

论著 · 临床研究

# 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与精子 DNA 完整性相关性研究

辛增莲<sup>1</sup>, 代文成<sup>2</sup>, 韩锐<sup>1△</sup>, 韩宁宁<sup>1</sup>

(1. 新疆医科大学第一附属医院产前诊断中心, 新疆乌鲁木齐 830000; 2. 新疆维吾尔自治区妇幼保健院产前诊断中心, 新疆乌鲁木齐 830000)

**摘要:**目的 研究亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T 多态性与精子 DNA 完整性的关系。方法 选取新疆医科大学第一附属医院生殖助孕中心就诊的 913 例男性, 根据 MTHFR 基因 C677T 分型, 将患者分为 CC、CT 和 TT 3 组。采用改进的精子染色质扩散法(SCD)检测精子 DNA 碎片指数(DFI), 比较各组组内及组间 DFI 结果, 并进行统计学分析。结果 TT 组和 CC 组, DFI 比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); CT 组和 CC 组, DFI 比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); TT 组和 CT 组, DFI 比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 MTHFR C677T 多态性改变影响精子 DNA 完整性, MTHFR C677T 多态性可协助判断男性生育力。

**关键词:**亚甲基四氢叶酸还原酶; 精子 DNA 碎片指数; 生殖

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.18.003 中图法分类号: R715.3

文章编号: 1673-4130(2018)18-2215-03 文献标识码: A

## Study on the relationship between MTHFR C677T polymorphism and sperm DNA fragmentation index

XIN Zenglian<sup>1</sup>, DAI Wencheng<sup>2</sup>, HAN Rui<sup>1△</sup>, HAN Ningning<sup>1</sup>

(1. Prenatal Diagnosis Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Prenatal Diagnosis Center, Xinjiang maternal and Child Health Hospital, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the relationship between MTHFR C677T polymorphism and sperm DNA fragmentation index (DFI). **Methods** Semen specimens were collected from 913 male patients in our center, they were divided into three groups upon results of MTHFR C677T polymorphism: group CC, group CT, group TT. Sperm chromatin dispersion (SCD) was used to detect DFI. The DFI results in each group were compared and analyzed statistically. **Results** There was significant difference in DFI between group TT and group CC ( $P < 0.05$ ). There was significant difference in DFI between group CT and group CC ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in DFI between group TT and group CT ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** MTHFR C677T polymorphism affects the DNA fragmentation. Sperm DNA damage degree can lead to the decline of sperm motility rate. MTHFR C677T polymorphism could help to dge the male fertility.

**Key words:** MTHFR; sperm DNA fragmentation index; reproduction

亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是叶酸与同型半胱氨酸(Hcy)代谢中的重要酶, MTHFR 基因多态性可引起叶酸代谢通路中缺乏甲基供体和高同型半胱氨酸血症, 造成精子 DNA 完整性受损, 会影响受精、受精卵分裂和胚胎发育等过程, 临床上易导致不孕不育、流产死胎、婴儿发育异常等<sup>[1]</sup>。关于 MTHFR C677T 多态性与精子 DNA 损伤的关系, 前期研究缺乏针对新疆地区的不育男性, 且多数研究样本量不足。有研究认为精子 DNA 完整性与年龄存在负相关关系<sup>[2-4]</sup>, 故本次研究在各组中控制年龄因素造成的影响, 现将结果报道如下。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料 选择 2017 年 1—8 月在新疆医科大

学第一附属医院生殖助孕中心就诊的 913 例男性作为研究对象。纳入标准: 告知研究对象后, 取得知情同意; 年龄 20~55 岁; 男性检查包括男性第二性征、阴茎、阴囊、精索、输精管、附睾、睾丸等均无异常; 要求研究对象禁欲天数为 2~7 d; 手淫法收集精液标本至干燥无菌取精杯中, 立即送检。排除无精子症及精子水平 $< 5 \times 10^6$ /mL 重度少精子症男性。

**1.2 仪器与试剂** 罗氏 Light Cycler480 实时定量 PCR 检测仪; ABI 9700 PCR 仪; Nano Drop 2000 核酸水平测定仪 (Thermo), 核酸提取试剂盒以及 MTHFR C677T 基因检测试剂盒均为上海百傲科技股份有限公司生产; 精子 DNA 完整性检测试剂盒为安徽安科生物工程有限公司产品。

作者简介: 辛增莲, 女, 技师, 主要从事产前诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: 417467215@qq.com。

本文引用格式: 辛增莲, 代文成, 韩锐, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与精子 DNA 完整性相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(18): 2215-2216.

### 1.3 方法

**1.3.1 基因多态性分析** 采集受检者静脉血 2 mL, 根据核酸提取试剂盒说明书进行操作, 包括全血 DNA 提取和 PCR 扩增步骤。运行扩增程序: 50 ℃ 5 min, 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 25 s, 56 ℃ 25 s, 72 ℃ 25 s, 72 ℃ 5 min, 最后芯片杂交显色, 确定样本基因型, 同时记录检测结果。

**1.3.2 DNA 碎片指数(DFI)检测** 采用的方法为精子染色质扩散法(SCD 法)。在显微镜下对 500 条精子进行计数, 分别统计大晕环精子(单侧晕环厚度>2/3 精子头部最小直径)、中晕环精子(1/3 精子头部最小直径<单侧晕环厚度≤2/3 精子头部最小直径)、小晕环精子(单侧晕环厚度≤1/3 精子头部最小直径)、无晕环精子以及退化精子的个数。精子 DFI (%)=(小晕环精子+无晕环精子+退化的精子)/500×100%。

**1.4 统计学处理** 采用统计软件 SPSS11.0 进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量数据符合近似正态分布者以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验; 计数资料以率(%)表示, 组间比较采用秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

共有 913 例男性纳入本次研究, 其中 CC 组 339 例(占 37.1%), CT 组 291 例(占 31.9%), TT 组 283 例(占 31.0%)。3 组年龄比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 1。CC 组 DFI 低于 CT 组, CC 组 DFI 低于 TT 组, CT 组 DFI 低于 TT 组。将 CT 组和 TT 组分别于 CC 组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), TT 组和 CT 组比较, DFI 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 2。

| 表 1 不同组别年龄比较( $\bar{x} \pm s$ ) |          |              |                                |
|---------------------------------|----------|--------------|--------------------------------|
| 组别                              | <i>n</i> | 年龄(岁)        | <i>P</i>                       |
| CC 组                            | 339      | 35.050±5.519 | $P_{\text{CC组 vs. CT组}}=0.317$ |
| CT 组                            | 291      | 35.505±5.847 | $P_{\text{CT组 vs. TT组}}=0.474$ |
| TT 组                            | 283      | 34.731±5.688 | $P_{\text{TT组 vs. CC组}}=0.103$ |

| 表 2 不同组别 DNA 碎片率比较 |        |        |            |    |                   |
|--------------------|--------|--------|------------|----|-------------------|
| 组别比较               | 平均秩次   |        | DFI 中位数(%) |    | <i>Z</i> <i>P</i> |
| CC 组与 CT 组         | 293.87 | 340.71 | 20         | 24 | -3.220 0.001*     |
| CC 组与 TT 组         | 290.56 | 336.58 | 20         | 26 | -3.181 0.001*     |
| CT 组与 TT 组         | 285.48 | 289.58 | 24         | 26 | -0.296 0.767      |

注: \* 表示差异有统计学意义,  $P < 0.05$

## 3 讨 论

MTHFR 基因定位于 1p36.32, 编码蛋白质含 656 个氨基酸。MTHFR 在体内叶酸代谢中起着非常重要的作用, 影响 DNA 合成与甲基化。MTHFR 不可逆地催化 5,10-亚甲基四氢叶酸转化成 5-甲基四氢叶酸。5-甲基四氢叶酸是叶酸在体内的主要活性形

式, 为 Hcy 再甲基化过程提供甲基, 该过程中生成甲硫氨酸, 维持体内 Hcy 的正常代谢过程。甲硫氨酸继续代谢成 S-腺苷甲硫氨酸, 是体内参与 DNA 修复、甲基化反应的主要甲基供体<sup>[5]</sup>。

本研究针对 MTHFR C677T 单核苷酸多态性对男性育龄人群的相关性进行探讨, 对其 3 种基因型 CC、CT 及 TT 进行精子 DNA 完整性分析。结果显示, TT 组与 CC 组比较、CT 组与 CC 组比较, DFI 增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。MTHFR C677T 基因型为 CT 或者 TT 时, MTHFR 活性下降, 造成 DNA 完整性降低, 这也与本次研究结果相符。表明 MTHFR 677 C→T 的位点突变增加, 男性生育力下降, 提示 MTHFR C677T 多态性可能是男性不育的易感性因素。本次研究 CT 组与 TT 组 DFI 比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 考虑与 MTHFR 活性下降程度有关, 有文献报道显示, 当患者 MTHFR C677 位点基因型为 CC 时, 其 MTHFR 酶活性为 100%, 叶酸转化能力正常, 甲基化正常; 当为 CT 基因型时, MTHFR 酶活性为 65%, 叶酸转化能力中等, 甲基化一般; 当为 TT 基因型时, MTHFR 酶活性为 30%, 叶酸转化能力低下, 甲基化不足, CT 组与 TT 组酶活性有一定差别<sup>[6]</sup>, 但影响程度尚需进一步研究。

目前, 对精子 DNA 完整性受损从而影响男性不育的精确机制尚无定论, 有学者认为与 5,10-亚甲基四氢叶酸代谢通路造成 DNA 合成障碍及低甲基化而致精子形成障碍有关<sup>[7]</sup>, 有文献报道可能是 Hcy 水平超过正常的生理水平诱导生成活性氧(ROS), ROS 直接损伤精子 DNA<sup>[8]</sup>。

目前, MTHFR C677T 多态性对男性不育的影响还没有定论。针对多中心的 Meta 分析结果指出<sup>[9]</sup>, 亚洲人相对于高加索人, C677T 突变更易发生男性不育。在荷兰、法国的研究显示 C677T 多态性与男性不育无显著相关性<sup>[10-11]</sup>。国内, 在不同地域, 包括宁夏<sup>[12]</sup>、河南<sup>[13]</sup>、湖北<sup>[14]</sup> 地区, 研究认为 MTHFR C677T 多态性为易感性风险因素。这些研究提示, 不同地域、种族背景、生活习惯, 可能得出的结果不统一。本次研究选取对象为新疆常住居民, MTHFR C677T 多态性与男性不育的关联, 尚需多地区多中心研究结果。

## 4 结 论

本次研究针对新疆常住地居民, 选取新疆医科大学第一附属医院生殖助孕中心就诊的 913 例男性, 对其 MTHFR C677T 多态性与精子 DNA 完整性的关系进行研究, 结果显示 MTHFR C677T 多态性改变影响精子 DNA 完整性。

## 参考文献

[1] GANDINI L, LOMBARDO F, PAOLI D, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa[J]. Hum Reprod, 2000, 15(4): 830-839. (下转第 2219 页)

与孙玲玲等<sup>[15]</sup>研究结果相似。临床上应将超声结果与唐筛或无创 DNA 等结果相结合再决定是否行产前诊断。

4 结 论

综上所述,高龄妊娠、唐筛高风险、超声异常、无创 DNA 高风险等产前诊断指征,应相互结合起来判断是否行羊水细胞染色体核型分析,从而提高染色体异常的检出率,有效避免染色体异常胎儿的出生。

参考文献

[1] 刘洁,左娟,朱瑾,等. 1 837 例不同指征产前诊断羊水细胞染色体核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2016,24(11):57-59.

[2] 尤俊岭. 探讨不同的产前诊断指征与胎儿染色体异常的关系[J]. 中国优生与遗传杂志,2017,25(2):91-92.

[3] 刘明艳,徐贵江,李茜,等. 1 868 例孕妇羊水细胞染色体检测指征及结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(2):217-219.

[4] 吴汉锋,梁景欣. 产前诊断 89 例羊水细胞染色体异常核型分析[J]. 广西医学,2016,38(7):1001-1003.

[5] 罗小金,郭岩芸,朱自然,等. 产前诊断中染色体异常核型的细胞遗传学及临床分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2016,24(5):47-48.

[6] 赖怡,刘之英,秦利,等. 25 510 份孕中期羊水细胞的染色体分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2015,32(1):117-119.

[7] 王卫红,卢焰梅,柳钡. 长沙地区 1 955 例羊水细胞染色体

产前诊断[J]. 中国优生与遗传杂志,2017,25(1):50-51.

[8] 王卫红,李红玉,贺骏,等. 产前诊断胎儿染色体异常 159 例回顾性分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2014,22(4):41-42.

[9] 黄贞. 孕中期无创 DNA 产前筛查与妊娠结局的研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2018,39(1):149-151.

[10] 胡祝明,朱海波,李琳琳,等. 产前无创 DNA 筛查高风险孕妇羊水穿刺诊断符合率分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2018,35(2):304-306.

[11] 陈慧,冯谦谨,苏年华. 1 172 例高龄孕妇妊娠中期羊水染色体核型分析[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(9):1245-1247.

[12] 蒋向荣,隋丽萍,刘敬华,等. 1 212 例不同产前诊断指征羊水细胞染色体核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2017,25(7):49-50.

[13] PERALTA C F, BARINI R. Obstetric ultrasound between the 11 and 14 weeks: beyond the screening for chromosomal abnormalities[J]. Rev Bras Ginecol Obstet,2011,33(1):49-57.

[14] 殷文静,周平,易菁,等. 单脐动脉的超声检测与胎儿染色体异常分析[J]. 实用医学杂志,2014,30(5):1228-1230.

[15] 孙玲玲,邓学东,姜伟,等. 中孕期超声软指标在胎儿染色体筛查中的价值[J]. 中国医学影像学技术,2016,32(5):765-768.

(收稿日期:2018-02-18 修回日期:2018-05-08)

(上接第 2216 页)

[2] ALSHAHRANI S, AGARWAL A, ASSIDI M, et al. Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage[J]. Reprod Biol Endocrinol,2014,12(1):103.

[3] VAGNINI L, BARUFFI R L, MAURI A L, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population[J]. Reprod Biomed Online,2007,15(5):514-519.

[4] 刘安娜. 男性不育患者年龄对精子形态及精子 DNA 完整性的影响分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2014,22(5):131.

[5] 刘丹琦,盛阳昊,王萍,等. 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与不育不孕症相关性研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2015,2(2):235-240.

[6] 赵加洪,李瑛,鲁衍强,等. MTHFR 基因多态性检测在生殖健康领域的临床价值[J]. 中国妇幼卫生杂志,2015,6(1):79-83.

[7] 郭凯敏,田润辉. MTHFR 基因多态性与不孕不育关系的研究进展[J]. 中华男科学杂志,2016,22(2):171-174.

[8] ADEWOYIN M, IBRAHIM M, ROSZAMAN R, et al. Male infertility: the effect of natural antioxidants and phytochemicals on seminal oxidative stress[J]. Diseases (Basel, Switzerland),2017,5(1):9.

[9] WU W, SHAN O, QIN Y, et al. Methylenetetrahydrofolate

reductase C677T polymorphism and the risk of male in fertility: a meta-analysis[J]. Int J Androl,2012,35(1):18-24.

[10] EBISCH I M, VAN HEERDE W L, THOMAS C M, et al. C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and Zinc sulfate on sperm concentration[J]. Fertil Steril,2003,80(5):1190-1194.

[11] RAVEL C, CHANTOT-BASTARAUD S, CHALMEY C, et al. Lack of association between genetic polymorphism in enzymes associated with folate metabolism and unexplained reduced sperm counts[J/CD]. PLoS One,2009,4:e6540.

[12] 邱晓峰,胡小平,李元杰,等. 宁夏地区汉族 MTHFR 基因 C677T 多态性与男性无精和严重少弱精的相关性分析[J]. 宁夏医科大学学报,2011,33(7):623-628.

[13] 裴杰. MTHFR 基因 C677T 多态性与河南汉族男性无精症的相关性分析[J]. 中国保健营养(中旬刊),2013(7):629-630.

[14] 邹宇洁,常硕,庞湘力,等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与男性不育的相关性及机制研究[J]. 生殖医学杂志,2017(12):1177-1181.

(收稿日期:2018-02-14 修回日期:2018-05-04)