

• 论 著 •

基因芯片法分析 MTHFR 基因 C677T 还原酶位点多态性与原因不明不良孕产的关系

孙政敏, 王 华, 冯 东

(河南省新乡市第一人民医院/新乡医学院附属人民医院检验科 453000)

摘 要:目的 探讨 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 位点多态性与原因不明不良孕产的关系。方法 选取 2014 年 6 月至 2016 年 5 月在新乡市第一人民医院不孕不育科、妇产科就诊的原因不明不良孕产 ≥ 2 次 320 例孕妇作为病例组,388 例无流产史健康经产妇作为对照组。采用基因芯片法分析两组人群 MTHFR 基因 C677T 位点多态性;比较组间基因型、等位基因频率分布的差异,分析原因不明不良孕产与 MTHFR C677T 位点多态性的关系。结果 MTHFR C677T 基因型 C/C 频率分布病例组和对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$, $OR=0.284$);基因型 C/T 频率分布两组间比较差异无统计学意义($P=0.400$, $OR=1.140$);基因型 T/T 频率分布两组间比较差异有统计学意义($P<0.05$, $OR=7.672$);等位基因 C、T 频率分布两组间比较差异有统计学意义($P<0.05$, $OR=0.304$)。结论 MTHFR C677T 基因型 T/T 的高表达可能是育龄女性妇女原因不明不良孕产的危险因素。

关键词:原因不明; 不良孕产; 等位基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)04-0473-03

Analysis on relationship between MTHFR C677T locus polymorphism and unexplained adverse pregnancy by gene chip method

SUN Zhengmin, WANG Hua, FENG Dong

(Department of Clinical Laboratory, Xinxiang Municipal First People's Hospital/Affiliated People's Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T locus polymorphism and unexplained adverse pregnancy. **Methods** Three hundreds and twenty pregnant women with unknown adverse pregnancy ≥ 2 times in the infertility department, and obstetrics and gynecology department of our hospital from June 2014 to May 2016 were selected as the case group and 388 healthy non-abortion parous women were taken as the control group. The MTHFR gene C677T locus polymorphism in the two groups was analyzed by using gene chip method. The differences in genotype and allele frequency distribution were compared between the two groups, and the relationship between unexplained adverse pregnancy and MTHFR C677T locus polymorphism was analyzed. **Results** The frequency distribution of MTHFR genotype C677T C/C had statistically significant difference between the case group and control group ($P<0.05$, $OR=0.284$). The frequency distribution of genotype C/T had no statistical difference between the case group and control group ($P=0.400$, $OR=1.140$). The frequency distribution of genotype T/T had statistical difference between the case group and control group ($P<0.05$, $OR=7.672$). The frequency distribution of allele C and T had statistical difference between the case group and control group ($P<0.05$, $OR=0.304$). **Conclusion** The high expression of MTHFR C677T genotype T/T may be a risk factor of unknown adverse pregnancy in child-bearing age women.

Key words: unexplained; adverse pregnancy; allele

5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是叶酸代谢过程中的关键酶,近年来对叶酸代谢机制的研究发现,MTHFR C677T 突变多态性可导致叶酸水平降低及高同型半胱氨酸血症,由此引起妊娠相关疾病包括流产、早产、胎儿宫内发育迟缓等不良孕产现象^[1-4]。本实验旨在对尚有原因不明不良孕产育龄妇女的 MTHFR C677T 基因多态性进行分析,并探讨二者发生的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 6 月至 2016 年 5 月在新乡市第一人民医院不孕不育科、妇产科就诊的原因不明不良孕产 ≥ 2 次,孕 ≤ 12 周 320 例孕妇作为病例组,年龄 19~44 岁,平均

(28.0 ± 3.1)岁,本组夫妻双方均经临床排除血栓形成、内分泌失调、染色体异常、生殖器异常,以及常见泌尿系统传染病,男方精液常规分析正常;同期在新乡市第一人民医院 388 例无流产史的健康经产妇作为对照组,孕期无高血压、无糖尿病及无家族遗传病史,年龄 19~41 岁,平均(27.0 ± 3.5)岁;两组年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。具有可比性。研究对象遵从临床试验研究过程规定,实验人群均签署书面知情同意书,经新乡市第一人民医院伦理委员会批准备案。

1.2 仪器与试剂 基因组提取试剂盒及 MTHFR C677T 基因检测试剂盒均购自上海百傲科技有限公司,ABI9700PCR 扩增仪,Thermo Scientific 超紫外分光光度计,上海百傲科技有

限公司全自动杂交仪以及生物芯片适读仪。

1.3 方法

1.3.1 提取基因组 DNA 取实验 EDTA 抗凝全血 200 μ L, 以 DNA 提取试剂盒流程提取基因组 DNA, 紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度, DNA 浓度 $\geq 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 应为 1.5~2.0。

1.3.2 PCR 扩增 C677T-C 和 C677T-T 等位基因反应体系: 基因组 DNA 5 μ L, C677T-C 和 C677T-T 扩增液 19 μ L, 反应液 A 1 μ L, 总体积 25 μ L, C677T 扩增液中含生物素残基标记的引物对。阴性阳性对照和样本一起扩增。等位基因扩增条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、(94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s、48 $^{\circ}\text{C}$ 40 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) 循环 35 次、72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.3.3 杂交显色 配好预杂交液、杂交反应液、洗液、抗体液及显色液。杂交仓放入预杂交液 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 吸除, 再加入杂交反应液, 放入基因芯片, 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 吸除杂交反应液; 加洗液 1, 42 $^{\circ}\text{C}$ 6 min, 吸除洗液 1, 重复 1 次; 加入洗液 2, 28 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 吸除洗液 2, 重复 1 次; 加入抗体液 28 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 吸除抗

体液; 加入洗液 2, 28 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 吸除洗液 2, 重复 1 次; 加入洗液 3, 28 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 吸除洗液 3, 重复 1 次; 加入显色液 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 吸除显色液; 芯片显色区用蒸馏水冲洗烘干。

1.3.4 芯片扫描与数据分析 芯片放入适读仪, 百傲基因芯片图像分析软件进行图像扫描与数据分析, 输出检测结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行相应统计学分析, 组间基因型频率及等位基因频率的比较采用 χ^2 检验, 基因型对不明原因胎停育发病的相对风险以 OR 值表示, OR 值的 95%CI 计算采用 Miettinen 法; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

病例组和对对照组 C677T 基因型和等位基因频数频率分布情况, 见表 1。病例组和对对照组间 MTHFR C677T 基因型 C/C 频率分布比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); 基因型 C/T 频率分布差异无统计学意义 ($P=0.400$); 基因型 T/T 频率分布差异有统计学意义 ($P<0.05$); 等位基因 C、T 频率分布差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 两组人群 C677T 基因型和等位基因频数频率分布[n(%)]

组别	n	等位基因频率		基因型频率		
		C	T	C/C	C/T	T/T
病例组	320	300(46.9)	340(53.1)	81(25.3)	138(43.1)	101(31.6)
对照组	388	577(74.4)	199(25.6)	211(54.4)	155(39.9)	22(5.7)
χ^2		112.350		61.150	0.729	81.903
P		0.000		0.000	0.400	0.000
OR		0.304		0.284	1.140	7.672
95%CI		0.243~0.381		0.206~0.392	0.844~1.539	4.698~12.531

3 讨 论

MTHFR 基因定位于 1p36.3, 16 种突变类型中 MTHFR 基因 677C-T 位点突变(其编码的丙氨酸被缬氨酸替代, 同时产生一个 Hinf I 限制性内切酶)最常见, 有 3 种基因型: 正常型 C/C 型(野生型)、C/T 型(杂合型)和 T/T 型(纯合突变型); C677T 突变可导致酶活力降低约 50%^[5], 使叶酸在甲硫氨酸代谢循环中的作用丧失或降低。甲硫氨酸是 S 腺苷甲硫氨酸(SAM)的直接前体, SAM 是细胞内重要的甲基供体, 参与组织发育生长所必需的 DNA、蛋白质和脂质等甲基化反应^[6], 甲硫氨酸的合成减少可造成叶酸水平降低, 以及流产、早产、胎儿宫内发育迟缓、胎盘早剥、妊娠高血压综合征等妊娠相关疾病。引起不良孕产的常见因素很多, 主要包括染色体异常、内分泌异常、感染因素、免疫因素、环境因素等, 国内部分相关报道可见: 于凤娜等^[7]报道染色体平衡易位导致不良孕产, 朱彩丹^[8]高血压患者有较差的妊娠结局, 赵永平等^[9]报道精子细胞凋亡率增加、精子质量下降可能与配偶胚胎停止发育有关, 付娟娟等^[10]报道染色体数目异常是导致孕早期胚胎停育和自然流产的重要因素, 其中 16 号染色体三体是主要改变。本研究旨在对除上述临床常见影响因素之外, 对原因不明不良孕产育龄妇女的 MTHFR C677T 基因多态性进行分析, 并探讨其发生的关系。

本实验中两组间 MTHFR C677T 基因型 C/C 频率分布差异有统计学意义 ($P<0.05$); 基因型 T/T 频率分布差异有统计学意义 ($P<0.05$); 等位基因 C、T 频率分布差异有统计学意义 ($P<0.05$), 可以基本得出原因不明不良孕产可能与 T/T 基因型的高表达相关。国内孕早期丢失妊娠与 MTHFR C677T 部分相关报道可见, 尚鹏超^[11]报道不明原因胎停育与 T/T 基因型的高表达相关, 李茜西等^[12]报道 MTHFR C677T 与女性不良孕产的发生有一定的相关性, 杨文方等^[13]报道 MTHFR C677T 突变可能是早期妊娠丢失的遗传易感性因素。对照组基因型分布频率与上述报道^[11-13]略有出入, 可能与本实验数据收集仅限于新乡市第一人民医院、样本量偏少及 MTHFR 基因多态性分布存在种族差异和地域差异有关^[11]。

由于本研究样本来源的局限性、样本量偏少及仅分析了 MTHFR 基因多态性等原因, 育龄妇女原因不明不良孕产的相关研究结果相对局限。以后应增加样本量和样本来源, 并应用新技术对原因不明不良孕产的相关原因加以分析和研究。

参考文献

[1] Uvuz F, Kilic S, Yilmaz N, et al. Relationship between preterm labor and thrombophilic gene polymorphism: A prospective sequential cohort study[J]. (下转第 477 页)

($P < 0.05$)。因此测定 HBV 基因型对于评估判断乙肝患者罹患 LC 和 HCC 的风险有一定的帮助。

关于 HBV 基因型与 HBeAg 阳性率和 HBV DNA 载量水平等相关性的研究结果一直存在分歧^[11-12]。研究结果的不一致可能有多种原因,如研究对象的选择、标本量的大小以及研究方法学的不一致。本次研究 HBV 基因型与 HBeAg 阳性率和 DNA 病毒载量均无统计学意义($P > 0.05$)。本次研究用巢式 PCR 法对西安市 HBV 基因型的分布做出了较为初步的分析,但由于标本量的局限并不能完全的反映出西安地区 HBV 基因型的分布及其与 HBV 感染者病情的发展关系。希望随着对 HBV 的研究更深入更具体,能将 HBV 基因型在疾病的发生、发展与治疗转归中扮演的角色更加清晰的阐述出来,让 HBV 基因型作为 HBV 感染患者的用药指标和治疗标准的参考成为可能。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病分会,中华医学会感染学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].临床肝脏病杂志,2015,31(12):1941-1954.
- [2] Panduro A, Maldonado-Gonzalez M, Fierro NA, et al. Distribution of HBV genotypes F and H in Mexico and Central America[J]. Antivir Ther, 2013, 18(3): 475-484.
- [3] Tanwar S, Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2012, 14(1): 37-46.
- [4] Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus [J]. Hepatol Res, 2010, 40(1): 14-30.

- [5] Shen L, Yin W, Zhang S, et al. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus genotypes in Southwest, China [J]. J Med Virol, 2014, 86(8): 7-13.
- [6] Wang B, Feng Y, Li Z, et al. Distribution and diversity of B virus genotypes in Yunnan, China [J]. Red Med Virol, 2014, 86(10): 75-82.
- [7] Wang XW, Hussain SP, Huo TI, et al. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma [J]. Toxicology, 2002, 43(47): 181-182.
- [8] 张菁超.乙型肝炎病毒基因型与表型的相关性研究[J].中国医学创新, 2013, 10(30): 127-128.
- [9] 付建军,白艳丽,王巧侠,等.慢性乙型肝炎患者 196 例病毒基因分型与临床的关系[J].山西医科大学学报, 2011, 42(9): 710-713.
- [10] Lu FM, Zhang H. Management of hepatitis B in China [J]. Chin Med J, 2009, 122(1): 3-4.
- [11] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype [J]. J Virol, 2009, 83(20): 10538-10547.
- [12] Lei JH, Liang J, Yang X, et al. Analysis of serum HBeAg/HBeAb and HBV DNA level in hepatitis B patients of various clinical types [J]. Chin J Mod Med, 2008, 18(17): 2493-2496.

(收稿日期:2016-10-09 修回日期:2016-11-30)

(上接第 474 页)

- Gynecol Obstet Invest, 2009, 68(4): 234-238.
- [2] Yenicesu GI, Cetin M, Ozdemir O, et al. A prospective case-control study analyzes 12 thrombophilic gene mutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss [J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(2): 126-136.
- [3] Coppede F, Migheli F, Bargagna S, et al. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring [J]. Neurosci Lett, 2009, 449(1): 15-19.
- [4] Harisha PN, Devi BI, Christopher R, et al. Impact of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on neural tube defects [J]. J Neurosurg Pediatr, 2010, 6(4): 364-367.
- [5] 徐莉,刘肖曼,张红岩,等.亚甲基四氢叶酸还原酶、凝血因子 V 和凝血酶原基因多态性与原因不明复发性早期流产的关系[J].中华妇产科杂志, 2007, 42(3): 180-183.
- [6] 余章斌,韩树萍,郭锡熔. 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与先天性心脏病关系的 Meta 分析[J].中国循证儿科杂志, 2009, 54(3): 253-262.
- [7] 于凤娜,张丽萍,李琳.染色体平衡易位伴不良孕产两

- 系四例[J].中华医学遗传学杂志, 2014, 31(4): 545.
- [8] 朱彩丹.妊娠期高血压患者随机尿蛋白/肌酐比值水平与不良妊娠结局的关系研究[J].中国全科医学, 2015, 18(10): 1168-1171.
- [9] 赵永平,林典梁,张晓威,等.精子细胞凋亡率与胚胎停育相关分析[J].中国计划生育杂志, 2012, 20(9): 619-622.
- [10] 付娟娟,杨晨晨,胡小萍. FISH 检测孕早期胚胎停育和自然流产绒毛染色体异常的应用研究[J].新疆医科大学学报, 2015, 38(5): 612-614.
- [11] 尚鹏超.基因芯片法分析 MTHFR C677T 位点多态性与不明原因胎停育的关系[J].中国医师杂志, 2016, 18(5): 702-705.
- [12] 李茜西,伍萍芝,何琳琳.叶酸代谢相关酶基因多态性与不良孕产发生易感性的关系[J].重庆医学, 2015, 44(10): 1330-1333.
- [13] 杨文方,樊静,李丹阳.亚甲基四氢叶酸还原酶多态性与早期妊娠丢失风险的关系研究[J].中国妇幼保健研究, 2015, 26(6): 1128-1130.

(收稿日期:2016-10-05 修回日期:2016-11-26)