

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.19.006

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与血栓弹力图 在胎儿不良妊娠结局中的应用价值*

伦瑞花¹, 乔 静², 张 欣³, 张晓科¹, 田 军¹, 王仁存⁴, 庞新丰^{5△}

河南省焦作市妇幼保健院:1. 检验科;2. 儿科一区;3. 医学遗传与产前诊断科;
4. 产科一区;5. 输血科, 河南焦作 454000

摘 要:目的 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性与血栓弹力图在胎儿不良妊娠结局中的应用价值。方法 选取 2019 年 5 月至 2020 年 10 月于该院就诊的发生胎儿不良妊娠结局的孕产妇 100 例作为研究组,选取同期 60 例健康体检育龄期女性(有正常妊娠史)作为对照组。采用荧光定量 PCR 检测 MTHFR C677T、A1298C 基因单核苷酸多态性。比较两组 MTHFR C677T、A1298C 基因型及等位基因分布情况;分析 MTHFR C677T 基因型与胎儿不良妊娠结局的关系;分析血栓弹力图各参数诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的价值。结果 研究组与对照组 C677T 基因 TT 型、T、C 等位基因所占比例比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。C677T 基因型中,TT 型携带者的胎儿不良妊娠结局发生率明显高于 CC+CT 型携带者,差异有统计学意义($P<0.05$)。C677T 基因型中,TT 型与 CC+CT 型携带者凝固时间(K)、凝固角(α 角)、血凝块形成的最大振幅(MA)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。MA 诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的曲线下面积(AUC)为 0.856,高于反应时间、K 及 α 角的 AUC。结论 MTHFR C677T 基因 TT 型与孕产妇发生胎儿不良妊娠结局有关,MA 诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的价值较高。

关键词:胎儿不良妊娠结局; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性; 血栓弹力图

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)19-2809-04

Application value of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and thromboelastography in adverse pregnancy outcome of fetus*

LUN Ruihua¹, QIAO Jing², ZHANG Xin³, ZHANG Xiaoke¹, TIAN Jun¹,
WANG Rencun⁴, PANG Xinfeng^{5△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pediatric Ward One;
3. Department of Medical Genetics and Prenatal Diagnosis;
4. Department of Obstetrics Ward One; 5. Department of Blood Transfusion,
Jiaozuo Maternal and Child Health Hospital, Jiaozuo, Henan 454000, China

Abstract:Objective To explore the application value of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and thromboelastography in the adverse pregnancy outcome of fetus. **Methods** A total of 100 pregnant women with adverse pregnancy outcome of fetus treated in the hospital from May 2019 to October 2020 were selected as the study group, and 60 healthy women of childbearing age (with normal pregnancy history) were selected as the control group. The single nucleotide polymorphisms of MTHFR C677T and A1298C genes were detected by fluorescence quantitative PCR. Compared the distribution of MTHFR C677T, A1298C genotypes and alleles between the two groups. Analyzed the relationship between MTHFR C677T genotype and adverse pregnancy outcome of fetus. Analyzed the value of thromboelastogram parameters in the diagnosis of adverse pregnancy outcome of fetus in TT type carriers of MTHFR C677T gene. **Results** There was a statistically significant difference in the proportions of TT type, T and C alleles in C677T gene between the study group and the control group ($P<0.05$). In the C677T genotype, the incidence of adverse pregnancy outcome of fetus in TT type carriers was significantly higher than that in CC+CT type carriers, and the

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20191368)。

作者简介:伦瑞花,女,主管技师,主要从事分子生物学方面的研究。△ 通信作者,E-mail:123309539@qq.com。

本文引用格式:伦瑞花,乔静,张欣,等.亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与血栓弹力图在胎儿不良妊娠结局中的应用价值[J].检验医学与临床,2021,18(19):2809-2812.

difference was statistically significant ($P < 0.05$). In the C677T genotype, the coagulation time (K), coagulation angle (α angle), and the maximum amplitude of clot formation (MA) between TT and CC+CT type carriers were compared, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The area under the curve of MA in the diagnosis of adverse pregnancy outcome of fetus in MTHFR C677T TT type carriers was 0.856, which was higher than the reaction time, K and α angle. **Conclusion** The TT type of MTHFR C677T gene relates to the occurrence of adverse pregnancy outcome of fetus in pregnant women. The value of MA in the diagnosis of adverse pregnancy outcome of fetus in MTHFR C677T gene TT type carriers is higher.

Key words: adverse pregnancy outcome of fetus; methylenetetrahydrofolate reductase; gene polymorphism; thromboelastography

胎儿不良妊娠结局主要包括流产、死胎、早产、低出生体质量儿、巨大儿、新生儿先天性异常及死亡等。导致胎儿不良妊娠结局的原因包括父母双方或一方外周血染色体异常,孕产妇生殖系统或功能异常,妊娠期高血压、糖尿病、甲状腺功能异常等妊娠期合并症,以及孕妇血液高凝状态等^[1]。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是人体内叶酸代谢和同型半胱氨酸代谢作用酶,与脱氧核糖核酸甲基化关系紧密^[2]。MTHFR 基因多态性可使 MTHFR 的生理活性减低,发生同型半胱氨酸代谢异常^[3],引起体内叶酸水平减少,并发生高同型半胱氨酸血症,高凝状态下,引起微血管栓塞、胎儿发育受限,诱发不良妊娠结局^[4]。目前,关于 MTHFR 基因多态性与高凝状态导致胎儿不良妊娠结局的相关研究甚少。本研究对发生胎儿不良妊娠结局的孕产妇进行 MTHFR 基因多态性与血栓弹力图指标检测,并分析其临床意义,以期为临床诊治提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 5 月至 2020 年 10 月于本院就诊的发生胎儿不良妊娠结局的孕产妇 100 例作为研究组,年龄 22~35 岁。纳入标准:无近亲结婚;外周血染色体核型正常。排除标准:孕产妇生殖系统结构或功能异常;合并妊娠期高血压、糖尿病、甲状腺功能异常等妊娠期合并症。选取同期本院 60 例健康体检育龄期女性(有正常妊娠史)作为对照组,年龄 21~35 岁。

1.2 方法

1.2.1 MTHFR C677T、A1298C 基因多态性检测 采用荧光定量 PCR 检测 MTHFR C677T、A1298C 基因单核苷酸多态性。反应体系为 10 μ L,包含 1 μ L 基因组 DNA(20 ng/ μ L),5 μ L Taqman Universal Master Mix,0.5 μ L Taqman-MGB 探针,3.5 μ L 去离子水。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,92 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,20 个循环;89 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,30 个循环。反应完成后,在 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪上读取样品孔中的终点荧光,利用分析软件确定基因分型结果。

1.2.2 血栓弹力图检测 采集外周静脉血 1.8 mL,

加入含 3.2% 枸橼酸钠抗凝剂 0.2 mL 的真空管中,轻柔混匀后送检,检测在 2 h 内完成。检测方法为粘度测定法,采用宝锐生物 BVCA-1 型血栓弹力图仪及配套的试剂及质控品,模式设置为普通杯检测,按照试剂说明书进行操作。血栓弹力图参数包括反应时间(R)、凝固时间(K)、凝固角(α 角)、血凝块形成的最大振幅(MA)。

1.2.3 常规凝血指标检测 采用希森美康 CS5100 全自动凝血检测仪及配套试剂检测常规凝血指标[凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)],检测前进行室内质控,检测过程按试剂说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)进行诊断效能评价。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 MTHFR C677T、A1298C 基因型分布情况比较 纳入研究对象的基因型、等位基因频数分布符合哈迪-温伯格平衡定律。研究组与对照组 C677T 基因型中 TT 型所占比例比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 CC、CT 型比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。A1298C 基因型中 AA、AC、CC 型所占比例比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 两组 MTHFR C677T、A1298C 等位基因分布情况比较 研究组与对照组 C677T T、C 等位基因所占比例比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);研究组与对照组 A1298C A、C 等位基因所占比例比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 研究组 MTHFR C677T 基因型与胎儿不良妊娠结局的关系 C677T 基因型中,TT 型与 CC+CT 型携带者出现低出生体质量儿、早产的比例比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);发生流产、死胎、新生儿先天性异常的比例比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TT 型携带者的胎儿不良妊娠结局发生率明显高于 CC+CT 型携带者,差异有统计学意义($P <$

0.05)。见表 3。

表 1 两组 MTHFR C677T、A1298C 基因型分布情况比较[n(％)]

组别	n	C677T 基因型			A1298C 基因型		
		CC	CT	TT	AA	CC	AC
研究组	100	18(18.0)	46(46.0)	36(36.0)	56(56.0)	8(8.0)	36(36.0)
对照组	60	16(26.7)	32(53.3)	12(20.0)	35(58.3)	5(8.3)	20(33.3)
χ ²		1.680	0.810	4.570	0.083	0.006	0.117
P		0.195	0.369	0.033	0.773	0.940	0.732

表 2 两组 MTHFR C677T、A1298C 等位基因分布情况比较[n(％)]

组别	n	C677T 等位基因		A1298C 等位基因	
		C	T	A	C
研究组	100	82(41.0)	118(59.0)	148(74.0)	52(26.0)
对照组	60	64(53.3)	56(46.7)	90(75.0)	30(25.0)
χ ²		4.60		0.48	
P		0.03		0.49	

2.4 研究组 MTHFR C677T 基因型与血栓弹力图

表 3 研究组 MTHFR C677T 基因型与胎儿不良妊娠结局的关系[n(％)]

基因型	n	低出生体质量儿	早产	流产	新生儿先天性异常	死胎	合计
TT	36	7(19.4)	5(13.9)	9(25.0)	5(13.9)	6(16.7)	32(88.9)
CC+CT	64	11(17.2)	7(10.9)	5(7.8)	1(1.6)	2(3.1)	26(40.6)
χ ²		0.080	0.190	5.650	6.210	5.740	22.030
P		0.778	0.663	0.027	0.022	0.024	<0.001

表 4 研究组 MTHFR C677T 基因型与血栓弹力图及常规凝血指标的关系(±s)

基因型	n	血栓弹力图				常规凝血指标		
		R(min)	K(min)	α 角(°)	MA(mm)	PT(s)	APTT(s)	FIB(g/L)
TT	36	5.13±0.59	1.56±0.39	68.15±5.20	66.59±5.33	10.2±1.1	28.11±1.94	4.23±0.70
CC+CT	64	4.83±0.85	2.15±0.37	61.75±8.32	61.87±4.91	10.7±1.4	27.75±1.83	4.06±0.61
t		1.88	7.51	4.17	4.47	1.84	0.92	1.27
P		0.064	<0.001	<0.001	<0.001	0.068	0.358	0.208

表 5 血栓弹力图各参数诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的效能

指标	AUC	SE	P	95%CI	截断值	灵敏度	特异度
R	0.688	0.100	0.059	0.593~1.683	5.60 min	0.523	0.895
K	0.557	0.105	0.588	0.652~2.172	1.40 min	0.923	0.368
α 角	0.715	0.110	0.052	0.396~2.031	69.30°	0.615	0.947
MA	0.856	0.080	<0.001	0.589~0.936	62.70 mm	0.923	0.789

3 讨 论

C677T 突变是 MTHFR 基因最常见的错义突变^[5],其能使 MTHFR 活性降低,导致叶酸代谢受到

及常规凝血指标的关系 C677T 基因型中,TT 型与 CC+CT 型携带者 PT、APTT、FIB 水平及 R 比较,差异无统计学意义(P>0.05),K、α 角、MA 比较,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 4。

2.5 血栓弹力图各参数诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的价值 ROC 曲线分析结果显示,MA 诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的曲线下面积(AUC)为 0.856,高于 R、K 及 α 角的 AUC,具有较高的诊断效能。见表 5。

影响。有研究发现,MTHFR 基因多态性与妊娠 10 周后的胎儿不良妊娠结局有关,特别是与妊娠 20 周后的非复发性流产之间存在相关性^[6]。高同型半胱

氨酸血症增加了妊娠期胎盘微血管血栓的形成风险。通常认为血液流速低容易造成母胎连接处血栓形成,引起胎盘出现相应改变,常见的不良妊娠结局有早产、流产、妊娠期高血压合并子痫前期、胎儿生长受限及胎盘早剥等^[7]。本研究结果显示,研究组与对照组 C677T 基因型中 TT 型所占比例比较,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 TT 型与胎儿不良妊娠结局有关;进一步分析两组等位基因分布情况发现,研究组与对照组 C677T T、C 等位基因所占比例比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。研究显示,携带 T 等位基因可能是导致胎儿不良妊娠结局的原因^[8]。进一步分析 C677T 基因多态性与胎儿不良妊娠结局间的关系,结果显示,TT 型携带者发生流产、死胎、新生儿先天性异常的比例高于 CC+CT 型携带者;TT 型携带者的胎儿不良妊娠结局发生率明显高于 CC+CT 型携带者,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 C677T 基因 TT 型可能是导致胎儿不良妊娠结局的重要因素。

发生胎儿不良妊娠结局的孕产妇血液通常为高凝状态,容易形成血管微血栓,导致胎盘血液循环异常,造成早产、胎盘发育停止、胎盘早剥、胎死宫内等情况^[9]。孕产妇血液高凝状态的程度与胎儿不良妊娠结局的发生率呈正相关^[10]。在发生胎儿不良妊娠结局的孕产妇中, MTHFR C677T 基因 TT 型与 CC+CT 型携带者 PT、APTT、FIB 水平及 R 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而 K、 α 角、MA 比较,差异有统计学意义($P<0.05$),说明常规凝血指标水平与发生胎儿不良妊娠结局孕产妇的 MTHFR C677T 基因多态性无明显关系;而血栓弹力图参数更能有效反映孕产妇因 MTHFR C677T 基因多态性而引起的凝血功能异常^[11]。采用 ROC 曲线分析血栓弹力图各参数诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的价值,结果显示, MA 诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的 AUC 为 0.856,高于 R、K 及 α 角的 AUC,具有较高的诊断效能。MA 是反映血小板聚集功能的指标,血小板功能或数量异常都有可能造成 MA 水平异常。血栓弹力图比常规凝血指标能更早地检测出机体病理性高凝状态及血栓形成倾向^[12],因此,对于 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者临床上可考虑结合血栓弹力图检测,提高对孕产妇发生胎儿不良妊娠结局的预测能力^[13]。

综上所述, MTHFR C677T 基因 TT 型与孕产妇

发生胎儿不良妊娠结局有关,血栓弹力图相关参数中 MA 诊断 MTHFR C677T 基因 TT 型携带者发生胎儿不良妊娠结局的价值较高。

参考文献

- [1] 唐黛丽,吴忠琴,金亚清,等. MTHFR C677T 基因多态性及血浆 HCY 与复发性流产的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(6): 15-16.
- [2] 梁玲芝,许美芬,陈贤君,等. 不良妊娠结局患者和正常人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(15): 1862-1864.
- [3] 顾莹,杨舒婷,汤欣欣,等. 不明原因复发性自然流产夫妇 MTHFR C677T 位点多态性分析[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(27): 5244-5247.
- [4] 冯杏琳,申华,罗素霞,等. MTHFR C677T 基因多态性分布与不良妊娠结局的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(11): 12-13.
- [5] 徐佳佳,梁玲芝,陈贤君,等. MTHFR 基因多态性与先兆流产和复发性流产的关系[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(6): 1326-1328.
- [6] 孙庆梅,林晓娟,姜岩,等. 叶酸代谢相关基因多态性与不良妊娠结局的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(12): 2281-2284.
- [7] 章莉,俞菁,谭美玉,等. MTHFR 基因 C677T 多态性与孕妇血栓前状态的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(14): 2011-2012.
- [8] 王苏梅,贾颐舫,杨丹彤,等. MTHFR 基因 C677T 多态性与原因不明复发性自然流产的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2011, 29(6): 1385-1387.
- [9] POURSADEGH Z A, CHAPARZADEH N, ASGHARI ESTIAR M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutations in women with recurrent spontaneous abortions in the Northwest of Iran[J]. ISRN Obstet Gynecol, 2012, 2012: 945486.
- [10] 汪希鹏,林其德,洪燕,等. 原因不明复发性流产遗传性凝血因素研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2006, 26(12): 1361-1364.
- [11] 徐畅,李昀晖,张文,等. 子痫前期患者凝血功能变化检测指标及其防治[J]. 实用妇产科杂志, 2019, 35(2): 38-41.
- [12] 李贤见,易宏,黄裕林,等. 复发性流产与血栓弹力图及血小板参数的相关性分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(6): 81-82.
- [13] 李慧梁,唐新桥,蔡丹. 血栓弹力图对早期复发性流产患者妊娠率的预测价值[J]. 医学临床研究, 2020, 37(7): 995-997.

(收稿日期: 2021-01-27 修回日期: 2021-04-20)