

不同地区妊娠期女性叶酸代谢障碍风险及其相关基因多态性的研究

王 玲 梁 雄

摘 要 **目的** 通过对妊娠期女性叶酸代谢基因多态性的检测,研究 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 基因位点变异的地域差异性。**方法** 选择 2018 年 1 月 1 日~2019 年 10 月 30 日在珠海市人民医院进行产前检查的妊娠期女性 1415 例,根据研究对象籍贯,将其分为南部地区(广东省、广西壮族自治区、湖南省)、中部地区(安徽省、湖北省、江西省、河南省)、北部地区(河北省、山东省、黑龙江省、辽宁省、吉林省)3 组,采集研究对象口腔黏膜上皮细胞,用荧光定量 PCR 进行亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C667T、A1298C 位点和甲硫氨酸合酶还原酶(MTRR) A66G 位点的基因型的检测,比较基因多态性以及叶酸代谢障碍风险度在不同地域之间的差异。**结果** MTHFR 基因 C667T、A1298C 位点的基因型和等位基因频率在南部、中部及北部地区不同,差异有统计学意义($P < 0.05$), MTRR A66G AG、CG 型在 3 地区构成比较差异无统计学意义($P > 0.05$);南部地区、中部地区和北部地区叶酸代谢障碍高风险的人群比例分别为 11.80%、25.16% 和 38.23%,差异有统计学意义($P < 0.01$),无风险人群比例分别为 44.00%、32.90% 和 27.11%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 妊娠期女性的叶酸基因多态性在南部、中部、北部地区有差异,叶酸代谢障碍风险有明显的地域差异,呈北高南低的趋势。

关键词 叶酸代谢 基因多态性 妊娠期女性 地域差异

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.07.025

Risk of Folate Metabolism and Related Gene Polymorphism in Pregnant Women in Different Regions. Wang Ling, Liang Xiong. Department of Obstetrics, Zhuhai People's Hospital, Guangdong 519000, China

Abstract Objective Through the detection of polymorphism of folate metabolism related genes in pregnant women, to study the regional differences of MTHFR A1298C, C677T and MTRR A66G gene loci. **Methods** Totally 1415 pregnant women who were prenatally examined at Zhuhai People's Hospital from January 1st 2018 to October 30th 2019, were divided into the southern (Guangdong, Guangxi, Hunan), the middle part (Anhui, Hubei, Jiangxi, Henan) and northern (Hebei, Shandong, Heilongjiang, Liaoning, Jilin) according to the research destination. The oral mucosal epithelial cells of the study subjects were collected, and the genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C667T, A1298C locus and methionine synthase reductase (MTRR) A66G locus were detected by real-time PCR, comparing gene polymorphisms and the risk of folate metabolism disorders in geographical differences. **Results** There were significant regional differences in genotype and allele frequencies of MTHFR gene C667T, A1298C locus ($P < 0.05$). There was no significant difference in the composition of MTRR A66G AG and CG in the three regions ($P > 0.05$). The proportion of people with high risk of folate metabolism disorders in the southern, central and northern regions was 11.80%, 25.16% and 38.23%, respectively, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$), and the proportion of risk-free people was 44.00%, 32.90%, and 27.11%, respectively, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** The folate gene polymorphisms of pregnant women are different in the southern, middle part and northern; the risk of folic acid metabolism has obvious regional differences, showing a trend of higher in the north and lower in the south.

Key words Folate metabolism; Genetic polymorphism; Pregnant women; Regional difference

围孕期叶酸缺乏可导致妊娠期贫血、妊娠期高血压疾病、死胎、新生儿神经管缺陷、唇腭裂、新生儿先天性心脏病、自闭症等不良妊娠结局的发生^[1]。叶

酸代谢障碍是导致妊娠期女性体内叶酸缺乏的重要因素之一,其中亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)及甲硫氨酸合酶还原酶(methionine synthase reductase, MTRR)是叶酸代谢通路中的关键酶,其基因多态性与叶酸代谢障碍息息相关。我国叶酸代谢水平在不同地域女性中分布的差异性缺乏大样本的研究。本研究通过对

基金项目:广东省珠海市医学科研基金资助项目(20181117A010024)

作者单位:519000 珠海市人民医院产科

通讯作者:梁雄,主任医师,电子信箱:150504249@qq.com

1415 例妊娠期女性 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 的基因型检测,获取叶酸代谢关键酶基因多态性,分析部分妊娠期女性叶酸代谢基因的分布特征,为进一步的群体遗传分析奠定基础,给予不同地域围孕期女性的叶酸补充提供依据。

对象与方法

1. 研究对象:选择 2018 年 1 月 1 日~2019 年 10 月 30 日在珠海市人民医院产前检查妊娠早期女性为研究对象。研究对象年龄 19~45 岁,平均年龄 30.08 ± 4.59 岁,均同意进行口腔黏膜细胞采样并进行叶酸代谢基因遗传检测,根据研究对象籍贯,将其分为南部地区 500 例(广东省、广西壮族自治区、湖南省)、中部地区 465 例(安徽省、湖北省、江西省、河南省)、北部地区 450 例(河北省、山东省、黑龙江省、辽宁省)3 组。共获取符合以上条件的有效样本及结果

1415 例,其中汉族 1402 例,少数民族 13 例。

2. 样本采集及 DNA 检测方法:(1)样本采集:使用专用采样拭子采集口腔黏膜上皮脱落细胞。该方法无创、无交叉感染、操作简单方便。(2)检测设备:采用美国 Applied Biosystems 公司的 7900 型荧光定量 PCR 仪,检出率可达 99% 以上,可重复性达到 100%。(3)基因分型技术:采用荧光定量 PCR 技术,对 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 进行基因分型。每个样品检测孔中加 3.5 μ l 去离子水,1 μ l 浓度为 20ng/ μ l 的 DNA 模板,0.5 μ l 的 20 $\times$ Taqman-MGB 和 5 μ l 的 2 $\times$ Taqman Universal Master Mix 探针,探针信息详见表 1。PCR 反应初始温度为 95 $^{\circ}$ C 10min,92 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min 扩增 20 个循环,最后用 89 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 90s 扩增 30 个循环。结束后,根据各反应孔的荧光,确定各样本基因分型结果。

表 1 Taqman-MGB 探针位置

基因位点	探针位置(5'→3')
MTHFR C677T	GAAAAGCYGCGTGATGATGAAATCG[G/A]CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA
MTHFR A1298C	AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCCCA
MTRR A66G	AGGCAAAGGCCATCGCAGAGAAAGAAAT[A/G]TGTGAGCAAGCTGTGTACATGGAT

3. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析,对研究对象进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。组间比较采用行 $\times$ 列表的 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同地区育龄女性 MTHFR、MTRR 的基因多态性比较:统计样本人群中叶酸代谢障碍相关 3 个位点(MTHFR A1298C、MTHFR C677T、MTRR A66G)的基因型数据并进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,发现这 3 个位点均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,证明研究对象具有该区域群体代表性。MTHFR A1298C 3 个基因位点 AA(野生型)、AC(杂合突变

型)、CC(纯合突变型)在南部、中部、北部 3 地区基因型分布多态性存在不一致,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 AA 型在南部地区、中部地区和北部地区的比例为 58.00%、63.87% 和 76.89%,呈南低北高趋势。MTHFR C677T 3 个基因位点 CC(野生型)、CT(杂合突变型)、TT(纯合突变型)在南部地区、中部地区和北部地区多态性分布不一致,差异有统计学意义($P < 0.01$)。CC 型在南部地区、中部地区和北部地区的比例分别为 57.80%、35.27% 和 14.67%,呈南高北低趋势。MTRR A66G AG(杂合突变型)、CG(纯合突变型)在 3 地区构成比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。

表 2 3 地区育龄女性 MTHFR、MTRR 的基因位点多态性比较 [$n(\%)$]

组别	n	MTHFR A1298C			MTHFR C677T			MTRR A66G		
		AA	AC	CC	CC	CT	TT	AA	AG	CG
南部地区	500	290 (58.00)	180 (36.00)	30 (6.00)	289 (57.80)	182 (36.40)	29 (5.80)	251 (50.20)	206 (41.20)	43 (8.60)
中部地区	465	297 (63.87)	149 (32.04)	19 (4.09)	164 (35.27)	203 (43.66)	98 (21.07)	273 (58.71)	161 (34.62)	31 (6.67)
北部地区	450	346 (76.89)	94 (20.89)	10 (2.22)	66 (14.67)	222 (49.33)	162 (36.00)	256* (56.89)	162 (36.00)	32 (7.11)
χ^2		38.939	27.332	8.471	190.317	16.336	133.088	7.884	4.992	1.437
P		0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.019	0.082	0.487

与中部地区比较,* $P = 0.577$

2. 不同地区育龄女性 MTHFR、MTRR 的等位基因频率比较: MTHFR A1298C 等位基因 A 和 C 频率变异比较 3 地区存在明显差异, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中突变 C 基因频率南部地区比北部地区高 11.23%; MTHFR C677T 基因位点 C 和 T 在 3 地区频率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中 MTHFR667 基因 T 基因频率南部地区 (24.20%) 明

显低于北部地区 (60.67%); MTRR A66G 基因位点中, A、C、G 基因频率南部与其他两地区比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但中部地区及北部地区 3 个等位基因分布比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其中 C 基因频率南部地区明显高于其他两地区, G 基因频率南部地区明显低于其他两地区, 详见表 3。

表 3 3 地区育龄女性 MTHFR、MTRR 的等位基因频率比较 [$n(\%)$]

组别	n	MTHFR A1298C		MTHFR C677T		MTRR A66G		
		A	C	C	T	A	C	G
南部地区	1000	761 (76.10)	239 (23.90)	758 (75.80)	242 (24.20)	709 (70.90)	249 (24.90)	42 (4.20)
中部地区	930	743 (79.89)	187 (20.11)	531 (57.10)	399 (42.90)	707 (76.02)	31 (3.33)	192 (20.65)
北部地区	900	786 (87.33)	114 (12.67)	354 (39.33)	546 (60.67)	674 (74.89) *	32 (3.56) *	194 (21.55) *
χ^2		39.657		259.206		7.280	303.538	144.052
P		0.000		0.000		0.026	0.000	0.000

与中部地区比较, * $P > 0.05$

3. 不同地区育龄女性叶酸代谢障碍风险分析: 根据本研究结果, 南部地区、中部地区和北部地区叶酸代谢高风险的人群比例分别为 11.80%、25.16% 和 38.23%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 南部地区、中部地区和北部地区中风险的比例分别为 37.80%、31.40% 和 25.33%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 南部地区、中部地区和北部地区叶酸代谢低风险的人群比例分别为 6.40%、10.54% 和 9.33%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 南部地区、中部地区和北部地区叶酸代谢无风险的人群比例分为 44.00%、32.90% 和 27.11%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 详见表 4。

过程中的关键酶, MTHFR 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, 后者在 MTRR 催化下参与人体内广泛的甲基化反应, 如同型半胱氨酸甲基化为甲硫氨酸, 复甲基化为 S-腺苷甲硫氨酸等。MTHFR、MTRR 基因不同位点的突变会降低其酶的活性, 不同程度的降低孕妇叶酸代谢水平^[4]。所以了解不同地区妊娠期女性叶酸代谢基因位点及其变异特征, 对基层医院指导孕妇补充叶酸显得非常重要。

C677T 是 MTHFR 基因最常见的位点变异。MTHFR 第 667 位核苷酸上胞嘧啶 (C) 变为胸腺嘧啶 (T), 使编码的氨基酸序列改变, 缬氨酸替代丙氨酸, 导致 MTHFR 酶的耐热性和活性下降, 使 5,10-亚甲基四氢叶酸还原成为 5-甲基四氢叶酸减少, 从而降低体内叶酸水平^[5]。研究显示, 母亲 MTHFR C677T 纯合子突变使出生神经管缺陷婴儿的风险升高, 携带 677T 等位基因的孕妇比野生型孕妇生育唐氏综合征患儿的风险大, 胎儿患先天性心脏病的概率较 CC 型高^[6-10]。通过对 MTHFR、MTRR 的 3 个基因多态性比较, 南部地区、中部地区及北部地区存在地域差异, 北部地区和中部地区 MTHFR C667T 的基因 TT 型率分别为 36.00% 和 21.07%, 明显高于南部地区 (5.80%), 同时叶酸代谢障碍高风险人群北部地区比南部地区高 26.43%, 提示此基因位点突变可能是导致叶酸代谢障碍的危险因素, 此结果与贺宪民等^[11]的研究结论一致。

表 4 3 地区育龄女性叶酸代谢障碍风险分度结果 [$n(\%)$]

组别	n	高风险组	中风险组	低风险组	未发现风险组
		(n = 343)	(n = 855)	(n = 140)	(n = 791)
南部地区	500	59 (11.80)	189 (37.8)	32 (6.40)	220 (44.00)
中部地区	465	117 (25.16)	146 (31.40)	49 (10.54)	153 (32.90)
北部地区	450	172 (38.23)	114 (25.33)	42 (9.33)	122 (27.11)
χ^2		89.280	17.028	5.538	31.018
P		0.000	0.000	0.063	0.000

讨 论

妊娠期女性体内的叶酸水平低于非妊娠期女性, 并随孕周增加而逐渐下降, 故孕期是急需补充叶酸的时期^[2]。妊娠期的叶酸缺乏可导致妊娠期并发症的发生、胎儿畸形甚至影响子代健康等不良后果^[3]。既往研究表明, MTHFR、MTRR 均是叶酸代谢

A1298C 位点突变是 MTHFR 基因另一个主要的位点变异。其突变导致编码的氨基酸序列中谷氨酸被丙氨酸替代,导致 MTHFR 酶的活性下降,但耐热性不变^[5]。本研究结果显示,A1298C 基因 AC 型、CC 型在 3 地区存在差异性,南部地区 AC 型、CC 型高于中部地区和北部地区,但北部地区孕妇叶酸代谢障碍的发生率却明显高于南部地区。既往也有研究指出,A1298C 基因 AC 型、CC 型广东及海南地区高于河北地区,且部分研究发现母亲的 MTHFR A1298C 基因位点突变与不良妊娠结局、新生儿神经管畸形、新生儿先天性心脏病的发生无明显相关性,提示单一的 MTHFR A1298C 基因突变是否会导致人群叶酸代谢障碍需进一步研究^[12~15]。A66G 是 MTRR 基因最常见的变异位点,在本研究中,MTRR A66G 基因的突变型 AC 型、CG 型在 3 地区比较差异无统计学意义。

个体对于叶酸的利用能力,是由叶酸代谢酶的基因多态性决定的。在服用同剂量及同疗程叶酸的情况下,叶酸代谢障碍人群血清和红细胞中的叶酸水平低于正常人群^[16]。本研究结果显示,叶酸代谢高风险人群在北部地区的比例为 38.23%,比南部地区高 26.43%,比中部地区高 13.07%;未发现风险组北部地区低于南部地区 16.89%。孔亚敏等^[17]通过分析 2004~2011 年中国神经管缺陷(NTDs)报告得出我国 NTDs 发生率呈现北高南低的规律,与本研究结果一致。

综上所述,叶酸基因代谢风险存在地域差异,尤其是北部地区,近一半的妊娠期女性存在叶酸代谢高风险,此结果对于尚未开展叶酸代谢检测的基层地区的围孕期女性孕期是否需要继续或者加量服用叶酸提供指导。若本研究扩大样本量,进行南部地区、中部地区和北部地区多中心研究,则研究结果更有说服力。

参考文献

- 1 许培,余波澜,陈敦金.围孕期补充叶酸对不良妊娠结局的影响[J].中国实用妇科与产科杂志,2017,33(11):1203-1205
- 2 霍文华,周玉博,王斌,等.妊娠期妇女血液叶酸水平及影响因素分析[J].中国生育健康杂志,2019,30(2):101-105
- 3 赵丽娟,秦家碧,王婷婷,等.基于前瞻性队列研究先天畸形的危险因素及其对其他不良妊娠结局的影响[J].中华疾病控制杂志,2019,23(4):376-381,396
- 4 Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases[J]. Gene, 2014, 533(1):11-20
- 5 Peter C, Danny SP, Alejandro Villao, *et al.* Polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene(C677T and A1298C) in nulliparous women complicated with preeclampsia[J]. Gynecol Endocrinol, 2014, 30(5):392-396
- 6 Yadav U, Kumar P, Yadavsk, *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
- 7 Wang W, Jiao XH, Wang XP, *et al.* MTR, MTRR, and MTHFR gene polymorphisms and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2016, 20(6):297-303
- 8 Izci Ay O, Ay ME, Erdal ME, *et al.* Folate metabolism gene Polymorphisms and risk for down syndrome offspring in Turkish women[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2015, 19(4):191-197
- 9 邢焕霞,付敏,李朋斌,等.廊坊地区 3326 例孕妇 MTHFR 与 MTRR 基因多态性与胎儿唐氏综合征高风险的关系研究[J].中国妇幼保健,2018,33(23):5521-5523
- 10 Yin M, Dong L, Zheng J, *et al.* Meta analysis of the association between MTHFR C677T Polymorphism and the risk of congenital heart defects[J]. Ann Hum Genet, 2012, 76(1):9-16
- 11 贺宪民,张群,杨琦,等.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研究[J].中国计划生育学杂志,2010,18(1):13-18
- 12 邸文治,张瀚文,强桂彦,等.沧州地区汉族育龄女性 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶及甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分析[J].中国妇幼保健,2019,34(12):2793-2796
- 13 莫晖,王华伟,王港,等.云南地区 MTHFR 基因多态性与不良妊娠结局的关系研究[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(7):63-64
- 14 姜志娥,陈雨历,李金良,等.神经管发育不良患儿及其核心家庭 MTHFR 基因 A1298C 多态性分布的研究[J].中华小儿外科杂志,2003,24(4):307-310
- 15 王淑媛,黄京希,王静,等.MTHFR、MTRR 基因多态性及 Hcy 水平与胎儿先天性心脏病的相关性[J].中国妇幼保健,2018,33(11):2519-2522
- 16 Nishio K, Goto Y, Kondo T, *et al.* Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake[J]. J Epidemiol, 2008, 18(3):125-131
- 17 孔亚敏,向坤,瑶瑶,等.中国神经管缺陷发生率地区差异及干预对策[J].中国实用妇科与产科杂志,2015,31(12):1110-1116

(收稿日期:2020-01-14)

(修回日期:2020-02-25)