

乌鲁木齐汉族妇女亚甲基四氢叶酸还原酶基因变异与血清叶酸和同型半胱氨酸水平的相关性研究*

张燕¹, 王伟红¹, 郝万鹏² (1. 乌鲁木齐市第一人民医院检验科, 乌鲁木齐 830011;
2. 乌鲁木齐市温泉康复医院, 乌鲁木齐 830017)

摘要:目的 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 变异的特征及对叶酸和同型半胱氨酸(Hcy)浓度的影响,并分析叶酸与 Hcy 的相关性。方法 采取病例与对照研究的方法,选取 110 例 MTHFR 基因 C677T 位点 TT 基因型为观察组,同时根据纳入标准选对照组 118 例。通过 PCR-金磁微粒层析法检测 MTHFR 基因多态性。采用电化学发光法测定血清中叶酸浓度,使用全自动生化分析,循环酸法检测血清中 Hcy。结果 乌鲁木齐地区汉族女性 MTHFR 位点 TT 基因型的频率为 24.5%。观察组叶酸均值为 $4.9 \pm 2.6 \mu\text{g/L}$, Hcy 均值为 $25.9 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$, 对照组叶酸与 Hcy 均值分别为 $15.5 \pm 1.9 \mu\text{g/L}$ 和 $10.5 \pm 1.8 \mu\text{mol/L}$, 两组比较,差异均有统计学意义($t=8.356, 9.835$, 均 $P<0.05$)。观察组不良妊娠结局发生频率为 19.1%, 对照组为 4.2%, 差异具有统计学意义($\chi^2=29.3, P=0.000$)。叶酸与 Hcy 呈负相关(回归方程: $Y=-0.785X+0.913, r=-0.859, P<0.05$)。结论 乌鲁木齐地区女性 MTHFR 位点 TT 基因型频率与文献报道一致。叶酸浓度降低,而 Hcy 浓度升高,两者关系呈负相关。女性在怀孕期需进行 MTHFR 基因多态性检测。

关键词:亚甲基四氢叶酸还原酶;基因;叶酸;同型半胱氨酸

中图分类号:Q754 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)05-098-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.05.024

Study on the Correlation between the Variation of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Folate and Homocysteine in Urumqi Han Women

ZHANG Yan¹, WANG Wei-hong¹, HAO Wan-peng²

(1. Department of Clinical Laboratory, Urumqi First People's Hospital, Urumqi 830011, China;

2. Urumqi Hot Spring Rehabilitation Hospital, Urumqi 830017, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation on the concentration of folate and homocysteine (Hcy), in addition, the correlation between folate and Hcy in TT genotypes with MTHFR polymorphism was also analyzed. **Methods** Total of 110 MTHFR C677 genotypes were selected as the observation group, and 118 were selected as the control group according to the inclusion criteria. The polymorphism of MTHFR gene was detected by PCR-gold magnetic particle chromatography. The concentration of folate in serum was determined by electrochemical luminescence method, and the serum Hcy was detected by automatic biochemical analysis and circulating acid method. **Results**

The TT genotype frequency of MTHFR loci was 24.5%. The mean value of folate in the observation groups was $4.9 \pm 2.6 \mu\text{g/L}$, the mean value of Hcy was $25.9 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$, and the mean value of folate in the control group were $15.5 \pm 1.9 \mu\text{g/L}$, and the mean value of Hcy in the control group were $10.5 \pm 1.8 \mu\text{mol/L}$. The difference between the two groups was statistically significant ($t=8.356, 9.835, P<0.005$). The frequency of adverse pregnancy in the observation group were 19.1%, the control group was 4.2%, the difference was statistically significant ($\chi^2=29.3, P=0.000$). Folate negatively correlated with Hcy (regression equation: $Y=-0.785X+0.913, r=-0.859, P<0.05$). **Conclusion** The TT genotype frequency of female MTHFR loci in Urumqi was consistent with literature report. There was a negative correlation between folate concentration and Hcy concentration. Female should be tested for MTHFR polymorphism during pregnancy.

Keywords: methylene tetrahydrofolate reductase; gene; folic acid; homocysteine

亚甲基四氢叶酸还原酶全称为 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR),为叶酸(folic)与同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢通路的关键酶,从而维持了血液中 Hcy 的浓度;另一方面还参与体内嘌呤、嘧啶的合成及 DNA, RNA 蛋白质的甲基化。MTHFR 基因位点发生突变,其变异直接影响酶

的活性,引起 MTHFR 酶活性下降,使 Hcy 向蛋氨酸的转化发生障碍,引起高同型半胱氨酸血症。影响叶酸的整个代谢过程。有学者研究报道,rs1801133(C677T)这个位点与人类疾病的关联更为紧密,这个位点的多态性在不同人群、不同种族中的分布不一致,在全球范围内的变异频率较高,不同地区有较大差异^[1-2]。还有文献报道,异常的

* 作者简介:张燕(1975-),女,大学本科,副主任检验师,研究方向:分子生物学, E-mail:1017537634@qq.com。

叶酸代谢可能导致引起高同型半胱氨酸血症,从而导致多种疾病的发生。产生胎盘毒性等机制导致不良妊娠结局(包括自然流产、早产、异位妊娠、胚胎停育、死胎、先天性心脏病、出生缺陷等)的发生。MTHFR 基因 C677T 多态性位点可能是导致不良妊娠高风险的因素之一^[3]。据此,本文利用 2018 年 1 月~2019 年 1 月来本院进行孕前或孕期体检的 MTHFR 位点 TT 基因型的育龄妇女作为观察组研究对象。另选择非 MTHFR 位点 TT 基因型者的健康育龄妇女作为对照组研究对象,两组研究对象皆在我院产科分娩。研究两组不良妊娠结局的发生频率,同时分析叶酸与 Hcy 两者浓度的变化及相关性,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 1 月~2019 年 1 月期间在我院进行孕前与孕期检查且在我院分娩的汉族育龄女性。选择观察组,排除不符合要求、籍贯非本市者,共 110 例,年龄在 20~35 岁,平均年龄 30.5 ± 5.1 岁。全部为 MTHFR C677T 位点 TT 基因型。对照组纳入标准:非 MTHFR C677T 位点 TT 基因型者,生育史正常,无不良妊娠史及家族性遗传病史,无甲亢及糖尿病等内分泌病史,新生儿健康。年龄在 19~34 岁之间,平均年龄 29.1 ± 4.1 岁,在年龄、血压、BMI 方面,差异无统计学意义($P > 0.05$)。在我院进行孕前与孕期检查且在我院分娩的汉族育龄女性 118 例。进行回顾性研究。

1.2 仪器与试剂 基因测定:PCR 基因扩增仪(苏州市天隆科技有限公司)。MTHFR C677T 基因检测试剂盒(西安金磁纳米生物技术有限公司)。Hcy 测定:全自动生化分析仪(罗氏公司 7600 型),试剂盒为北京九强科技有限公司产品。叶酸测定:化学发光分析仪(罗氏公司 E602 型),试剂盒为罗氏公司配套产品,批号 332978。

1.3 方法

1.3.1 样品收集:对所有受检查者空腹抽取外用静脉血 2 ml 于 EDTA 抗凝管,另取 5 ml 于分离胶采血管。

1.3.2 MTHFR C677T 基因检测:检测项目为 MTHFR C677T 位点。样品为收集的 2 ml EDTA 抗凝血,通过侧向层析技术实现 MTHFR C677T 基因多态性的检测。具体参数及操作方法参照 PCR 扩增仪及试剂盒说明书进行。

1.3.3 血清 Hcy 测定:将 5 ml 分离胶采血管离心分离血清,仪器使用罗氏 7600 全自动生化分析,试剂使用北京九强循环法试剂盒,按照仪器与试剂说明书操作步骤进行 Hcy 检测。Hcy 正常参考范

围为 $5 \sim 15 \mu\text{mol/L}$ 。

1.3.4 血清叶酸测定:将测定 Hcy 分离的血清,使用罗氏 E602 全自动化学发光分析仪,厂家配套试剂盒(批号 E602 号 332978),按照说明书进行操作,正常参考范围为 $7.5 \sim 20.1 \mu\text{g/L}$ 。

1.4 统计学分析 将两组所得的原始数据,使用 SPSS18.0 统计软件进行统计学处理,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用成组设计资料的 t 检验,计数资料采用例或百分率(n 或 $\%$)表示,采用卡方(χ^2)检验,计量与计数资料均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用 Pearson 相关分析变量间的相关性。

1.5 质量控制 所使用仪器每年进行一次计量检测,均须合格。所使用试剂均有注册证。Hcy 及叶酸测定参加了国家卫健委临床检验中心室内质评。测定样品时均做室内质控,在控时才可检测。

2 结果

2.1 MTHFR C677T 位点 TT 基因型 Hcy 与叶酸浓度 见表 1。MTHFR C677T 位点 TT 基因型者,叶酸浓度降低,Hcy 浓度升高,叶酸与 Hcy 浓度两组比较,差异均具有统计学意义($P = 0.000$)。

表 1 MTHFR C677T 位点 TT 基因型指标比较($\bar{x} \pm s$)

项 目	观察组($n=110$)	对照组($n=118$)	t 值	P 值
Hcy($\mu\text{mol/L}$)	25.9 ± 2.9	10.5 ± 1.8	9.835	0.000
叶酸($\mu\text{g/L}$)	4.9 ± 2.6	15.5 ± 1.9	8.356	0.000

2.2 MTHFR C677T 位点 TT 基因型不良妊娠结局者与正常人群的比较 在 110 例 TT 基因型观察组中,发生不良妊娠结局者 21 例,发生频率为 19.1%,而对照组 118 例中,发生不良妊娠结局者只有 5 例,发生频率 4.2%。两组数据经计数资料卡方检验,差异均有统计学意义($\chi^2 = 29.3$, $P = 0.000$),两组差异具有统计学意义,MTHFR C677T 位点 TT 基因型不良妊娠结局发生频率高于对照组。

2.3 Hcy 与叶酸的相关性 见图 1。对两组数据进行 Pearson 相关分析,结果显示 Hcy 与叶酸呈显著负相关,相关系数 $r = -0.859$,回归方程为: $Y = -0.785X + 0.913$ 。以叶酸为 Y 轴,以 Hcy 为 X 轴,做散点图,进行相关性分析,两组数据差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 MTHFR 基因分布频率及分布特点 乌鲁木齐地区育龄妇女 MTHFR C677T 位点 TT 基因型频率为 24.5%(110/449)。与相关文献报道^[4]的乌鲁木齐地区汉族女性 MTHFR C677T 纯合突变基因型频率 24.1%(52/216)相接近。高于惠州(10.9%,39/359),柳州(9.2%,24/260)等^[5,9]地区,差异有统计学意义($\chi^2 = 39.3$, 45.9, 均 $P =$

0.000);与银川(23.0%,102/443),延安(26.7%,403/1508),镇江(21.8%,630/2885)等^[6-8]地区比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.18$, $P=0.983$; $\chi^2=5.21$, $P=0.74$; $\chi^2=2.16$, $P=0.361$)。

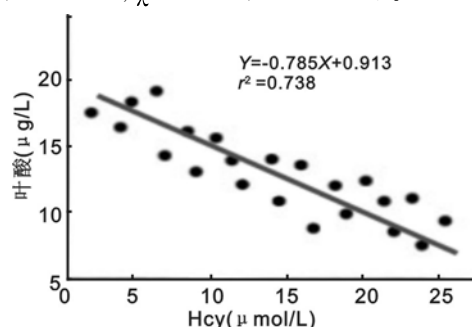


图1 Hcy与叶酸相关性散点图

3 讨论

3.1 MTHFR C677T 基因多态性是第 677 位点突变,它是目前发现最常见的基因突变位点,该位点的变化是碱基胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)置换,这种功能性的突变直接影响 MTHFR 酶的活性和耐热性。该位点突变有 3 种基因型:野生型 CC,杂合突变型 CT,纯合突变型 TT。TT 型的活性仅为 CC 型的 30%,加热 5 min 后,CT 型酶活性为 56%,而 TT 型酶活性仅为 22%,CC 型作为对照组剩余酶活性为 67%^[1]。中国汉族人群 C677T 的突变频率为 40%,MTHFR C677C 等位基因频率分布呈现地理梯度,突变频率随着纬度的增加先增加再减少。TT 型基因频率在南方地区为 6.6%,中部地区为 14.2%,北部地区为 21.3%,最北部地区为 15%。MTHFR 位点的多态性可能会引发孕妇妊娠高血压,而且与不明原因反复自然流产也有关(TT 型基因),也增加胎儿心脏畸形的发生率,同时增加伴随先天性心脏病的先天愚型(也称唐氏综合征)患儿的出生率。也是引起流产或使胎儿生长受限等的原因。由于与孕妇疾病及出生缺陷的相关性,MTHFR 位点已被列入计划生育常规体检项目,女性在怀孕期间最好进行“孕期叶酸需求”基因检测。

3.2 叶酸是合成核酸必不可少的元素之一,但是不能在人体内合成,因此必须从外界获取。叶酸代谢是一个复杂的生化过程。在叶酸代谢过程中,涉及到的一些酶具有多态性。由于个体遗传差异因素的存在,MTHFR 基因发生突变者,就导致对叶酸的利用率降低,使孕妇补充等量叶酸后,但是体内的叶酸活性存在差异。研究表明,MTHFR 基因多态性是叶酸代谢障碍发生的重要因素^[10]。

3.3 Hcy 是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中的一个中间产物,损伤血管内皮细胞。血清 Hcy 水平亦是心脑血管疾病的独立危险因素。高同型半胱氨酸血症严重影响血管增殖和相应的修复功能,从而引发孕妇体内胎儿发生血管病变和凝血系统障碍等,故必须保持体内 Hcy 浓度处于平衡状态。叶酸代谢相关酶活性正常,才能维持体内 Hcy 水平。

影响 Hcy 代谢的因素主要有环境和遗传两个方面。遗传因素方面,有文献报道,MTHFR 基因的 677 位点突变后,血清中 Hcy 浓度会显著升高。在 MTHFR 患者中,带有 TT 基因型的患者血清中 Hcy 浓度明显高于 CC 基因型患者。孕妇检测 MTHFR 基因 C677T 位点基因型,并结合血清 Hcy 浓度测定,有助于预防出生缺陷的发生。

参考文献:

- [1] 朱娟娟,唐吉斌,亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析的临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志,2018,10(6):361-366.
ZHU Juanjuan, TANG Jibin. Clinical application of polymorphism analysis in the methylenetetrahydrofolate reductase gene[J]. Journal of Molecular Diagnosis and Therapy, 2018, 10(6): 361-366.
- [2] 周佳菁,袁菁,韩峻松,等.亚甲基四氢叶酸还原酶多态性的临床应用研究进展[J]. 医学院述,2018,24(7):1266-1272.
ZHOU Jiajing, YUAN Qing, HAN Junsong, et al. Research progress in clinical application of MTHFR polymorphisms[J]. Medical Recapitulate, 2018, 24(7): 1266-1272.
- [3] 黄娟娟,岳红云,张娟. MTHFR(C677T, A1298C 和 G1793A)基因多态性对死胎的影响[J]. 现代检验医学杂志,2017,32(1):72-76.
HUANG Juanjuan, YUE Hongyun, ZHANG Juan. Effects of polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T, A1298C and G1793A) on stillbirth[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 72-76.
- [4] 郝友瑛,鲁衍强,李瑛,等.乌鲁木齐市汉族人群叶酸代谢通路关键酶基因 MTHFR, MTRR 单核苷酸多态性分布特征调查[J]. 中国妇幼保健,2016,31(18):3772-3775.
HAO Youying, LU Yanqiang, LI Ying. Investigation on distribution characteristics of single nucleotide polymorphisms of folic acid pathway key enzymes-MTHFR and MTRR genes among Han population in Urumqi[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2016, 31(18): 3772-3775.
- [5] 高利洁,鲁衍强,芮欣忆,等.惠州汉族女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成还原酶基因多态性分布[J]. 中山大学学报(医学科学版),2013,34(1):140-143.
GAO Lijie, LU Yanqiang, RUI Xinyi, et al. Polymorphism distribution of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase among the Han women in Huizhou[J]. Journal of Sun Yat-Sen University(Medical Science), 2013, 34(1): 140-143.
- [6] 刘晓玲,鲁衍强,李瑛,等.银川市汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性研究[J]. 宁夏医科大学学报,2014,36(11):1216-1219.
LIU Xiaoling, LU Yanqiang, LI Ying, et al. Polymorphisms of MTHFR and MTRR among the Han women in Yinchuan city[J]. Journal of Ningxia Medical University, 2014, 36(11): 1216-1219.

(下转 105 页)