

河南省育龄女性叶酸利用能力现状研究

何燕霞 巩皎梅 沈勇 贾莉婷 李肖甫 王燕 李雁青 张展

基金项目:2012 年度河南省医学科技攻关项目(NO.20120350)

作者单位:450052 郑州市,郑州大学第三附属医院检验科

【摘要】 目的 了解河南省育龄女性叶酸利用现状,从而指导其在孕前及孕早期合理补充叶酸,避免由于叶酸代谢障碍导致的各种出生缺陷、自发性流产、妊娠期高血压疾病以及早产的发生,提高出生人口素质。方法 采集 1093 例育龄女性口腔黏膜上皮细胞,进行荧光定量 PCR-DNA 测序,测定其 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)C677T、A1298C 和甲硫氨酸合成酶还原酶(methionine synthase reductase, MTRR)A66G 位点的基因序列,根据该基因型对叶酸利用能力的影响,得出携带该基因型的女性是否有叶酸利用风险以及风险的等级。结果 MTHFR C677T 位点野生型 CC 占 18.11%,纯合突变型 TT 占 36.78%,突变基因 T 的基因频率为 59.33%;MTHFR A1298C 位点野生型 AA 占 73.01%,纯合突变型 CC 占 2.38%,突变基因 C 的基因频率为 14.68%;MTRR A66G 位点野生型 AA 占 57.09%,纯合突变型 GG 占 6.31%,突变基因 G 的基因频率 24.61%;双杂合子 677CT、1298AC 占 15.37%;MTHFR 两位点与中国人基因型和等位基因分布差异均有统计学意义(P 均 <0.05),MTRR 位点与中国人基因型和等位基因分布差异均无统计学意义(P 均 >0.05);叶酸利用能力遗传检测未发现风险的只占 26.72%,而中、高度风险各占 24.70%、38.97%。结论 河南省育龄女性叶酸利用能力现状不容乐观,携带中高度风险基因的人群超过一半。

【关键词】 叶酸;5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶;甲硫氨酸合成酶还原酶;遗传风险

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.01.002

The study of folic acid usage in women of childbearing age in Henan province

HE Yan-xia, GONG Jiao-mei, SHEN Yong, et al. Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective To investigate the ability of using folic acid in women of childbearing age in Henan province, so as to guide their reasonable folic acid supplements before and during early pregnancy, and avoid a variety of birth defects, spontaneous abortion, hypertensive disorders in pregnancy and premature occurrence caused by the folic acid metabolic disorder. **Methods** There were 1093 samples in this study. The oral mucosal epithelial cells of women of childbearing age were collected with brush. By the way of fluorescence quantitative PCR, DNA sequencing, the gene sequence of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C and methionine synthase reductase (MTRR) A66G locating were determined. According to the affection of genetic risk based on the genotype of folic acid, the level of folic acid risk of the women who carry the genotype was draw. **Results** The accounting for 18.11% of the MTHFR C677T in point of the wild type CC, 36.78% of the homozygous mutant TT, mutant gene T frequency was 59.33%; the MTHFR A1298C point wild-type AA accounted for 73.01%, homozygous mutant CC accounted for 2.38%, the frequency of gene mutations in the gene C was 14.68%; accounted for 57.09% of the MTRR A66G point wild type AA, homozygous mutant GG accounted for 6.31% and 24.61% of the mutations in the gene G; double heterozygous 677CT and 1298AC accounted for 15.37%; There were statistical significance in the differences between MTHFR two points and the Chinese population genotype and allele distribution (P all <0.05). There were no statistical significance in the differences between MTRR and Chinese population genotype and allele distribution (P all >0.05); The people who do not have the risk of using folic only accounting 26.72%, the risk of medium and high risk accounting for 24.70%, 38.97%. **Conclusion** The folic acid using ability of the status of childbearing age women in Henan province cannot be optimistic, women who bring medium and high risk gene cover more than half.

【Key words】 Folic acid; 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase; Methionine synthase reductase; Genetic risk

叶酸是水溶性 B 族维生素,其还原形式四氢叶酸是一碳单位的运载体,可运载甲基、亚甲基、甲酰

基等一碳单位,促进体内同型半胱氨酸甲基化生成甲硫氨酸,甲硫氨酸经 ATP 磷酸化后形成的 S-腺苷甲硫氨酸参与 DNA 和蛋白质的合成。

亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是叶酸代谢的关键酶,在体内催化 5,10-亚甲基四氢叶酸转换成 5-甲基四氢叶酸,为同型半胱氨酸提供甲基形成甲硫氨酸。目前越来越多的基础研究、动物实验及流行病学调查结果提示,由于 MTHFR 基因产生突变,引起酶活性降低,同型半胱氨酸向甲硫氨酸的转化发生障碍,使血中的同型半胱氨酸堆积,导致同型半胱氨酸血症^[1]。

甲硫氨酸是一碳单位代谢的必需氨基酸,它的合成是由甲硫氨酸合酶催化的,而甲硫氨酸合酶因为辅助因子维生素 B₁₂ 被氧化而最终失活。甲硫氨酸合成酶还原酶(methionine synthase reductase, MTRR)能够通过还原性甲基化作用重新生成具有功能活性的甲硫氨酸合酶。MTRR 突变是造成叶酸/甲基维生素缺乏症 E 型的主要病因,也是同型半胱氨酸、叶酸代谢异常的主要原因之一^[2]。

育龄女性作为一个特殊的群体,对叶酸的需求增加,如果体内叶酸缺乏,会引起很严重的问题,如习惯性流产、新生儿神经管畸形等。本文研究通过检测河南省育龄女性体内叶酸代谢关键酶 MTHFR 和 MTRR 编码基因的三个多态性位点,预测其叶酸利用能力,从而指导其在孕前期及孕期适量补充叶酸,避免出生缺陷患儿的出生。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2010 年 12 月至 2011 年 12 月来我院进行孕前和孕期叶酸利用能力检测的女性。纳入标准为同意进行口腔黏膜细胞采样并进行遗传检测的围孕期女性,排除 DNA 抽提不符合要求者,共获取有效样本 1093 例,其中汉族 1075 例,少数民族 18 例,年龄 19~44 岁,平均年龄(28.5±4.18)岁。

1.2 样本 DNA 采集与基因检测方法 ①样本 DNA 采集:提取受检者的口腔黏膜上皮细胞,然后利用柱式抽提试剂盒抽提样本 DNA。②基因检测方法:对 MTHFR 基因 C677T、A1298C 和 MTRR 基因 A66G 位点的 SNP 分型采用 Taqman-MGB 技术,相关仪

器、试剂均购自美国 ABI 公司。对 3 个位点分别进行荧光定量 PCR,反应所用 Taqman-MGB 探针信息见表 1。③检测步骤:每个反应体系为总体积 10 μl,包含浓度为 20 ng/μL 的 DNA 模板 1 μl,2× Taqman Universal Master Mix 5 μl,20× Taqman-MGB 探针 0.5 μl,去离子水 3.5 μl。反应条件为 95 ℃ 10 min,随后进行 20 个循环的扩增(92 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min),再进行 30 个循环的扩增(89 ℃ 15 s,60 ℃ 90 s)。反应结束后在 ABI 7900 型荧光定量 PCR 仪上读取样品孔中的终点荧光,利用其分析软件确定各个样品的基因分型结果。

1.3 统计学处理 提取整理基因型频数,对研究人群进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验后,使用 SPSS 13.0 进行统计分析,河南省育龄女性与中国人人群中 MTHFR、MTRR 基因频率、等位基因频率比较采用拟合优度 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTHFR、MTRR 基因频数和频率分布结果 对采集标本行 MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 位点的检测并将数据进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,均符合 Hardy-Weinberg 平衡,证明该样本具有该区域群体代表性。经统计学分析,MTHFR C677T 位点野生型 CC 占 18.11%,纯合突变型 TT 占 36.78%;MTHFR A1298C 位点野生型 AA 占 73.01%,纯合突变型 CC 占 2.38%;MTRR A66G 位点野生型 AA 占 57.09%,纯合突变型 GG 占 6.31%;双杂合子 677CT、1298AC 占 15.37%;MTHFR 两位点与中国人人群基因型分布差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),MTRR 位点与中国人人群基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.2 MTHFR、MTRR 等位基因频数和频率分布结果 MTHFR C677T 位点突变基因 T 的基因频率为 59.33%;MTHFR A1298C 位点突变基因 C 的基因频率为 14.68%;MTRR A66G 位点突变基因 G 的基因频率 24.61%;MTHFR 两位点等位基因分布与中国人人群差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),MTRR 位点等位基因分布与中国人人群差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 1 Taqman-MGB 探针所在位置

基因多态位点	检测探针所在位置
MTHFR C677T	GAAAGCTGCGTGATGATCAAATCG[G/A]CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA
MTHFR A1298C	AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGCTCAGCTCCTCCGCC
MTRR A66G	AGGCAAAGGCCATCGCACAAGAAAT[A/G]TCTGAGCAAGCTGTGCTACATGGAT

表 2 河南省育龄女性 MTHFR、MTRR 基因型频数和频率分布

基因	基因型	频数	频率(%)	中国人群中频率(%)
MTHFR C677T [*]	CC	198	18.12	22.00
	CT	493	45.11	50.00
	TT	402	36.78	28.00
MTHFR A1298C ^{**}	AA	798	73.01	66.00
	AC	269	24.61	31.00
	CC	26	2.38	3.00
MTRR A66G ^{***}	AA	624	57.09	58.00
	AC	400	36.60	36.00
	GG	69	6.31	6.00
MTHFR C677T+A1298C	CT+AC	168	15.37	15.00~20.00 ^[9]

注: *河南省育龄女性与中国人群 MTHFR C677T 位点基因型分布差异有统计学意义 $\chi^2=19.848, P=0.000<0.05$; **河南省育龄女性与中国人群 MTHFR A1298C 位点基因型分布差异有统计学意义 $\chi^2=12.793, P=0.002<0.05$; ***河南省育龄女性与中国人群 MTRR A66G 位点基因型分布差异无统计学意义 $\chi^2=0.208, P=0.901>0.05$

表 3 河南省育龄女性 MTHFR、MTRR 等位基因频数和频率分布

基因	等位基因	频数	频率(%)	中国人群中的频率(%)	χ^2 值	P 值
MTHFR C677T [*]	C	889	40.67	47.00	17.694	0.000
	T	1297	59.33	53.00		
MTHFR A1298C ^{**}	A	1865	85.32	81.50	11.391	0.001
	C	321	14.68	18.50		
MTRR A66G ^{***}	A	1648	75.39	76.00	0.210	0.647
	G	538	24.61	24.00		

注: *河南省育龄女性与中国人群 MTHFR C677T 位点等位基因分布差异有统计学意义 $\chi^2=17.694, P=0.000<0.05$; **河南省育龄女性与中国人群 MTHFR A1298C 位点等位基因分布差异有统计学意义 $\chi^2=11.391, P=0.001<0.05$; ***河南省育龄女性与中国人群 MTRR A66G 位点等位基因分布差异没有统计学意义 $\chi^2=0.210, P=0.647>0.05$

2.3 叶酸利用能力风险等级结果 结果显示: 叶酸利用能力遗传检测未发现风险的只占 26.72%, 而中、高度风险各占 24.70%、38.97%。见表 4。

表 4 河南省育龄女性叶酸利用能力风险等级

风险等级	频数	频率(%)
未发现风险	292	26.72
低度风险	105	9.61
中度风险	270	24.70
高度风险	426	38.97

3 讨论

目前研究表明叶酸代谢障碍会导致新生儿神经管畸形、孕妇习惯性流产、唐氏综合症的发生^[3-5]。因此选择育龄女性作为调查对象, 及时发现其体内是否携带叶酸代谢风险基因, 从而指导其在孕前及孕期合理补充叶酸, 阻止由于叶酸代谢障碍而导致的血浆叶酸浓度减低和同型半胱氨酸浓度增高, 减少新生儿出生缺陷, 尤其是神经管畸形的发生显得尤为重要和迫切^[6]。同型半胱氨酸是一种含硫氨基酸, 是心、脑血管病的独立危险因素^[1]。河南省属于人口

大省, 目前尚未见到关于人群 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 位点的基因多态性分析的文献报道。

人类 MTHFR 基因已被成功克隆, 并发现了多个突变位点。其中第 677 位核苷酸多态性不仅引起酶活性降低, 还与酶的热敏感性有关^[7]。该位点已被证实与神经管畸形、习惯性流产等疾病相关。A1298C 是该基因的另一个常见多态性位点, 位于该基因外显子上, A1298C 突变会影响酶的活性, 但不影响其耐热性^[8]。近年来人们越来越关注 C677T 伴有 A1298C 突变的人群, 经小群体研究表明双杂合子个体与仅含 C677T 突变的个体相比同型半胱氨酸浓度显著升高^[9]。本文研究测定双杂合子占 15.37%, 与 Benrahma 等^[9]报道的结果一致。不同国家和地区的研究表明, MTHFR 基因上述两位点的分布存在群体差异, 这种群体差异可能与人群对多种疾病的群体易感性有关^[2]。

中国地域广阔, 各民族和人群分布情况复杂, 各地不同人群中的 MTHFR 基因 C677T 多态性分布也

有很大差异。据文献^[10]报道,贵州荔波汉族 TT 基因频率为 2.2%,CT 41.1%,CC 56.7%,雷山苗族 TT 2.8%,CT 15.7%,CC 81.5%;海南省汉族人群 TT 9.36%,CT 33.64%,CC 57.00%,黎族人群 TT 3.54%,CT 21.90%,CC 74.56%^[11];宁夏回族人群 TT 19.7%,CT 42.7%,CC 37.6%^[12]。马来西亚人群 TT 6.3%,CT 33.8%,CC 59.9%^[13]。本文研究发现 MTHFR C677T 位点纯合突变型 36.78%,杂合突变型 45.11%,野生型 18.12%,和上述报道的差异较大。1997 年发现的 MTHFR 基因另一个常见突变位点 A1298C 人群分布也不相同。在菲律宾的一项研究报道^[14]显示,MTHFR A1298C 中 AA 基因频率为 30%,AC 50%,CC 20%,C 的基因型频率为 45.2%;非洲和南美对这一位点的报道较少,我国贵州雷山苗族该等位基因频率较高,尤其是雷山苗族等位基因频率高达 48.7%^[10],而本文研究的河南人群等位基因频率仅为 14.68%。以上资料说明不同地区、不同人群 MTHFR 基因分布各有其特点,存在明显群体、种族差异。

本文研究发现,MTRR 主要突变类型为 A66G,在国外人群中该位点突变被证实与同型半胱氨酸、叶酸代谢疾病(唐氏综合征、神经管疾病、心血管疾病)相关^[15],在巴西儿童中该位点突变型与叶酸、维生素 B₁₂、同型半胱氨酸浓度相关^[16]。国内关于此位点的报道很少,有研究^[17]表明携带该位点突变基因的母亲生育唐氏综合征患儿的风险增加,但因病例数较少,研究尚待证实。

本文研究还发现,在河南省育龄女性叶酸利用能力遗传检测中,中、高度风险人群占了调查人数的一半以上,而未发现风险的仅占 26.72%。河南省平均每年出生人口 114.6 万人,神经管畸形的发生率为 0.2%~0.4%,如果未及时发现育龄女性携带有叶酸利用风险基因,指导其在孕期合理补充叶酸,每年将会有上千例神经管畸形患儿出生,给家庭、社会增加很大的负担。

随着产前诊断技术的进步及孕期叶酸补充等措施的实施,使近年新生儿神经管畸形等出生缺陷的发病率明显降低,目前国内外围孕期妇女补充叶酸的剂量一般为 0.4 mg/d。对于那些由于叶酸代谢关键酶的编码基因突变造成叶酸代谢障碍的女性人群,在补充相同剂量叶酸的情况下,血浆叶酸的浓度较正常人低,而在血浆叶酸浓度低的情况下,血浆同型半胱氨酸浓度明显升高。若能使机体血浆叶酸浓度保持正常,则血浆同型半胱氨酸浓度就不会明显

升高^[7]。因此,对于携带风险基因型的妇女,可以通过增加叶酸的补充而维持正常的血浆叶酸水平,从而降低血浆同型半胱氨酸浓度,降低神经管畸形患儿的出生概率。

神经管畸形作为新生儿出生缺陷最重要的一个组成部分,是影响出生人口素质的很大问题,对育龄女性进行大规模的遗传学检测,避免神经管畸形患儿的出生就显得尤为重要。因此,基于 MTHFR 和 MTRR 多态性检测的孕期叶酸补充指导和监测将是进一步降低新生儿出生缺陷的重要方法,也是提高人口素质的必要手段。

4 参考文献

- 1 Ghassibe-Sabbagh M, Platt DE, Youhanna S, et al. Genetic and environmental influences on total plasma homocysteine and its role in coronary artery disease risk. *Atherosclerosis*, 2012, 222: 180-186.
- 2 Jiang Y, Xia X, Wang W, et al. Hyperhomocysteinemia and related genetic polymorphisms correlate with ulcerative colitis in southeast China. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62: 203-210.
- 3 De Castro SC, Leung KY, Savery D, et al. Neural tube defects induced by folate deficiency in mutant curly tail (Grhl3) embryos are associated with alteration in folate one-carbon metabolism but are unlikely to result from diminished methylation. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2010, 88: 612-618.
- 4 Madjunkova S, Volk M, Peterlin B, et al. Detection of Thrombophilic Mutations Related to Spontaneous Abortions by a Multiplex SNaPshot Method. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2012, 16: 259-264.
- 5 Bozovic IB, Vranekovic J, Cizmarenic NS, et al. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int*, 2011, 53: 546-550.
- 6 Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr*, 2008, 62: 1010-1021.
- 7 Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 1995, 10: 111-113.
- 8 De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J Cancer*, 2009, 45: 1333-1351.
- 9 Benrahma H, Abidi O, Melouk L, et al. Association of the C677T Polymorphism in the Human Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene with the Genetic Predisposition for Type 2 Diabetes Mellitus in a Moroccan Population. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011.
- 10 肖雁,单可人,李毅,等. 贵州荔波汉族与雷山苗族 MTHFR 基因多

- 态性分布的比较. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13: 14-16.
- 11 劳海红, 贺宪民. 海南省汉族和黎族妇女亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究. 中国计划生育学杂志, 2011, 19: 655-657.
 - 12 顾燕宁, 贾绍斌. 宁夏回族冠心病患者亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的研究. 临床心血管病杂志, 2009, 25: 439-441.
 - 13 Mejia Mohamed EH, Tan KS, Ali JM, et al. TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is an important determinant for homocysteine levels in multi-ethnic Malaysian ischaemic stroke patients. Ann Acad Med Singapore, 2011, 40: 186.
 - 14 Alcaasbas P, Ravindranath Y, Goyette G, et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and the risk of acute lymphoblastic leukemia(ALL) in Filipino children. Pediatr Blood Cancer, 2008, 51: 178-182.
 - 15 Locke AE, Dooley KJ, Tinker SW, et al. Variation in folate pathway genes contributes to risk of congenital heart defects among individuals with Down syndrome. Genet Epidemiol, 2010, 34: 613-623.
 - 16 Alessio AC, Hoehr NF, Siqueira LH, et al. Polymorphism C776G in the transcobalamin II gene and homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations. Association with MTHFR C677T and A1298C and MTRR A66G polymorphisms in healthy children. Thromb Res, 2007, 119: 571-577.
 - 17 Wang SS, Qiao FY, Feng L, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. J Zhejiang Univ Sci B, 2008, 9: 93-99.

(收稿日期: 2011-11-24)

(本文编辑: 杨军)

【消 息】

全国病理学临床诊断新进展讲习班

为促进我国病理学的良性发展, 提高病理医(技)师的业务水平, 由中华医学电子音像出版社举办的“全国病理学临床诊断新进展讲习班”于 2012 年 3 月 16 日在福建省福州市举行。所有学员经考核合格后均可获得中华医学会 I 类继续医学教育学分。现将有关事宜通知如下:

1 授课内容及师资

1、子宫颈鳞状上皮内瘤变的诊断与鉴别诊断 复旦大学附属妇产科医院周先荣

2、子宫颈鳞状细胞癌的诊断 复旦大学附属妇产科医院周先荣

3、子宫颈腺体原位癌与腺癌的诊断 复旦大学附属妇产科医院周先荣

4、子宫颈非肿瘤性病变的诊断 复旦大学附属妇产科医院周先荣

5、常见肾小球疾病肾活检病理诊断 南京军区福州总医院余英豪

(1)国内肾活检病理检查现状;(2)开展肾活检病理检查的基本要求;(3)常见肾小球疾病的病理诊断要点;(4)肾活检远程邮寄病理检验的实施与推广。

6、胃肠道活检诊断规范 福建省立医院陈小岩

7、胃肠道肿瘤 2010 新分类解读 福建省立医院陈小岩

8、病理基本功要点 武警总医院纪小龙

(1)乳腺;(2)甲状腺;(3)淋巴;(4)内窥镜活检;(5)骨;(6)肺;(7)肝;(8)其他

2 会议相关信息

授课方式:会议采取讲授、提问、现场答疑等多种形式, 满足会议代表的学习需求, 同时就重点、难点问题进行细致入微的讲解与探讨。

学员对象:欢迎全国病理科、检验科及相关临床科室医师踊跃参加。

收费标准:会务费 980 元/人(含听课费、照相费等), 资料费另计;

食宿安排:食宿统一安排, 费用各单位自理。

3 会议时间及地点

会议时间:2012 年 3 月 16 日全天报到, 17 日开课。

会议地点:报名事宜及报到地点将于报名后由会务组另行通知。

报名截止:参加学习的老师请在接到邀请函后于 2012 年 2 月 29 日前通过电子邮箱、手机短信及电话报名, 也可将报名回执传真或邮寄到会务组。

报名地址:北京市东西大街 42 号中华医学会 110 室病理学医学会会务组。

4 联系方式

联系人:孙浩(15811266772)、于美君(13521831451)

E-mail:yixuehuiwuzu@126.com

联系电话:010-85158658;010-85158657

传真号码:010-85158656