个多态位点基因型比较

Table 3 *MTHFR* polymorphisms and allele frequencies of the cases and controls

多态位点	基因型	病例组 (%)	对照组	OR (95% CI)	P 值
C677T	CC	26(21.14%)	21(16.28%)	1 (参考值)	-
	CT	59(47.96%)	73(56.59%)	0.66(0.34~1.29)	0.23
	TT	38(30.89%)	35(27.13%)	0.88(0.42~1.98)	0.73
A1298C	AA	95(77.23%)	95(73.64%)	1 (参考值)	-
	AC	26(21.13%)	33(25.58%)	0.79(0.67~1.03)	0.43
	CC	2(1.62%)	1(0.77%)	2(0.18~22.26)	0.57
G1793A	GG	111(90.24%)	119(92.25%)	1 (参考值)	-
	GA	12(9.75%)	10(7.75)	1.28(0.53~3.08)	0.68

表 4 C677T 与 A1298C 位点基因型对银屑病发病风险的联合影响
Table 4 Joint effect of C677T and A1298C genotypes on risk of psoriasis

基因型	病例组(%)		对照组(%)	OR(95% CI)	P 值
	C677T	A1298C			
CC	AA	14(11.38%)	13(10.08%)	1 (参考值)	-
CC	AC	10(8.13%)	7(5.49%)	1.32(0.39~4.65)	0.65
CC	CC	2(1.63%)	1(0.76%)	1.86(0.15~23.01)	0.63
CT	AA	43(34.96%)	49(37.98%)	0.81(0.34~1.91)	0.64
CT	AC	16(13.01%)	24(18.60%)	0.62(0.14~2.72)	0.34
TT	AA	38(30.89%)	33(22.58%)	1.07(0.44~2.60)	0.88
TT	AC	0	2(1.55%)	-	-

但也有个别研究通过最大似然统计方法发现 T/C 单体型^[7]。

3 讨论

通过对实验数据的分析及处理,我们未得出 *MTHFR* 的 3 个多态位点同寻常型银屑病相关的结论,杨维玲等对该基因的 C677T 位点的多态性与银屑病进行过研究,认为银屑病纯合突变(TT)同正常对照是不同的。对比两研究数据发现,在我们研究的病例组和对照组中,677 T 等位基因频率分别为 54.87%、55.04%,杨维玲等研究报道的病例组和对照组 677T 等位基因频率为 55.13%、39.87%。两组研究均针对黑龙江人群,故结果不同可能是由于研究样本量的差异导致的。另外,可能也是由于在杨维玲等的研究中未进行病例与正常对照两组年龄与性相匹配的缘故。未得出 *MTHFR* C677T、A1298C 两个位点同银屑病相关的结论可能由于:其一为在我们的群体中 *MTHFR* 677TT 并不是高半胱氨酸血症的决定因素,并且对高半胱氨酸不构成影响,并不是银屑病高半胱氨酸血症的主要原因,在一些研究中也类似报道^[8,9]。另外,考虑银屑病为多因素复杂致病及高同型半胱氨酸血症与营养、遗传等多因素有关,叶酸、维生素 B₆、B₁₂ 这些因子在同型半胱氨酸代谢反应中为必需因子,均可导致高同型半胱氨酸血症的发生,这种多因素之间的相互作用可能减弱了或掩盖了 *MTHFR* 基因多态性与银屑病的关系。

对于 C677T、A1298C 两个位点的人群分布已有许多研究,*MTHFR* 677T 等位基因频率欧洲人在 22%~44% 之间,非洲撒哈拉地区黑人为 7% 且未发现有纯合突变、日本人 677T 等位基因频率为 34%^[10]。在中国少数民族中,该位点 T 等位基因频

率达朝鲜族人为 45%,朝鲜人为 47%^[8,11],荔波汉族、布依族和苗族 677T 等位基因频率分别为 22.8%、16.1% 和 10.6%^[12];1298 C 等位基因频率在西欧为 27%~36%、非洲为 39%、亚洲为 17%~19%^[8]。北方少数民族为 9%~38%,贵州荔波汉族、布依族和苗族分别为 28.9%、16.1%、10.6%^[12]。我们的研究结果表明,黑龙江人群中 *MTHFR* 基因 C677T 位点 T 等位基因频率为 55.04%,A1298C 位点 C 等位基因频率为 13.56%,对比研究结果,677T 等位基因频率明显偏高,1298C 等位基因频率偏低。这可能由于多态性分布存在地域及群体差异性有关。这两个多态性位点在不同地区和种族间基因型分布及等位基因频率差异均有统计学意义,这可能是一些相关疾病在不同种族、不同地区间具有不同发病率和临床特点的原因之一。而对于 T677C 具有如此高频率的突变分布,一种可能的解释是,不论杂合子还是纯合子,突变体基因型可以有超越正常个体的选择优势;另一种解释是 *MTHFR* 的热不稳定形式被认为与减少高半胱氨酸的再甲基化导致衍生的—碳单位仍保留有价值的嘌呤和胸腺嘧啶核苷的生物合成有关^[13]。

对于 A1298C 的研究,国内外常采用的方法为利用内切酶 *Mbo* II 酶切 A1298C PCR 产物,然后用琼脂糖凝胶电泳或非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法区分基因型。但这种研究方法存在一个问题,在 A1298C 位点旁边存在一个 T1317C 多态位点,这个位点如果为 C,会形成一个 *Mbo* II 的酶切序列,这个酶切序列的酶切位点与 A1298C 位点 A 时形成的酶切位点只相差 1 个碱基,故利用琼脂糖凝胶电泳或非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法无法判断该酶切位点是由 1298A 还是由 1317C 导致的。虽然 Nathaliem 在研究 450 个荷兰个体时得出 1317C 的替

换可能发生在 1298A 时,可能并不影响 A1298C 的分型的结论^[14]。但 NCBI 的 SNP 数据库显示 T1317C 位点的杂合率为 0.164,且 HAPMAP 数据库显示该位点在 YRI 研究样本中的 C 的频率为 0.692。因此,用 *Mbo* II 酶切方法来研究 A1298C 位点的准确性还需进一步考证。本文选用等位基因特异性 PCR 的方法对该位点进行研究,效果较好、经济方便,且不涉及 T1317C 位点干扰的问题。

本研究结果表明, *MTHFR* 的 3 个多态位点 (C677T、A1298C、G1793A) 与寻常型银屑病无明显的相关关系。但要明确 *MTHFR* 同银屑病易感性是 否有关还需要进一步扩大样本继续进行研究,还应收集全面的流行病学和临床相关资料进行分层分析,结合叶酸水平、血浆半胱氨酸、 B_6 、 B_{12} 水平及环境进行交互作用分析。只有全面深入了解各种因素作用的方式和效应,才可能阐明 *MTHFR* 与银屑病的关系。

参 考 文 献

- 1 Yoo JH, Choi GD, Kang SS. Pathogenicity of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase for vascular dementia. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2000, 20:1921-1925.
- 2 Van Der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*, 1998, 62:1044-1051.
- 3 Vanizor Kural B, Orem A, Cimsit G, et al. Plasma homocysteine and its relationships with atherothrombotic markers in psoriatic patients. *Clin Chim Acta*, 2003, 32:23-30.
- 4 Yang WL, Wang XH, Zheng SY, et al. Study on the Relationship Between Psoriasis and the Polymorphic Site A677V of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *Chin J Dermatol*, 1999, 2:87-89.
[杨维玲, 王晓慧, 郑淑云, 等. 银屑病与亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态位点 A677V 关系的研究. *中华皮肤科杂志*, 1999, 2: 87-89.]

polymorphisms: diet, estrogen, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004, 13, 285-292.
6 Keku T, Millikan R, Worley K, et al. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in african americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11:1611-1621.

- 7 Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, et al. The 1298AC polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): In vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*, 2001, 156:409-415.
- 8 Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the french population. *Thromb Haemost*, 2005, 94:510-515.
- 9 Boscol P, Mania R, Rodriguez G, et al. Association of homocysteine (but not of MTHFR 677 C > T, MTR2756 A > G, MTRR 66 A > G and TCN2 776 C > C) with ischaemic cerebrovascular disease in sicily. *Thromb Haemost*, 2006, 96:154-159.
- 10 Schneider JA, Rees DC, Liu YT, et al. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet*, 1998, 62:1258-1260.
- 11 Xue Y, Yu J, Wan Q, et al. Distribution of a common methylenetetrahydrofolate mutation in six Chinese population groups. *Anthropol Anz*, 2000, 58:253-257.
- 12 Yu JM, Wang XC, Cheng BB. Study on the MTHFR gene polymorphism of five nationalities in China. *Acta Anthropologica Sinica*, 1998, 17:242-246.
[于佳梅, 王新春, 陈白滨, 等. 中国 5 个民族亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的研究. *人类学学报*, 1998, 17:242-246.]
- 13 Xiao Y, Shan KR, Li Y, et al. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in three nationalities of Guizhou in China. *Chin J Med Genet*, 2005, 22:219-221.
[肖雁, 单可人, 李毅, 等. 贵州三个民族亚甲基四氢叶酸还原酶基因的遗传多态性. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22:219-221.]
- 14 Nathaliem. J, Van Der Put, Henk J. Blom. Reply to Donnelly. *Am J Hum Genet*, 2000, 66:744-745.
(收稿日期:2007-02-28)
(本文编辑:高巍)

5 Curtiu K, Biqler J, Slatterv ML, et al. MTHFR C677T and A1298C