

血清同型半胱氨酸及亚甲基四氢叶酸还原酶与先兆流产相关性研究*

叶贵诚¹, 王冬娥¹, 程立子², 袁春雷¹, 彭建明¹ (广东省中山市博爱医院: 1. 检验中心; 2. 生殖中心 528403)

【摘要】 目的 探讨血清同型半胱氨酸(Hcy)水平及亚甲基四氢叶酸还原酶基因(MTHFR)C677T、A1298C位点多态性与先兆流产的关系。**方法** 以 93 例先兆流产患者为病例组, 99 例健康孕妇为对照组, 采用荧光定量 PCR 技术检测 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 位点多态性, 同时应用酶循环法测定血清 Hcy 水平。比较病例组和对照组间基因型分布频率和血清 Hcy 水平差异。**结果** 病例组血清 Hcy 水平明显高于对照组; 高 Hcy 是先兆流产的危险因素($OR=2.056, P=0.016$); MTHFR C677 TT 基因型携带者血清 Hcy 水平明显高于其他基因型; A1298 CC 基因型携带者血清 Hcy 水平明显高于 AA 野合型; 病例组 A1298 CC 纯合基因频率明显高于对照组; 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Hcy 升高是导致先兆流产的重要危险因素; MTHFR A1298 CC 纯合突变可致血清 Hcy 水平升高与先兆流产的发生有一定的相关性。

【关键词】 同型半胱氨酸; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 先兆流产; 相关性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.04.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)04-0443-03

Study on correlation between serum homocystine and methylenetetrahydrofolate reductase with threatened abortion*

YE Gui-cheng¹, WANG Dong'e¹, CHENG Li-zi², YUAN Chun-lei¹, PENG Jian-ming¹ (1. Clinical Laboratory Center; 2. Reproductive Medical Center, Boai Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between homocystine (Hcy) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T, A1298C site polymorphism with threatened abortion. **Methods** 93 cases of threatened abortion and 99 healthy pregnant women were selected as the cases group and the control group respectively. The polymorphism of C677T, A1298C in MTHFR gene were detected by the fluorescence quantitative PCR, meanwhile the level of serum Hcy was tested by the enzymatic cycling assay. The differences in genotypes distribution frequency and serum Hcy level were compared between the two groups. **Results** The serum Hcy level in the case group was remarkably higher than that in the control group; the high Hcy level was the risk factor of threatened abortion($OR=2.056, P=0.016$); the serum Hcy level in the C677 TT genotype carriers was remarkably higher than that in the other genotypes carriers; the serum Hcy level in the A1298 CC genotype carriers was significantly higher than that in the AA genotype carriers; the frequency of MTHFR A1298 CC isozygosity gene in the case group was obviously higher than that in the control group, the differences were statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** The increase of serum Hcy level is an important risk factor of threatened abortion; the isozygosity mutation of MTHFR A1298 CC can cause the increase of serum Hcy level and has certain relation with the occurrence of threatened abortion.

【Key words】 homocystine; methylenetetra hydrofolate reductase; threatened abortion; relationship

先兆流产是指在妊娠未满 28 周前, 先出现少量阴道出血, 继而伴有阵发性下腹痛或腰背痛。经适当治疗后多能继续妊娠, 但如病情继续发展, 也可能导致自然流产的发生。导致先兆流产的病因复杂多样, 可能与胚胎染色体异常、母体内分泌异常、免疫功能异常、某些基因异常等有关, 但尚无定论。过往研究表明 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因(MTHFR)多态性可能是复发性流产的危险因素, 但仍存较大争议^[1]。MTHFR 基因多态性是否同样可以增加先兆流产发生的风险, 目前尚无报道。

本研究通过分析血清同型半胱氨酸(Hcy)水平及 MTHFR C677T、A1298C 位点多态性与先兆流产的关系, 为通过基因型筛选先兆流产高危人群, 进而实施先兆流产的个体化预防

及病因分析提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1~12 月本院收治的先兆流产患者 93 例为病例组, 平均年龄(27.99±4.19)岁。另选取同期健康孕妇为对照组, 纳入标准: 健康孕妇, 正常生育史, 无不良孕产史; 如为首次怀孕, 则要求孕 28 周以上, 孕期各项指标无异常者。共收集 99 例, 平均年龄(28.19±3.95)岁。

1.2 方法

1.2.1 基因标本采集及检测 采集受检者口腔黏膜上皮细胞用于基因分析; 采取硅胶吸附方法提取样本 DNA, 采用荧光定量 PCR 技术检测基因多态性, 仪器及试剂均由美国 ABI 公司提供。

* 基金项目: 中山市科技计划资助项目(20102A131)。

作者简介: 叶贵诚, 男, 本科, 主管技师, 主要从事临床生物化学与检验方面的研究。

1.2.2 Hcy 标本采集及检测 空腹采集静脉血 3 mL, 2 h 内离心上机检测。检测方法为酶循环法, 仪器为 SIEMENS ADVIA 2400 全自动生化分析仪, 试剂由浙江伊利康公司提供。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对数据进行处理及统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料采用百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组血清 Hcy 水平比较 病例组的血清 Hcy 水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组血清 Hcy 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Hcy 水平 ($\mu\text{mol/L}$)	t	P
病例组	93	9.47 \pm 2.39*	3.008	0.003
对照组	99	8.36 \pm 2.70		

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 血清 Hcy 水平与先兆流产关系 按 Hcy 浓度将病例组

表 3 MTHFR 不同基因型与血清 Hcy 水平的关系 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

类别	C677T			A1298C		
	CC	CT	TT	AA	AC	CC
Hcy	8.89 \pm 2.69	8.41 \pm 2.50	10.45 \pm 1.98*	8.53 \pm 2.57	9.53 \pm 2.65	10.36 \pm 1.43 Δ

注: 与同位点 CC 野合型或 CT 杂合型比较, * $P < 0.05$; 与同位点 AA 野合型比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.4 两组 MTHFR C677T 基因型和等位基因分布 经 χ^2 检验, 两组的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$), 可认为研究对象具有群体代表性。病例组 TT 基因型虽较对照组高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 两组 MTHFR C677T 基因型频率和等位基因分布 [$n(\%)$]

组别	基因频率			等位基因	
	CC	CT	TT	C	T
病例组	50(53.8)	30(32.2)	13(14.0)	130(69.9)	56(30.1)
对照组	54(54.5)	37(37.4)	8(8.1)	145(73.2)	53(26.8)
χ^2	0.012	0.552	1.712	0.049	
P	0.913	0.457	0.191	0.826	

2.5 两组 MTHFR A1298C 基因型和等位基因分布 经 χ^2 检验, 两组的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$), 可认为研究对象具有群体代表性。病例组 CC 基因型与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), AA、AC 基因型和等位基因两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 两组 MTHFR A1298C 基因型频率和等位基因分布 [$n(\%)$]

组别	基因频率			等位基因	
	AA	AC	CC	A	C
病例组	61(65.6)	27(29.0)	5(5.4)	149(80.1)	37(19.9)
对照组	67(67.7)	32(32.3)	0(0.0)	116(83.8)	32(16.2)
χ^2	0.094	0.244	5.465*	0.150	
P	0.759	0.621	0.019	0.698	

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

和对照组分别进行分类 ($\text{Hcy} > 10.0 \mu\text{mol/L}$ 为高 Hcy, $\text{Hcy} \leq 10.0 \mu\text{mol/L}$ 为 Hcy 正常), 结果显示病例组高 Hcy 者为 48.4%, 高于对照组的 31.3%, 高 Hcy 为先兆流产的危险因素, 结果差异有统计学意义 ($\text{OR} = 2.056, P = 0.016$)。见表 2。

表 2 血清 Hcy 水平与先兆流产关系 [$n(\%)$]

组别	n	高 Hcy	Hcy 正常	χ^2	P	OR	95%CI
病例组	93	45(48.4)	48(51.6)	5.845	0.016	2.056	1.142~3.703
对照组	99	31(31.3)	68(68.7)				

2.3 MTHFR 不同基因型与血清 Hcy 水平的关系 MTHFR 基因 C677 位点 TT 纯合子的 Hcy 水平为 (10.45 \pm 1.98) $\mu\text{mol/L}$, 高于 CC 野合型和 CT 杂合型的 Hcy 水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A1298 位点 CC 纯合子的 Hcy 水平为 (10.36 \pm 1.43) $\mu\text{mol/L}$, 高于 AA 野合型 Hcy 水平 ($P < 0.05$), 与 AC 杂合型 Hcy 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

3 讨 论

3.1 血清 Hcy 与先兆流产 导致自然流产的病因复杂, 其中至少 40% 以上病例原因不明^[2]。有研究表明, 血液高凝状态、胎盘血管血栓形成与流产发生密切相关^[3-4]。高 Hcy 血症是导致血液高凝状态和血栓形成的独立危险因素^[5]。Nelen 等^[6]发现复发性流产组 Hcy 浓度较对照组高, 推断高 Hcy 可能引起绒毛膜血管发育不良, 造成胚胎死亡而流产; Sztenc^[7]则发现高 Hcy 者的习惯性流产发生率亦较高。本研究显示, 先兆流产病例组 Hcy 水平明显高于对照组, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 按 Hcy 浓度将病例组和对照组分别进行分组 (以 $\text{Hcy} > 10.0 \mu\text{mol/L}$ 为高 Hcy, $\text{Hcy} \leq 10.0 \mu\text{mol/L}$ 为 Hcy 正常), 发现病例组高 Hcy 者占 48.4%, 高于对照组的 31.3%, Hcy 升高可以增加先兆流产发生的风险 ($\text{OR} = 2.056, P = 0.016$), 证明 Hcy 升高与先兆流产密切相关, 与上述研究结果相似。尽管有大量病例流行病学调查证明 Hcy 升高可以增加流产的发生的危险, 但 Hcy 导致流产的具体机制仍不明确, 可能与以下因素有关: (1) Hcy 可通过氧化应激直接对胚胎细胞产生毒性作用, 导致胚胎异常发育; (2) Hcy 可通过损伤血管内皮细胞, 刺激血管平滑肌细胞增生, 激活血小板等作用破坏凝血-抗凝血平衡。妊娠期 Hcy 升高可增加胎盘血栓形成的危险性, 导致胎盘血栓形成, 从而抑制胎盘向胎儿供给营养物质和排出代谢产物。以上机制协同作用, 最终导致流产发生。

3.2 MTHFR 基因多态性与血清 Hcy Hcy 是蛋氨酸代谢的中间产物, 其水平主要受营养和遗传两方面因素的影响。代谢酶基因突变引起的基因缺陷或酶活性下降是导致 Hcy 升高的主要原因^[8]。MTHFR 是参与 Hcy 代谢过程的关键酶, 在该酶的催化下, 四氢叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸, Hcy 接受后者提供的甲基重新合成蛋氨酸。MTHFR 基因有多种突变类型,

以 C677T 和 A1298C 多见。James 等^[9]研究发现, C677 基因的 CT 杂合型突变可使酶的活性下降 35%, TT 纯合型突变更可使酶的活性下降 70%; 而 A1298C 中纯合型 CC 的酶活性也有明显降低。MTHFR 活性降低将导致 Hcy 向蛋氨酸转化受阻, Hcy 在体内蓄积, 形成高 Hcy 血症^[10]。本研究发现, C677 TT 纯合突变基因携带者血清 Hcy 水平均明显高于野合型和杂合型携带者, A1298 CC 纯合突变基因携带者血清 Hcy 水平明显高于 AA 野合型基因携带者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 MTHFR 基因突变可以引起血清 Hcy 水平升高。

3.3 MTHFR 基因多态性与先兆流产 MTHFR 基因多态性是否可以增加流产的发生风险, 观点尚不一致。宋绿茵等^[11]通过比较 50 例习惯性流产者和 56 例健康孕妇的基因分布频率, 发现 MTHFR C677T 的纯合突变与习惯性流产有明确的相关关系, 韩红敬等^[12]的结论与之相同; 刘宇岩等^[13]通过 Meta 分析了 22 篇文献发现, MTHFR C677T 与国内人群复发性流产相关, 但在其他国家人群中并未发现同样结果。MTHFR 基因多态性是否可以用于解释先兆流产的发生, 目前尚未见报道。本研究发现, 研究组 MTHFR C677 的 TT 基因型频率虽较对照组高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 C677T 突变不是构成先兆流产的遗传风险因子, 与上述研究有所差异, 分析其原因可能为: (1) 不同地区人群中 MTHFR 基因分布频率不同, 本研究样本仅来自中山市, 结果可能受不同地区和种族因素影响; (2) 不同人群的饮食习惯不同, 使得通过食物来源的叶酸摄入量不同, 最终导致体内 Hcy 浓度不同; (3) 补充叶酸后 TT 基因型携带者 Hcy 浓度较其他基因型携带者下降更快, 本研究并未排除孕妇于孕前或孕期补充叶酸^[14]。以上因素可能影响了 MTHFR 活性下降升高 Hcy 的效果, 而使得不同人群中 MTHFR 基因多态性与先兆流产的相关性发生改变。本研究还发现, 研究组 MTHFR A1298 的 CC 纯合型基因频率明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。A1298 CC 纯合突变可能是导致先兆流产的一个遗传危险因素, 而杂合突变并未观察到可增加先兆流产的发生; A1298 CC 纯合突变可能通过升高血 Hcy 水平而增加先兆流产的发生风险。补充叶酸是已证实的降低血 Hcy 的有效手段, 对 MTHFR 携带者额外补充叶酸, 可能有助于降低先兆流产的发生率, 但其具体剂量及用药时机尚待进一步研究。

综上所述, Hcy 升高是先兆流产的重要危险因素; MTHFR A1298C 基因多态性可能通过影响血清 Hcy 水平而与先兆流产相关。通过基因型分析筛选先兆流产高危人群, 个性化补充叶酸, 对高危人群提前预防和监测, 将有助于进一步降低先兆流产的发生率。

参考文献

[1] Rai V. Methylene tetrahydrofolate reductase gene A1298C

polymorphism and susceptibility to recurrent pregnancy loss; a meta-analysis[J]. Cell Mol Biol, 2014, 60(2): 27-34.

[2] 肖世金, 赵爱民. 复发性流产病因学研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2014, 30(1): 41-45.

[3] 涂虹霞, 苏放明. 血栓前状态与妊娠期疾病抗凝治疗的相关问题[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(9): 1471-1474.

[4] 董雪梅, 杜晓钟, 赵翠生, 等. 血栓形成倾向与反复自然流产的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(2): 197-200.

[5] Bellver J, Soares SR, Alvarez C, et al. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion[J]. Hum Reprod (Oxford, England), 2008, 23(2): 278-284.

[6] Nelen WL, Bulten J, Steegers EA, et al. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss[J]. Hum Reprod (Oxford, England), 2000, 15(4): 954-960.

[7] Sztenc S. Hyperhomocysteinemia and pregnancy complications[J]. Ginekol Pol, 2004, 75(4): 317-325.

[8] 邓旭, 贾得志. 血同型半胱氨酸检测的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(15): 2037-2039.

[9] James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome[J]. Am J Clin Nutr, 1999, 70(4): 495-501.

[10] Mandaviya PR, Stolk L, Heil SG. Homocysteine and DNA methylation; a review of animal and human literature[J]. Mol Genet Metab, 2014, 113(4): 243-252.

[11] 宋绿茵, 戚潜辉, 余达贤, 等. 同型半胱氨酸代谢相关酶基因多态性与习惯性流产关系的研究[J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(3): 160-164.

[12] 韩红敬, 沈浣, 王艳槟, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 677 位多态性、高同型半胱氨酸血症与复发性流产[J]. 生殖与避孕, 2012, 32(7): 486-489.

[13] 刘宇岩, 杨博逸, 李永芳, 等. 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性与原因不明复发性流产关联的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2013, 16(31): 2992-2997.

[14] 邢金芳, 贾莉婷, 袁恩武, 等. 育龄女性基因多态性对补充叶酸降低 HCY 的影响[J]. 医药论坛杂志, 2014, 35(5): 10-11.

(收稿日期: 2015-07-25 修回日期: 2015-09-25)

(上接第 442 页)

glycoprotein Ib alpha Kozak and p selectin glycoprotein ligand 1 loci[J]. Cell Biochem Funct, 2005, 23(1): 55-58.

[10] 张爱琴, 郑敏, 郝跃伟, 等. 脑梗死患者血小板膜糖蛋白 I b α 基因 HPA-2、Kozak 位点多态性分析[J]. 山东医药, 2010, 50(38): 23-24.

[11] 魏伟明, 叶加建, 邵美英. 血浆 P-选择素和血小板聚集功能与急性脑梗死的相关性探讨[J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2012, 26(1): 25-27.

(收稿日期: 2015-07-05 修回日期: 2015-10-10)