

首都医科大学医学检验优秀论文·论著

青年脑卒中与 MTHFR 基因多态性、同型半胱氨酸水平及血小板参数的相关性研究*

刘淑静, 孙嘉璐, 王玉飞, 李斯文, 周 金, 谷愉愉, 司学众, 张国军[△]首都医科大学附属北京天坛医院检验科/国家药监局体外诊断试剂质量控制重点实验室/
北京市免疫试剂临床工程技术研究中心, 北京 100070

摘要:目的 通过分析青年脑卒中患者亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性、同型半胱氨酸水平和血小板参数,探究青年脑卒中的危险因素及早期诊断青年脑卒中的实验室指标。方法 回顾性分析 2016—2020 年首都医科大学附属北京天坛医院青年脑卒中患者 78 例(青年脑卒中组)、中老年脑卒中患者 138 例(老年脑卒中组)及体检健康者 411 例(对照组)的 MTHFR 基因型、同型半胱氨酸水平、血小板参数和血栓弹力图结果,采用 SPSS26.0 统计学软件分析各指标在青年脑卒中组、老年脑卒中组和对照组中的差异。结果 青年脑卒中组 MTHFR 基因 677TT 纯合突变型比例和同型半胱氨酸水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。青年脑卒中组 MTHFR 基因 677TT 纯合突变型比例和同型半胱氨酸水平与老年脑卒中组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。青年脑卒中患者血小板分布宽度明显高于老年脑卒中患者,血凝块形成点至描记图最大曲线弧度作切线与水平线的夹角明显低于老年脑卒中患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 青年脑卒中和老年脑卒中患者的血小板参数存在差异,青年脑卒中患者血小板分布宽度高于老年脑卒中患者和血凝块形成点至描记图最大曲线弧度作切线与水平线的夹角低于老年脑卒中患者,对研究青年脑卒中发病机制和治疗预后具有指导作用。

关键词:青年脑卒中; 亚甲基四氢叶酸还原酶基因; 同型半胱氨酸; 血栓弹力图

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.19.002

中图法分类号:R743.3

文章编号:1673-4130(2021)19-2309-04

文献标志码:A

Relationship between MTHFR gene polymorphism, homocysteine level and platelet parameters in young patients with stroke*

LIU Shujing, SUN Jialu, WANG Yufei, LI Siwen, ZHOU Jin,
GU Yuyu, SI Xuezhong, ZHANG Guojun[△]Department of Clinical Laboratory, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University/
NMPA Key Laboratory for Quality Control of In Vitro Diagnostics/Beijing Engineering Research
Center of Immunological Reagents Clinical Research, Beijing 100070, China

Abstract: Objective To analyze the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) gene polymorphism, homocysteine level and platelet function in young stroke patients, and to explore the risk factors of young stroke and laboratory indicators for early diagnosis of young stroke. **Methods** The MTHFR genotype, homocysteine level, platelet parameters and thromboelastogram results of 78 young stroke patients (young stroke group), 138 middle-aged and elderly stroke patients (elderly stroke group) and 411 healthy subjects (control group) in Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University from 2016 to 2020 were analyzed retrospectively. SPSS26.0 statistical software was used to analyze the differences of each index in young stroke group, elderly stroke group and control group. **Results** The proportion of MTHFR 677TT homozygous mutant and homocysteine level in young stroke group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference in the proportion of MTHFR gene 677TT homozygous mutant and homocysteine level between young stroke group and elderly stroke group ($P > 0.05$). The platelet distribution width of young stroke patients was significantly higher than that

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82002198)。

作者简介:刘淑静,女,副主任医师,主要从事神经系统疾病的免疫学和分子生物学研究。△ 通信作者,E-mail:tiantanzgj@163.com。

本文引用格式:刘淑静,孙嘉璐,王玉飞,等.青年脑卒中与 MTHFR 基因多态性、同型半胱氨酸水平及血小板参数的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(19):2309-2312.

of elderly stroke patients, and the angle between the tangent line and the horizontal line from the blood clot formation point to the maximum curve radian of the tracing diagram was significantly lower than that of elderly stroke patients, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** There are differences in MTHFR gene polymorphism, homocysteine level and platelet parameters between young stroke and elderly stroke patients, the platelet distribution width of young stroke patients is higher than that of elderly stroke patients and the angle between the tangent line and the horizontal line from the blood clot formation point to the maximum curve radian of the tracing diagram is lower than that of elderly stroke patients, which has a guiding role in studying the pathogenesis and treatment prognosis of young patients with stroke.

Key words: youth stroke; 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene; homocysteine; thromboelastogram

脑卒中是目前世界范围内病死率排名第 2 位的疾病,其主要患病人群是中老年人,但近年来平均发病年龄呈现出“年轻化”的趋势。脑卒中患者预后差,常伴有单侧或双侧肢体无力、言语不清、感觉障碍等后遗症,严重影响患者生活质量,患者还存在发生血管疾病等其他并发症的风险,需要长期接受康复治疗。因此,对脑卒中早发现、早诊断、早治疗具有重要的临床意义^[1]。青年脑卒中通常被认为与传统老年脑卒中的病因有一定差异^[2],因此,对于青年脑卒中的研究十分有必要。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是体内代谢同型半胱氨酸和叶酸的重要物质,有研究表明 MTHFR 基因多态性与脑卒中的发病相关^[3]。该基因 677 位点的基因片段突变后产生 3 种基因型:野生纯合型 CC、杂合型 CT 及纯合型突变 TT。该基因产生的突变可以使血中同型半胱氨酸水平升高^[4],是心血管疾病的危险因素,但该基因在脑血管疾病,特别是青年脑卒中的研究较少,因此,本研究通过对 MTHFR 基因型、同型半胱氨酸水平、血小板参数等指标分析,比较青年脑卒中与老年脑卒中发病危险因素的差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016—2020 年首都医科大学附属北京天坛医院收治的 627 例脑卒中患者和健康志愿者作为研究对象。依据年龄将 >45 岁脑卒中患者作为老年脑卒中组, ≤ 45 岁脑卒中患者作为青年脑卒中组^[5];健康志愿者作为对照组。脑卒中患者共 216 例,男 202 例,女 14 例,年龄 17~85 岁。其中青年脑卒中组 78 例,老年脑卒中组 138 例。对照组共 411 例,男 252 例,女 159 例,年龄 19~82 岁。

患者纳入标准:根据第四次全国脑血管病会议提出的脑卒中相关标准诊断为脑卒中患者^[6]。患者排除标准:诊断不明确患者;未区分脑卒中或脑出血患者;同时患有肿瘤或血液系统疾病的患者。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 MTHFR C677T 基因检测选用 ABI 公司 Verity™ Dx96 Well Thermal Cycler PCR 扩增仪及西安金磁纳米生物技术有限公司 MTHFR C677T 基因检测试剂盒;Hcy 检测采用 7020 日本

HITACHI 全自动生化分析仪和武汉长立生物技术开发有限公司生产的生化检测试剂盒进行;血常规检测采用迈瑞 BC-6900 全自动血细胞分析仪及配套试剂盒进行;血栓弹力图采用美国 Haemoscope 公司的血栓弹力图仪 TEGTEG-5000 及配套试剂盒进行。

1.2.2 检测方法 MTHFR C677T 基因检测方法为 PCR-金磁微粒层析法,取患者外周血,提取其基因组 DNA 进行检测;同型半胱氨酸测定使用循环酶法,利用酶促反应及还原性辅酶 1 的变化来测定血清同型半胱氨酸水平;血常规检测原理为电阻抗法检测全血;血栓弹力图用于监测全凝血状态。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计学软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较行 χ^2 检验;非正态分布以计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 MTHFR 基因型分布 老年脑卒中组和青年脑卒中组 MTHFR 基因 677TT 纯合突变型比例明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),青年脑卒中组和老年脑卒中组 MTHFR 基因 677TT 纯合突变型比例差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组 MTHFR 基因型分布见表 1。

表 1 青、老年脑卒中组与对照组 MTHFR 基因型分布分析

组别	n	基因型频率率[n(%)]			基因频率(%)	
		677CC	677CT	677TT	C	T
青年脑卒中组	78	5(6.4)	15(19.2)	58(74.4)	16.0	84.0
老年脑卒中组	138	11(7.9)	35(25.4)	92(66.7)	20.6	79.4
对照组	411	86(20.9)	189(46.0)	136(33.1)	43.9	56.1

2.2 各组同型半胱氨酸水平比较 青年脑卒中组同型半胱氨酸水平为 36.7(19.0, 54.5) $\mu\text{mol/L}$,老年脑卒中组为 29.1(20.1, 45.0) $\mu\text{mol/L}$,两组比较差异无统计学意义($P = 0.209$)。对照组同型半胱氨酸水平为 12.4(10.3, 15.1) $\mu\text{mol/L}$,低于青年脑卒中组和老年脑卒中组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 青年脑卒中与老年脑卒中患者血小板功能比

较 青年卒中组的血小板计数(PLT)、平均血小板体积(MPV)、大血小板比率(Plcr)和血小板压积(PCT)与老年卒中组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);青年卒中组的血小板分布宽度(PDW)高于老年卒中组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.4 青年脑卒中与老年脑卒中患者血栓弹力图比

表 2 青、老年脑卒中组血小板功能比较[M(P_{25} , P_{75})]

组别	PLT($\times 10^9/L$)	PDW(%)	MPV(fL)	Plcr(%)	PCT(%)
青年脑卒中组	232.0(196.3,272.0)	13.0(11.4,15.5) ^a	10.1(9.5,10.6)	25.7(21.1,30.6)	0.24(0.20,0.28)
老年脑卒中组	226.0(184.0,272.0)	11.6(10.8,13.1)	10.0(9.4,10.8)	25.4(20.9,31.8)	0.22(0.19,0.27)

注:与老年脑卒中组比较,^a $P<0.05$ 。

表 3 青、老年脑卒中组血栓弹力图比较[M(P_{25} , P_{75})]

组别	MA(mm)	$\alpha(^{\circ})$
青年脑卒中组	63.1(60.3,66.5)	64.3(60.5,67.5) ^a
老年脑卒中组	63.6(60.7,66.8)	67.7(64.3,71.2)

注:与老年脑卒中组比较,^a $P<0.05$ 。

3 讨 论

近年来,我国脑卒中发病的年轻化趋势越来越严重,脑卒中负担在过去 30 年中也有所增加,并且在农村地区发病率尤其较高。中国脑卒中呈南北梯度,北部和中部地区脑卒中负担最大^[7]。一项历时 15 年的研究表明,脑卒中患者住院率增加了一倍多,且住院死亡率较高,住院花费较多^[8]。因此,早期发现脑卒中,并进行预防性治疗非常必要。国内外对于青年卒中危险因素的研究目前大多停留在如高血压、糖尿病、高脂血症等传统卒中危险因素上,对青年卒中中和老年卒中发病因素的差异研究较少。本研究通过对 MTHFR 基因型、同型半胱氨酸水平、血小板参数等指标分析,比较青年脑卒中与老年卒中发病危险因素的差异。本研究共收集脑卒中患者 216 例,青年脑卒中患者 78 例,老年脑卒中患者 138 例,该比例较 NING 等^[9]报道的青年脑卒中占全部脑卒中的 13.3% 更高。本研究脑卒中患者中,男 202 例,女 14 例,这与国内外报道一致^[9-10]。研究显示,在 35~45 岁年龄段脑血管病的发病率男性为 18/100 000~142/100 000,女性为 23/100 000~95/100 000,大约 1.49:1.00^[9]。有文献表明,国外同年龄段青年卒中男女比例为 1.7:1.0^[10]。

MTHFR 是叶酸代谢途径中的关键酶,其催化亚甲基四氢叶酸还原成 5-甲基四氢叶酸,5-甲基四氢叶酸作为甲基供体,与 DNA、RNA 和蛋白质的修复有关,同时同型半胱氨酸依靠 5-甲基四氢叶酸提供的甲基,发生甲基化反应生成甲硫氨酸,维持血浆同型半胱氨酸的正常水平^[11]。研究表明,677T 等位基因纯合个体的酶活性只有野生型 C 等位基因纯合个体酶活性的 30%,而是杂合子保留野生型 MTHFR 酶活

较 青年脑卒中组从血凝块形成点至描记图最大曲线弧度作切线与水平线的夹角(α)低于老年脑卒中组,差异有统计学意义($P<0.05$);青年脑卒中组血凝块最大振幅(MA)与老年脑卒中组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

性的 65%^[12]。与正常的非突变对照者相比,纯合突变患者同型半胱氨酸水平更高,而杂合突变患者同型半胱氨酸水平轻度升高^[13]。本研究结果显示,与对照组比较,青年脑卒中组和老年脑卒中组 MTHFR 基因 677TT 纯合突变型比例显著增高,符合以往研究结果^[13]。青年脑卒中患者中,677CC 型 5 例,所占比例为 6.4%;677CT 型 15 例,所占比例为 19.2%;677TT 型 58 例,所占比例为 74.4%。老年脑卒中患者中 677CC 型 11 例,所占比例为 7.9%;677CT 型 35 例,所占比例为 25.4%;677TT 型 92 例,所占比例为 66.7%。但青年脑卒中患者 MTHFR 基因 677TT 纯合突变型与老年脑卒中患者比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

由于 MTHFR 基因多态性,677 位点 C→T 的突变,可导致酶活性下降,从而引起血同型半胱氨酸水平升高。笔者发现,青年脑卒中组和老年脑卒中组同型半胱氨酸水平与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。高同型半胱氨酸会对血管内皮细胞造成损伤,促进血管平滑肌增殖,增加血液中血小板的黏附性,从而导致心脑血管疾病的发生^[14]。血清同型半胱氨酸水平升高可能与颅内动脉钙化和动脉粥样硬化密切相关^[14]。也有研究显示,血清同型半胱氨酸水平升高与中青年患者颅内大动脉狭窄引起的缺血性中风相关^[16]。本研究结果显示,青年脑卒中组同型半胱氨酸水平与老年脑卒中组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。这一结果与本研究的 MTHFR 基因结果一致。

本研究还分析了各组血小板参数。青年脑卒中组的 PDW 高于老年脑卒中组,差异有统计学意义($P<0.05$)。PDW 是反映血小板体积变化的参数,正常参考值为 15%~17%。如果 PDW 增大,说明血小板大小不均。有研究也发现,PDW 是房颤患者脑卒中的重要危险因素,有可能成为预测脑卒中发生的新的生物标志物^[17]。PDW 的差异提示青年卒中中和老年脑卒中的发病机制可能存在差异。

本研究选用血栓弹力图来分析各组凝血功能,血

栓弹力图可以监测凝血的整个过程(除血管内皮因素外),其检测内容为血凝块强度的变化及时间,包括血凝块形成的速率(纤维蛋白的形成速度)、血凝块的强度、血凝块的稳定性(血凝块溶解)^[18]。本研究分析了反映血小板聚集功能的 MA 和反映血凝块形成速率的 α , 结果显示青年脑卒中组 α 显著低于老年脑卒中组,提示凝血功能对于青年脑卒中和老年脑卒中的影响有明显差异,此项结果与以往研究结果一致^[17,19]。这可能与同型半胱氨酸损伤血管内皮,导致动脉粥样硬化,使血小板易于黏附、聚集血管壁相关,且同型半胱氨酸水平升高可直接或间接引起血管内皮细胞损伤。此外,同型半胱氨酸也能氧化自身产生有毒的活性氧,引起血管功能异常,其产生的活性氧中间产物与血小板 L-Arg/NOS/NO 系统功能呈高度一致性变化^[19],这种功能变化可以反映内皮功能。血管疾病、血流动力学和血液成分的改变与缺血性脑卒中的发生和发展有关,因此血小板凝血功能和生物活性的评估在监测急性缺血性脑卒中发病和进展中具有重要意义,血小板参数可以作为评估急性缺血性脑卒中发生、发展的组合标志物^[20]。

本研究根据文献[6]以 45 岁为界,将脑卒中患者分为青年脑卒中组和老年脑卒中组,对可能的危险因素进行了分析。本研究发现,青年脑卒中患者 PDW 增加, α 减小,提示青年脑卒中患者与老年脑卒中患者发病原因可能存在差异。但是,本研究中青年脑卒中患者与老年脑卒中患者 MTHFR 基因型和血同型半胱氨酸水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),这可能与本研究样本量有关,下一步研究笔者将加大样本量并进一步对年龄进行更细的分层,以挖掘可能存在的差异。

参考文献

- [1] MEYER S, PORYO M, FLOTATS-BASTARDAS M, et al. Schlaganfall bei Kindern und Jugendlichen[J]. Radiologie, 2017, 57(7): 569-576.
- [2] VAN ALEBEEK M E, ARNTZ R M, EKKER M S, et al. Risk factors and mechanisms of stroke in young adults: the FUTURE study[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(9): 1631-1641.
- [3] 黄文江, 黄莺. 冠状动脉慢血流研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(14): 2772-2775.
- [4] 陈萍, 郑立红. MTHFR 基因多态性与糖尿病心脏病相关性分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(7): 14-15.
- [5] KISSELA B M, KHOURY J C, ALWELL K, et al. Age at stroke: temporal trends in stroke incidence in a large, biracial population[J]. Neurology, 2012, 79(17): 1781-1787.
- [6] 崔元孝. 脑血管疾病诊治进展 脑血管病的分类与诊断标准[J]. 山东医药, 2004, 48(30): 62-63.
- [7] WANG W, JIANG B, SUN H, et al. NESS-China investigators. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults[J]. Circulation, 2017, 135(8): 759-771.
- [8] LEVIN B L, VARGA E. MTHFR: Addressing genetic counseling dilemmas using evidence-based literature[J]. J Genet Couns, 2016, 25(5): 901-911.
- [9] NING X, SUN J, JIANG R, et al. Increased stroke burdens among the low-income young and middle aged in rural China[J]. Stroke, 2017, 48(1): 77-83.
- [10] JUKKA P, ANTTI J M, TIINA M M. Analysis of 1 008 consecutive patients aged 15 to 49 with first-ever ischemic stroke: the Helsinki young stroke registry[J]. Stroke, 2009, 40(4): 1195-1203.
- [11] SANTOS J V, PEREIRA J, PINTO R, et al. Atrial Fibrillation as an ischemic stroke clinical and economic burden modifier: a 15-year nationwide study[J]. Value Health, 2017, 20(8): 1083-1091.
- [12] 孟翀, 王桂红. 血小板参数与急性缺血性脑卒中的关系[J]. 中国医药指南, 2017, 15(12): 11-12.
- [13] LIEW S C, GUPTA E D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases[J]. Eur J Med Genet, 2015, 58(1): 1-10.
- [14] 张垚, 李杰. 高血压与同型半胱氨酸的关系研究[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(30): 15.
- [15] KIM J M, PARK K Y, SHIN D W, et al. Relation of serum homocysteine levels to cerebral artery calcification and atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2016, 254(14): 200-204.
- [16] GUNGOR L, POLAT M, OZBERK M B, et al. Which ischemic stroke subtype is associated with hyperhomocysteinemia? [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(7): 1921-1929.
- [17] LYU Q S, LIU B, HUANG C, et al. The association between platelet distribution width and stroke in atrial fibrillation patients[J]. Ann Clin Lab Sci, 2019, 49(1): 143-147.
- [18] 张星辰, 郑欣, 孙玛骥, 等. 骨科围手术期血栓弹力图的应用研究[J/CD]. 中华关节外科杂志(电子版), 2017, 11(1): 83-86.
- [19] 金艳, 杨承健, 徐欣, 等. 冠状动脉慢血流现象与血小板功能及同型半胱氨酸水平的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(4): 781-782.
- [20] 常闪闪, 有风芝, 宋超, 等. MTHFR C677T 基因多态性及血浆 Hcy 水平与胎儿先天性心脏病的关系[J]. 中国妇幼卫生杂志, 2019, 10(2): 24-29.