

# MTHFR C677T 多态性与脓毒血症的关系

罗翠竹<sup>1</sup>, 王小明<sup>2</sup>, 周云<sup>1</sup>

(萍乡市人民医院重症医学科<sup>1</sup>, 检验科<sup>2</sup>, 江西 萍乡 337000)

**摘要:**目的 探讨 MTHFR C677T 基因多态性(SNP)与脓毒血症的关系。方法 选择 2014 年 1 月~2018 年 6 月我院住院的脓毒血症患者 98 例,采用梯度 PCR 及 DNA 测序技术,检测 MTHFR C677T 基因型,比较不同 T 淋巴细胞凋亡比例脓毒血症患者 MTHFR C677T 基因型分布情况及 MTHFR C677T 多态性与脓毒血症的关系。结果 MTHFR C677 各位点基因型在 T 淋巴细胞中的凋亡比例方面比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );APACHE II <4 分,SOFA <2 分的 CT 比例高于 CC 与 TT 基因型,降钙素原减少比例 TT 低于 CC 基因型与 CT 基因型,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),28 天死亡人数比例 TT 低于 CC 基因型与 CT 基因型,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 MTHFR C677T 与脓毒血症患者预后有关,可根据 MTHFR C677T 的基因多态性预测脓毒血症的预后。

**关键词:**脓毒血症;亚甲基四氢叶酸还原酶;单核苷酸多态性;死亡率

中图分类号:R459.7

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.21.031

文章编号:1006-1959(2019)21-0101-03

## Relationship between MTHFR C677T Polymorphism and Sepsis

LUO Cui-zhu<sup>1</sup>, WANG Xiao-ming<sup>2</sup>, ZHOU Yun<sup>1</sup>

(Department of Critical Care Medicine<sup>1</sup>, Department of Laboratory<sup>2</sup>, Pingxiang People's Hospital, Pingxiang 337000, Jiangxi, China)

**Abstract:** Objective To investigate the relationship between MTHFR C677T gene polymorphism (SNP) and sepsis. Methods 98 patients with sepsis hospitalized in our hospital from January 2014 to June 2018 were selected. Gradient PCR and DNA sequencing techniques were used to detect the MTHFR C677T genotype and compare the proportion of different T lymphocyte apoptosis patients with sepsis. The distribution of MTHFR C677T genotype and the relationship between MTHFR C677T polymorphism and sepsis. Results There was no significant difference in the proportion of MTHFR C677 genotypes in T lymphocytes ( $P>0.05$ ). APACHE II <4 points, SOFA <2 points had higher CT ratio than CC and TT genotypes. The proportion of procalcitonin reduction was lower than CC genotype and CT genotype, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The proportion of deaths in 28 days was lower than that of CC genotype and CT genotype, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Conclusion MTHFR C677T is associated with the prognosis of patients with sepsis. The prognosis of sepsis can be predicted based on the gene polymorphism of MTHFR C677T.

**Key words:** Sepsis; Methylene tetrahydrofolate reductase; Single nucleotide polymorphism; Mortality

脓毒血症(sepsis)是由于机体遭受感染袭击,威胁患者的机体免疫系统<sup>[1]</sup>,可能危及患者生命,可造成机体炎症反应加重,引起多器官衰竭,自身组织细胞破坏<sup>[2]</sup>。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是叶酸代谢中的限速酶,对于甲氨蝶呤(MTX)药理作用的发挥起关键的调节作用,其单核苷酸基因多态性(SNP)对于严重炎症反应具有一定的相关性<sup>[3]</sup>。不同 MTHFR C677T 基因型患者淋巴细胞凋亡存在明显差异<sup>[4]</sup>,需要进一步研究 MTHFR C677T 基因型对脓毒血症患者免疫功能的影响<sup>[5]</sup>。本研究拟比较不同 MTHFR C677T 基因型患脓毒血症时,T 淋巴细胞凋亡的比例及死亡率有无差异,为临床提供治疗参考依据,可为脓毒血症的预后提供参考。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 纳入 2014 年 1 月~2018 年 6 月萍乡市人民医院收治的脓毒血症患者 98 例作为研究对象。本研究获医院伦理评审委员会批准,患者及家属均知情同意,并签署知情同意书。年龄 40~60 岁,平均年龄(62.36±2.14)岁,男 64 例,女 34 例;T 淋巴细胞凋亡比例<20%有 43 例,20%~60%有 39 例,≥

60%有 16 例。临床严重程度分级:低危组 43 例,女 16 例,男 27 例,年龄 40~60 岁,平均年龄(55.76±2.38)岁;中危组 39 例,女 12 例,男 27 例,年龄 40~60 岁,平均年龄(59.94±2.64)岁;高危组 16 例,女 5 例,男 11 例,年龄 40~60 岁,平均年龄(66.03±2.26)岁;三组性别、年龄比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 1.2 方法

**1.2.1 试剂与仪器** Reverse Transcriptase XL 逆转录试剂盒购自大连 TAKARA<sup>®</sup>公司,琼脂糖购自西班牙 Pharmacia 公司, QIAamp RNA Blood Mini Kit 试剂盒购自天根生化科技,所有引物均由华大基因科技公司合成。主要仪器为核酸电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)/梯度 PCR 检测仪(德国 Biometra 公司)。

**1.2.2 RNA 提取及 cDNA 制备** 均按试剂盒说明书操作,使用 QIAamp RNA 试剂盒提取总 RNA,抽取患者外周血 2 ml, EDTA 抗凝并于-70℃保存,制备 cDNA 采用 Reverse Transcriptase XL 逆转录试剂。

**1.2.3 引物设计** MTHFR C677T 的引物设计由上海生工设计, Genbank 获取 MTHFR 核苷酸序列。突变探针 MTHFR 677T: 5'-荧光基团-CGGG+AG+T+CGATTT-淬灭基团;野生探针 MTHFR 677C: 5'-荧光基团-CGGG+AG+C+CGATTT-淬灭基团。

项目名称:江西省卫生计生委科技计划(编号:20164047)

作者简介:罗翠竹(1983.11-),女,江西萍乡人,硕士,主治医师,主要从事脓毒症的发病机制及个体化治疗的研究

**1.2.4 PCR 扩增** MTHFR C677T 的总反应体系为 50  $\mu$ l: 去离子水 17  $\mu$ l、正向与反向引物(10  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ l、Mix(2 $\times$ )25  $\mu$ l、DNA 模板 4  $\mu$ l。反应条件均为: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 54  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共进行 36 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

**1.2.5 PCR 产物电泳及测序** 加入 3% 琼脂糖凝胶孔内, 取待测 PCR 产物 5.0  $\mu$ l 及 Marker 7.5  $\mu$ l, 电压为 60 mV, 电泳 60 min, 凝胶成像系统拍照。

**1.3 T 淋巴细胞凋亡比例分析** 收集空腹新鲜外周血, 加 CD3 抗体和膜联蛋白 5 抗体, CD3 抗体和膜联蛋白 5 抗体均从 Elabscience 公司购买。应用流式细胞仪检测淋巴细胞凋亡比例, 所有试验操作严格按照有关说明书进行, MTHFR C677 各位点基因型在 T 淋巴细胞中的凋亡比例, 按照凋亡占比进行比较。

**1.4 观察指标** 比较不同 T 淋巴细胞凋亡比例脓毒血症患者 MTHFR C677T 基因型分布情况及 MTHFR C677T 多态性与脓毒血症的关系。

**1.5 统计学处理** 本研究数据采用 SPSS 22.0 软件分析, 计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用  $t$  检验; 计数资料(%)表示, 采用  $\chi^2$  检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同 T 淋巴细胞凋亡比例脓毒血症患者 MTHFR C677T 基因型分布情况** 脓毒血症患者 MTHFR C677T 位点: TT 纯合型 19 例 (19.39%)、CT 杂合型 46 例 (46.94%)、CC 野生型 33 例 (33.67%)。MTHFR C677 基因型在 T 淋巴细胞中的凋亡比例比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见表 1。

表 1 不同 T 淋巴细胞凋亡比例脓毒血症患者 MTHFR C677T 基因型分布[n(%)]

T 淋巴细胞凋亡比例	n	TT	CT	CC
<20%	43	9(20.93)	21(48.84)	13(30.23)
20%~60%	39	8(20.51)	18(46.15)	13(33.33)
$\geq 60\%$	16	2(12.50)	7(43.75)	7(43.75)

注:  $\chi^2=1.167$ ,  $P=0.883$

**2.2 MTHFR C677T 多态性与脓毒血症的关系** 98 例脓毒血症患者中, APACHE II  $<4$  分, SOFA  $<2$  分的 CT 比例高于 CC 与 TT 基因型, 降钙素原减少比例 TT 低于 CC 基因型与 CT 基因型, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 28 天死亡人数比例 TT 低于 CC 基因型与 CT 基因型, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见表 2。

## 3 讨论

脓毒血症由于细菌或者感染灶引起的全身炎症性反应综合征, 该病对患者的生命具有严重威胁性<sup>[4]</sup>。已有的研究对其机制的探讨主要集中在免疫攻击方面, 当机体遭受到感染的侵袭时, 可引起细胞和组织的破坏, 造成机体全身免疫炎症系统破坏, 出

表 2 MTHFR C677T 多态性与脓毒血症的关系

项目	n	TT	CT	CC	$\chi^2$	P
T 淋巴细胞升高	14	3	5	6	0.853	0.632
APACHE II $<4$ 分, SOFA $<2$ 分	51	13	22	16	3.034	0.034
降钙素原减少	78	13	39	26	3.621	0.026
住 ICU 时间 $>14$ 天	25	6	11	8	0.443	0.834
28 天死亡人数	21	4	8	10	3.751	0.025
同型半胱氨酸水平升高	36	8	15	13	0.634	0.746

现多器官功能衰竭。脓毒血症患者普遍存在免疫功能低下, 中性粒细胞凋亡延迟, 淋巴细胞凋亡增加<sup>[5]</sup>。亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T, 即 MTHFR C677T, 在人群中存在普遍多态性, 表现为 MTHFR C677CC, MTHFR C677CT, MTHFR C677TT 三种基因型<sup>[6]</sup>。目前已有研究表明 MTHFR C677T 基因多态性与肿瘤、心血管疾病、白血病、抑郁症等多种疾病相关<sup>[7]</sup>; 此外, 不同 MTHFR C677T 基因型, 其淋巴细胞遗传稳定性存在明显差异, MTHFR C677CC 基因型遗传稳定性显著高于 MTHFR C677TT, MTHFR C677CC 基因型淋巴细胞凋亡明显减少<sup>[8]</sup>。目前关于不同 MTHFR C677T 基因型患脓毒血症时, 不同基因型淋巴细胞凋亡的比率及患者死亡率有无差异, 目前研究报道较少<sup>[9]</sup>。

已有研究结果显示, 不同种族、地区人群 MTHFR 的 SNP 的突变有所差异。本研究通过对 MTHFR C677T 基因位点的变异了解其对脓毒血症预后的影响效应。首先检测了不同 T 淋巴细胞凋亡比例脓毒血症患者 MTHFR C677T 基因型分布情况, 结果显示 MTHFR C677 各位点基因型在 T 淋巴细胞凋亡的比例上差异均无统计学意义, 说明不同 T 淋巴细胞凋亡情况对 MTHFR C677T 基因型分布并未产生明显影响。目前研究提示, 脓毒血症与 MTHFR C677T 关系有着不同的观点, 有研究显示 677CT/TT 基因型会使脓毒血症患者出现血炎症水平升高的风险增加, 导致预后风险也出现升高<sup>[10]</sup>。本研究显示 APACHE II  $<4$  分, SOFA  $<2$  分的 CT 比例高于 CC 与 TT 基因型, 降钙素原减少比例 TT 低于 CC 基因型与 CT 基因型, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 28 天死亡人数比例 TT 低于 CC 基因型与 CT 基因型, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 其余各 SNP 的差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 提示基因多态性对预后有一定的差异性影响。本研究结果还提示不同 T 淋巴细胞凋亡比例脓毒血症患者 MTHFR C677T 基因型分布之间差异无统计学意义, 因此基因型类别不能用于评估 T 淋巴细胞凋亡的情况。

综上所述, MTHFR C677T 的基因多态性可能影响脓毒血症患者预后效果, 根据 MTHFR C677T 的

(下转第 105 页)

(上接第 102 页)

基因多态性有助于预测脓毒血症的预后。此外还可参照基因多态性对疾病进一步的分析,指导脓毒血症的治疗。本研究的初步结论还需要得到进一步样本量的扩大与验证探讨。

#### 参考文献:

- [1]Giuffrè M,Verso CL,Serra G,et al.Portals Vein Thrombosis in a Preterm Newborn with Mutation of the MTHFR and PAI-1 Genes and Sepsis by *Candida parapsilosis* [J].*Am J Perinatol*,2016,33(11):1099-1103.
- [2]Roy Moulik N,Kumar A,Agrawal S,et al.Role of folate status and methylenetetrahydrofolate reductase genotype on the toxicity and outcome of induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia [J].*Leuk Lymphoma*,2015,56 (5): 1379-1384.
- [3]Ioannou A,Dimitriou D,Dimitriou P,et al.Complicated Lemierre Syndrome Caused by *Streptococcus gordonii* and Possible Rickettsial Co-Infection in a Patient with Thrombophilia Predisposition[J].*Eur J Case Rep Intern Med*,2017,4(5): 606.
- [4]Chen F,Wang Y,Zhang W,et al.A Functional Polymorphism-Mediated Disruption of EGR1/ADAM10 Pathway Confers the Risk of Sepsis Progression [J].*MBio*,2019,10 (4):1663-1669.
- [5]Bermúdez-Mejía C,Torres-Cordón MF,Becerra-Bayona S, et al.Prognostic Value of MMP-9-1562 C/T Gene Polymorphism in Patients With Sepsis [J].*Biomark Insights*,2019,20(14): 117-221.
- [6]Varljen T,Rakic O,Sekulovic G,et al.Association between Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Promoter-308 G/A Polymorphism and Early Onset Sepsis in Preterm Infants[J].*Tohoku J Exp Med*,2019,247(4):259-264.
- [7]Runzheimer J,Mewes C,Büttner B,et al.Lack of an Association between the Functional Polymorphism TREM-1 rs2234237 and the Clinical Course of Sepsis among Critically Ill Caucasian Patients-A Monocentric Prospective Genetic Association Study[J].*J Clin Med*,2019,8(3):301.
- [8]Chen Y,Hu Y,Song Z.The association between interleukin-6 gene-174G/C single nucleotide polymorphism and sepsis:an updated meta-analysis with trial sequential analysis[J].*BMC Med Genet*,2019,20(1):35.
- [9]Rahmel T,Rump K,Peters J,et al.Aquaporin 5-1364A/C Promoter Polymorphism Is Associated with Pulmonary Inflammation and Survival in Acute Respiratory Distress Syndrome[J].*Anesthesiology*,2019,130(3):404-413.
- [10]Lambden S,Tomlinson J,Piper S,et al.Evidence for a protective role for the rs805305 single nucleotide polymorphism of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2)in septic shock through the regulation of DDAH activity [J].*Crit Care*,2018,22(1):336.

收稿日期:2019-8-24;修回日期:2019-9-18

编辑/肖婷婷