

MTHFR、MTRR基因多态性与不明原因反复妊娠丢失的相关性研究

翟焕玲¹, 李鸿昌^{2*}

¹济宁医学院附属金乡县人民医院生殖医学科, 山东 济宁

²山东大学生殖医学研究中心, 山东 济南

收稿日期: 2023年8月6日; 录用日期: 2023年9月1日; 发布日期: 2023年9月7日

摘要

目的: 在uRPL (unexplained Recurrent pregnancy loss, uRPL)人群中检测MTHFR基因C677T、A1298C位点和MTRR基因A66G位点, 以明确其与uRPL发生及不同流产次数的相关性, 为uRPL的病因筛查提供遗传学证据, 并指导临床应用。方法: 本研究收集了2012~2015年在山东大学629例育龄夫妇的临床信息和外周血样本, 其中既往与同一丈夫连续发生 ≥ 2 次妊娠28周内妊娠丢失且排除明确病因的患者纳入uRPL组, 既往至少有一次活产且没有流产或任何其他不良妊娠结局及并发症病史的患者纳入对照组。根据患者的年龄进行1:1个案匹配, 最终有230例uRPL组的女性及230例对照组女性匹配成功。采用高分辨熔解曲线分析技术进行SNP位点基因分型, 根据SNP检测结果, 对uRPL组和对照组的叶酸代谢风险和叶酸代谢相关基因MTHFR C677T、MTHFR A1298C、MTRR A66G的基因型以及等位基因频率分布进行统计分析, 并按照流产次数(2、3、 ≥ 4 次)分层分析进一步比较。结果: 叶酸代谢风险等级在uRPL人群中分布无显著差异, 并与既往流产次数无关($P > 0.05$)。进一步对三个多态位点的基因型分布进行统计分析, 发现: 1) MTHFR基因C667T位点在uRPL人群中总体CT (杂合突变)比例增加, 而TT (纯合突变)比例降低, 亚组分析当既往自然流产次数为3时, 纯合突变比例降低, 具有显著差异($P < 0.05$, Bonferroni法校正后 $P < 0.0167$), 等位基因T的频率也同样显著降低; 2) A1298C多态位点在uRPL人群中分布无显著差异($P > 0.05$); 3) MTRR基因A66G多态位点在uRPL人群中分布也无显著差异($P > 0.05$), 但亚组分析当既往自然流产次数为3时, 纯合突变比例降低具有显著差异($P < 0.05$, Bonferroni法校正后 $P < 0.0167$), 但等位基因的频率分布未见显著差异。结论: 发现叶酸代谢风险等级在uRPL人群中的分布无显著差别, MTHFR基因C667T、A1298C两个多态位点和MTRR基因A66G多态位点突变频率在uRPL总体人群中未见显著增加, 并与既往流产次数无显著相关性。

关键词

反复妊娠丢失, 易栓症, 叶酸代谢酶, MTHFR, MTRR

Correlation Study of MTHFR and MTRR Gene Polymorphisms and Unexplained Recurrent Pregnancy Loss

*通讯作者。

Huanling Zhai¹, Hongchang Li^{2*}

¹Reproductive Medicine Department of Jinxiang County People's Hospital Affiliated to Jining Medical University, Jining Shandong

²Research Center of Reproductive Medicine, Shandong University, Jinan Shandong

Received: Aug. 6th, 2023; accepted: Sep. 1st, 2023; published: Sep. 7th, 2023

Abstract

Objective: Detect the C677T, A1298C loci of the MTHFR gene, and A66G loci of the MTRR gene in the unexplained recurrent pregnancy loss (uRPL) population to clarify their correlation with the occurrence of uRPL and different miscarriages, provide genetic evidence for the etiology screening of uRPL, and guide clinical application. **Methods:** Clinical information and peripheral blood samples were collected from couples of reproductive age attending the Shandong University 2012 to 2015. 629 uRPL patients included those with ≥ 2 previous consecutive pregnancy losses within 28 weeks of gestation with the same spouse and excluded a clear etiology, while patients in the control group were those with at least one previous live birth and without a history of miscarriage or any other adverse pregnancy outcomes. Pair matching 1:1 was conducted according to female age. 230 patients in the uRPL group and 230 patients in the control group were successfully matched. SNP genotyping technology was performed using high-resolution melting curve analysis. The risk of folate metabolism and genotypes of the genes related to folate metabolism, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and MTRR A66G, as well as the allele frequency distribution, were statistically analyzed in the uRPL and control groups and further compared by stratified analysis of the number of miscarriages (2, 3, ≥ 4). **Results:** There was no significant difference in the distribution of folic acid metabolic risk grades in the uRPL population, and it was not related to the number of previous miscarriages ($P > 0.05$). 1) Further statistical analysis of the genotype distribution of the three polymorphic sites found that the overall proportion of CT (heterozygous mutation) at the C667T site of the MTHFR gene in the uRPL population increased, while the proportion of TT (homozygous mutation) decreased. When the number of previous spontaneous abortions was 3, the proportion of homozygous mutations decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.0167$ after Bonferroni method correction), and the frequency of allele T also decreased significantly; 2) There was no significant difference in the distribution of A1298C ($P > 0.05$); 3) There was also no significant difference in the distribution of the MTRR gene A66G polymorphism in the uRPL population ($P > 0.05$), but in subgroup analysis, when the number of previous spontaneous abortions was 3, the proportion of homozygous mutations significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.0167$ after Bonferroni method correction), but no significant difference was found in the frequency distribution of alleles. **Conclusion:** There was no significant difference in the distribution of risk level of folate metabolism among the women with uRPL. In the overall uRPL population, the frequencies of polymorphisms of MTHFR (C667T, A1298C), and MTRR (A66G) did not increase significantly, which were also not significantly associated with the number of previous miscarriages.

Keywords

Recurrent Pregnancy Loss, Prethrombotic State, Folic Acid Metabolism Enzyme, MTHFR, MTRR

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

反复妊娠丢失(RPL)是指与同一配偶连续发生 ≥ 2 次妊娠 28 周之前的妊娠丢失,是导致妊娠失败的常见生殖障碍性疾病。RPL 病因和发病机制复杂,主要包括染色体异常、子宫解剖异常等,另有 40%~50% 原因不明,被称为不明原因反复妊娠丢失(uRPL)。易栓症被认为是 RPL 发生的重要原因之一[1] [2]。易栓症是因为血液中促凝或抗凝因子的数量和功能异常,导致血液呈高凝状态,容易形成血栓,影响胎盘微循环血供、影响子宫动脉[3]、子宫内膜血供,进一步对流产率造成影响[4] [5];易栓症可分为获得性和遗传性两种类型。其中,获得性易栓症是指后天获得的,如抗磷脂综合征等,造成血栓形成风险增加;遗传性易栓症是指由于凝血、纤维溶解和抗凝相关基因异常所导致的凝血功能增强或纤维溶解功能降低,这些基因包括抗凝蛋白相关基因,如蛋白 C、蛋白 S 缺乏;凝血因子相关基因,如因子 VLeiden、亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)、甲硫氨酸合成酶还原酶(methionine synthetase reductase, MTRR)等基因发生突变导致的。叶酸代谢酶 MTHFR、MTRR 均参与叶酸-甲硫氨酸的代谢过程,并促进叶酸的转运、利用及代谢循环[6] [7]。其中, MTHFR 可以催化 5,10-亚甲基四氢叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸,后者是叶酸在血液中主要的存在形式; MTRR 可以催化同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)转化为甲硫氨酸,参与甲硫氨酸循环,为生物学过程提供甲基,同时自身转化为四氢叶酸,形成叶酸循环。这两个酶的编码基因 MTHFR 和 MTRR 基因突变可以导致酶的活性异常,引起叶酸浓度异常、HCY 正性积累,并影响甲基代谢过程[8]。

叶酸代谢酶 MTHFR C677T 位点野生型为 CC,突变型包括杂合型突变 CT 和纯合型突变 TT;MTHFR A1298C 位点野生型为 AA,突变型包括杂合型突变 AC 和纯合型突变 CC;叶酸代谢酶 MTRR A66G 位点野生型为 AA,突变型包括杂合型突变 AG 和纯合型突变 GG。若以 MTHFR C667 位点未发生突变的 CC 型的酶活力定为正常(100%),则杂合型突变的 CT 酶活力降低,纯合型突变的 TT 酶活力下降更为显著,代谢相关疾病的发病风险增加。考虑到基因的功能的不同,对叶酸代谢风险进行分级,可分为:未发现风险(三个基因位点均无突变,或仅叶酸代谢酶 MTHFR C677T 的基因型为杂合型,或仅 MTHFR A1298C 基因型为杂合型)、低度风险(叶酸代谢酶 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 为杂合型,或仅 MTHFR 基因 C677T 为纯合型,或仅 MTHFR 基因 A1298C 为纯合型,或仅 MTRR 基因 A66G 为杂合型)、中度风险(叶酸代谢酶 MTHFR 基因 C677T 或 A1298C 为纯合型且 MTRR 基因 A66G 为杂合型或仅 MTRR 基因 A66G 为纯合型)、高度风险(叶酸代谢酶 MTHFR 基因 C677T、A1298C 和 MTRR 基因 A66G 至少有两个为纯合型) [9]。

MTHFR 基因有 30 多种突变类型, MTHFR A1298C 位点和 MTRR A66G 位点的突变导致的酶活性改变与 MTHFR C667 位点相似。不同位点突变对 MTHFR 酶的活性和热稳定性产生不同的影响,其中位于第 4 外显子上的 C677T 位点及第 7 外显子上的 A1298C 位点是最关键的两个位点[10]。C677T 多态位点最为常见,表现为 MTHFR 第 4 外显子上的第 677 个核苷酸上发生 C \rightarrow T 突变,从而导致丙氨酸被缬氨酸取代,该突变可引起该酶的热不稳定性增加,酶活性下降[11]; A1298C 为另一个常见的多态位点,该位点突变可导致多肽链上相应的谷氨酸被丙氨酸所取代,从而影响酶的活性,使其催化 5,10-亚甲基四氢叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸的能力降低,干扰叶酸代谢过程。MTRR 基因位点 A66G 是其主要的变异位点,变异导致异亮氨酸被甲硫氨酸取代[12],造成相应甲硫氨酸合成酶的酶活性降低或消失,甲硫氨酸以及 S-腺苷甲硫氨酸/蛋氨酸合成障碍,使体内 HCY 循环通路受阻,导致高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHCY)。HCY 过高可以导致血管内皮损伤,引起血小板聚集,增加血栓风险。HHCY 被认为与胎盘血管病变、妊娠期高血压疾病以及妊娠期糖尿病等妊娠并发症有关[13] [14]。同时,研究发现 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 基因多态性和叶酸浓度降低是导致血浆高脂质水平的主要因素,促进血栓形成[15] [16]。

我国地域辽阔, 张春红[17]等通过研究叶酸代谢关键酶 MTHFR 和 MTRR 基因多态性的地区特征分布, 发现中国人群中 MTHFR 和 MTRR 基因多态性具有区域差异, 其多态位点的分布频率由南向北具有阶梯性。MTHFR 相关疾病分布随 MTHFR 基因多态性分布也具有一定的种族和区域性差异[18]。MTHFR 基因多态性可能与自然流产、胎儿先天畸形、先天性心血管疾病、妊娠高血压疾病等不良孕产事件相关, 不同地域、不同种族研究所得结论有所不同。因此, 在中国山东地区系统分析 MTHFR 和 MTRR 基因多态性的基因型分布情况, 明确其与 RPL 发生的相关性, 可以完善叶酸代谢相关基因分布图谱, 明确其人群特异性, 指导 RPL 人群的精准诊疗。考虑到这两个基因多态性位点在不同国家和地区的分布差异, 以及既往研究 RPL 人群样本量和纳入标准的参差不齐, 其与 uRPL 发生的相关性并不明确, 同时是否与既往自然流产次数有关也尚不清楚。目前临床上, 有专家推荐 uRPL 患者常规进行血清 HCY 的检测、条件性筛查凝血相关基因, 并行加大叶酸补充、给予阿司匹林治疗等方式预防自然流产, 但这些措施仍缺乏充分的循证医学证据[19]。本研究主要在 uRPL 人群中对 MTHFR 基因 C677T、A1298C 位点和 MTRR 基因 A66G 位点进行检测, 以明确其与 uRPL 发生及不同流产次数的相关性, 为 uRPL 的病因筛查提供遗传学证据, 并指导临床应用。

2. 资料及方法

2.1. 一般资料

研究对象为 2012~2015 年在山东大学就诊的 RPL 患者, 收集夫妇双方的临床信息及外周血样本。RPL 的诊断标准为既往与同一丈夫连续发生 ≥ 2 次妊娠 28 周内妊娠丢失的患者[20], 排除标准包括: 夫妻双方或任一方染色体核型异常、子宫解剖异常、内分泌异常、感染性疾病、凝血异常(包括凝血常规、蛋白 C、蛋白 S 等)、自身免疫功能障碍(包括抗核抗体、抗双链 DNA 抗体、抗心磷脂抗体和抗 $\beta 2$ 糖蛋白抗体、狼疮等)和其他全身疾病等。对照组为既往至少有一次活产且没有流产或任何其他不良妊娠结局及并发症病史的患者。总共有 345 例纳入 uRPL 组和 284 例纳入可育对照组, 并根据患者的年龄进行 1:1 个案匹配, 最终有 230 例 uRPL 组女性及 230 例对照组女性匹配成功。

2.2. 方法

抽取对照组及 uRPL 组所有纳入者静脉血 2~3 ml, 注入含 EDTA 抗凝剂处理过的采血管中, 立即进行 5~10 次轻颠、摇匀的方式混匀, 使抗凝剂与静脉血液能充分混匀。采用 QIAamp 血液 DNA 提取试剂盒(Qiagen)、LC-Green Plus 荧光染料(爱达荷技术公司)、Light Cycler 480 (罗氏诊断有限公司)、Fascan 48E 多通道荧光定量分析仪, 依据单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms SNP)检测, 对 SNP 位点(MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRRA66G)基因型进行判定。通过比较熔融曲线, 区分 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 的基因型。

2.3. 统计学处理

首先, 将 uRPL 组和对照组采用个案匹配方法根据年龄进行 1:1 匹配。根据 SNP 检测结果, 对 uRPL 组和对照组的叶酸代谢风险和叶酸代谢相关基因 MTHFR C677T、MTHFR A1298C、MTRR A66G 的基因型以及等位基因频率分布进行统计分析, 并按照流产次数分层分析进一步比较。连续数值变量如果符合正态分布, 用平均数 \pm 标准差表示, 采用独立样本 t 检验进行对照组及 uRPL 组的组间比较分析; 如果呈偏态分布, 则用中位数(四分之一位数、四分之三位数)表示, 采用非参数检验(Mann-Whitney U 检验)进行两组间比较分析。分类变量则使用率(%)表示, 并采用卡方检验对分类变量进行两组间的差异比较分析, 特殊情况下如果一个单元格的期望指数 < 5 , 用 Fisher 确切概率法; 若 $P < 0.05$, 表示差异有统计学

意义; 卡方检验多组比较后如 $P < 0.05$, 则采用 Bonferroni 法校正检验水准。所有数据均采用 IBM SPSS Statistics 26.0 统计学软件进行分析比较。

3. 结果

3.1. uRPL 组与对照组的基本信息比较

如表 1 所示, 经过 1:1 个案匹配后, uRPL 组和对照组之间女性年龄无显著统计学差异(28.38 ± 3.95 vs. 28.48 ± 4.20 , $P = 0.799$)。uRPL 组既往流产次数为 2 [2; 3] 次。

3.2. uRPL 组与对照组叶酸代谢风险结果比较

如表 2 所示, 在整体上, uRPL 组与对照组之间叶酸代谢风险无显著统计学差异($P = 0.123$)。根据既往流产次数(2、3、 ≥ 4 次)进行分层分析, 两组间的叶酸代谢风险仍然无统计学差异, 如表 3 所示。

Table 1. Comparison of patients' basic information

表 1. 患者基本信息比较

	uRPL 组(N = 230)	对照组(N = 230)	P
年龄(岁)	28.38 ± 3.95	28.48 ± 4.20	0.799
既往流产次数(次)	2 [2; 3]	-	

Table 2. Comparison of folic acid metabolic risk between the two groups

表 2. 两组叶酸代谢风险结果比较

叶酸代谢风险	uRPL 组(N = 230)	对照组(N = 230)	P
未发现风险	68 (29.6%)	53 (23.0%)	0.123
低度风险	109 (47.4%)	115 (50.0)	
中度风险	48 (20.9%)	57 (24.8%)	
高度风险	5 (2.2%)	5 (2.2%)	

Table 3. Comparison of folic acid metabolic risk between two groups after stratification of spontaneous abortion frequency

表 3. 自然流产次数分层后两组叶酸代谢风险结果比较

叶酸代谢风险	uRPL 组(N = 230)	对照组(N = 230)	P
自然流产次数 = 2	162		
未发现风险	45 (27.8%)	53 (23.0%)	0.656
低度风险	79 (48.8%)	115 (50.0%)	
中度风险	36 (22.2%)	57 (24.8%)	
高度风险	2 (1.2%)	5 (2.2%)	
自然流产次数 = 3	52		
未发现风险	18 (34.6%)	53 (23.0%)	0.107
低度风险	23 (44.2%)	115 (50.0%)	
中度风险	8 (15.4%)	57 (24.8%)	
高度风险	3 (5.8%)	5 (2.2%)	
自然流产次数 ≥ 4	16		

Continued

未发现风险	5 (31.3%)	53 (23.0%)	0.827
低度风险	7 (43.8%)	115 (50.0%)	
中度风险	4 (25.0%)	57 (24.8%)	
高度风险	0 (0%)	5 (2.2%)	

3.3. uRPL 组与对照组基因多态性的结果及基因频率分布

3.3.1. uRPL 组和对照组 MTHFR C677T 位点 CC、CT 与 TT 三种基因型分布

对 uRPL 组和对照组 MTHFR C677T 位点 CC、CT 与 TT 三种基因型分布进行统计分析; 整体上, uRPL 组 CT (杂合突变) 比例增加, TT (纯合突变) 比例降低, 两组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 同时, 等位基因 T 的频率显著降低; 根据既往流产次数 (2、3、 ≥ 4 次) 进行分层分析, 自然流产次数为 3 时, 仅发现 uRPL 组 TT (纯合突变) 比例降低, 两组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, Bonferroni 法校正后 $P < 0.0167$), 等位基因 T 的频率也同样显著降低; 当自然流产次数为 2 或者 ≥ 4 次, MTHFR C677T 位点基因型分布和等位基因频率分布均无统计学差异 (表 4、表 5)。

Table 4. The distribution of CC, CT and TT genotypes at C677T locus of MTHFR in the two groups

表 4. 两组 MTHFR C677T 位点 CC、CT 与 TT 三种基因型分布

基因型	uRPL 组 (N = 230)	对照组 (N = 230)	P
CC (正常)	33 (14.3%)	27 (11.7%)	0.013*
CT (杂合突变)	117 (50.9%)	92 (40.0%)	
TT (纯合突变)	80 (34.8%)	111 (48.3%)	
C	39.8%	31.7%	0.011*
T	60.2%	68.3%	

注: *对自然流产次数不分层, 整体上 uRPL 组 TT (纯合突变) 比例降低 ($P = 0.013, P < 0.05$); 等位基因 T 的频率显著降低 ($P = 0.011, P < 0.05$)。

Table 5. The distribution of CC, CT and TT genotypes of MTHFR C677T locus in the two groups after stratification of spontaneous abortion frequency

表 5. 自然流产次数分层后两组 MTHFR C677T 位点 CC、CT 与 TT 三种基因型分布

基因型	uRPL 组 (N = 230)	对照组 (N = 230)	P
自然流产次数 = 2	162		
CC (正常)	21 (13.0%)	27 (11.7%)	0.061
CT (杂合突变)	82 (50.6%)	92 (40.0%)	
TT (纯合突变)	59 (36.4%)	111 (48.3%)	
C	38.3%	31.7%	0.058
T	61.7%	68.3%	
自然流产次数 = 3	52		
CC (正常)	10 (19.2%)	27 (11.7%)	0.018*
CT (杂合突变)	28 (53.8%)	92 (40.0%)	
TT (纯合突变)	14 (26.9%)	111 (48.3%)	
C	46.2%	31.7%	0.005*

Continued

T	53.8%	68.3%	
自然流产次数 ≥ 4	16		
CC (正常)	2 (12.5%)	27 (11.7%)	0.940
CT (杂合突变)	7 (43.8%)	92 (40.0%)	
TT (纯合突变)	7 (43.8%)	111 (48.3%)	
C	34.4%	31.7%	0.757
T	65.6%	68.3%	

注: *流产次数等于 3 时, 在 uRPL 组 TT (纯合突变)比例降低($P = 0.018, P < 0.05$); 等位基因 T 的频率显著降低($P = 0.005, P < 0.05$)。

3.3.2. MTHFR 基因 A1298C 位点 AA、AC 与 CC 三种基因型分布

对 uRPL 组和对照组 MTHFR 基因 A1298C 位点 AA、AC 与 CC 三种基因型分布进行统计分析, 整体上和按照流产次数分层分析后均未发现统计学差异; 同样, 等位基因的频率分布也未见统计学差异(表 6、表 7)。

Table 6. Two groups of MTHFR gene A1298C locus AA, AC and CC genotype distribution

表 6. 两组 MTHFR 基因 A1298C 位点 AA、AC 与 CC 三种基因型分布

基因型	uRPL 组(N = 230)	对照组(N = 230)	P
AA (正常)	178 (77.4%)	188 (81.7%)	0.468
AC (杂合突变)	47 (20.4%)	39 (17.0%)	
CC (纯合突变)	5 (2.2%)	3 (1.3%)	
A	87.6%	90.2%	0.208
C	12.4%	9.8%	

Table 7. The distribution of AA, AC and CC genotypes at the A1298C locus of MTHFR gene in the two groups after the number of spontaneous abortions was stratified

表 7. 自然流产次数分层后两组 MTHFR 基因 A1298C 位点 AA、AC 与 CC 三种基因型分布

基因型	uRPL 组(N = 230)	对照组(N = 230)	P
自然流产次数 = 2	162		
AA (正常)	128 (79.0%)	188 (81.7%)	0.625
AC (杂合突变)	30 (18.5%)	39 (17.0%)	
CC (纯合突变)	4 (2.5%)	3 (1.3%)	
A	88.3%	90.2%	0.383
C	11.7%	9.8%	
自然流产次数 = 3	52		
AA (正常)	38 (73.1%)	188 (81.7%)	0.368
AC (杂合突变)	13 (25.0%)	39 (17.0%)	
CC (纯合突变)	1 (1.9%)	3 (1.3%)	
A	85.6%	90.2%	0.166
C	14.4%	9.8%	

Continued

自然流产次数 ≥ 4	16		
AA (正常)	12 (75.0%)	188 (81.7%)	0.655
AC (杂合突变)	4 (25.0%)	39 (17.0%)	
CC (纯合突变)	0 (0%)	3 (1.3%)	
A	87.5%	90.2%	0.620
C	12.5%	9.8%	

3.3.3. MTRR 基因 A66G 位点 AA、AG 与 GG 三种基因型分布

对 uRPL 组和对照组 MTRR 基因 A66G 位点 AA、AG 与 GG 三种基因型分布进行统计分析, 整体上, MTRR 基因 A66G 位点基因型分布在两组之间无显著统计学差异, 同时, 等位基因的频率分布也未见显著差异; 根据既往流产次数(2、3、≥4 次)进行分层分析, 自然流产次数为 3 时, 发现 uRPL 组 GG (纯合突变)比例增高, 两组差异具有统计学意义($P < 0.05$, Bonferroni 法校正后 $P < 0.0167$), 但等位基因的频率分布未见显著差异; 当自然流产次数为 2 或者 ≥ 4 次, MTRR 基因 A66G 位点基因型分布和等位基因的频率分布均无统计学差异(表 8、表 9)。

Table 8. The two groups of MTRR gene A66G locus AA, AG and GG genotype distribution
表 8. 两组 MTRR 基因 A66G 位点 AA、AG 与 GG 三种基因型分布

基因型	uRPL 组(N = 230)	对照组(N = 230)	P
AA (正常)	138 (60.0%)	136 (59.1%)	0.496
AG (杂合突变)	78 (33.9%)	85 (37.0%)	
GG (纯合突变)	14 (6.1%)	9 (3.9%)	
A	77.0%	77.6%	0.813
G	23.0%	22.4%	

Table 9. The distribution of A66G genotype AA, AG and GG of MTRR gene in the two groups after spontaneous abortion frequency stratification

表 9. 自然流产次数分层后两组 MTRR 基因 A66G 位点 AA、AG 与 GG 三种基因型分布

基因型	uRPL 组(N = 230)	对照组(N = 230)	P
自然流产次数 = 2	162		
AA (正常)	96 (59.3%)	136 (59.1%)	0.977
AG (杂合变)	59 (36.4%)	85 (37.0%)	
GG (纯合突变)	7 (4.3%)	9 (3.9%)	
A	77.5%	77.6%	0.963
G	22.5%	22.4%	
自然流产次数 = 3	52		
AA (正常)	32 (61.5%)	136 (59.1%)	0.014*
AG (杂合突变)	13 (25.0%)	85 (37.0%)	
GG (纯合突变)	7 (13.5%)	9 (3.9%)	

Continued

A	74.0%	77.6%	0.435
G	26.0%	22.4%	
自然流产次数 ≥ 4	16		
AA (正常)	10 (62.5%)	136 (59.1%)	0.720
AG (杂合突变)	6 (37.5%)	85 (37.0%)	
GG (纯合突变)	0 (0%)	9 (3.9%)	
A	81.3%	77.6%	0.632
G	18.7%	22.4%	

注: *流产次数等于 3 时, 在 uRPL 组 GG (纯合突变)显著增多($P = 0.014, P < 0.05$)。

4. 讨论

随着临床医学的需求和发展, 对 uRPL 病因及发病机制的研究越来越多, 并取得了许多成果, 但如何更有效地减少 RPL 的发生, 仍是生殖医学的研究热点。2017 年 ESHRE 关于 RPL 的诊治指南[21]提出, 不推荐 RPL 患者常规行遗传性易栓症相关筛查, 包括血清 HCY 检测、MTHFR 基因多态性检测等, 原因为血清 HCY 水平与 RPL 发生的相关性尚存在争议。在欧洲地区, 波兰和爱尔兰的研究[22] [23]分析了 MTHFR 基因 C667T 和 uRPL 人群相关性, 得出了阴性结论; 而 2002 年的奥地利研究[24]和 2019 年的俄罗斯研究[25]表明两者存在显著的相关性。其他地区, 比如巴西和埃及研究[26] [27]也否认了 MTHFR 基因多态位点是 uRPL 发生的危险因素, 但突尼斯的研究[14]表明其可能增加 uRPL 发生风险。多项 RPL 人群的病例对照研究表明, 血清 HCY 水平在 uRPL 人群中未见显著增高, 并且未发现与既往自然流产次数存在显著相关性[28] [29] [30]。同样, 如前所述, MTHFR、MTRR 基因多态性与 uRPL 的相关性也缺乏大样本的可靠证据; 此外, Alonso 等[31]发现并非所有合并 HHCY 的 RPL 患者中都能检测出 MTHFR 突变或维生素缺陷。

然而, 我国 2022 年最新发布的 RPL 诊治专家共识[20]也指出: 推荐 RPL 患者进行遗传性易栓症相关系列筛查, 包括: 凝血常规、蛋白 C、蛋白 S、血清 HCY 等等以排除遗传原因导致的血栓形成风险; 但并不常规进行 MTHFR 等凝血相关基因的检测。我们的研究成果为 RPL 的规范诊疗进一步提供了证据支持。

叶酸代谢酶的基因型突变可能通过影响叶酸的吸收和代谢影响红细胞内叶酸浓度。Crider KS 等[32]研究认为 MTHFR 基因 C677T 多态位点 TT 纯合型患者红细胞内叶酸水平要低于杂合型和野生型, 并对叶酸补充剂的反应减弱。有研究表明, uRPL 女性每天补充 0.5 毫克叶酸(持续 2 个月)可显著降低血清 HCY 浓度[33], 并且诊断有 HHCY 和 MTHFR 基因 C677T 突变纯合型的 RPL 女性在进行高剂量叶酸治疗后的活产率显著提高[34]。2017 年我国发布《围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南》明确提出叶酸的个性化增补方案, 即血液叶酸水平低、MTHFR 基因 C677T 多态位点 TT 纯合型、HHCY 需酌情增加叶酸补充剂量或延长时间[35]。然而, 2017 年 ESHRE 的 RPL 诊治指南[21]中提出, 孕前常规补充低剂量叶酸可以预防神经管缺陷, 但尚未证明其可以预防 uRPL 患者的再发流产; 考虑到缺乏充分的循证医学证据, 没有 HHCY 或者未诊断为与神经管缺陷高风险相关潜在疾病(糖尿病、癫痫)的 RPL 女性并不推荐补充高剂量叶酸, 因此临床上针对 RPL 患者的高剂量叶酸补充需明确其他相关指征。

针对发现 MTHFR、MTRR 基因突变同时伴有 HHCY 的 RPL 患者, 为降低血栓形成风险和避免再次自然流产, 目前临床上给予一系列经验性治疗, 包括叶酸补充、抗凝治疗等。RPL 的抗凝治疗, 包括低

分子肝素、阿司匹林等, 目前主要应用于伴有抗磷脂综合征的患者。但有研究报告了伴有 HHCY 的 RPL 患者同时给与 LMWH 与阿司匹林治疗后, 胎儿心脏活动维持至妊娠 12 周, 从而改善妊娠结局[21] [36]。考虑到目前尚缺乏充分的循证医学证据, 大多属于经验性治疗, 因此应谨慎对待。

目前已经证实叶酸缺乏可增加胎儿神经管畸形发生的风险, 但是叶酸代谢基因与 uRPL 的相关性结论不一, 尚缺乏充分的证据支持。本研究进一步分析验证了叶酸代谢酶 MTHFR、MTRR 的基因型与 uRPL 的关系, 分析了中国北方 RPL 人群中 MTHFR、MTRR 基因常见多态位点的基因型分布情况, 明确了叶酸代谢基因多态性与 RPL 发生之间的人群特异性和多样性, 并为 RPL 人群的精准诊疗提供研究依据。

在临床上, 我们的研究结果进一步提示 RPL 患者临床诊疗过程中无需进行叶酸代谢相关基因的常规检测; 与基因检测结果相比, 血清 HHCY 水平更受临床关注, 但其与 RPL 相关性尚缺乏充分的证据, 因此是否常规检测血清 HCY 水平尚存在争议。然而, 如果在 RPL 女性同时伴有 HHCY, 则可以考虑使用降低 HCY 水平的治疗方法, 如高剂量补充叶酸、抗凝治疗等, 以期改善妊娠结局, 但需要进一步研究提供循证医学证据。

致 谢

本篇论著是在山东大学生殖医学研究中心李鸿昌老师的帮助下完成的, 在李老师引导下, 从选题、审题到写提纲、筛查标本、到开展实验、再到研究具体问题, 严格把关, 倾注了李老师的辛苦及精力, 在此我表示对李老师的衷心感谢。同时我还要感谢在我论文期间给我极大帮助、关心和我们的我们生殖医学科的全体医师还有在我背后默默支持我的朋友和家人们, 你们辛苦啦!

最后, 向审阅本论著的专家、教授及卢编辑的辛勤付出表示衷心的感谢。感谢您在百忙之中的辛勤审阅和指导。

参考文献

- [1] Sergi, C., Al Jishi, T. and Walker, M. (2015) Factor v Leiden Mutation in Women with Early Recurrent Pregnancy Loss: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Causal Association. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **291**, 671-679. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3443-x>
- [2] Nahas, R., Saliba, W., Elias, A. and Elias, M. (2018) The Prevalence of Thrombophilia in Women with Recurrent Fetal Loss and Outcome of Anticoagulation Therapy for the Prevention of Miscariages. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, **24**, 122-128. <https://doi.org/10.1177/1076029616675967>
- [3] 周迪. 孕早期子宫动脉血流异常的相关因素及妊娠结局分析[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2023. <https://doi.org/10.27162/d.cnki.gjlin.2023.005700>
- [4] 葛淑妙. 经阴道超声检测子宫动脉血流参数在诊断稽留流产中的应用价值[D]: [硕士学位论文]. 百色: 右江民族医学院, 2023. <https://doi.org/10.27908/d.cnki.gymzy.2023.000104>
- [5] 刘娟, 谭宗建, 陈朝军, 等. 体外受精-胚胎移植妊娠者高凝状态及早期干预后流产率降低的疗效观察[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(28): 4678-4680.
- [6] González-Mercado, M.G., Rivas, F., Gallegos-Arreola, M.P., et al. (2017) *MTRR* A66G, *RFC1* G80A, and *MTHFR* C677T and A1298C Polymorphisms and Disease Activity in Mexicans with Rheumatoid Arthritis Treated with Methotrexate. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **21**, 698-704. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0124>
- [7] Goyette, P., Pai, A., Milos, R., et al. (1998) Gene Structure of Human and Mouse Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, **9**, 652-656. <https://doi.org/10.1007/s003359900838>
- [8] 黄国平, 徐梅, 陈月华, 等. 同型半胱氨酸联合叶酸代谢相关酶基因在妊娠期高血压疾病中的临床价值[J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(15): 2201-2205.
- [9] La, X., Wang, W., Zhang, M. and Liang, L. (2021) Definition and Multiple Factors of Recurrent Spontaneous Abortion. In: Zhang, H. and Yan, J., Eds., *Environment and Female Reproductive Health. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 1300, Springer, Singapore, 231-257. https://doi.org/10.1007/978-981-33-4187-6_11
- [10] Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S. and Rozen, R. (1998) A Second Genetic Polymorphism in Methylene-

- netetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Molecular Genetics and Metabolism*, **64**, 169-172. <https://doi.org/10.1006/mgme.1998.2714>
- [11] Hiraoka, M. and Kagawa, Y. (2017) Genetic Polymorphisms and Folate Status. *Congenital Anomalies*, **57**, 142-149. <https://doi.org/10.1111/cga.12232>
- [12] 梅雪昂, 韩瑞钰, 高章圈, 等. 河北省9地区汉族育龄期女性MTHFR C677T、A1298C和MTRR A66G基因多态性分布研究[J]. 现代预防医学, 2018, 45(23): 4273-4275+4285.
- [13] 万波, 骆婵珍, 柳国胜, 等. 高同型半胱氨酸血症与妊娠相关疾病的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(6): 58-59. <https://doi.org/10.13404/j.cnki.cjbh.2012.06.041>
- [14] Mtiraoui, N., Zammiti, W., Ghazouani, L., et al. (2006) Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphism and Changes in Homocysteine Concentrations in Women with Idiopathic Recurrent Pregnancy Losses. *Reproduction*, **131**, 395-401. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00815>
- [15] Li, W.-X., Lv, W.-W., Dai, S.-X., Pan, M.-L. and Huang, J.-F. (2015) Joint Associations of Folate, Homocysteine and MTHFR, MTR and MTRR Gene Polymorphisms with Dyslipidemia in a Chinese Hypertensive Population: A Cross-Sectional Study. *Lipids in Health and Disease*, **14**, Article No. 101. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0099-x>
- [16] Lin, Z., Li, Q., Sun, Y., et al. (2019) Interactions Between Genetic Variants Involved in the Folate Metabolic Pathway and Serum Lipid, Homocysteine Levels on the Risk of Recurrent Spontaneous Abortion. *Lipids in Health and Disease*, **18**, Article No. 143. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1083-7>
- [17] 张春红, 霍军生, 孙静, 黄建. 中国成年女性一碳单位代谢通路关联基因多态性位点地域分布特征[J]. 卫生研究, 2020, 49(1): 123-131. <https://doi.org/10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2020.01.022>
- [18] 余飞, 梁林慧, 冯国钢, 韦必晓. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性研究进展[J]. 当代医学, 2019, 25(12): 189-191.
- [19] 自然流产诊治中国专家共识编写组. 自然流产诊治中国专家共识(2020年版) [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(11): 1082-1090. <https://doi.org/10.19538/j.fk2020110113>
- [20] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 复发性流产诊治专家共识编写组. 复发性流产诊治专家共识(2022) [J]. 中华妇产科杂志, 2022, 57(9): 653-667. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112141-20220421-00259>
- [21] Bender Atik, R., Christiansen, O.B., Elson, J., et al. (2018) ESHRE Guideline: Recurrent Pregnancy Loss. *Human Reproduction Open*, **2018**, Article No. hoy004. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoy004>
- [22] Wolski, H., Barlik, M., Drews, K., et al. (2017) Contribution of Inherited Thrombophilia to Recurrent Miscarriage in the Polish Population. *Ginekologia Polska*, **88**, 385-392. <https://doi.org/10.5603/GP.a2017.0072>
- [23] Murphy, R.P., Donoghue, C., Nallen, R.J., et al. (2000) Prospective Evaluation of the Risk Conferred by Factor V Leiden and Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms in Pregnancy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **20**, 266-270. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.1.266>
- [24] Unfried, G., Griesmacher, A., Weismüller, W., et al. (2002) The C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Idiopathic Recurrent Miscarriage. *Obstetrics & Gynecology*, **99**, 614-619. <https://doi.org/10.1097/00006250-200204000-00020>
- [25] Trifonova, E.A., Swarovskaya, M.G., Ganzha, O.A., et al. (2019) The Interaction Effect of Angiogenesis and Endothelial Dysfunction-Related Gene Variants Increases the Susceptibility of Recurrent Pregnancy Loss. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **36**, 717-726. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01403-2>
- [26] Settin, A., Elshazli, R., Salama, A. and ElBaz, R. (2011) Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms in Egyptian Women with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **15**, 887-892. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2011.0049>
- [27] Lino, F.L., Traina, É., Barreto, J.A., Moron, A.F. and Mattar, R. (2015) Thrombophilic Mutations and Polymorphisms, Alone or in Combination, and Recurrent Spontaneous Abortion. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, **21**, 365-372. <https://doi.org/10.1177/1076029613520465>
- [28] Creus, M., Deulofeu, R., Peñarrubia, J., Carmona, F. and Balasch, J. (2013) Plasma Homocysteine and Vitamin B12 Serum Levels, Red Blood Cell Folate Concentrations, C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Mutation and Risk of Recurrent Miscarriage: A Case-Control Study in Spain. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **51**, 693-699. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0452>
- [29] Zammiti, W., Mtiraoui, N. and Mahjoub, T. (2008) Lack of Consistent Association between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms, Homocysteine Levels and Recurrent Pregnancy Loss in Tunisian Women. *American Journal of Reproductive Immunology*, **59**, 139-145. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00551.x>
- [30] Lee, G.S., Park, J.C., Rhee, J.H. and Kim, J.I. (2016) Etiologic Characteristics and Index Pregnancy Outcomes of Recurrent Pregnancy Losses in Korean Women. *Obstetrics & Gynecology Science*, **59**, 379-387. <https://doi.org/10.5468/ogs.2016.59.5.379>

-
- [31] Alonso, A., Soto, I., Urgellés, M.F., *et al.* (2002) Acquired and Inherited Thrombophilia in Women with Unexplained Fetal Losses. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, **187**, 1337-1342. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.126849>
- [32] Crider, K.S., Zhu, J.-H., Hao, L., *et al.* (2011) *MTHFR* 677C→T Genotype Is Associated with Folate and Homocysteine Concentrations in a Large, Population-Based, Double-Blind Trial of Folic Acid Supplementation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **93**, 1365-1372. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004671>
- [33] Nelen, W.L., Blom, H.J., Thomas, C.M., *et al.* (1998) Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphism Affects the Change in Homocysteine and Folate Concentrations Resulting from Low Dose Folic Acid Supplementation in Women with Unexplained Recurrent Miscarriage. *The Journal of Nutrition*, **128**, 1336-1341. <https://doi.org/10.1093/jn/128.8.1336>
- [34] Quéré, I., Mercier, E., Bellet, H., *et al.* (2001) Vitamin Supplementation and Pregnancy Outcome in Women with Recurrent Early Pregnancy Loss and Hyperhomocysteinemia. *Fertility and Sterility*, **75**, 823-825. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)01678-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)01678-8)
- [35] 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南工作组. 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南(2017) [J]. 中国生育健康杂志, 2017, 28(5): 401-410.
- [36] Chakraborty, P., Banerjee, S., Saha, P., *et al.* (2013) Aspirin and Low-Molecular Weight Heparin Combination Therapy Effectively Prevents Recurrent Miscarriage in Hyperhomocysteinemic Women. *PLOS ONE*, **8**, e74155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074155>