

# MTHFR 基因及 PAI-1 基因多态性与复发性流产的相关性分析

詹乔乔, 何莲芝

( 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 妇产科, 安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶( MTHFR) 基因 C677T 的多态性及纤溶酶原激活抑制物( PAI-1) 基因 4G/5G 的多态性与复发性流产的相关性。方法: 采用原位杂交荧光染色分析技术检测 98 例有生育史的健康妇女和 120 例习惯性流产女性的 C677T 基因型和 4G/5G 基因型。结果: C677T 基因型包括 CC、CT 和 TT。病例组 TT 型阳性率是 34.2%。4G/5G 基因型包括 4G4G、4G5G 和 5G5G。病例组 4G5G 基因型阳性率是 40.8%。结论: MTHFR 基因 C677T 多态性及 PAI-1 基因 4G/5G 多态性与复发性流产密切相关。

**【关键词】**MTHFR 基因; PAI-1 基因; 复发性流产

**【中图分类号】**R 714.21 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2017.01.011

## Correlation analysis of MTHFR and PAI-1 polymorphisms with recurrent spontaneous abortion

ZHAN Qiaoqiao, HE Lianzhi

Department of Gynecology & Obstetrics, The first Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the association of MTHFR gene C677T and plasminogen activator inhibitor type 1 ( PAI-1) gene 4G/5G polymorphisms with recurrent spontaneous abortion. **Methods:** Fluorescence in situ hybridization( FISH) was used to detect the C677T and 4G/5G genotypes in 98 healthy women with fertility history and 120 women with recurrent spontaneous abortion. **Results:** Variant genotype of C677T consisted of CC, CT and TT and 4G/5G included 4G4G, 4G5G and 5G5G. The positive rate for TT was 34.2% and for 4G5G 40.8%, respectively, in women with recurrent spontaneous abortion. **Conclusion:** MTHFR gene C677T and PAI-1 4G/5G polymorphisms are strongly associated with recurrent spontaneous abortion.

**【Key words】** MTHFR gene; PAI-1 gene; recurrent spontaneous abortion

习惯性流产( habitual abortion, HA) 是指在 20 周之前自然流产 2 次或 2 次以上者, 也为复发性自然流产( recurrent spontaneous abortion, RSA), 是影响生育年龄夫妻的一个重要的临床问题<sup>[1]</sup>。RSA 使生育年龄夫妻承受着巨大的社会及心理压力<sup>[2-3]</sup>, 可能引起离婚及一系列的社会问题。妊娠期发生流产 1 次的概率为 15%~20%, 1%~5% 的孕妇出现 RSA。由于一些女性在意识到自己怀孕前就发生流产, 复发性流产的概率比实际报道的要高。除了已知的自身免疫因素、生殖系统畸形、双方染色体异常、男性精液异常等因素, 其中 40%~55% 的 RSA 目前尚无明确病因<sup>[4]</sup>。近年来, RSA 患者呈上升趋势, 本研究的目的在于发现不明原因复发性

流产与亚甲基四氢叶酸还原酶( 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 基因 C677T 多态性及纤溶酶原激活抑制物( plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 基因 4G/5G 多态性的关系, 为临床 RSA 的发生提供基础理论研究依据, 将来预测及预防 RSA 的发生。

### 1 资料与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 3 月~2016 年 3 月弋矶山医院妇科门诊、妇产科住院部及生殖医学中心就诊的 120 例习惯性流产患者作为病例组, 平均年龄( 29.2±5.5) 岁( 23~37 岁), 同期选取我院妇科住院部 98 例有正常生育史的健康女性为对照组, 平均

收稿日期: 2016-04-27

作者简介: 詹乔乔( 1991-), 女, 2014 级硕士研究生, ( 电话) 15805535046, ( 电子信箱) 690124059@qq.com;

何莲芝, 女, 主任医师, 硕士生导师, ( 电子信箱) 429094335@qq.com, 通信作者。

年龄(27.4±6.8)岁(22~38岁)。所有研究对象均为随机选择,且签署知情同意书并得到医院道德伦理委员会的批准。

1.2 纳入及排除标准 ①全部研究对象均排除内科及内分泌系统疾病;②流产原因明确与女性生殖系统畸形无关(如子宫过小、宫腔粘连、鞍状子宫等子宫发育异常);③怀孕期间无大量饮用酒精类饮品、含咖啡因类食品、剧烈运动等严重不良嗜好、不良生活习惯等;④男方精液常规及夫妻双方染色体等无异常;⑤TORCH(-)、生殖抗体检测等无异常。

1.3 方法

1.3.1 血标本 采集患者外周静脉血2~3 mL装于乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na)抗凝采血真空管中。

1.3.2 实验试剂及器材 L998A 荧光检测仪购买自西安天隆科技有限公司;微型高速离心机购买自杭州奥盛仪器有限公司;氯化铵溶液购买自北京华夏时代基因科技发展有限公司;PHARM-GENE01SNP 分析保存液购买自北京华夏时代基因科技发展有限公司,主要成分:50 μL 60%聚乙二醇200 40 μL 氢氧化钾(终浓度20 mmol/L)和去离子水;PHARM-GENE200SNP 分析样品处理试剂购买自北京华夏时代基因科技发展有限公司,15 μL 主要成分:1 μL Tris.HCl(终浓度20 mmol/L),3 μL KCl(终浓度50 mmol/L),3 μL MgCl<sub>2</sub>(终浓度1.5 mmol/L),1 μL 0.1%吐温20,2 μL 0.01%BSA,1.5 μL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(终浓度5 mmol/L),Oligonucleotides, KOD,1 μL dNTPs(终浓度200 μmol/L)。

1.3.3 实验方法 氯化铵溶液与灭菌注射用水按照1:9比例稀释作为工作液;在1.5 mL离心管中加入1 mL工作液,取150 μL混匀的待检血液标本加入离心管中,颠倒混匀,室温静置5 min;样本放入离心机,3000 r/min离心5 min;取出离心管,吸去上清,在离心管底部获得富集的白细胞沉淀;在离心管中加入100 μL 耀金保,反复吹打混匀,室温下静置30 min,得到白细胞保存液;吸取1.5 μL 白细胞保存液加入相应耀金分中,完成后盖紧管盖,置入荧光检测仪;采用荧光染色原位杂交及染色体核型分析系统自动判读荧光信号值,获取荧光曲线图,进行MTHFR677C>T,PAI14G5G基因分型,并作阳性质控<sup>[5]</sup>。

1.4 统计学处理 所有数据均采用SPSS 18.0进行统计学分析。两组基因型频数比较采用χ<sup>2</sup>检验;两组纯合子及杂合子基因型、等位基因频数之间的比较采用χ<sup>2</sup>检验、OR及CI。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 MTHFR 基因型频率及等位基因频率分析

复发性流产组 MTHFR 基因 C677T 突变基因型明显高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),其中TT基因型频率(34.2%)高于对照组(11.2%),TT与CC基因型频率比较(χ<sup>2</sup>=23.789,P<0.05,OR=6.613,95%CI:2.978~14.681)差异有统计学意义。CT基因频率(40%)高于对照组(32.7%),差异有统计学意义(P<0.05)。CT与CC基因型频率比较差异有统计学意义(χ<sup>2</sup>=9.534,P=0.010,OR=2.661,95%CI:1.421~4.985)。复发性流产组总突变T等位基因频率(54.2%)高于正常对照组(27.6%),差异有统计学意义(χ<sup>2</sup>=31.334,P<0.05,OR=3.108,95%CI:2.076~4.652),详见表1、2。

表1 两组 C677T 和 4G/5G 基因型频率分布 n(%)

分组	C677T 基因型			PAI-1 基因型		
	CC	CT	TT	5G5G	4G5G	4G4G
病例组	31(25.8)	48(40.0)	41(34.2)	30(25.0)	49(40.8)	41(34.2)
对照组	55(56.1)	32(32.7)	11(11.2)	45(45.9)	23(23.5)	30(30.6)
χ <sup>2</sup> 值	25.242			28.028		
P 值	<0.01			<0.01		

表2 两组 C677T 和 4G/5G 等位基因频率分布 n(%)

分组	C677T 等位基因		4G/5G 等位基因	
	C	T	4G	5G
病例组	110(45.8)	130(54.2)	109(45.4)	131(54.6)
对照组	142(72.4)	54(27.6)	113(57.7)	83(42.3)
χ <sup>2</sup> 值	31.334		6.464	
P 值	<0.01		<0.05	
OR	3.108		1.636	
CI	2.076~4.652		1.118~2.394	

2.2 两组 PAI-1 基因型频率及等位基因频率分析

复发性流产组 PAI-1 基因 4G/5G 突变基因型高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。其中4G4G基因型频率(34.2%)高于对照组(30.6%),4G4G与5G5G基因型频率比较差异有统计学意义(χ<sup>2</sup>=4.598,P=0.032,OR=2.050,95%CI:1.060~3.965);4G5G基因型频率(40.8%)高于对照组(23.5%),4G5G与5G5G基因型频率比较差异有统计学意义(χ<sup>2</sup>=11.631,P=0.010,OR=3.196,95%CI:1.623~6.291),复发性流产组总突变4G等位基因频率(54.6%)高于正常对照组(42.3%),差

异有统计学意义(  $\chi^2 = 6.646$  ,  $P = 0.011$  ,  $OR = 1.636$  ,  $95\% CI: 1.118 \sim 2.394$  )。详见表 1、2。

### 3 讨论

尽管已有文献报道 MTHFR 基因有几个突变位点,但 C677T 和 A1298C 突变仍是其最常见的突变<sup>[6]</sup>。MTHFR 是机体代谢过程中的一个关键酶,可将同型半胱氨酸转变成蛋氨酸,S-腺苷蛋氨酸是 DNA 甲基化的重要的甲基供体<sup>[7]</sup>。而 DNA 甲基化则在基因表达过程中扮演重要角色。当该酶活性异常时,可影响血管形成及胚胎的生长发育。已有报道指出,在正常怀孕前三个月胚胎处于低同型半胱氨酸及高叶酸、高蛋白的状态。MTHFR 的催化作用可使 5,10-亚甲基四氢叶酸还原成 5-甲基四氢叶酸,5-甲基四氢叶酸再催化高同型半胱氨酸成蛋氨酸。MTHFR 基因 C677T 多态性可影响酶的活性,CT 型携带者较 CC 型有 65% 的酶活性,而 TT 基因型携带者较 CC 型只有 30% 的酶活性。有学者<sup>[8]</sup>对 2427 例复发性流产患者组及 3118 例正常组的对比研究中发现 TT 基因纯合子患者可增加 RSA 的风险,但对于 3 次及 3 次以上复发性流产患者,除了 TT 型纯合子携带者可增加流产率,CT+CC 型与流产率无明显关系。Nair<sup>[9]</sup>研究发现 T 等位基因与不明原因复发性流产的关系显著。有资料显示,高同型半胱氨酸对胚胎的毒性作用远大于其对细胞甲基化的影响,而且高半胱氨酸通过循环单核细胞诱导组织因子的表达导致血栓的形成,引发体内的凝血机制,进而引起胎盘血栓栓塞导致流产。并且,高同型半胱氨酸通过促进白细胞聚集影响内皮细胞的作用,使机体处于高氧化应激状态,影响 RSA 患者的妊娠结局。金华<sup>[10]</sup>对 84 例不良妊娠结局的妇女的研究也发现,较 C677T 的 CC 型相比,CT 型、TT 型和 CT + TT 型会增加发生不良妊娠的风险。本研究同样支持该论点,CT 型及 TT 型患者较正常对照组妇女发生习惯性流产的几率分别增加 1.5 倍及 4 倍。

怀孕期间是一个高凝状态,但如果怀孕被血栓形成所影响,则怀孕的高凝状态越发严重,而且可能损害静脉的血液流动,导致深静脉血栓形成、胎盘血栓形成,引起胎儿生长受限或者胎儿死亡,最终引发流产。由于血栓形成对复发性流产的影响,抗凝剂用于治疗复发性流产越来越广泛。纤溶酶原激活物属于丝氨酸蛋白酶,在酶级联反应中将血纤溶酶原催化成纤溶酶。PAI-1 位于 7 号染色体的长臂,由 8 个内含子及 9 个外显子组成,其是在滋养层入侵,是

孕产妇组织重构过程中控制蛋白质水解的关键酶。当该基因位点突变时,纤溶酶原激活物(PA)与 PAI 的动态平衡即被打破,PAI-1 通过与 PA 结合形成稳定、没有活性的复合物,高浓度的 PAI-1 通过纤维蛋白溶解凝固而导致血栓形成<sup>[11-12]</sup>,可引起胎盘损害和血栓并发症的形成<sup>[13]</sup>。PAI-1 基因启动区域 4G 等位基因的纯合型和 PAI-1 基因的转录有关,可增加该基因的表达。4G4G 纯合子基因携带者体内 PAI-1 浓度最高,4G5G 杂合子基因携带者次之,5G5G 型体内 PAI-1 浓度最低。Patil<sup>[14]</sup>发现 PAI-1 4G/5G 纯合子突变与复发性流产相关性最高,王晓慧<sup>[15]</sup>发现 4G/5G 多态性与 RSA 的风险增加有关,其中 4G 突变是引发 RSA 的主导因素。本实验结果也发现 4G4G 型及 4G5G 型携带者发生习惯性流产的概率均高于正常对照组,更加支持 4G 突变是不明原因 RSA 的高危因素之一。

对于不明原因复发性流产基因多态性的研究分析应在不同地域、不同种族、不同人群中展开全面调查,这些研究结果可以帮助临床医生制定更好的治疗策略。本文研究中发现 MTHFR T 等位基因及 PAI-1 4G 等位基因在复发性流产的患者中突变率较高,提示这两种突变等位基因是不明原因复发性流产的潜在危险因素之一。那么在怀孕前期及怀孕早期是否可以适当服用叶酸及阿司匹林来预防血栓形成的可能性,降低因 MTHFR 基因及 PAI-1 基因位点突变引发流产的风险,这一观点仍然需要大量的临床试验研究来证实。

### 【参考文献】

- [1] 李晓英,陈丽娟,郭惠萍,等.叶酸代谢酶基因多态性与反复自然性流产易感性的研究[J].当代医学,2015,21(33):1-3.
- [2] BAVANDEN A.The psychological and social consequences of miscarriage[J].Expert review,2011,6(3):295-304.
- [3] YUMI N,TATSUO A,MAYUMI SO.Cognitive behavior therapy for psychological distress in patients with recurrent miscarriage[J].Psychology Research and Behavior Management,2013,6:37-43.
- [4] VANDENBERG MM,VISSENBERG RM.Recurrent miscarriage clinics[J].Obstet Gynecol Clin North Am,2014,41(1):145-155.
- [5] 王华先.荧光原位杂交技术及染色体核型分析在产前诊断中的应用价值[J].中国实用医药,2015,10(12):93-95.
- [6] CHAITHRA PT,MALINI SS,KUMAR CS.An Overview of Genetic and Molecular Factors Responsible for Recurrent Pregnancy Loss[J].Int J Hum Genet,2011,11(4):217-225.
- [7] CAI D,NING L,PAN C,et al.Association of polymorphisms in folate metabolic genes and prostate Cancer risk: a case-control study in a Chinese population[J].J Genet,2010,89(2):263-267.

• 临床医学 •

文章编号: 1002-0217( 2017) 01-0041-03

## 8-OHdG、8-isoPGF 2 $\alpha$ 在预测孕妇早产中的意义

刘柯伶, 王莉, 翁铭娜

( 深圳市宝安区人民医院 产科 广东 深圳 518101)

**【摘要】**目的: 探讨氧化应激指标 8-OHdG、8-isoPGF 2 $\alpha$  在不同样本来源早产孕妇中的表达及意义。方法: 测定病例组与对照组产前及产后尿液、分娩前外周静脉血、分娩时羊水和脐血中 8-OHdG 和 8-isoPGF 2 $\alpha$  的水平, 用统计学方法分析, 找出其相关规律。结果: 病例组不同样本来源 8-OHdG 和 8-isoPGF 2 $\alpha$  的水平均高于对照组水平(  $P$  均 $<0.05$ ); 病例组组 1、组 2、组 3 之间产前产后尿液、静脉血羊水及脐血中的 8-OHdG 和 8-isoPGF 2 $\alpha$  水平均无统计学差异(  $P>0.05$  )。结论: 氧化应激指标( 8-OHdG、8-isoPGF 2 $\alpha$  ) 可作为预测早产的诊断指标之一。

**【关键词】**氧化应激; 早产; 8-羟基脱氧鸟苷; 8-异前列腺素

**【中图分类号】**R 363; R 714.2 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2017.01.012

## Significance of 8-OHdG and 8-isoPGF 2 $\alpha$ in predicting preterm delivery

LIU Keling, WANG Li, WENG Mingna

Department of Obstetrics, Baoan District People's Hospital, Shenzhen 518101, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the expression and significance of oxidative stress indicator 8-OHdG and 8-isoPGF 2 $\alpha$  in different samples from women with preterm delivery. **Methods:** The pregnant women were initially divided into case group( including group 1, 2 and 3) and control group and received measurement of 8-OHdG and 8-isoPGF 2 $\alpha$  levels in the samples respectively obtained from the urine before and after delivery, peripheral venous blood before delivery, amniotic fluid during delivery and umbilical cord blood. Statistics was performed to identify the association of the two markers with preterm delivery. **Results:** The three case group had significantly higher levels of 8-OHdG and 8-isoPGF 2 $\alpha$  than the control group(  $P<0.05$  ) yet the three case groups remained no significant difference concerning the levels of 8-OHdG and 8-isoPGF 2 $\alpha$  in the urine collected before and post delivery as well as venous blood, amniotic fluid and umbilical cord blood(  $P>0.05$  ). **Conclusion:** Both 8-OHdG and 8-isoPGF 2 $\alpha$  level can serve as one of the predictors for preterm delivery.

**【Key words】**oxidative stress; preterm birth; 8-OHdG; 8-isoPGF 2 $\alpha$

基金项目: 深圳市宝安区科技技术项目( 2015056)

收稿日期: 2016-03-21

作者简介: 刘柯伶( 1982-), 女, 主治医师, 硕士。( 电话) 15817402722 ( 电子信箱) callingliu2004@126.com。

- [8] 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.
- [9] NAIR RR, KHANNA A, AINGH. MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population [J]. *Reprod Sci* 2012, 19( 2) : 210-215.
- [10] 金华, 蔡艳, 赵燕, 等. MTHFR 基因多态性与不良妊娠的相关性研究 [J]. *中国妇幼保健* 2014, 29( 18) : 2929-2932.
- [11] CHEN H, NIE S, LU M. Association between plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2015, 73( 4) : 292-300.
- [12] ARABI M, MEMARIANI T, AREFI S, *et al.* Polymorphisms of plasminogen activator inhibitor-1, angiotensin converting enzyme and coagulation factor XIII genes in patients with recurrent spontaneous abortion [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2011, 24( 3) : 545-548.
- [13] COULAM CB, WALLIS D, WEINSTEIN J, *et al.* Comparison of thrombophilic gene mutations among patients experiencing recurrent miscarriage and deep vein thrombosis [J]. *Am J Reprod Immunol* 2008, 60: 426-431.
- [14] PATIL R, GHOSH K, VORA S, *et al.* Inherited and acquired thrombophilia in Indian women experiencing unexplained recurrent pregnancy loss [J]. *Blood Cells Mol Dis* 2015, 55( 3) : 200-205.
- [15] 王晓慧, 姜文洁, 张东峰, 等. PAI-1 基因 4G/5G 多态性与中国地区原因不明习惯性流产的 Meta 分析 [J]. *现代生物医学进展* 2013, 13( 16) : 3029-3031.