

· 论 著 ·

MTHFR 基因 C677T 多态性与孕妇血栓前状态的关系

章 莉,俞 菁,谭美玉,侯雅萍,李海川,胡荷宇,龚 波[△]
(上海市长宁区妇幼保健院,上海 200051)

摘 要:目的 研究 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 位点突变,探讨其与孕妇异常高凝状态的关系。方法 采用聚合酶链式反应-熔解曲线分析法,检测 50 例异常高凝状态孕产妇和 44 例健康对照孕产妇的 MTHFR 基因 C677T 位点突变情况。结果 异常高凝组和对照组 MTHFR 基因 C677T3 种基因型在两组的总体分布差异有统计学意义($P=0.033$),其中高凝组 CC 基因型表达频率明显降低($P=0.01$),T 等位基因表达频率明显增大($P=0.005$)。结论 孕产妇异常高凝状态与 MTHFR 基因 C677T 位点突变有关。

关键词:高凝状态; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 多态性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.025 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)14-2011-02

The study of MTHFR C677T mutation in hypercoagulable pregnant woman
Zhang Li, Yu Jing, Tan Meiyu, Hou Yaping, Li Haichuan, Hu Heyu, Gong Bo[△]
(Shanghai Changning Maternity and Infant Health Hospital, Shanghai, 200051, China)

Abstract: **Objective** To investigate methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in pregnant woman with hypercoagulable state. **Methods** Polymerase chain reaction-melting curve was employed to detect the mutation of MTHFR C677T in 50 hypercoagulable pregnant woman and 44 normal controls. **Results** The frequencies of the three C677T associated genotypes distributed between hypercoagulable pregnant woman and control group reached the statistical significance as a whole ($P=0.033$). The frequency of genotype CC was significantly decreased ($P=0.01$), and allele T was significantly increased ($P=0.005$) in hypercoagulable pregnant woman. **Conclusion** The mutation of MTHFR C677T plays a role in the mechanism of hypercoagulable pregnant woman in Chinese population.

Key words: hypercoagulable state; methylenetetrahydrofolate reductase; mutation

正常妊娠妇女体内的凝血状态会发生一系列改变,包括凝血因子的增加,天然抗凝物质的减少以及纤溶活性的降低等^[1]。这种改变可以有效地减少产妇分娩时出血的危险,但亦增加了血栓形成的风险。血栓弹力图(TEG)能有效监测孕产妇的凝血功能,全面评估体内凝血状态。研究显示晚孕期孕妇体内凝血综合指数 CI 值较未孕及早孕期妇女显著增高,平均 $(0.71 \pm 1.20)(-1.7 \sim 2.9)^{[2-4]}$ 。在实际工作中,亦有部分孕妇会表现为异常高凝,即 $CI \geq 3.0$ 。新近研究表明,遗传性血凝——即由于体内凝血有关的基因突变,与凝血状态有一定关系。其中亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因位点突变最常见导致凝血增强的基因^[5-6]。MTHFR 基因编码亚甲基四氢叶酸脱氢酶,该酶是调节叶酸和甲硫氨酸代谢的限速酶。MTHFR 基因最常见的多态性为 C677T,该位点位于 MTHFR 的催化区域,其多态性碱基变化导致酶活性和酶的耐热性下降^[7]。本研究通过应用 PCR-熔解曲线法分析高凝孕妇 MTHFR 基因 677 位点多态性,分析其与孕妇高凝状态的相关性。为有效地早期预测妇产科领域中出血和血栓性疾病的发病风险提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1~12 月于本院分娩的孕产妇外周全血标本 94 例,分娩前均行血栓弹力图检测。其中高凝组($CI > 3.0$)50 例,平均年龄 (28.8 ± 3.5) 岁;对照组($CI < 3.0$)44 例,平均年龄 (29.7 ± 3.1) 岁。

1.2 核酸提取 全血核酸提取采用核酸提取试剂盒(QIAamp,美国),操作严格按照说明书进行。

1.3 MTHFR C677T 基因多态性检测 MTHFR 基因多态性采用 PCR-熔解曲线法进行,操作严格 MTHFR 基因多态性(SNP)检测试剂盒(锐奇生物,中国)说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计数资料应用 χ^2 检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTHFR C677T 基因多态性 熔解曲线峰图中包含两条曲线,其中 1 条有 2 个峰的曲线为杂合型阳性对照品的熔解曲线。 T_m 值较高的峰(右侧)为“C”碱基特征峰, T_m 值较低的峰(左侧)为“T”碱基特征峰。若标本只出现其中 1 个峰,则其基因型为 CC 或 TT 纯合子,若同时出现 2 个峰,则为 CT 杂合子。

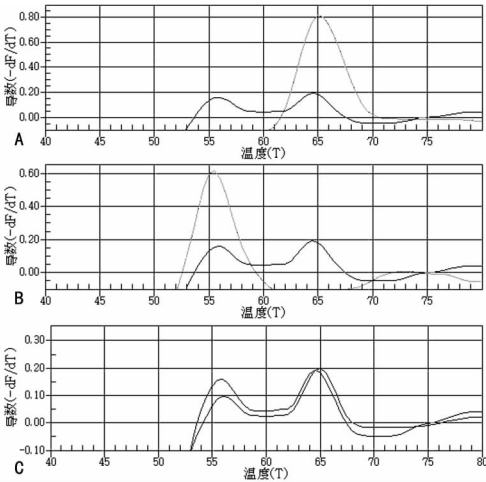
2.2 样本检测结果 MTHFR 基因 C677T 位点多态性检测结果如表 1 所示。3 种基因型在高凝组和对照组的分布差异有统计学意义($\chi^2 = 6.844, P = 0.033$)。其中 C/C 型在高凝组中表达频率显著降低($\chi^2 = 6.715, P = 0.01$),T/T 型在 2 组中分布分率差异无统计学意义($P > 0.05$)。T 基因频率在高凝组中显著增大($\chi^2 = 7.690, P = 0.005$)

表 1 高凝组和对照组 MTHFR 基因多态性分布情况[n(%)]

MTHFR	高凝组(n=50)	对照组(n=44)
677 基因多态性		
C/C	14(28.0)	22(50.0)
C/T	21(42.0)	17(38.6)
T/T	15(30.0)	5(11.4)
677 等位基因频率		

续表 1 高凝组 and 对照组 MTHFR 基因多态性分布情况[n(%)]

MTHFR	高凝组(n=50)	对照组(n=44)
C	49(49.0)	61(69.3)
T	51(51.0)	27(30.4)



A: C/C 型; B: T/T 型; C: C/T 型。
图 1 PCR-熔解曲线法检测 MTHFR C677T 基因多态性结果

3 讨 论

正常妊娠期血液的高凝状态是维持和保护正常妊娠的重要因素之一,但异常高凝状态是引发各种产科并发症的潜在危险,特别是孕期中如合并妊娠高血压综合征、胎盘早剥、羊水栓塞、产后出血等病理因素则因血液的高凝状态更趋于严重,凝血与纤溶系统间的动态平衡受到破坏,凝血功能障碍,而易导致弥散性血管内凝血(DIC)等严重并发症,危急生命。

MTHFR 基因是最常见导致凝血增强的基因。MTHFR 基因 C677T 位点突变已被证实与动静脉血栓形成、神经管畸形、胎盘早剥、先兆子痫以及复发性流产等有关。本研究发现孕妇异常高凝状态与 MTHFR 基因 C677T 位点多态性有关,异常高凝组野生纯合型 CC 基因型表达频率显著降低($P>0.05$),T 等位基因表达频率显著增大($P>0.05$)。MTHFR 基因产物主要是调节半胱氨酸和四氢叶酸的代谢关键酶,通过转硫途径和再甲基化途径降低半胱氨酸血浓度。MTHFR 基因 C677T 突变位于 MTHFR 的催化区域,其多态性碱基变化

导致酶活性和酶的耐热性下降,当该位点由野生纯合型(CC)转变为杂合型(CT)时,酶活仅剩 60%,转变为突变纯合型(TT)时,酶活仅剩 30%。酶活性降低后导致的高半胱氨酸血症易造成血管内皮细胞损伤,增加血栓形成。

产科出血和血栓形成与妊娠期的血栓前状态和凝血异常密切相关,通过筛查凝血基因多态性对于早期诊断、判别妊娠期和妊娠并发症患者的血栓前状态、凝血异常及微循环障碍,识别前 pre-DIC 状态,改善患者预后具有很大的临床意义,同时这也是该领域的重点和难点之一。有理由推测,具有 MTHFR 基因 C677T 突变的孕产妇,体内产生高半胱氨酸血症,损伤血管内皮细胞,影响胎盘部位的血管网路形成;而该时段体内多种凝血因子含量及活性增加、抗凝物质减少、纤溶活性降低导致的高凝状态与血管内皮损伤产生协同作用,更进一步促进血栓形成,增加产后出血风险。另外,由宫缩乏力等病因导致的产后出血控制不佳时,具有遗传性血凝的孕产妇更易发生继发性凝血功能障碍,易加重产后出血的发生。这方面的研究本课题组正着手深入探讨。

参考文献

[1] Patrick Thornton. Coagulation in pregnancy[J]. Clinical Obstetrics and Gynaecology, 2010, 24(3): 339-352.

[2] 龚波,章莉,戴云,等. 正常妊娠妇女血栓弹力图参考范围的建立[J]. 诊断学理论与实践, 2012, 5(4): 490-493.

[3] 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.

[4] Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2003, 16(14): 153-168.

[5] 丁虹,朱付凡. 妊娠期血液高凝状态与产科并发症[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(6): 643-645

[6] Li X, Luo YL, Zhang QH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T, A1298C polymorphisms and pre-eclampsia risk: a meta-analysis[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(53): 5435-5448.

[7] Gebhardt GS, Scholtz CL, Hillermann R, et al. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001, 97(2): 174-177.

(收稿日期: 2015-02-15)

(上接第 2010 页)

Orphanet J Rare Dis, 2010, 28(1): 13-15.

[4] Yin XL, Zhang XH, Zhou TH, et al. Hemoglobin H disease in Guangxi province, Southern China: Clinical review of 357 patients [J]. Acta Haematol, 2010, 124(1): 86-91.

[5] 毛江洪,霍晓春. α -地中海贫血的研究现状[J]. 实用临床医学, 2005, 6(3): 134-136.

[6] Xiong F, Huang QY, Chen XY, et al. A Melting curve analysis-based PCR Assay for one-step genotyping of β -thalassemia mutations[J]. JMD, 2011, 13(4): 427-435.

[7] 肖奇志,周玉球,谢建红,等. 基于实时荧光 PCR 的探针熔解曲线分析技术和反向点杂交技术应用于 β -地中海贫血基因诊断与产前诊断的对比研究[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 413-417.

[8] 严提珍,罗世强,唐宁,等. 实时荧光 PCR 熔解曲线法在 β -地中海贫血基因诊断和产前诊断中的临床应用评价[J]. 中华检验医学

杂志, 2012, 35(5): 407-412.

[9] 严提珍,钟青燕,唐宁,等. 多色探针荧光 PCR 熔解曲线法在 G6PD 基因突变检测中的临床应用评价[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(2): 156-162.

[10] 高旭,李静,柳清云,等. 异质性耐药对结核分枝杆菌表型和基因型耐药检测结果的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(4): 260-265.

[11] 魏明,廖灿,李茹,等. 高分辨熔解曲线分析技术检测 α -地中海贫血常见三种点突变[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 463-465.

[12] 周玉球,李莉艳,肖鸽飞,等. 珠海市户籍人群中 α -地中海贫血的分子流行病学调查[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(4): 358-360.

(收稿日期: 2015-02-15)