DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000745

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与胚胎停止发育的相关性研究

秦　奇，有风芝，张　仪
（郑州大学第三附属医院妇产科，郑州　450052）

【摘　要】**目的**：分析亚甲基四氢叶酸还原酶（methylenetetrahydrofolate reductase，MTHFR）和甲硫氨酸合成酶还原酶（methionine synthase reductase，MTRR）基因多态性与胚胎停育的相关性。**方法**：采用 qRT-PCR 检测有胚胎停育史的妇女 90 例（病例组）和正常妊娠妇女 99 例（对照组）口腔黏膜细胞 MTHFRC677T、A1298C 和 MTRRA66G 的基因多态性，并对分布特点进行统计分析。**结果**：(1)病例组 90 例中 MTHFRC677T 纯合突变 TT 型 41 例 45.6%，杂合突变 CT 型 32 例 35.6%，野生基因型 CC 型 17 例 18.8%，对照组 99 例 MTHFRC677T TT 型 6 例 6.1%，CT 型 55 例 55.5%，CC 型 38 例 38.4%，3 组基因型比较均有统计学差异（χ^2_{TT}=39.358，P_{TT}=0.000，χ^2_{CT}=7.591，P_{CT}=0.006，χ^2_{∞}=8.684，P_{CC}=0.003）；(2)MTHFRA1298C 位点单基因突变，病例组中等位基因 A、C 频率分别为 87.2%、12.8%，对照组分别为 86.9%、13.1%。两组间 A、C 等位基因的出现频率无明显差异（χ^2=0.010，P=0.919）；(3)MTHFRA1298C 与 MTHFRC677T 协同突变时只有 1 种 CT+AC 型，病例组与对照组的 CT+AC 基因分布频率分别为 14.4%和 4.00%（χ^2=6.234，P=0.013）；(4)2 组 MTRRA66G 基因型 AA，AG+GG 及等位基因 A 的 χ^2 值分别为 4.78、11.343、7.846，P 值分别为 0.029、0.001、0.005，差异有统计学意义。**结论**：MTHFRC677T、MTRRA66G 两位点单基因突变易造成胚胎停育；MTHFRA1298C 位点单基因突变与胚胎停止发育无相关性；MTHFRC677T 与 MTHFRA1298C 协同突变可能是导致胚胎停育的原因。

【关键词】胚胎停止发育；MTHFR 和 MTRR 基因；基因多态性
【中图分类号】R714.21；Q78　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-03-21

Relationship between MTHFR, MTRR gene polymorphism and embryonic development termination

Qin Qi, You Fengzhi, Zhang Yi
(*Department of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University*)

【Abstract】***Objective***: To analyze the relationship of the embryonic development termination and the gene polymorphism of MTHFR and MTRR. ***Methods***: MTHFRC677T, A1298C and MTRRA66G genotypes were analyzed by quantitative PCR in 90 women with embryonic stop fertility history(case group) and 99 normal pregnant women(control group). The characteristics of distribution were analyzed bystatistical software. ***Results***: In case group, possibilities of MTHFRC677T TT(puremutant, 41 samples), CT(heterozy gousmutant, 55 samples), CC(wild type, 17 samples) genotypes were 45.6%, 35.6%, 18.8% respectively, comparing with 6.1%, 55.5%, 38.4% in control group. The results showed obvious difference in genortypes of TT, CT, and CC(χ^2_{TT}=39.358, P_{TT}=0.000, χ^2_{CT}=7.591, P_{CT}=0.006, χ^2_{∞}=8.684, P_{CC}=0.003). When A1298C mutated alone, the frequencies of A allele in case group and control group were 87.2% and 86.9%; the frequencies of C allele in case group and control group were 12.8% and 13.1%; there was no significant difference between them (χ^2=0.010, P=0.919). There was only CT+AC when MTHFRA1298C mutated in collaboration with MTHFRC677T; the frequencies of CT+AC homozygote in case group and control group were 14.4% and 4.00%(χ^2=6.234, P=0.013). The comparison of the MTRRA66G polymorphism between case group and control group: Chi-square values of AA, AG+GG, allele A were 4.78, 11.343, 7.846(P values were 0.029, 0.001, 0.005). ***Conclusion***: Single gene mutation of MTHFRC677T and MTRRA66G gene locus can easily lead to embryonic development termination. The mutation of MTHFR1298A-C can not induce embryonic development termination, but it may become a risk factor for embryonic development termination when it occurs with the mutation of 677C-T.

【Key words】embryonic development termination; MTHFR and MTRR genes; polymorphism

作者介绍：秦　奇，Email：435766543@qq.com，
研究方向：MTHFR 和 MTRR 基因多态性。
通信作者：有风芝，Email：youfengzhi@souhu.com。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150811.2256.004.html
(2015-08-11)

胚胎停育是指妊娠早期因某原因所致胚胎停止发育，属于流产前的病理过程[1]，即妊娠早期（受精 5 周或妊娠 7 周）后见胚芽而无原始心管搏动，孕囊枯萎或 B 超图像仅见孕囊而未见胚芽[2]，可导致稽留流产和不全流产。近年来，该病的发病率明显上升。本文收集了有过胚胎停育史的孕产妇 90 例，有 1 次及以上正常孕产史孕妇 99 例，分别测定亚甲基四氢叶酸还原酶（methylenetetrahydrofolate reductase，MTHFR）和甲硫氨酸合成酶还原酶（methionine synthase reductase，MTRR）基因类型及等位基因分布情况，分析 MTHFR 和 MTRR 基因多态性与胚胎停止发育的相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 7 月至 2014 年 6 月来本院就诊的孕产妇，病例组 90 例，纳入标准：经 B 超确诊有胚胎停育史；夫妇双方染色体核型正常，无家族遗传病史；无生殖系统解剖畸形；内分泌功能正常；TORCH 检测阴性；ABO 血型抗体系统检测 IgG 抗 A 抗体、IgG 抗 B 抗体滴度低于 1:64，RH 因子阳性。对照组 99 例，纳入标准：有 1 次以上正常生育史，无不良孕产史。2 组患者均无心、肝、肾病史。病例组年龄（30.190 ± 5.491）岁，身高（161.810 ± 4.189）cm，体质量（58.520 ± 7.207）kg 与对照组年龄（29.910 ± 4.682）岁，身高（162.550 ± 3.905）cm，体质量（60.060 ± 6.694）kg 无统计学差异（$t_{年龄}$=0.378，$P_{年龄}$=0.706；$t_{身高}$=0.698，$P_{身高}$=0.214；$t_{体质量}$=0.629，$P_{体质量}$=0.129）。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 采用专用的采样拭子留取口腔黏膜细胞，柱式抽提试剂盒抽提样本 DNA。

1.2.2 基因检测 采用 Taqman-MGB 技术，检测 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 的基因多态性，相关仪器、试剂均购自美国 ABI 公司 。

1.2.3 qRT-PCR 检测 每个反应体系总体积 10 μl，包含浓度为 20 ng/μl 的 DNA 模板 1 μl，2 × Taqman Universal MasterMix 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，利用分析软件确定各个样本的基因分型结果。

1.3 数据分析

用 SPSS 16.0 软件对所取得的数据进行统计学分析及处理，各组 MTHFR、MTRR 基因型分布及等位基因频率之间的比较均采用卡方检验，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间差异比较用独立样本 t 检验，均以 α=0.05 为检验水准。

2 结 果

2.1 2 组 MTHFRC677T 基因型及等位基因频数比较

90 例病例组中野生基因型 CC 型 17 例 18.8% 杂合突变 CT32 例 35.6% 纯合突变 TT 41 例 45.6% 对照组 99 例中野生基因型 CC 型 38 例 38.4% 杂合突变 CT55 例 55.5% 纯合突变 TT 6 例 6.1% 各组间比较野生型及杂合突变差异明显。病例组中等位基因 T、C 频率分别为 63.3%、36.7%，对照组中分别为 33.8%、66.2%（χ^2=32.869，P=0.000），均有差异（表1）。

表 1 MTHFRC677T 基因型及等位基因分布情况

Tab.1 Distribution of MTHFRC677T genotype and allele

组别	n	基因型(%)			等位基因分布(%)	
		CC	TT	CT	C	T
病例组	90	17(18.8)	41(45.6)	32(35.6)	66(36.7)	114(63.3)
对照组	99	38(38.4)	6(6.1)	55(55.5)	131(66.2)	67(33.8)
χ^2 值		8.684	39.358	7.591	32.869	
P 值		0.003	0.000	0.006	0.000	

2.2 2 组 MTRRA66G 基因型及等位基因频数比较

病例组 A66G 位点的 GG 基因型频率分布 21.6%明显高于对照组 2.10%，病例组 AG+GG 的频率 61.6%与对照组35.4%相比（χ^2=11.343，P=0.001），等位基因 G 分布频率病例组（31.1%）高于对照组（18.7%）（表 2）。

表 2 MTRRA66G 基因型及等位基因分布情况

Tab.2 Distribution of MTRR A66G genotype and allele

组别	n	基因型(%)			等位基因分布(%)	
		AA	AG	GG	A	G
病例组	90	44(38.4)	36(40.0)	10(21.6)	124(68.9)	56(31.1)
对照组	99	64(64.6)	33(33.3)	2(2.10)	161(81.3)	37(18.7)
χ^2 值		4.780	11.343		7.846	
P 值		0.029	0.001		0.005	

2.3 2 组 MTHFRA1298C 基因型及等位基因频数比较

经过分析发现 MTHFRA1298C 的各种基因型 AA、AC、CC及等位基因 A 在病例组及对照组中的分布无明显统计学差异（χ^2 值 0.272、1.589、1.713、0.010，P 值 0.602、0.207、0.191）（表 3）。

表 3 MTHFRA1298C 基因型及等位基因分布情况

Tab.3 Distribution of MTHFR A1298C genotype and allele

组别	n	基因型(%)			等位基因分布(%)	
		AA	AG	GG	A	G
病例组	90	69(76.7)	19(21.1)	2(2.20)	157(87.2)	23(12.8)
对照组	99	79(79.8)	14(14.1)	6(6.10)	172(86.9)	26(13.1)
χ^2 值		0.272	11.343	1.713	0.010	
P 值		0.602	0.001	0.191	0.919	

2.4 2 组 MTHFRC677T 与 MTHFRA1298C 基因协同分布情况

病例组和对照组协同型突变基因型仅有一种 CT+AC 型，未发现其他类型，且病例组 CT+AC 分布 14.4%明显高于对照组 4.00%（χ^2=6.234，P=0.013）（表 4）。

表 4 MTHFRC677T 与 MTHFRA1298C 基因协同突变多态分布情况

Tab.4 Distribution of polymorphism of MTHFRC677T and MTHFR collaborative mutation of A1298C gene

组别	n	协同型（CT+AC）	非协同型
病例组	90	13(14.4)	77(85.6)
对照组	99	4(4.0)	95(96.0)
χ^2值		6.234	
P 值		0.013	

注：协同型：TT+AC，TT+CC，CT+AC，CT+CC；非协同型：排除协同型之外其他所有类型；病例组中 5 例 TT+AC 型，对照组 0 例。TT+CC、CT+CC 在 2 组中均未出现

3 讨 论

胚胎停育孕妇和正常孕妇 MTHFR 基因多态性分析。诱发胚胎停育的原因很多，研究表明感染、子宫畸形、男性精子异常，内分泌异常及染色体异常等因素可导致胚胎停止发育，除外，还有 60%~70%的原因不明[3]。目前 MTHFRC677T，A1298C 位点是研究的热点。MTHFR 是同型半胱氨酸复甲基化代谢途径中的关键酶，它在 5，10-亚甲基四氢叶酸还原成为 5-甲基四氢叶酸的过程中起催化作用。5-甲基四氢叶酸为同型半胱氨酸（homocysteine，HCY）提供一碳单位并使其甲基化而生成甲硫氨酸，从而起到调节体内 HCY 正常水平的作用。MTHFR677 的野生型基因为 C，突变性为 T，该位点突变使高度保守的丙氨酸转变成缬氨酸，而这种突变一方面使 MTHFR 活性降低，5-甲基四氢叶酸生成减少，嘧啶、嘌呤和核酸代谢障碍，胎儿生长发育所需 DNA 和蛋白质甲基化不足，导致胚胎停育[4]。另一方面导致血浆中 HCY 的蓄积[5]。妊娠期高 HCY 可增加母亲血栓形成的危险性，引起胎盘血栓栓塞，从而引发胚胎停育。Wiwanitkit[6]在 2005 年的研究发现 C677T 可能不是诱发机体流产的原因，而蔡丽梅等[2]的研究表明 MTHFR 基因 TT 突变会影响胚胎的正常发育，相互之间存在明显的相关性。Wu 等[7]在2012 年收集了 2 472 例有反复流产史患者的 MTHFRC677T，发现 C677T 基因多态性分布与流产有明显的相关性。国内外多项关于 MTHFR 基因个型分布频率研究结果存在差异的可能原因包括：种族之间等位基因频率的差异、基础疾病、叶酸营养状况，饮食或同时服用的药物等环境因素[8]。本组资料显示胚胎停止组 TT 基因型（P=0.000）和 T 等位基因（P=0.000）所占的比率明显高于正常胚胎组，CT、CC 基因型、C 等位基因所占比率明显小于正常胚胎组（P 值分别为 0.006、0.003、0.000）（表 1）。因此本文支持MTHFR677 位点 T 突变型基因与胚胎停止发育存在相关性。

MTHFR 的另一基因位点 A1298C 也是人们关注的焦点，A1298C 突变位于 MTHFR 基因第 7 外显子 C 端调节区核苷酸 1 298 位点，该位点的腺苷酸突变为胞嘧啶，导致编码的谷氨酸被丙氨酸取代。有研究认为 A1298C 纯合突变可导致 MTHFR 的活性降低，被认为是高同型半胱氨酸血症的遗传危险因素[9]。在本研究中发现胚胎停育组突变型 CC/AC 与观察组 CC/AC 的频率 χ^2 分别为 1.713/0.272（P 值 0.191/0.602），且等位基因 C 与 A 的发生频率在两组之中亦无统计学意义（χ^2=0.010，P=0.919）（表 3），即 MTHFRA1298C 基因的突变与胚胎停育无相关性。MTHFRC677T，A1298C 协同突变时，本研究在病例组和对照组中仅发现了一种协同突变基因型即 CT+AC，病例组中有 5 例 TT 型+AC 型，其他类型没有发现。这个研究同 Callejón 等的研究一致[10]。原因可能与 C677T 和 A1298C 在染色体上的排列顺序有关，即 C677T 和 A1298C 在染色体上呈反式排列，具有连锁不平衡性，也就是说这两个突变等位基因通常不会同时存在于 1 条染色体上，如果 2 个突变同存在于一条染色体上，将会对 MTHFR 酶的活性影响较大[11]，致使这种基因型联合突变的人群在胚胎或是胎儿时期以自然流产的形式而不存在[12]。Hubacek 等[13]在 2014 年的研究显示 MTHFRC677T，A1298C 的基因分布的不同组合与自然流产在白种人中有很高的风险关联。本研究的病例组 CT+AC 分布概率 14.4 明显高于对照组 4.00（χ^2=6.234，P=0.013）（表 4）统计学有意义，即 MTHFR C677T，A1298C 协同突变时胚胎停育的几率会大大增加。

胚胎停育孕妇和正常孕妇 MTRR 基因多态性分析，MTRR 基因定位于 5P 15.2~15.3，MTRR 是 HCY 再甲基化途径中的重要酶，对维持细胞内蛋氨

酸、四氢叶酸水平及同型 HCY 无毒性有重要作用[14]；MTRR 存在 66A-G 的多态性，导致蛋氨酸被异亮氨酸替代，使该酶活性降低，且这种多态性可引起高 HCY 血症，而高 HCY 血症会刺激血管平滑肌细胞增生，破坏机体凝血和纤溶平衡，导致内皮损伤和功能异常，使胎盘处于血栓前状态而最终导致胚胎停育的发生。国内学者研究显示 MT 的 AA 基因型可能是颅内动脉瘤的保护性基因，发生变异时患病风险增加[15]。近年来国内外众多的研究表明，MTRR 基因 A66G 多态性与出生缺陷如神经管缺陷的发生有关[16]。本研究显示，胚胎停育组的 AA、AG、GG 基因型频率与对照组比较有统计学差异；且研究组的等位基因 A、G 与对照组比较同样有统计学差异（P=0.005）（表 2）。提示突变基因 G 与胚胎停育的发生存在相关性。

参 考 文 献

[1] 李丽珍，杜 诚，王 帆. B 超早期诊断胚胎停止发育的原因探讨[J]. 中国实用妇科与产科志，2003，19(6)：377-378.

[2] 蔡丽梅，朱珍珍，虞如芬. MTHFR 基因多态性、Hcy、B 12、叶酸与胚胎停止发育的相关性[J]. 现代实用医学，2014，26(5)：602-604.

[3] 罗雪莹，王占平. 反复自然流产患者妊娠组织中 survivin 和 PCNA 的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健，2010，25(1)：107.

[4] 马淑芳，郑梅玲. MTHFRC677T 基因多态性与复发性流产的关系[J]. 保健医学研究与实践，2008，5(4)：4-5.

[5] Frosst P，Blom HJ，Milos R，et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease：a common mutation in methylenetetrahydrofolqte reductase[J]. Nat Genet，1995，10(1)：111-113.

[6] Wiwanitkit V. Roles of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in repeated pregnancy loss[J]. Clin Appl Thromb Hemost，2005，11(3)：343-345.

[7] Wu X，Zhao L，Zhu H，et al. Association between the MTHFR C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss：a meta-analysis[J]. Genet Test Mol Biomarkers，2012，16(7)：806-811.

[8] Liu SG，Li ZG，Cui L，et al. Effects of methyle netetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on toxicities during consolidation therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population[J]. Leuk Lymphoma，2011，52(6)：1030-1040.

[9] Kumar J，Das SK，Sharma P，et al. Homocy steine levels are associated with MT HFR A1298C polymorphism in Indian population[J]. J Hum Genet，2005，50(12)：655-663.

[10] Callejón G，Mayor-Olea A，Jiménez AJ，et al. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss[J]. Human Reproduction，2007，22(12)：3249-3254.

[11] Weisherg IS，Jaeques PF，Selhub J，et al. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)：in vitro expression and association with homocysteine[J]. Atherosclerosis，2001，156(2)：409-412.

[12] Goa M，Sliwerska E，Szpecht PA. Mutation incidence in folate metabolism genes and regulatory gene in Polish families with neural Tube defects[J]. J Appl Genet，2004(45)：363-368.

[13] Hubacek JA，Rynekrova J，Kasparova D，et al. Association of MTHFR genetic variants C677T and A1298C on predisposition to spontaneous abortion in Slavonic population[J]. Clin Chim Acta，2015，440(2)：104-107.

[14] 王伟华，王凤菊，刘 伟. MTRR 基因 A66G 多态性与高同型半胱氨酸血症的相关性研究[J]. 山东医药，2007，47(25)：54-55.

[15] 陈盛强，戴文伟，许绍强，等. 同型半胱氨酸及其代谢关键酶 MTRR 基因多态性与颅内动脉瘤的关系[J]. 实用医学杂志，2011，27(19)：3522-3525.

[16] Yadav U，Kumar P，Yadav SK，et al. Polymorphisms in folate metabolism genes as maternal risk factor for neural tube defects：an updated meta-analysis[J]. Metab Brain Dis，2015，30(1)：7-24.

（责任编辑：张辉洁）