· 论著 ·

1 098 例不良妊娠女性亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析

周林　董文文　郭淑新

作者单位：252000　山东聊城，聊城市东昌府区妇幼保健院检验科
通信作者：郭淑新，Email：drz1984@163.com
DOI：10.3969/j.issn.1674-7151.2023.01.005

【摘要】 目的　探讨不良妊娠女性亚甲基四氢叶酸还原酶（MTHFR）基因 A1298C、C677T 位点多态性分布及叶酸代谢能力，为叶酸的个体化补充提供依据。**方法**　选择 2017 年 1 月—2020 年 12 月聊城市东昌府区妇幼保健院收治的 1 098 例非正常妊娠女性作为研究对象。采用荧光定量聚合酶链反应（PCR）检测 MTHFR 基因 A1298C、C677T 位点的不同基因型在 1 098 例不良妊娠女性中的分布，并进行叶酸代谢能力评估；分析并比较 A1298C、C677T 位点基因型在不同地区不良妊娠女性中的分布差异。**结果**　MTHFR 基因 C677T 位点的突变基因型（TT+CT）频率为 89.25%，明显高于 A1298C 位点的突变基因型 CC 和 AC（突变频率为 24.59%），差异具有统计学意义（$P<0.05$）。1 098 例不良妊娠女性中，较弱及弱叶酸代谢能力者占比为 91.26%。在我国不同地区的不良妊娠女性中，A1298C 位点的突变基因型分布频率为 22.0%～50.0%，C677T 位点的突变基因型分布频率为 44.7%～88.5%，C677T 位点的突变率较高。**结论**　不良妊娠女性的 MTHFR 基因具有较高的突变率，且叶酸代谢能力多低于正常水平，应个体化补充叶酸，提高叶酸补充效率，降低不良妊娠发生率。

【关键词】 亚甲基四氢叶酸还原酶；　基因多态性；　不良妊娠；　叶酸；　代谢能力

基金项目：山东省聊城市医学科研立项项目（2015-231）

Analysis on polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene in 1 098 women with adverse pregnancy

Zhou Lin, Dong Wenwen, Guo Shuxin.　Department of Clinical Laboratory, Dongchangfu District Maternal and Child Health Care Hospital of Liaocheng, Liaocheng 252000, Shandong, China
Corresponding author: Guo Shuxin, Email: drz1984@163.com

【Abstract】 Objective　To explore the polymorphism distribution of A1298C and C677T loci in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and folic acid metabolism ability in women with adverse pregnancy, and provide a basis for individualized supplementation of folic acid. **Methods**　The 1 098 women with abnormal pregnancy admitted in Dongchangfu District Maternal and Child Health Care Hospital of Liaocheng from January 2017 to December 2020 were selected as research objects. Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the distribution of different genotypes of A1298C and C677T on MTHFR gene in 1 098 women with adverse pregnancy, and folic acid metabolism was evaluated. The genotypes distribution differences of A1298C and C677T among women with adverse pregnancies in different regions were compared and analyzed. **Results**　The mutation frequency of MTHFR gene C677T locus (TT+CT) was 89.25%, which was significantly higher than that of A1298C locus CC and AC (the mutation frequency was 24.59%), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Among 1 098 women with adverse pregnancy, 91.26% had weak folic acid metabolism. Among women with adverse pregnancy in different regions of China, the distribution frequency of mutant genotypes at A1298C locus was 22.0%-50.0%, and that at C677T locus was 44.7%-88.5%, indicating a high mutation rate at C677T locus. **Conclusions**　The MTHFR gene of women with adverse pregnancy has a high mutation frequency, and the metabolic capacity of folic acid is mostly lower than the normal level. Folic acid should be individually supplemented to improve clinical efficacy and reduce the incidence of adverse pregnancy.

【Key words】 Methylenetetrahydrofolate reductase;　Gene polymorphism;　Adverse pregnancy;　Folic acid;　Metabolic capability

Fund Program: Medical Research Project Approval in Liaocheng City, Shandong Province (2015-231)

亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是人体内叶酸代谢的关键酶,其编码基因的多态性改变可降低 MTHFR 酶的生物活性,进而影响叶酸代谢能力,导致孕妇体内叶酸水平低下,增加孕产妇习惯性流产、胎儿神经管畸形、唇腭裂及 21 三体综合征等母婴不良妊娠结局的发生风险[1-4]。本研究通过分析不良妊娠史女性 MTHFR 基因 A1298C、C677T 位点的多态性分布,旨在了解不良妊娠女性的叶酸代谢能力,为叶酸的有效补充提供临床依据,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2017 年 1 月—2020 年 12 月在聊城市产前诊断中心就诊的 1 098 例非正常妊娠女性作为研究对象,年龄 19 ~ 40 岁。

1.1.1 纳入标准 ① 有自然流产史(次数≥ 2 次);② 有唇腭裂、神经管畸形、先天性心脏病等胎儿畸形史以及有死胎、死产等生育史。

1.1.2 排除标准 ① 夫妻或流产组织具有明确的染色体核型异常;② 孕前或孕期存在 TORCH 等病原体感染;③ 有明显的生殖系统结构畸形。

1.1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,并通过本院伦理委员会审批(审批号:20230202),所有研究对象对本研究知情同意。

1.2 仪器与试剂 Nano-100 微量分光光度计购自杭州奥盛仪器有限公司, Viia 7 Dx 荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测仪购自美国 ABI 公司;全基因组 DNA 提取试剂盒购自上海柏辰生物有限公司,叶酸代谢能力测定试剂盒(荧光法)购自江西诺德医疗器械有限公司。

1.3 研究方法

1.3.1 基因检测位点的选取 MTHFR 是叶酸代谢循环中的关键酶, MTHFR 基因 A1298C、C677T 位点的多态性改变直接影响 MTHFR 酶活性,进而导致叶酸代谢能力的改变。因此本研究选择 MTHFR 基因 A1298C、C677T 作为检测位点,观察其在不良妊娠女性中的多态性分布。

1.3.2 基因组 DNA 提取 使用全基因组 DNA 提取试剂盒,从乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝血中提取 DNA,使用微量分光光度计对提取的基因组 DNA 浓度及纯度进行检测。将 DNA 浓度稀释为 20 mg/L 的工作液,置于 4 ℃冰箱备用。

1.3.3 基因型检测分析 基于免疫荧光技术,不同的荧光基团与相应位置的氨基酸特异性结合后,会发出不同颜色的荧光信号,通过检测反应最终的荧光信号,确定样品中 MTHFR 基因 A1298C、C677T 位点的基因型。

1.3.4 不同基因型与叶酸代谢的关系 MTHFR 基因 A1298C 位点的基因型为野生型 AA、杂合突变型 AC、纯合突变型 CC;MTHFR 基因 C677T 位点的基因型为野生型 CC、杂合突变型 CT、纯合突变型 TT。不同基因型受检者对叶酸的代谢能力不同。见表 1。

表 1 MTHFR 基因不同位点变异与叶酸代谢能力的关系

检测位点	检测结果	叶酸代谢能力(%)	检测位点	检测结果	叶酸代谢能力(%)
A1298C	AA	100	C677T	CC	100
	AC	83		CT	65
	CC	61		TT	30

注:MTHFR 为亚甲基四氢叶酸还原酶

1.3.5 叶酸代谢能力评估 综合分析 A1298C 和 C677T 位点的变异情况,根据 A1298C、C677T 位点的不同基因型组合,可将叶酸代谢能力分为正常、较弱、弱三类。见表 2。

表 2 MTHFR 基因不同位点基因型叶酸代谢能力综合评定标准

检测位点	基因型								
A1298C	CC	CC	CC	AC	AC	AC	AA	AA	AA
C677T	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
代谢能力	较弱	弱	较弱	正常	较弱	弱	正常	较弱	弱

注:MTHFR 为亚甲基四氢叶酸还原酶

1.4 统计学分析 采用 Excel 软件录入数据及检测结果。以例(%)表示不同基因型及叶酸代谢能力的分布情况,采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,不同基因型的比较分析采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不良妊娠女性 MTHFR 基因 A1298C、C677T 位点基因型分布 1 098 例不良妊娠女性 MTHFR 基因 C677T 位点的突变基因型(TT+CT)所占比例明显高于 A1298C 位点的突变基因型(CC+AC),差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.2 叶酸代谢能力分析 分析 MTHFR 基因 A1298C、C677T 位点的变异情况,评估 1 098 例不良妊娠女性的叶酸代谢能力,结果显示叶酸代谢能力较弱者 549 例(占 50.00%),叶酸代谢能力弱者 453 例(占 41.26%),代谢能力较弱及弱者占 91.26%,表明绝大部分不良妊娠女性的叶酸代谢能力低下。

表 3　1 098 例不良妊娠女性 A1298C、C677T 位点基因型分布

SNP 位点	基因型	基因型分布〔例(%)〕	突变型和野生型分布〔例(%)〕
A1298C	CC	23(2.09)	270(24.59)
	AC	247(22.50)	
	AA	828(75.41)	828(75.41)
C677T	TT	547(49.82)	980(89.25)
	CT	433(39.44)	
	CC	118(10.75)	118(10.75)

注：SNP 为单核苷酸多态性

2.3　不同地区不良妊娠女性 MTHFR 基因 A1298C 位点的基因型分布　聊城地区不良妊娠女性的 MTHFR 基因 A1298C 位点基因型分布与河南、河北地区接近，而与其他地区比较差异均有统计学意义（$P<0.05$），表明 MTHFR 基因 A1298C 位点的变异具有明显的地区差异性。见表 4。

表 4　不同地区不良妊娠女性 MTHFR 基因 A1298C 位点基因型分布比较

地区	例数(例)	基因型分布〔例(%)〕			P 值
		CC	AC	AA	
聊城	671	32(4.8)	134(20.0)	505(75.3)	
天津[5]	244	5(2.1)	74(30.3)	165(67.6)	0.000
河北[6]	200	5(2.5)	39(19.5)	156(78.0)	0.361
河南[7]	140	6(2.9)	34(23.6)	102(73.5)	0.562
陕西[8]	132	1(0.8)	39(29.5)	92(69.7)	0.009
兰州[9]	154	6(3.9)	60(38.9)	88(57.1)	0.000
江苏[10]	80	10(12.5)	30(37.5)	40(50.0)	0.000
湖北[11]	359	26(7.3)	115(32.0)	218(60.7)	0.000
广西[12]	300	33(11.0)	117(39.0)	150(50.0)	0.000
三亚[13]	139	10(7.2)	50(36.0)	79(56.8)	0.000
海南[14]	344	26(7.6)	126(36.6)	192(55.8)	0.000

注：MTHFR 为亚甲基四氢叶酸还原酶；P 值为其他地区与聊城地区比较

2.4　不同地区不良妊娠女性 MTHFR 基因 C677T 位点的基因型分布　聊城地区不良妊娠女性 MTHFR 基因 C677T 位点突变基因型频率与天津、河南、河北等北方地区接近，而与西部及南方地区，尤其是广西、海南等地区差异明显。见表 5。

表 5　不同地区不良妊娠女性 MTHFR 基因 C677T 位点基因型分布比较

地区	例数(例)	基因型分布〔例(%)〕			P 值
		CC	AC	AA	
聊城	671	32(4.8)	134(20.0)	505(75.3)	
天津[5]	244	5(2.1)	74(30.3)	165(67.6)	0.000
河北[6]	200	5(2.5)	39(19.5)	156(78.0)	0.361
河南[7]	140	6(2.9)	34(23.6)	102(73.5)	0.562
陕西[8]	132	1(0.8)	39(29.5)	92(69.7)	0.009
兰州[9]	154	6(3.9)	60(38.9)	88(57.1)	0.000
江苏[10]	80	10(12.5)	30(37.5)	40(50.0)	0.000
湖北[11]	359	26(7.3)	115(32.0)	218(60.7)	0.000
广西[12]	300	33(11.0)	117(39.0)	150(50.0)	0.000
三亚[13]	139	10(7.2)	50(36.0)	79(56.8)	0.000
海南[14]	344	26(7.6)	126(36.6)	192(55.8)	0.000

注：MTHFR 为亚甲基四氢叶酸还原酶；P 值为其他地区与聊城地区比较

3　讨论

MTHFR 基因位于 1 号染色体短臂（1p36.3），反转录 DNA 全长 2 200 bp，含有 12 个外显子，编码 657 个氨基酸，其编码的 MTHFR 酶是叶酸代谢的关键酶，与叶酸的新陈代谢、血清正常同型半胱氨酸（homocysteine，HCY）水平的维持密切相关。MTHFR 基因的完整性是维持酶正常功能的基础，其多态性改变会降低 MTHFR 酶的生物活性，减弱机体对叶酸的代谢能力，引起机体利用叶酸障碍，进而增加妊娠相关疾病的发生风险[15-17]。

A1298C 和 C677T 是 MTHFR 基因最常见的两个突变位点。A1298C 位点是 MTHFR 基因第 7 外显子上 A 碱基到 C 碱基的突变，导致其编码产物由谷氨酸转变为丙氨酸，杂合突变可导致 MTHFR 酶的活性降至 83%，纯合突变会导致酶活性降至 61%[18]。C677T 位点是位于 MTHFR 基因第 5 外显子 C 碱基到 T 碱基的突变，该位点变异导致丙氨酸转变为缬氨酸，引起 MTHFR 酶的热稳定性和活性降低，杂合突变导致酶活性降至 65%，纯合突变导致酶活性降至 30%[18]。由此可见，C677T 位点的突变对 MTHFR 酶活性的改变强于 A1298C 突变对 MTHFR 酶活性的影响。

本研究分析 A1298C 和 C677T 两个位点不同突变类型在聊城地区 1 098 例具有不良孕产史女性中的分布情况，结果表明 C677T 位点的突变基因型频率（TT+CT，89.25%）明显高于 A1298C 位点的突变基因型（CC+AC，24.59%），且 C677T 位点突变纯合型 TT 的比例（49.82%）亦明显高于 A1298C 位点的突变纯合型 CC（2.09%），由此可见在不良孕产女性中 C677T 位点的突变频率高于 A1298C 位点。

为探讨不良妊娠女性 MTHFR 基因 A1298C、C677T 位点多态性是否存在地区差异性，本研究比较并分析了 10 个地区 MTHFR 基因 C677T、A1298C 位点多态性与不良妊娠相关性的研究，结果表明，10 个地区不良妊娠女性中，A1298C 位点的突变基因型分布频率为 22.0%～50.0%，C677T 位点的突变基因型分布频率为 44.7%～88.5%，C677T 位点具有较高的突变率。本研究中 A1298C、C677T 位点的突变率与河南、河北等地接近，与广西、海南等地有显著差异，表明 MTHFR 基因 A1298C、C677T 位点多

态性在我国南北方存在地区差异性。

大量研究已证实,围孕期及孕期女性补充一定量的叶酸,可以预防胎儿神经管畸形发生,降低胎儿先天性心脏病、唇腭裂等出生缺陷的发生率[19-20]。我国妇幼保健机构推荐育龄期女性在孕前 3 个月至孕早期 3 个月应每天补充 0.4 mg 叶酸。近年来研究表明,育龄期女性叶酸代谢能力存在较大差异,河南省高达 66.57% 的育龄期女性存在叶酸代谢障碍[21],内蒙古自治区赤峰地区育龄女性携带叶酸代谢高风险基因的比例超过 70%[22]。鉴于叶酸代谢能力的个体差异,服用相同剂量的叶酸时,不同个体的吸收利用率会存在较大差异。因此,为有效补充叶酸,育龄期女性应在备孕期进行叶酸代谢相关基因检测,了解自身的叶酸代谢能力,进行个体化补充,避免因盲目补充而导致叶酸补充不足或叶酸中毒以及由此带来的一系列不良后果。

叶酸的代谢过程复杂,涉及的代谢相关基因较多,本研究仅对 MTHFR 基因的 A1298C 和 C677T 位点进行分析,尚未研究 MTHFR 基因其他位点及相关基因,依然存在许多不足之处。在今后的研究中,我们将继续探讨不良妊娠的致病原因,为临床孕前门诊叶酸精准补充提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

1 朱长玲,卢帅军,史颖姣,等.同型半胱氨酸及叶酸代谢基因 MTHFR 多态性与复发性流产发病风险的关联性 [J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31 (19): 3026–3030. DOI: 10.11816/cn.ni.2021–203615.

2 WU H, ZHU P, GENG X Y, et al. Genetic polymorphism of MTHFR C677T with preterm birth and low birth weight susceptibility: a meta–analysis [J]. Arch Gynecol Obstet, 2017, 295 (5): 1105–1118. DOI: 10.1007/s00404–017–4322–z.

3 YUAN Y, YU X, NIU F L, et al. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase as a potential risk factor for congenital heart disease: a meta–analysis in Chinese pediatric population [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96 (23): e7057. DOI: 10.1097/MD.0000000000007057.

4 MAHMUTBEGOVIC E, MARJANOVIC D, MEDJEDOVIC E, et al. Prevalence of F5 1691G>A, F2 20210G>A, and MTHFR 677C>T polymorphisms in Bosnian women with pregnancy loss [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2017, 17 (4): 309–314. DOI: 10.17305/bjbms.2017.1954.

5 谢晓媛, 张颖, 辛力, 等. 叶酸代谢酶 MTHFR、MTRR 基因多态性与原因不明复发性流产的关系 [J]. 天津医药, 2016, 44 (10): 1243–1246. DOI: 10.11958/20160099.

6 段素霞,李贵霞,邱方洲,等.叶酸代谢过程相关的四个单核苷酸多态性位点与先天性心脏病发病风险的病例–对照研究 [J]. 卫生研究, 2018, 47 (4): 536–542. DOI: CNKI:SUN:WSYJ.0.2018–04–008.

7 张仪, 有风芝, 秦奇, 等. MTHFR 基因多态性及叶酸摄入量与不良孕产史关系的研究 [J]. 医药论坛杂志, 2017, 38 (1): 66–69. DOI: CNKI:SUN:HYYX.0.2017–01–023.

8 杨瑞利, 翟华丽, 王飞露, 等. 叶酸代谢相关酶基因多态性与先兆流产的相关性探讨 [J]. 华南预防医学, 2017, 43 (2): 179–181. DOI: 10.13217/j.scjpm.2017.0179.

9 吕玲, 肖晨光, 陈雪, 等. 兰州地区几种不同 MTHFR 基因及其多态性与早产及叶酸代谢水平关系的研究 [J]. 中国计划生育学杂志, 2018, 26 (7): 582–587, 591. DOI: 10.3969/j.issn.1004–8189.2018.07.010.

10 陆继红, 施晓艳, 万金华. 分析叶酸代谢相关酶基因多态性与不良孕产的临床关系 [J]. 中国实用医药, 2017, 12 (16): 88–89. DOI: 10.14163/j.cnki.11–5547/r.2017.16.042.

11 刘念, 阎炯, 杨林. 叶酸代谢相关酶基因多态性与不良孕产关系的研究 [J]. 中国计划生育学杂志, 2015, 23 (5): 318–320. DOI: 10.3969/j.issn.1004–8189.2015.05.

12 李茜西, 伍萍芝, 何琳琳, 等. 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. DOI: 10.3969/j.issn.1671–8348.2015.10.012.

13 李小兰, 林琼珊, 鲁衍强, 等. 先兆流产与 MTHFR、MTRR 基因多态性的关系 [J]. 重庆医学, 2017, 46 (6): 770–772. DOI: 10.3969/j.issn.1671–8348.2017.06.016.

14 劳海红, 贺宪民, 王洁, 等. 叶酸代谢相关基因多态性与自然流产的相关性研究 [J]. 中国妇幼保健, 2017, 32 (4): 791–793. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001–4411.2017.04.53.

15 张勤, 白宝玲, 刘晓真, 等. 中国山西人群中叶酸代谢基因 MTRR 和 MTHFR 与复杂先天畸形关联研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16 (8): 840–845. DOI: 10.7499/j.issn.1008–8830.2014.08.014.

16 杨慧, 朱晓琴, 余敏敏, 等. 叶酸对围产儿先天性心脏病发生率的影响 [J]. 江苏医药, 2014, 40 (7): 845–846. DOI: CNKI:SUN:YIYA.0.2014–07–040.

17 苗卉, 薛赓, 孙树汉. 母体叶酸水平与子代生长发育状况相关性的研究进展 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37 (5): 423–428. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096–2916.2017.05.017.

18 梁娜, 邓洋, 周永安. 山西地区育龄妇女叶酸代谢相关基因的多态性分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33 (6): 801–805. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–9406.2016.06.012.

19 喻琼琼, 石冰. 孕妇补充叶酸与唇腭裂畸形发生的关系 [J]. 国际口腔医学杂志, 2014, 41 (3): 368–370. DOI: 10.7518/gjkq.2014.03.029.

20 廖华. 叶酸治疗 30 例习惯性流产的临床效果分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24 (8): 1866–1867. DOI: 10.3969/j.issn.1001–8174.2013.08.137.

21 马新利, 张婷婷, 王玥, 等. 河南省 9 826 例育龄女性叶酸代谢相关基因多态性分布研究 [J]. 河南预防医学杂志, 2021, 32 (3): 170–173, 210. DOI: 10.13515/j.cnki.hnjpm.1006–8414.2021.03.003.

22 张明杰, 苏东越, 崔贵虎, 等. 赤峰地区育龄女性叶酸代谢相关基因检测分析 [J]. 实用检验医师杂志, 2021, 13 (4): 225–228. DOI: 10.3969/j.issn.1674–7151.2021.04.009.

（收稿日期：2023–02–23）
（本文编辑：邰文）