

· 论 著 ·

育龄女性 MTHFR 基因多态性与叶酸浓度的关系研究*

杨丰美¹, 迟玉君², 张丽萍^{1△}

(1. 湖北医药学院附属太和医院妇产科, 湖北十堰 442000; 2. 江苏省泰州市姜堰区太宇医院检验科 225500)

摘要:目的 通过对孕期育龄女性叶酸代谢关键酶 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T 的基因多态性检测, 分析 MTHFR C677T 基因多态性与外周血红细胞中叶酸浓度之间的关系。方法 收集孕期育龄女性 100 例, 采用基因芯片法检测外周血红细胞中 MTHFR C677T 的基因多态性, 并对所有研究对象中的育龄女性给予口服 800 $\mu\text{g}/\text{d}$ 叶酸 1 个月, 抽取口服叶酸前后 EDTA 抗凝血各 5 mL, 化学发光法检测口服叶酸前后不同基因型女性外周血细胞中叶酸浓度的变化。结果 100 例育龄妇女 MTHFR C677T 基因 CC 型、CT 型、TT 型的检出频率分别为 26%、54%、20%; CC 型受试者口服叶酸前后平均红细胞叶酸浓度之间差异无统计学意义($P>0.05$), CT 型和 TT 型受试者口服叶酸后红细胞叶酸浓度较口服前升高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 外周血中 MTHFR C677T 基因分型可以影响细胞内叶酸的浓度, 口服叶酸可以提高育龄女性红细胞内叶酸浓度。

关键词: 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性; 育龄女性; 叶酸

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.008 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2016)14-1924-03

Study on the relationship between the MTHFR gene polymorphism of fertile women and the concentration of folic acid*

YANG Fengmei¹, CHI Yujun², ZHANG Liping^{1△}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Taihe Hospital Affiliated of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Taiyu Hospital of Jiangyan District, Taizhou, Jiangsu 225500, China)

Abstract: Objective To explore the correlation of MTHFR C677T gene polymorphism and the concentrations of folic acid in fertile women. Methods Gene chip method was used to examine the polymorphism, and all the women were given oral administration of folic acid 800 $\mu\text{g}/\text{d}$ for one month. 5 mL anticoagulant blood from the fertile women were detected before and after giving the oral folic acid. And the level of folic acid in peripheral blood was analyzed by chemiluminescence. Results The detection rate of gene polymorphism of CC, CT and TT were 26%, 54% and 20%, respectively. The levels of folic acid in peripheral blood of CC genotype groups before and after giving the oral folic acid had no significant differences ($P>0.05$), and the rates in CT and TT genotype groups after giving the oral folic acid were significantly higher than before ($P<0.05$). Conclusion MTHFR C677T genotypes can affect the concentration of folic acid in peripheral blood. And oral folic acid can improve the concentration of folic acid in peripheral blood in fertile women.

Key words: MTHFR; gene polymorphism; fertile women; folic acid

出生缺陷在我国比较常见, 总发病率为 5.6%^[1], 出生缺陷的围生儿给社会和家庭带来了沉重的负担。育龄女性体内的叶酸不能被机体有效利用或者摄入不足, 均可导致新生儿出生缺陷的发生。叶酸的吸收或代谢障碍可以导致多种出生缺陷性疾病的发生, 如神经管畸形、先天性心脏病、唇腭裂等^[2], 以神经管畸形最为常见。5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶 MTHFR 是叶酸代谢过程中的关键酶, 该基因的突变可以导致摄入的叶酸代谢及利用途径障碍, 进而增加神经管缺陷的发生^[3]。其中 MTHFR 最常见的基因突变是 677 位核苷酸突变为 CC、CT、TT 三种。杂合型 CT 突变和纯合型 TT 突变均可以导致 MTHFR 酶活性的降低, 进而增加出生缺陷性疾病的发生率。本研究采用基因芯片法检测育龄女性 MTHFR C677T 等位基因的突变, 分析不同 MTHFR 基因型与红细胞中叶酸浓度的关系, 为育龄女性的叶酸补充提供个体化的指导建议。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2014 年 5 月至 2015 年 4 月门诊接待的孕期育龄女性 100 例, 研究对象的纳入标准: 夫妻双方无家族性遗传病史, 无急慢性疾病, 无血液系统或免疫系统疾病, 同意进行叶酸及基因多态性检测。取得其书面知情同意后, 采集其血液标本, 并给予口服叶酸治疗。研究对象平均年龄 (26.5 \pm 4.9) 岁。均统一口服叶酸(爱乐维复合维生素片, 德国拜耳) 800 $\mu\text{g}/\text{d}$, 连续 1 个月。

1.2 叶酸治疗 根据基因检测结果, 将研究对象分为 CC 组、CT 组和 TT 组。所有育龄女性给予 800 $\mu\text{g}/\text{d}$ 剂量叶酸口服 1 个月。抽取口服叶酸前及口服叶酸 1 个月以后空腹外周 EDTA-K₂ 抗凝血 5 mL 用于检测叶酸浓度。

1.3 试剂与仪器 全血 DNA 提取试剂盒(北京天根); ND-2000 微量核酸定量仪(Thermo 公司); PE7500 扩增仪(ABI);

* 基金项目: 太和医院院级项目资助(2014JJXM019)。

作者简介: 杨丰美, 女, 主治医师, 主要从事优生优育方面的研究。△ 通讯作者, E-mail: 1057986223@qq.com。

ADVIA Centaur XP 全自动化学发光仪(西门子);基因芯片仪、芯片识读仪(上海百傲);叶酸浓度检测试剂盒(山东鑫科)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 叶酸浓度 空腹抽取 100 名育龄女性口服叶酸前及口服叶酸 1 个月后外周 EDTA-K₂ 抗凝血 5 mL,在全自动化学发光仪上检测每位育龄女性外周血中的叶酸浓度。叶酸检测标准品由厂家提供,所有检测及定标均按照操作说明书严格执行,并在试剂有效期内使用。

1.3.2 MTHFR C677T 等位基因 空腹抽取 100 名育龄女性口服叶酸前及口服叶酸 1 个月后外周 EDTA-K₂ 抗凝血 2 mL,按照核酸提取试剂盒操作说明提取核酸。提取后的核酸进行 PCR 扩增或者 -80 °C 保存备用。PCR 扩增条件:50 °C 5 min;94 °C 5 min;94 °C 25 s,72 °C 25 s,35 个循环;72 °C 5 min。对上述 PCR 产物进行杂交,杂交体系及杂交条件参照说明书进行。杂交结束后,将芯片放置于芯片识读仪中对结果进行扫描判定。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 统计学软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTHFR C677T 基因多态性分析 本组 100 例中,MTHFR C677T 基因 CC 型、CT 型、TT 型的检出频率分别为 26%、54%、20%,等位基因频率 C 为 53%、T 为 47%。各基因型(CC 型、CT 型、TT 型)的判读结果如图 1 所示。

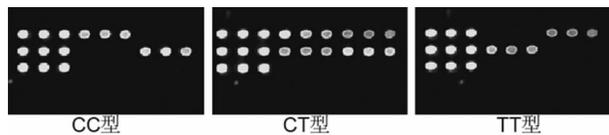


图 1 MTHFR C677T 基因多态性判读结果

2.2 口服叶酸前后叶酸浓度的变化 结果显示,CC 型受试者口服叶酸前后平均红细胞叶酸浓度之间差异无统计学意义($P > 0.05$),CT 型和 TT 型受试者口服叶酸后平均红细胞叶酸浓度较口服前高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 不同基因型受试者口服叶酸前后叶酸浓度的变化(nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

基因型	口服前	口服后
CC	278.7 ± 49.0	293.5 ± 50.0
CT	263.1 ± 47.6	312.7 ± 47.1*
TT	235.5 ± 50.8	330.9 ± 48.4*

注:与口服前比较,* $P < 0.01$ 。

3 讨论

新生儿出生缺陷是一个全球性问题,尤其在发展中国家,叶酸的摄入和代谢障碍是导致出生缺陷的重要原因之一^[4]。叶酸是一种水溶性的 B 族维生素,吸收的叶酸以 N5-甲基四氢叶酸的形式存在于血液中,和白蛋白疏松结合运输,通过叶酸受体被摄入细胞内,在维生素 B₁₂ 依赖的蛋氨酸合成酶作用下形成四氢叶酸而发挥作用。5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶 MTHFR 是叶酸代谢过程中的关键酶,在叶酸代谢过程中起到重要作用。研究表明 MTHFR 677 位点的基因多态性可以影

响到该酶的活性,引起叶酸代谢途径障碍,增加一系列出生缺陷(唇腭裂、先天性心脏病以及神经管畸形)的发病率^[5-7]。由于 MTHFR 基因分型的变化,会导致育龄女性体内叶酸浓度的变化,进而影响机体叶酸的代谢。所以通过检测 MTHFR 基因的多态性,可以为育龄女性个体化摄入叶酸提供一定的理论指导依据^[8]。

微阵列技术就是利用分子杂交原理,使同时被比较的标本(用同位素或荧光素标记)与微阵列杂交,并包被于芯片上,每张芯片上均标记有阳性对照探针、阴性对照探针以及空白对照^[9]。通过检测包被芯片杂交信号强度及数据处理,用一种直观图像反映出基因多态性的分型,如阳性对照探针显色,阴性对照及空白对照探针不显色表明实验成功。此方法常常用于遗传性基因多态性的分析。本研究采用 DNA 微阵列芯片法检测育龄女性外周血中 MTHFR 基因多态性发现,MTHFR C677T 基因 CC 型、CT 型、TT 型的检出频率分别为 26%、54%、20%,采用此方法可以很好的检出 MTHFR C677T 基因多态性分型。由于基因多态性与遗传性、地域性以及民族性有很大关系,并且我国的 MTHFR C677T 纯合突变的 TT 型有着北高南低的趋势,并且这种趋势差异与我国的神经管缺陷的北高南低趋势一致^[10-11],因此对育龄女性进行 MTHFR 基因多态性的检测对本地区的本地区的新生儿神经管缺陷有一定的预防作用。

MTHFR 是叶酸依赖性酶,具有遗传多态性,其中 677C > T 突变最为常见。MTHFR 酶缺陷及叶酸缺乏可以使胚胎发育所必需的 DNA 和蛋白质的甲基化不足,易引起基因突变,导致胎儿畸形或胚胎发育停止^[12]。董素芹等^[13]采用单因素分析及 MTHFR 基因型进行多元回归发现,在控制其他干扰因素后,叶酸浓度、TT 型仍具有相关性,表明红细胞叶酸浓度、TT 型是不明原因重复性自然流产发病的独立预测因素。MTHFR 基因 677C > T 位点发生突变,可以导致其编码的蛋白质氨基酸序列的改变,进而使得酶热稳定性和活性降低。据报道纯合子突变型(677TT)酶活性只有体外野生型(677CC)活性的 30%,而杂合突变(677CT)有正常酶活性的 65%^[14]。所以补充叶酸能降低维生素 K 依赖的凝血因子的水平,从而降低妊娠期胎盘血管血栓性病变的危险性,起到保护作用。

本研究对育龄女性口服叶酸后,检测口服前后叶酸浓度的变化发现,CC 型受试者口服叶酸前后平均红细胞叶酸浓度变化不明显,而 CT 型和 TT 型受试者口服叶酸前叶酸浓度相对较低,口服 800 μg/d 的叶酸后,可以维持红细胞内较高的叶酸浓度,对于降低新生儿出生缺陷有一定预防作用,这与国内张洁琼等^[15]的研究一致。这种 800 μg/d 的增补叶酸对于维持突变型女性体内叶酸代谢途径平衡有着重要意义。

综上所述,通过检测本地区 100 名育龄女性 MTHFR C677T 基因多态性,可以对不同基因型的育龄女性因地制宜地制定个体化的叶酸增补方案,对降低婴幼儿出生缺陷率有一定的预防指导意义。但还需要加大样本量,进一步了解本地区育龄女性 MTHFR 基因的遗传特征,进而制定合理的预防措施。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 中国出生缺陷防治报告(2012)

- [J]. 中国药房, 2012, 23(39): 3693.
- [2] 张海洋, 张金华, 张会敏, 等. MTHFR 基因多态性与脑卒中的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(4): 690-691.
- [3] Weiner AS, Boyarskikh UA, Voronina EN, et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level[J]. Gene, 2014, 533(1): 168-172.
- [4] 何俊琳, 刘学庆, 高茹菲, 等. 重庆市主城区早孕期妇女叶酸与出生缺陷预防认知调查[J]. 重庆医学, 2009, 38(15): 1849-1851.
- [5] Yasar A, Gunduz K, Onur E, et al. Serum homocysteine, vitamin B₁₂, folic acid levels and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism in vitiligo[J]. Dis Markers, 2012, 33(2): 85-89.
- [6] Wang SM, Wang JH, Yu JC, et al. Association between parental MTHFR gene polymorphism 677C/T and non-syndromic cleft lip and palate in offspring[J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2012, 29(4): 464-467.
- [7] Chorna LB, Akopian HR, Makukh HV, et al. Allelic polymorphism of MTHFR, MTR and MTRR genes in patients with cleft lip and/or palate and their mothers[J]. Tsitol Genet, 2011, 45(3): 51-56.
- [8] 赵如冰, 刁京晶, 朱文丽, 等. MTHFR 基因多态性与非综合征性唇腭裂的遗传易感性[J]. 中华疾病控制杂志, 2003, 7(1): 11-13.
- [9] 洗业星, 何文茵, 王维华, 等. 微阵列技术在植入前遗传学筛查领域中的应用[J]. 生殖与避孕, 2014, 34(9): 759-764.
- [10] 罗秀莉, 鲁衍强, 郭文竹, 等. 湖北松滋市汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分布[J]. 公共卫生与预防医学, 2014, 25(2): 29-32.
- [11] 张艳丽, 李华锋, 付广照, 等. 临沂地区汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2013, 35(6): 401-404.
- [12] 郝玲, 刘明珠, 血浆同型半胱氨酸与叶酸、维生素 B₁₂ 及还原酶的关系[J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34(1): 22-24.
- [13] 董素芹, 管立学, 杜欣莹, 等. 红细胞叶酸水平及 MTHFR 基因多态性与不明原因重复性自然流产的关系[J]. 中华围产医学杂志, 2006, 9(5): 315-319.
- [14] Kim SJ, Lee BH, Kim YM, et al. Congenital MTHFR deficiency causing early-onset cerebral stroke in a case homozygous for MTHFR thermolabile variant[J]. Metab Brain Dis, 2013, 23(9): 23-29.
- [15] 张洁琼, 徐东萍. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与先天性神经管缺陷的相关性研究[J]. 中国现代医生, 2014, 52(13): 16-18.

(收稿日期: 2016-01-25 修回日期: 2016-04-03)

(上接第 1923 页)

- 监测及诊断中的应用观察[J]. 临床内科杂志, 2013, 30(6): 384-386.
- [4] Koga M, Murai J, Saito H, et al. Glycated albumin levels are higher relative to glycated haemoglobin levels in gastrectomized subjects[J]. Ann Clin Biochem, 2010, 47(Pt 1): 39-43.
- [5] Koga M, Murai J, Saito H, et al. Glycated albumin and glycated hemoglobin are influenced differently by endogenous insulin secretion in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2010, 33(2): 270-272.
- [6] Hashimoto K, Tanikawa K, Nishikawa J, et al. Association of variation range in glycated albumin (ga) with increase but not decrease in plasma glucose: implication for the mechanism by which ga reflects glycemic excursion[J]. Clin Biochem, 2015, 48(6): 397-400.
- [7] Saisho Y, Tanaka K, Abe T, et al. Glycated albumin to glycated hemoglobin ratio reflects postprandial glucose excursion and relates to beta cell function in both type 1 and type 2 diabetes[J]. Diabetology International, 2011, 2(3): 146-153.
- [8] Kim D, Kim KJ, Huh JH, et al. The ratio of glycated albumin to glycated haemoglobin correlates with insulin secretory function[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2012, 77(5): 679-683.
- [9] Takahashi S, Uchino H, Shimizu T, et al. Comparison of glycated albumin (ga) and glycated hemoglobin (hba1c) in type 2 diabetic patients: usefulness of ga for evaluation of short-term changes in glycemic control[J]. Endocr J, 2007, 54(1): 139-144.
- [10] 王菊英, 姚琳芳, 周立荣, 等. FPG、GA、HbA1c 及 GA/HbA1c 比值在 T1DM/T2DM 中的诊疗价值[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(11): 1536-1540.
- [11] 周国用, 向日晖, 秦艳东, 等. 二甲双胍联合甘精胰岛素治疗 2 型糖尿病的临床分析[J]. 中国实用医药, 2013, 8(28): 58-59.
- [12] 王昕, 陈秋, 吕肖锋, 等. 瑞格列奈盐酸二甲双胍复方片治疗 2 型糖尿病的有效性及其安全性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(11): 954-959.

(收稿日期: 2016-01-29 修回日期: 2016-04-07)