

• 临床研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.14.009

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240412.1850.012\(2024-04-12\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240412.1850.012(2024-04-12))

口腔黏膜脱落细胞用于高血压患者 MTHFR C677T 基因突变快速检测的有效性和安全性研究^{*}

余将丽,高必贞,党书毅,王俊峰,魏云杰,周港彦,董晓[△]

(湖北医药学院附属医院/十堰市太和医院心血管病诊疗中心,湖北十堰 442000)

[摘要] **目的** 研究使用荧光探针法床边快速检测口腔黏膜脱落细胞标本亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T 基因型的准确率和安全性。**方法** 选取 2019 年 1 月至 2020 年 9 月间就诊于十堰市太和医院心血管内科的门诊和住院高血压患者,患者均在实验室检测血浆同型半胱氨酸(Hcy)水平,选取 Hcy ≥ 10 $\mu\text{mol/L}$ 的高血压患者共 482 例,患者均采集口腔黏膜细胞及全血标本,分别用口腔黏膜脱落细胞荧光探针法及全血标本对比试剂检测上述标本 MTHFR C677T 基因型,若两者检测结果不一致则使用“金标准”Sanger 测序法检测全血标本对 MTHFR C677T 基因型进行最终判定。比较两种检测方法的符合率并观察记录采集标本过程中发生不良事件的概率,评价荧光探针法检测患者口腔黏膜脱落细胞 MTHFR C677T 基因型的准确率和安全性。**结果** 482 例高血压患者口腔黏膜脱落细胞标本和全血标本成功完成采集,且采样过程中患者未发生明显不良反应。荧光探针法和对比试剂检测 MTHFR C677T 基因总突变发生率为 73.23%(353/482),两种方法检测 MTHFR C677T 基因纯合野生型(CC 型)符合率为 100.00%(95%CI:97.11~100.00),杂合突变型(CT 型)符合率为 99.14%(95%CI:96.91~99.76),纯合突变型(TT 型)符合率为 99.17%(95%CI:95.47~99.85),MTHFR C677T 基因型总符合率为 99.38%(95%CI:98.19~99.79),检测结果一致性 $Kappa$ 值为 0.990 2。**结论** 采集口腔黏膜脱落细胞使用荧光探针法检测 MTHFR C677T 基因突变操作简便、创伤小,且快速、安全、准确。

[关键词] 亚甲基四氢叶酸还原酶;基因多态性;荧光探针法快速检测;Sanger 测序法**[中图分类号]** R544**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2024)14-2125-05

Study on efficacy and safety of oral mucosal exfoliated cells used in rapid detection of MTHFR C677T gene mutation in patients with hypertension^{*}

YU Jiangli,GAO Bizhen,DANG Shuyi,WANG Junfeng,WEI Yunjie,ZHOU Gangyan,DONG Xiao[△]

(Cardiovascular Disease Diagnosis and Treatment Center,Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine/Shiyan Municipal Taihe Hospital,Shiyan,Hubei 442000,China)

[Abstract] **Objective** To study the accuracy and safety of oral mucosal exfoliated cell specimens used in the bedside rapid detection of MTHFR C677T genotype by using the fluorescent probe method. **Methods** The outpatients and inpatients with hypertension visited and admitted in the department of cardiovascular medicine of this hospital from January 2019 to September 2020 were selected. The plasma homocysteine (Hcy) level in all patients was detected in the laboratory,a total of 482 hypertensive patients with Hcy ≥ 10 $\mu\text{mol/L}$ were selected,and the oral mucosal cells and whole blood sample were collected in all patients,and the genotypes of the above specimens were detected by the oral mucosal exfoliative cell fluorescent probe method and whole blood sample contrast reagents. If the two test results were inconsistent,the “gold standard” Sanger sequencing method was used to detect the whole blood sample for the final determination of MTHFR C677T genotype. The coincidence rate was compared between the two detection methods,and the probability of adverse events during the samples collection was observed and recorded. The accuracy and safety of fluorescence probe method for detecting MTHFR C677T genotype in the patients with oral mucosa exfoliation was evaluated. **Results** The oral mucosal exfoliated cell samples and whole blood samples from 482 hypertensive patients were

^{*} 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2022CFB436);湖北省十堰市太和医院联合上海宝藤生物医药科技股份有限公司精准医学研究项目(2016JZ09)。[△] 通信作者,E-mail:10989786@bjmu.edu.cn。

successfully collected, and no obvious adverse reactions occurred during the sampling process. The incidence rate of total mutation of MTHFR C677T gene detected by the fluorescence probe method and contrast reagent all were 73.23% (353/482), the coincidence rate of homozygous wild type (CC type) in MTHFR C677T gene detected by the two methods was 100.00% (95%CI: 97.11–100.00), which of heterozygous mutant type (CT type) was 99.14% (95%CI: 96.91–99.76), which of homozygous mutant type (TT type) was 99.17% (95%CI: 95.47–99.85), the total coincident rate of MTHFR C677T genotype was 99.38% (95%CI: 98.19–99.79) and the detection results consistency *Kappa* value was 0.990 2. **Conclusion** The detection of MTHFR C677T gene mutation in oral mucosal exfoliated cells by fluorescent probe method is simple with less invasion, moreover which is rapid, safe and accurate.

[Key words] methylenetetrahydrofolate reductase; gene polymorphisms; fluorescent probe rapid detection; Sanger sequencing method

亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)的基因位于 1 号染色体的短臂末端(1p36.6), 是体内叶酸代谢通路中不可缺少的一种酶^[1]。该酶重要的生理作用是在叶酸代谢过程中将亚甲基四氢叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸, 后者具有生物活性, 可为同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢过程提供甲基, 使其甲基化并转化为甲硫氨酸, 而甲硫氨酸则在特定反应的情况下转变为 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM), SAM 间接为 DNA 和蛋白质的甲基化提供甲基, 这一转化过程可使血液中的 Hcy 保持动态平衡, 避免高同型半胱氨酸血症的发生^[2-3]。编码 MTHFR 的基因具有多态性, 其中 C677T 位的碱基突变最常见且最重要, 可分为纯合野生型(CC 型)、杂合突变型(CT 型)和纯合突变型(TT 型)^[4]。MTHFR 基因的点突变、片段缺失等都会引起基因多态性的改变, 从而导致机体内多个生化代谢过程发生紊乱, 引发神经缺陷、认知功能障碍、心脑血管疾病等多种疾病^[4-5]。检测高血压患者 MTHFR C677T 基因突变类型将有助于患者的预后评估和危险分层, 为制订个体化降压方案提供依据。

目前临床使用的 MTHFR C677T 基因突变检测方法较多, 本研究采用荧光探针法快速检测口腔黏膜脱落细胞的 MTHFR C677T 基因型, 同时采集患者全血标本使用对比试剂检测 MTHFR C677T 基因型, 通过对两种方法的比较, 评价前者检测 MTHFR C677T 基因的准确性和安全性, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2020 年 12 月本院门诊和住院部 Hcy≥10 μmol/L 的 482 例高血压患者参与研究。纳入标准:(1)明确诊断高血压^[6], 在未使用降压药物的情况下, 非同一天测量 3 次血压, 收缩压≥140 mmHg 和/或舒张压≥90 mmHg;(2)患者性别、年龄不限;(3)患者自愿签署知情同意书。排除标准:(1)患者无法配合采样;(2)既往有输血史及骨髓移植。

本研究经本院伦理委员会批准[审批号: 201912 第(01)号]。

1.2 方法

所有入选患者分别采集口腔黏膜脱落细胞和全血标本用于 MTHFR C677T 基因型检测, 将标本按要求保管, 3 d 内完成 DNA 的提取和检测, 血样采集后 7 d 内完成 DNA 的提取和检测。

1.2.1 盲法

研究过程采用盲法进行采样和检测, 标本采集和检测由不同研究者进行, 负责检测操作的研究者不接触标本信息, 收集的口腔黏膜脱落细胞和全血标本需要分别进行检测, 试验结束后再公布标本信息。

1.2.2 口腔黏膜脱落细胞荧光探针法

采用重庆京因生物科技有限责任公司生产的 MTHFR C677T 基因多态性检测试剂盒(荧光探针法)进行检测, 在退火及延伸阶段, 根据荧光信号在特定阈值时循环数(Ct 值)判定基因型, 若试验中质控品或空白对照检测结果不符合要求, 则该次检测无效, 排查原因后重新检测。检测中不需要 DNA 提纯等操作, 即可快速获得检测结果。每次操作过程中需要保证 MTHFR C677T 质控品及空白对照的有效性。

1.2.3 全血标本对比试剂检测

采用苏州旷远生物分子技术有限公司生产的人 MTHFR 基因多态性检测试剂盒(荧光 PCR 法)作为对比试剂进行检测; 常规采集 4 mL 血液, EDTA 抗凝, 7 d 内提取 DNA 标本, 使用对比试剂按操作说明在 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)中进行基因型检测。

1.2.4 Sanger 测序法

当口腔黏膜脱落细胞荧光探针法检测结果与全血标本对比试剂检测结果不一致时, 则将血液标本采用 Sanger 测序法进行复核。Sanger 测序法可作为基因序列检测的“金标准”。

1.2.5 不良反应记录

记录采集口腔黏膜脱落细胞及血液标本过程中

患者可能发生的不良反应,包括以下表现:口腔黏膜刮拭部位疼痛、黏膜破损、局部渗血,采血部位出血不止、局部肿胀、局部血栓形成等。

1.2.6 MTHFR C677T 基因突变结果判定方法

(1)口腔黏膜细胞荧光探针法:①若红通道 Ct 值<38,绿通道 Ct 值≥38 或未出现 Ct 值,判断 MTHFR C677T 基因型结果为 TT 型;②若红通道 Ct 值<38,绿通道 Ct 值<38,判断 MTHFR C677T 基因型为 CT 型;③若红通道 Ct 值≥38 或未出现 Ct 值,绿通道 Ct 值<38,判断 MTHFR C677T 基因型为 CC 型;④若红通道和绿通道 Ct 值同时≥38 或未出现 Ct 值,表示标本量不足或被污染,无法判定基因型。(2)全血标本对比试剂:根据荧光定量 PCR 仪上的 Ct 值判断 MTHFR 基因 C677T 位点核苷酸类型。(3)Sanger 测序法:通过序列信息得出相应位点的序列排序并进行基因型判读。

1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件进行统计分析,计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。分别计算两种检测方法的符合率和 95%CI,符合率越接近 100%,两种方法的检测结果符合程度越高,若符合率>0.9,则 95%CI 采用 Wilson score method 进行校正计算。计算两种检测方法的 Kappa 值,Kappa<0.40 表示两种检测方法的检测结果一致性差;当 Kappa 在 0.40~<0.8 时,表示两种检测方法的检测结果基本一致;当 Kappa≥0.8 时,表示两种检测方法的检测结果高度一致,即可认为一致性成立。

2 结 果

2.1 受试者一般资料情况

482 例患者中,男 202 例(41.91%),女 280 例(58.09%),平均年龄为(56.67±9.37)岁,428 例为(88.80%)门诊患者,54 例为(11.20%)住院患者。

2.2 两种方法检测 MTHFR C677T 基因突变检测结果比较

采用荧光探针法检测口腔黏膜脱落细胞的 MTHFR C677T 基因总突变发生率为 73.23%(353/482),全血标本对比试剂检测的总突变发生率为 73.23%(353/482),差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 两种方法检测 MTHFR C677T 基因突变检测结果比较(n)

项目	n	基因型		
		CC 型	CT 型	TT 型
口腔黏膜脱落细胞	482	129	231	122
全血标本	482	129	232	121

2.3 两种方法检测结果的符合率分析

两种方法检测 MTHFR C677T 基因 CC 型符合率为 100.00%,CT 型符合率为 99.14%,TT 型符合率为 99.17%,总符合率为 99.38%,见表 2。

表 2 两种方法检测结果的符合率分析(n=482)

基因型	符合率(%)	95%CI
CC 型	100.00	97.11~100.00
CT 型	99.14	96.91~99.76
TT 型	99.17	95.47~99.85
合计	99.38	98.19~99.79

2.4 两种方法检测结果的一致性分析结果

口腔黏膜脱落细胞荧光探针法与全血标本对比试剂一致性评价结果显示,MTHFR C677T 基因型总 Kappa 值为 0.990 2,估计值的标准误为 0.005 7,95%CI:0.979 1~1.000 0,提示荧光探针法与对比试剂检测结果高度一致。荧光探针法中有 3 例检测基因型与对比试剂结果不相符,后行 Sanger 测序法再次确认结果,2 例荧光探针法结果与 Sanger 测序法复核结论一致,1 例对比试剂与 Sanger 测序法复核结论一致。

2.5 两种方法不良反应发生率

两种方法在取样过程中均未发生不良反应。

3 讨 论

MTHFR 及其代谢途径在细胞 DNA 合成等方面发挥着不可替代的作用,一旦 MTHFR 基因发生突变,会引起酶的结构改变,从而降低酶的活性和耐热性,导致细胞 DNA 结构和相应代谢过程发生异常,引发心、脑、肾系统疾病^[7-9]。研究证明,高同型半胱氨酸血症也会导致左心室肥厚、认知功能障碍和痴呆等^[9-11],高水平 Hcy 可引起血小板活化、内皮细胞功能障碍、氧化应激反应和慢性炎症^[12-13]。目前,已有 15 种 MTHFR 的基因突变类型被发现,临床普遍认为 C677T 位点突变最易引发疾病^[4,14]。MTHFR C677T 位点突变的流行病学研究显示,MTHFR C677T 多态性的频率在不同的地理位置和种族间存在明显差异^[15-16]。研究显示,中国 MTHFR 677T 基因和 MTHFR 677TT 基因频率沿着南-中-北的方向逐渐增加^[15]。国外人群研究显示,MTHFR 677T 基因和 TT 型突变频率在不同的人群中存在异质性^[17]。本研究人群中,MTHFR 677T 基因突变发生率高于全国平均水平,提示本地区人群患 H 型高血压的临床风险更高,可能与摄入叶酸量相关^[18]。目前,研究认为高血压与 MTHFR C677T 基因存在相关性,部分研究结果显示 H 型高血压与血管内皮功能障碍、平滑肌肥大、氧自由基形成等病理变化有关^[19],也可能是通过刺激血管平滑肌细胞增殖诱导、增加胆固醇氧化

的作用引起动脉粥样硬化,从而导致血压升高^[20-21]。FU 等^[22]研究表明,Hcy 增加 5 $\mu\text{mol/L}$,高血压发生风险提高 1.32 倍。TRAN 等^[23]研究表明,Hcy 处于高水平患者比例随人群血压水平升高而逐渐增高,血浆 Hcy 水平每升高 5 $\mu\text{mol/L}$,收缩压升高约 10 mm-Hg^[23]。MTHFR C677T 基因多态性与心脑血管疾病之间的关系尚未完全阐明,需要大量临床和基础研究进行验证^[24-25];前瞻性研究结果显示,部分其他药物能够降低 Hcy 水平^[26]。

目前已有多种检测基因多态性的方法。其中,Sanger 测序法是基因检测的“金标准”,但其灵敏度较低,操作步骤复杂,且收集标本时易发生标本污染,因此难以在临床上开展快速检测。荧光探针法虽不能检测出所有基因的突变类型,但针对已知的基因突变,只需通过已知的突变类型设定引物、探针即可进行检测。荧光探针法灵敏度高,不需要操作 PCR 产物,但目前常规的荧光探针法检测需采集全血标本,过程较为复杂,难以适应床边快速检测需求,若采用口腔黏膜脱落细胞标本进行检测,则可以大大简化检测过程。由于国内采用口腔黏膜脱落细胞标本检测 MTHFR C677T 基因突变的研究较少,故作者采用不同方法检测患者 MTHFR C677T 基因型。

本研究结果显示纳入的 482 例患者中,两种检测方法检出的 MTHFR C677T 总突变发生率、不同基因型符合率无明显差异, $Kappa$ 值显示两种检测方法准确率高度一致,提示荧光探针法可准确地检测口腔黏膜脱落细胞标本的 MTHFR C677T 基因突变类型,可作为一种快速的床边检测手段。在安全性方面,两种方法采样中未发生明显的不良反应。相比静脉采血检测,荧光探针法更易被患者接纳,不需专业护理人员采集标本,简化了操作流程的同时可提高患者的配合度。

综上所述,口腔黏膜脱落细胞荧光探针法检测 MTHFR C677T 基因突变操作简便、创伤小,能为高血压患者 MTHFR C677T 基因型的临床诊断提供一种快速、安全、准确的方法,并帮助医生对高血压患者进行早期诊断和预后评估,改善患者临床预后。

参考文献

- [1] RAGHUBEER S, MATSHA T E. Methylene-tetrahydrofolate (MTHFR), the one-carbon cycle, and cardiovascular risks [J]. *Nutrients*, 2021,13(12):4562.
- [2] 朱娟娟,唐吉斌. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析的临床应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018,10(6):361-366.
- [3] AL-HAGEH C, ALEFISHAT E, GHASSIBE-SABBAGH M, et al. Homocysteine levels, H-Hypertension, and the MTHFR C677T genotypes:a complex interaction[J]. *Heliyon*, 2023, 9(6):e16444.
- [4] LIEW S C, GUPTA E D. Methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism:epidemiology, metabolism and the associated diseases[J]. *Eur J Med Genet*, 2015, 58(1):1-10.
- [5] FEKIH-MRISSA N, MRAD M, IBRAHIM H, et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase (C677T and A1298C) polymorphisms and vascular complications in patients with type 2 diabetes[J]. *Can J Diabetes*, 2017,41(4):366-371.
- [6] 诸葛瑞琪,刘梅林. 2018 年欧洲心脏病学会和欧洲高血压学会高血压管理指南解读[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2018,26(9):488-491.
- [7] 赵唱,贺欣. MTHFR C677T 基因多态性与同型半胱氨酸及冠心病的关系[J]. *中国当代医药*, 2020,27(26):4-7.
- [8] 林佑妮. 粤东地区 MTHFR 基因多态性与冠心病发生及冠状动脉病变严重程度的相关性分析[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020,18(20):3378-3383.
- [9] DENG Y, LI Z, AN X, et al. Hyperhomocysteinemia promotes cardiac hypertrophy in hypertension[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:1486157.
- [10] WANG L, CHEN J, LI J, et al. Threshold effect of plasma total homocysteine levels on cognitive function among hypertensive patients in China: a cross-sectional study[J]. *Front Neurol*, 2022, 13:890499.
- [11] ZHANG L, WANG T, SHEN Y, et al. Increased plasma homocysteine levels are associated with left ventricular hypertrophy in hypertensive patients with normal renal function[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2023,48(1):277-286.
- [12] ZHANG L, XU R, MA X, et al. Mechanism of arterial injury exacerbated by hyperhomocysteinemia in spontaneously hypertensive rats [J]. *Sci Rep*, 2023,13(1):2482.
- [13] JIN M, WANG N, LI X, et al. Relationship between MTHFR C677T, homocysteine, and ischemic stroke in a large sample of the Han Chinese population[J]. *Medicine*, 2022, 101(38):

e30562.

[14] SHIVKAR R R,GAWADE G C,PADWAL M K, et al. Association of MTHFR C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131) polymorphisms with serum homocysteine, folate and vitamin B12 in patients with young coronary artery disease[J]. Indian J Clin Biochem, 2022,37(2):224-231.

[15] LIU Y,XU C,WANG Y,et al. Association analysis of MTHFR (rs1801133 and rs1801131) and MTRR (rs1801394) gene polymorphisms towards the development of hypertension in the Bai population from Yunnan, China[J]. Clin Exp Hypertens,2023,45(1):2206066.

[16] SONG J, HOU J, ZHAO Q, et al. Polymorphism of MTHFR C677T gene and the associations with the severity of essential hypertension in Northern Chinese population[J]. Int J Hypertens,2020,2020:1878917.

[17] ZHAO W,GAO F, LV L,et al. The interaction of hypertension and homocysteine increases the risk of mortality among middle-aged and older population in the United States[J]. J Hypertens,2022,40(2):254-263.

[18] MA L,LI J,YUAN Y,et al. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on serum folate but not vitamin B12 levels in patients with H-type hypertension[J]. Mol Biol Rep,2022,49(10):9535-9541.

[19] PUSHPAKUMAR S,KUNDU S,SEN U. Hydrogen sulfide protects hyperhomocysteinemia-induced renal damage by modulation of caveolin and eNOS interaction[J]. Sci Rep,2019,9(1): 2223.

[20] FENG Y,KANG K,XUE Q, et al. Value of plasma homocysteine to predict stroke,cardiovascular diseases,and new-onset hypertension; a retrospective cohort study [J]. Medicine, 2020,99(34):e21541.

[21] WU D F,LIAO Q C,LU F, et al. Differential effects of hyperhomocysteinemia on the lipid profiles and lipid ratios between patients with and without coronary artery disease: a retrospective observational study [J]. Medicine, 2022,101(52):e32464.

[22] FU L,LI Y N,LUO D,et al. Evidence on the causal link between homocysteine and hypertension from a meta-analysis of 40 173 individuals implementing Mendelian randomization [J]. J Clin Hypertens, 2019, 21 (12): 1879-1894.

[23] TRAN S K,NGO T H,NGUYEN P H, et al. Hyperhomocysteinemia in patients with newly diagnosed primary hypertension in Can Tho City, Vietnam [J]. Healthcare, 2023, 11 (2): 234.

[24] 邱巍,陈素梅,刘东声. H 型高血压患者 MTHFR 基因 C677T 多态性与 Hcy 及血脂水平的关系[J]. 检验医学与临床,2022,19(5):622-625.

[25] DONG Y,HUANG T,ZHAI Z,et al. Lowering serum homocysteine in H-type hypertensive patients with atrial fibrillation after radiofrequency catheter ablation to prevent atrial fibrillation recurrence [J]. Front Nutr, 2022, 9: 995838.

[26] YU X,WEN C,XU R, et al. Dapagliflozin’s effect on serum homocysteine in patients with hypertension complicated with insulin resistance[J]. J Clin Hypertens, 2023, 25 (5): 489-496.

(收稿日期:2023-10-25 修回日期:2024-03-28)

(编辑:张芃捷)

(上接第 2124 页)

[24] STOUT A, FRIEDLY J, STANDAERT C J. Systemic absorption and side effects of locally injected glucocorticoids[J]. PMR,2019,11(4): 409-419.

[25] OTA R,HATA T,HIRATA A, et al. Risk of infection from glucocorticoid and methotrexate interaction in patients with rheumatoid arthritis using biologics: a retrospective cohort study [J]. Br J Clin Pharmacol, 2023, 89 (7): 2168-2178.

(收稿日期:2024-01-04 修回日期:2024-06-02)

(编辑:成 卓)