

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.016

## 先兆流产与 MTHFR、MTRR 基因多态性的关系\*

李小兰<sup>1</sup>, 林琼珊<sup>2</sup>, 鲁衍强<sup>3</sup>, 李 瑛<sup>3</sup>, 汤 萍<sup>3△</sup>, 陈春宝<sup>4</sup>, 杨 琦<sup>5</sup>

(1. 重庆市黔江区中心医院妇产科, 重庆 409099; 2. 海南省三亚市妇幼保健院妇产科 572000;  
3. 上海靶向分子医学研究所, 上海 200433; 4. 海南主健细胞分子遗传医学检验中心, 海口 570206;  
5. 中国疾病预防控制中心妇幼保健中心, 北京 100101)

**[摘要]** **目的** 调查叶酸代谢相关基因 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)、甲硫氨酸合成酶还原酶(MTRR)多态性与先兆流产的关系。**方法** 选择海南省三亚市妇幼保健院在 2009—2011 的 139 例具有先兆流产症状的育龄妇女(病例组)和 139 例健康对照(对照组)来进行病例对照研究,通过刮取受检者口腔黏膜上皮细胞,提取其基因组 DNA,对受检者 MTHFR 和 MTRR 基因多态性采用荧光定量 PCR 进行分析检测。通过分析病例组和对照组基因多态性的分布差异,评估其与先兆流产的相关性。**结果** 病例组和对照组基因分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,但经比较分析,病例组 MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 的基因型构成与对照组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 在先兆流产患者和健康人中,基因多态性分布无显著差异,叶酸代谢相关基因是否为先兆流产的风险因子还有待进一步研究。

**[关键词]** 叶酸代谢障碍;流产,先兆;基因;多态性,单核苷酸;5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶;甲硫氨酸合成酶还原酶

**[中图分类号]** R715.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)06-0770-03

## Investigation of the correlation of genetic polymorphism of MTHFR and MTRR and the threatened abortion\*

Li Xiaolan<sup>1</sup>, Lin Qiongshan<sup>2</sup>, Lu Yanqiang<sup>3</sup>, Li Ying<sup>3</sup>, Tang Ping<sup>3△</sup>, Chen Chunbao<sup>4</sup>, Yang Qi<sup>5</sup>

(1. Department of Gynaecology, Qianjiang Central Hospital, Chongqing 409099, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Sanya Maternal and Child Health Hospital, Sanya, Hainan 572000, China; 3. Institute of Targeted Therapy and Molecular Medicine of Shanghai, Shanghai 200433, China; 4. Hainan Zhujian Center of Molecular Cytogenetic Clinical Testing, Haikou 570206, China; 5. Maternal and Children's Health Center, the Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100101, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the influence of the genotype distribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, A1298C and methionine synthase reductase (MTRR) A66G in threatened abortion of Chinese Han gestational-age women in Sanya city, which involved in the folic acid biosynthetic pathway among. **Methods** One hundred and thirty-nine samples of case group and the same number of control group were recruited from Sanya region in Hainan Province. Genomic DNA was extracted from the mucosal epithelium of the subjects. The gene polymorphisms of MTHFR and MTRR were detected by Fluorescence quantitative PCR technology. The distribution frequencies of both case group and control group were analyzed and compared, to investigate the effect of the gene polymorphisms on threatened abortion. **Results** Both the case group and the control group complied with Hardy-Weinberg law. The genotype frequency of MTHFR C677T, MTHFR A1298C and MTRR A66G were not significantly different. **Conclusion** This study suggests that the gene polymorphism which involved in folic metabolism was not significantly different from the group of threatened abortion and the control group, and whether the metabolism related genes are the risk factors of threatened abortion need to be further discussed.

**[Key words]** folic acid biosynthetic pathway; abortion, threatened; gene; polymorphism, single nucleotide; 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; methionine synthase reductase

先兆流产(threatened abortion/threatened miscarriage)是一种常见的孕期并发症<sup>[1-2]</sup>。发生率约占 20%。其流产率是正常群体的 2.6 倍,17% 的患者在怀孕后期会产生并发症<sup>[3]</sup>。先兆流产的结局对于妊娠妇女及其家庭都是一件非常焦虑的事情,因此对于先兆流产进行积极地干预显得非常必要。

叶酸(folic acid)是人体所需的重要营养素,属于 B 族维生素。叶酸在体内被还原成具有生理活性的四氢叶酸,作为一碳单位的供体,主要参与 DNA 氧化损伤修复、细胞增殖及组织生长过程<sup>[4-5]</sup>。在叶酸代谢通路中,有多种酶共同参与了叶酸的转运和代谢,其中 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methionine synthase reductase, MTHFR)、甲硫氨酸合成酶还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTRR)两个酶最为关键,这些

酶基因在自然人群中存在一些单核苷酸多态性(SNP),其突变可引起酶活性的改变<sup>[6]</sup>,并造成叶酸代谢的异常,使得活性叶酸水平降低<sup>[7]</sup>及同型半胱氨酸(Hcy)水平升高<sup>[8-9]</sup>。血浆 Hcy 水平升高与神经管畸形(NTDs)、先天性心脏病(CHD)和唐氏综合征(DS)等多种出生缺陷的发生,以及妊娠高血压(PIH)、复发性流产(RLP)等孕期疾病密切相关。

目前,关于先兆流产和叶酸代谢的关系鲜有文献报道,而关于先兆流产与其易感基因型的文献也少有发现。本研究通过对海南省三亚市罹患先兆流产的汉族女性的 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 基因多态性进行分析,通过病例对照研究,分析其基因多态性和先兆流产的关系,对先兆流产干预指导的可行性进行了探索性的理论积累。

\* 基金项目:中国疾病预防控制中心妇幼保健中心妇幼保健分子遗传医学研究专项计划(FY-ZX-ZD-0050);三亚市医疗卫生科技创新项目(YW1231)。 作者简介:李小兰(1981—),主治医师,本科,主要从事围产期保健研究。 △ 通信作者, E-mail: tangping@genechina.com。

表 1 Taqman-MGB 探针所在位置

基因多态位点	检测探针所在位置(5'-3')
MTHFR A1298C	AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G / T]CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCCCA
MTHFR C677T	GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG[G / A]CTCCCGCAGACACCTTCTCCTCAA
MTRR A66G	AGGCAAAGGCCATCGCAGAAGAAAT[A / G]TGTGAGCAAGCTGTGGTACATGGAT

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为 2009 年 1 月至 2011 年 12 月在海南省三亚市妇幼保健院被确认为先兆流产的汉族女性,对照组为该院选取的与其年龄,民族,检测时期相匹配的无先兆流产的普通女性。入组受检者之间无血缘关系。入组标准为:(1)均为排除严重的器质性病变及子宫附件疾病的健康女性;(2)均获得研究对象知情同意。病例组平均年龄(26.69±4.37)岁,对照组平均年龄(26.73±4.69)岁,各收集样本 139 例。

1.2 方法

1.2.1 标本 DNA 采集 本研究采集的检测标本为受检者的口腔黏膜上皮脱落细胞。受检者签署知情同意后,由专业人员进行口腔黏膜细胞采样,样本送至生物公司进行分析。检验采用采样拭,在口腔内上下轻刮几十下,采用柱式抽提试剂盒抽提样本 DNA,试剂盒购自上海生工生物公司。

1.2.2 基因型检测 采用 Taqman-MGB 技术,使用 Taqman-MGB 探针的 real time PCR 反应,检测 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 的基因多态性。检测过程中所使用的仪器和试剂均购买自美国 ABI 公司。该反应所使用的仪器为 ABI7900HT 荧光定量 PCR 仪,将 DNA 模板(20 ng/μL, 1 μL)、探针(20×Taqman-MGB, 具体信息见表 1)及引物(2×Taqman Universal Master Mix 5 μL)投入仪器,每个反应体系总体积 10 μL。设定反应温度 95℃反应 10 min 后,92℃变性 15 s,60℃退火 1 min,20 个循环;之后 89℃反应 15 s,60℃退火 1.5 min,循环 30 次。最后,在 PCR 仪上读取反应重点,并利用分析软件确定基因型结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,Hardy-Weinberg 遗传平衡检验采用 t 检验。病例组和对照组叶酸代谢障碍关键酶 MTHFR(C677T、A1298C 两个位点)和 MTRR(A66G 位点)基因多态性及频率分布的差异比较采用 χ² 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡性 病例组和对照组 MTHFR、MTRR 基因多态性分布特征均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律(P>0.05),说明数据标本的选择来源于同一个孟德尔群体。

表 2 两组女性 MTHFR、MTRR 基因型频数和等位基因频率分布比较[n(%)]

基因多态位点	基因型	病例组 (n=139)	对照组 (n=139)	χ²	P
MTHFR A1298C	AA	79(56.8)	85(61.2)	0.84	0.656
	AC	50(36.0)	47(33.8)		
	CC	10(7.2)	7(5.0)		
MTHFR C677T	CC	70(50.4)	76(54.7)	0.86	0.652
	CT	53(38.1)	51(36.7)		
	TT	16(11.5)	12(8.6)		
MTRR A66G	AA	79(56.8)	72(51.8)	0.73	0.693
	AG	49(35.3)	54(38.8)		
	GG	11(7.9)	13(9.4)		

2.2 病例组和对照组 MTHFR、MTRR 基因型分析 通过分

析该两组人群的 MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 基因型的构成情况,发现病例组与对照组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。见表 2。

2.3 病例组和对照组 MTHFR、MTRR 等位基因频率分析 病例组女性的 MTHFR 677T 等位基因频率(11.5%)与对照组(8.6%)比较无统计学差异(P>0.05)。病例组 MTHFR 1298C 等位基因频率(25.2%)和对照组(21.9%)的差异以及 MTRR 66G 等位基因在病例组(25.5%)和对照组(28.8%)的差异,均无统计学意义(P>0.05)。见表 3。

表 3 两组女性 MTHFR、MTRR 等位基因频率分布及风险系数[n(%)]

基因多态位点	等位基因型	病例组 (n=278)	对照组 (n=278)	χ²	P
MTHFR A1298C	A	208(74.8)	217(78.1)	0.81	0.368
	C	70(25.2)	61(21.9)		
MTHFR C677T	C	123(88.5)	127(91.4)	0.81	0.425
	T	16(11.5)	12(8.6)		
MTRR A66G	A	207(74.5)	198(80.2)	0.74	0.391
	G	71(25.5)	80(28.8)		

3 讨论

叶酸是一种水溶性维生素,对光和热敏感,在食物的烹调加工过程中极易遭到破坏;同时叶酸吸收还受肠道 pH 值、代谢产物、厌氧菌等诸多因素的影响,故尽管食物中含量丰富,实际被人体摄入、吸收利用很有限。孕妇特殊的生理需求,导致其对叶酸的需求量约为常人的 2~3 倍。虽然按照我国现行的公卫政策,孕妇在孕前 3 个月至孕早期 3 个月,每天补充 400 微克的叶酸,但由于每个个体的遗传体质存在差异,仍有相当一部分人群由于 MTHFR、MTRR 基因发生风险突变而导致其对叶酸的利用能力降低,摄入体内的叶酸不能有效地转化成 5-甲基四氢叶酸,因此孕妇极易发生叶酸缺乏。叶酸代谢障碍会使得一系列与其通路密切相关的疾病发生风险增高,比如胎儿神经管畸形及唇腭裂,Down 综合征,以及自发性流产、胎儿宫内发育迟缓、早产及新生儿低出生体质量等<sup>[10-11]</sup>。但是叶酸代谢障碍是否会增加先兆流产的风险尚不得知。

叶酸代谢途径中的关键基因 MTHFR 基因的 C677T、A1298C 位点的基因多态性对其编码的酶的活性和热稳定性有巨大影响<sup>[9]</sup>。例如,携带 TT 基因型的人群,其 MTHFR 酶活性在 37℃时,较正常基因型 CC 型降低 50%~60%;MTHFR C677T 与 A1298C 发生协同作用时,也会导致其编码的酶活性减弱,只有正常基因型的 36%<sup>[12]</sup>。MTRR GG66 基因型和 AA66 基因型比较,个体发生神经管缺陷(NTDs)的风险增加到 2.6 倍(OR=2.6,95%CI:1.3~5.3)<sup>[11]</sup>。这 3 个基因位点的突变均为错义突变。除此以外,众多研究表明,MTHFR C677T 基因多态性还会增加前列腺癌<sup>[13]</sup>、口腔癌<sup>[12]</sup>、甲状腺癌<sup>[14]</sup>等癌症,以及脑血管疾病<sup>[15]</sup>、II 型糖尿病<sup>[16]</sup>等很多疾病的风险。与此同时,MTHFR A1298C 也与包括宫颈癌<sup>[17]</sup>等多

种疾病易感性相关,所以该基因会对多种疾病的发生和发展产生影响。

黄晓玲等<sup>[18]</sup>在一项针对中山市孕龄女性的研究中发现,先兆流产病例组的 MTHFR C677T 位点 TT 基因型占总体比例的 15.4%,是对照组 TT 型所占比例的两倍以上;病例组的 MTHFR A1298C 位点 CC 型占 5.5%,对照组则未检出该基因型。该结果提示以上两位点的纯合突变与先兆流产有一定关联性。但是,本研究通过比较病例组和对照组 C677T 等位基因的频率分布及组合,并未发现两组数据之间存在统计学差异。可能由于研究对象来自不同地域,其基因多态性分布特点、所处环境及生活习惯不同,导致研究结果不同。先兆流产的治愈不仅仅需要叶酸,更依赖的是雌激素<sup>[19]</sup>。这暗示叶酸代谢障碍相关基因位点的改变有可能并非导致先兆流产的充分条件,两者之间的关系也有待进一步研究。

先兆流产是孕期常见的临床病症之一,近年来,发病率呈现不减反增的趋势。由于引起先兆流产的原因复杂多样,导致临床难以作出明确的病因诊断。先兆流产不仅对孕妇身心造成较大伤害,对胎儿及新生儿健康也有较大影响<sup>[20]</sup>。因此,通过开展先兆流产的相关因素的调查,有望找出导致先兆流产的潜在影响因素,并分析各因素之间关联程度,有助于为其防治工作提供理论依据,为孕妇的孕期保健工作奠定基础。低叶酸水平,Hey 及叶酸代谢酶基因多态性与复发性流产存在明显关联<sup>[21]</sup>,而叶酸代谢关键酶基因多态性与先兆流产之间相关性研究较少。因此,通过 MTHFR 和 MTRR 的大样本分子流行病学调查,了解其与先兆流产的关系,对于先兆流产的积极干预有一定的创新意义。

## 参考文献

- Ahmed SR, El-Sammani Mel K, Al-Sheeha MA, et al. Pregnancy outcome in women with threatened miscarriage; a year study[J]. *Mater Sociomed*, 2012, 24 (1): 26-28.
- Sotiriadis A, Papatheodorou S, Makrydimas G. Threatened miscarriage; evaluation and management[J]. *BMJ*, 2004, 329(7458): 152-155.
- Hanita O, Roslina O, Azlin MI. Maternal level of pregnancy-associated plasma protein A as a predictor of pregnancy failure in threatened abortion[J]. *Malays J Pathol*, 2012, 34 (2): 145-151.
- Rolschau J, Date J, Kristoffersen K. Folic acid supplement and intrauterine growth[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1979, 58 (4): 343-346.
- Stefanovic S, Jancic MS, Banicevic B, et al. Disorders of vitamin B12 and folic acid metabolism[J]. *Srp Arh Celok Lek*, 1973, 101 (3): 261-272.
- Haggarty P, Campbell DM, Duthie S, et al. Folic acid use in pregnancy and embryo selection[J]. *BJOG*, 2008, 115 (7): 851-856.
- Thawnashom K, Tungtrongchitr R, Petmitr S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) in relation to homocysteine concentration in overweight and obese Thais[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2005, 36(2): 459-466.
- Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, et al. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults[J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(1): 1-4.
- 朱海燕, 罗克嫻. 叶酸缺乏研究综述[J]. *中华临床医药*, 2003, 4(7): 59-60.
- Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, et al. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects[J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 78(3): 216-221.
- Fard-Esfahani P, Mohammadi Torbati P, Hashemi Z, et al. Analysis of relation between C677T genotype in MTHFR gene and prostatic cancer in Iranian males[J]. *Acta Med Iran*, 2012, 50(10): 657-663.
- Jia J, Ma Z, Wu S. Positive association between MTHFR C677T polymorphism and oral cancer risk; a meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 4943-4948.
- Chango A, Boisson F, Barbe F, et al. The effect of 677C/T and 1298A/C mutations on plasma homocysteine and 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects[J]. *Br J Nutr*, 2000, 83: 593-596.
- Yang YM, Zhang TT, Yuan L, et al. The association between the C677T polymorphism in MTHFR gene and the risk of thyroid cancer: a meta-analysis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(15): 2097-2101.
- Zhang MJ, Li JC, Yin YW, et al. Association of MTHFR C677T polymorphism and risk of cerebrovascular disease in Chinese population; an updated meta-analysis[J]. *J Neurol*, 2014, 261(5): 925-935.
- Tutuncu NB, Erbas T, Alikasifoglu M, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase enzyme genotype is frequent in type 2 diabetic patients with normal fasting homocysteine levels[J]. *J Intern Med*, 2005, 257(5): 446-53.
- Yu L, Chang K, Han J, et al. Association between Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and susceptibility to cervical cancer; a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (2): e55835.
- 黄晓玲, 何艳君, 鲁衍强, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶多态性与先兆流产相关性研究. [J] *赣南医学院学报*, 2015, 1 (35): 41-47.
- Alimohamadi S, Javadian P, Gharedaghi MH, et al. Progesterone and threatened abortion; a randomized clinical trial on endocervical cytokine concentrations[J]. *J Reprod Immunol*, 2013, 98(1): 52-60.
- Toner JP, Flood JT. Fertility after the age of 40 [J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1993, 20(2): 261.
- Rohini R N, Khanna A, Singh S, et al. MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in North Indian population[J]. *Reprod Sci*, 2012, 19(2): 210-215.