

## 赤峰地区育龄女性叶酸代谢相关基因检测分析

张明杰 苏东越 崔贵虎 谢岩 张天昭 李久洋 高朋华

作者单位: 024000 内蒙古自治区赤峰, 赤峰市妇产医院, 内蒙古自治区计划生育科学技术研究所

通信作者: 崔贵虎, Email: 406297079@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.04.009

**【摘要】** 目的 调查分析内蒙古自治区赤峰地区育龄女性叶酸代谢相关基因频率及分布, 根据调查结果, 有针对性地指导育龄女性在备孕期间及孕期合理补充叶酸, 预防出生缺陷。方法 采用横断面调查研究方法, 以赤峰地区 748 名育龄女性作为研究对象, 其中蒙古族(第 1 组)和汉族(第 2 组)各 374 名, 两组一般资料比较差异无统计学意义。采集所有受检者口腔黏膜上皮细胞, 采用 DNA 提取试剂盒对细胞中的基因组 DNA 进行提取, 应用 Taqman-MGB 探针荧光定量聚合酶链反应(PCR)进行 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)和甲硫氨酸合成还原酶(MTRR)基因位点(包括 MTHFR C677T、MTHFR A1298C、MTRR A66G)的多态性检测, 统计并分析上述基因多态性的分布特征, 比较两组育龄女性的叶酸代谢能力是否存在差异。结果 经哈迪-温伯格(H-W)平衡分析, MTHFR C677T、MTHFR A1298C、MTRR A66G 位点均符合 H-W 平衡, 样本具有本区域群体代表性。第 1 组和第 2 组育龄女性 MTHFR C677T 位点野生型(CC)、杂合突变型(CT)、纯合突变型(TT)的基因频率分别为 23.8%、47.9%、28.3% 和 18.7%、49.2%、32.1%; MTHFR A1298C 位点野生型(AA)、杂合突变型(AC)、纯合突变型(CC)的基因频率分别为 66.9%、29.4%、3.7% 和 74.6%、22.5%、2.9%; MTRR A66G 位点野生型(AA)、杂合突变型(AG)、纯合突变型(GG)的基因频率分别为 48.7%、42.2%、9.1% 和 54.0%、37.7%、8.3%。第 1 组和第 2 组育龄妇女的叶酸代谢能力风险评级分析显示, 未发现风险、低度、中度、高度风险基因频率分别为 27.3%、6.7%、33.9%、32.1% 和 27.9%、8.3%、29.1%、34.7%, 两组比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。结论 赤峰地区超过 70% 的育龄女性携带叶酸代谢高风险基因, 应在孕前或孕早期检测叶酸代谢能力, 叶酸代谢基因多态性检测能为指导科学增补叶酸、监测孕期叶酸补充, 减少出生缺陷提供数据支持。

**【关键词】** 育龄女性; 叶酸代谢; 基因多态性

### Detection and analysis of folate metabolism related genes in women of childbearing age in Chifeng area

Zhang Mingjie, Su Dongyue, Cui Guihu, Xie Yan, Zhang Tianzhao, Li Jiuyang, Gao Penghua. Chifeng Gynecology and Obstetrics Hospital, Inner Mongolia Family Planning Research Institute, Chifeng 024000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: Cui Guihu, Email: 406297079@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate and analyze the frequency and distribution of folate metabolism related genes of women of childbearing age in Chifeng area of Inner Mongolia Autonomous Region, and according to the survey results, guide the women of childbearing age to reasonably supplement folate during pregnancy, so as to prevent birth defects. **Methods** Using the cross-sectional survey method, 748 women of childbearing age in Chifeng area were selected as research objects, including 374 Mongolian women (group 1) and 374 Han women (group 2). There was no significant difference in general data between the two groups. The oral mucosal epithelial cells were collected and genomic DNA in cells was extracted using DNA extraction kit. The gene polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthetic reductase (MTRR), including MTHFR C677T, MTHFR A1298C and MTRR A66G, were detected by TaqMan-MGB probe fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The distribution characteristics of above gene polymorphisms were analyzed and the folate metabolism abilities of women were compared between the two groups. **Results** According to Hardy-Weinberg (H-W) balance analysis, MTHFR C677T, MTHFR A1298C and MTRR A66G loci all conformed to H-W balance, and the sample was representative of the population in this region. The gene frequencies of genotypes wild type (CC), heterozygous mutant (CT) and homozygous mutant (TT) at MTHFR C677T locus in groups 1 and 2 were 23.8%, 47.9%, 28.3% and 18.7%, 49.2%, 32.1%, respectively. The gene frequencies of genotypes wild type (AA), heterozygous mutant (AC), and homozygous mutant (CC) at MTHFR A1298C locus were 66.9%, 29.4%, 3.7%

and 74.6%, 22.5%, 2.9%, respectively. The gene frequencies of genotypes wild type (AA), heterozygous mutant (AG), and homozygous mutant (GG) of MTRR A66G locus were 48.7%, 42.2%, 9.1% and 54.0%, 37.7%, 8.3%, respectively. The risk rating analysis of folate metabolic capacity of women of childbearing age in group 1 and group 2 showed that the gene frequencies of no risk, low risk, medium risk and high risk of folate metabolism in groups 1 and 2 were 27.3%, 6.7%, 33.9%, 32.1% and 27.9%, 8.3%, 29.1%, 34.7%, respectively, and there was no statistically significant difference between the two groups (all  $P > 0.05$ ). **Conclusions** More than 70% of women of childbearing age in Chifeng area carry folate metabolism related high-risk genes. The ability of folate metabolism should be detected before pregnancy or early pregnancy. The detection of folate metabolism related gene polymorphism can provide data support for guiding the scientific supplement of folate, monitoring the supplement of folate during pregnancy and reducing birth defects.

**【Key words】** Woman of childbearing age; Folate metabolism; Gene polymorphism

出生缺陷是胎儿或胚胎在生长发育中出现的机体解剖学结构以及功能或代谢异常。造成出生缺陷的因素主要有染色体变异、基因突变等遗传因素，以及环境因素、遗传和环境因素的交互作用等<sup>[1-2]</sup>。

叶酸也被称为维生素 B9，是维生素 B 族复合体之一，也是一种水溶性维生素。人体自身不能合成叶酸，必须通过摄取食物或合成叶酸来进行补充<sup>[3]</sup>。叶酸在人体生长发育及基因表达方面发挥着重要作用，主要参与 DNA 的合成和甲基化等，但叶酸代谢相关基因具有多态性，基因位点发生改变后会影 响人体内的叶酸代谢水平，进而影响叶酸含量，最终导致胎儿出生缺陷、孕妇习惯性流产、妊娠期高血压等不良结局<sup>[4]</sup>。5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)、甲硫氨酸合成还原酶(methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase, MTRR)在叶酸代谢途径中有关键作用，编码酶基因的位点(包括 MTHFR C677T、MTHFR A1298C、MTRR A66G)发生改变会使酶活性降低，从而导致机体对叶酸的利用能力降低<sup>[5]</sup>。当体内叶酸缺乏时，一碳单位的合成将受阻，进而影响 DNA 和 RNA 的合成。孕前和(或)孕期未补充叶酸或补充量不足，将增加胎儿患神经管畸形、唐氏综合征以及心脏畸形的风险<sup>[6-8]</sup>。自 1990 年起，全球范围内便开始对围孕期妇女增补叶酸情况进行干预，以避免出生缺陷<sup>[9]</sup>。我国也已经开始针对备孕和孕期女性进行叶酸增补。本研究调查分析内蒙古自治区赤峰地区育龄女性对叶酸的代谢能力，旨在根据不同人群对叶酸的利用能力差异，有针对性地制定叶酸增补方案，指导孕期保健，预防出生缺陷，现将结果报告如下。

**1 资料与方法**

**1.1 研究对象及一般资料** 选择 2019 年 6 月—2021 年 4 月在赤峰市妇产医院进行检查的 748 名

育龄女性作为研究对象，其中蒙古族〔第 1 组，平均年龄(30.0±3.6)岁〕和汉族〔第 2 组，平均年龄(31.0±4.2)岁〕各 374 名，两组年龄比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 研究方法**

**1.2.1 样本 DNA 提取** 采集所有受检者口腔黏膜上皮细胞样本，利用 DNA 提取试剂盒提取细胞中的 DNA，所有操作按照试剂盒说明书进行。

**1.2.2 检测方法** 采用 Taqman-MGB 探针荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测 MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 基因位点的多态性。

**1.3 伦理学** 本研究符合医学伦理学标准，并经赤峰市妇产医院伦理审批(审批号：20210918)，所有检测均获得受检者或家属的知情同意。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据。计数资料以例(%)表示，组间比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 赤峰地区育龄女性叶酸代谢能力风险评级分析** 通过检测赤峰地区两组育龄女性的叶酸代谢相关基因突变情况，综合评价研究对象叶酸代谢能力的强弱。经过统计得出，第 1 组和第 2 组育龄女性叶酸代谢能力分为 4 个等级，即未发现风险、低风险、中风险、高风险，基因频率分别为 27.3%、6.7%、33.9%、32.1% 和 27.9%、8.3%、29.1%、34.7%，两者比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。见表 1。

**表 1 赤峰地区育龄女性叶酸代谢能力风险评级**

组别	人数 (名)	风险等级〔名(%)〕			
		未发现风险	低风险	中风险	高风险
第 1 组	374	102(27.3)	25(6.7)	127(33.9)	120(32.1)
第 2 组	374	104(27.9)	31(8.3)	109(29.1)	130(34.7)

注：第 1 组为蒙古族育龄女性，第 2 组为汉族育龄女性

表 2 赤峰地区育龄女性叶酸代谢基因哈迪-温伯格平衡分析

组别	人数 (名)	MTHFR C677T(名)			P 值	MTHFR A1298C(名)			P 值	MTRR A66G(名)			P 值	
		野生型 CC	杂合 突变型 CT	纯合 突变型 TT		野生型 AA	杂合 突变型 AC	纯合 突变型 CC		野生型 AA	杂合 突变型 AG	纯合 突变型 GG		
第 1 组	实际频率	374	89	179	106	0.877	250	110	14	0.972	182	158	34	1.000
	理论频率	374	86	186	102		249	112	13		182	158	34	
第 2 组	实际频率	374	70	184	120	1.000	279	84	11	0.676	202	141	31	0.791
	理论频率	374	70	184	120		275	91	8		199	148	27	

注: MTHFR 为 5, 10- 亚甲基四氢叶酸还原酶, MTRR 为甲硫氨酸合成还原酶; 第 1 组为蒙古族育龄女性, 第 2 组为汉族育龄女性

表 3 赤峰地区育龄女性 MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 的基因型频数和频率分布

组别	人数 (名)	MTHFR C677T [名(%)]			P 值	MTHFR A1298C [名(%)]			P 值	MTRR A66G [名(%)]			P 值
		野生型 CC	杂合 突变型 CT	纯合 突变型 TT		野生型 AA	杂合 突变型 AC	纯合 突变型 CC		野生型 AA	杂合 突变型 AG	纯合 突变型 GG	
第 1 组	374	89(23.8)	179(47.9)	106(28.3)	0.201	250(66.9)	110(29.4)	14(3.7)	0.066	182(48.7)	158(42.2)	34(9.1)	0.342
第 2 组	374	70(18.7)	184(49.2)	120(32.1)		279(74.6)	84(22.5)	11(2.9)		202(54.0)	14(37.7)	31(8.3)	

注: MTHFR 为 5, 10- 亚甲基四氢叶酸还原酶, MTRR 为甲硫氨酸合成还原酶; 第 1 组为蒙古族育龄女性, 第 2 组为汉族育龄女性

**2.2 哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg, H-W)遗传平衡分析** 对检测到的 MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 基因位点分别进行 H-W 遗传平衡检验, 结果均符合 H-W 平衡, 证明样本具有本区域群体代表性。见表 2。

**2.3 赤峰地区育龄女性 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 的基因型分析** 赤峰地区育龄女性 MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 的野生型、杂合突变型和纯合突变型的基因型频率比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。见表 3。

### 3 讨论

出生缺陷又称为先天畸形, 其影响因素较多, 主要有感染、遗传、环境、物理化学、免疫和营养因素等<sup>[4, 10]</sup>。国家卫生健康委在 2012 年发布的中国出生缺陷防治报告中提到, 我国是人口出生缺陷大国, 每年新增出生缺陷人口约 90 万例, 总发生率高达约 5.6%, 给个人家庭和社会都带来了沉重负担<sup>[11-12]</sup>。为避免出生缺陷, 我国也已经开始指导孕期女性进行叶酸增补, 即明确需要怀孕的女性在孕前 3 个月至孕 3 个月口服叶酸, 剂量为 400  $\mu\text{g}/\text{d}$ , 但仍有很多女性在补充了叶酸后依然发生胎儿神经管缺陷, 分析其原因主要是由于发生遗传叶酸代谢障碍, 导致人体对叶酸利用能力有缺陷, 使常规的叶酸补充剂无法满足人体的需量<sup>[13]</sup>。因此, 为进一步降低叶酸代谢相关出生缺陷和妊娠相关疾病的发生, 应对育龄女性进行叶酸代谢能力相关基因检测, 筛选叶酸代谢能力异常的高危女性, 根据每个人的叶酸代谢能力风险程度补充合适剂量的叶酸, 从而达到促

进孕妇与胎儿健康的目标, 减少出生缺陷。

叶酸天然存在于绿叶蔬菜、柑橘类水果、豆类以及动物源性食物(如鸡蛋和肝脏)中。在功能上, 可参与人体内许多基本的生化过程, 包括 DNA 及 RNA 的合成与修复, 以及蛋白质的甲基化等。通过食物摄取天然存在的叶酸是可能的, 有时甚至是足够的, 但是, 每个人从食物中吸收及代谢叶酸的能力不同。膳食中含有的叶酸在体内转化为四氢叶酸, 四氢叶酸是大多甲基化反应的重要甲基供体。MTHFR 是叶酸代谢途径中的关键酶, 可将 5, 10- 亚甲基四氢叶酸转化为 5- 甲基四氢叶酸, 从而产生甲基供体, 用于将同型半胱氨酸甲基化为甲硫氨酸。但 MTHFR 具有多态性, 这种多态性导致酶活性降低和 DNA 甲基化与合成水平的改变, 从而导致每个人对叶酸的吸收代谢能力不同。这种多态性改变主要包括 MTHFR C677T 及 MTHFR A1298C 改变<sup>[14]</sup>。

MTHFR C677T 多态性是基因在第 677 位的交换, 其核苷酸半胱氨酸与胸腺嘧啶的交换最终导致 MTHFR 中的丙氨酸被缬氨酸取代。这种突变导致 5- 甲基四氢叶酸的减少和底物 5, 10- 亚甲基四氢叶酸的积累增加, 最终导致酶活性降低, 从而引发血浆同型半胱氨酸增高, 对母婴造成危害。MTHFR A1298C 多态性发生在第 7 外显子, 导致谷氨酸在第 429 位密码子转化为丙氨酸。这种多态性位于酶的调节结构域 s- 腺苷甲硫氨酸, 并导致 MTHFR 的构象变化, 使酶的活性降低, 最终导致胎儿流产、早产或出生缺陷<sup>[15-16]</sup>。

MTRR 能催化同型半胱氨酸转化为甲硫氨酸。

当位于 MTRR 第 66 位的碱基腺嘌呤(adenine, A)突变为鸟嘌呤(guanine, G)时,其编码的氨基酸会由甲硫氨酸转化为异亮氨酸,导致 MTRR 活性降低,不能催化同型半胱氨酸转化为甲硫氨酸发挥功能。同型半胱氨酸是一种含巯基的氨基酸,其转化需要叶酸的参与,当人体内叶酸缺乏时,血液中同型半胱氨酸的含量增加,高水平同型半胱氨酸会抑制胚胎细胞合成 DNA 及 RNA,同时也会使有丝分裂时染色体不分离,最终导致胎儿畸形。高水平同型半胱氨酸还会影响机体的凝血及纤溶系统,进而引发其他妊娠期相关疾病<sup>[15-16]</sup>。

为更好地评估育龄女性叶酸代谢障碍情况,制定个性化的叶酸增补方案,本研究以赤峰地区育龄女性为研究对象,检测与叶酸代谢相关的主要酶基因 MTHFR C677T、MTHFR A1298 及 MTRR A66G 的基因多态性分布,最终结果显示,赤峰地区育龄女性 MTHFR C677T、MTHFR A1298 及 MTRR A66G 的基因多态性分布不同于其他地区。

本研究对 374 名汉族与 374 名蒙古族育龄女性的叶酸代谢能力检测结果分析显示, MTHFR 基因的 C677T、A1298C 位点, MTRR 基因的 A66G 位点均存在多态现象。赤峰地区汉族和蒙古族育龄女性 MTHFR C677T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 基因型频率比较差异均无统计学意义。本研究结果显示,汉族与蒙古族育龄女性叶酸代谢能力未发现风险、低风险、中风险、高风险基因频率分别为 27.9%、8.3%、29.1%、34.7% 和 27.3%、6.7%、33.9%、32.1%,两组比较差异均无统计学意义,并且汉族和蒙古族育龄女性均超过 70% 携带叶酸代谢相关高风险基因,而未发现携带风险基因的仅占约 20%,因此提倡赤峰地区不论是蒙古族还是汉族育龄女性,均应在孕前或孕早期检测叶酸代谢能力,根据叶酸代谢风险程度和叶酸代谢基因多态性的检测结果,为临床科学指导增补叶酸,减少出生缺陷提供数据支持。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

1 云小云,欧凤荣. 叶酸缺乏与出生缺陷相关性研究进展[J]. 实用药物与临床, 2016, 19 (2): 244-248. DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.

201602030.

- 2 吴涛,海金富,何瑞芬,等. 育龄女性叶酸代谢关键酶基因遗传多态性的调查分析[J]. 宁夏医学杂志, 2019, 41 (5): 422-425. DOI: 10.13621/j.1001-5949.2019.05.0422.
- 3 陈新,张翠军. 江苏地区汉族育龄女性叶酸代谢酶基因多态性分析[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32 (7): 1527-1530. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2017.07.61.
- 4 韩亚,鲁衍强,刘红,等. 遵义地区育龄女性叶酸代谢关键酶基因位点多态性研究[J]. 中外女性健康研究, 2020, 29 (7): 4-5, 16.
- 5 李才明,张成,邱淑莲,等. 中国南方汉族人 MTHFR 基因多态性与缺血性脑卒中的遗传易感性研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14 (9): 526-528. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2002.09.004.
- 6 GAUGHAN D J, KLUIJTMANS L A, BARBAUX S, et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 157 (2): 451-456. DOI: 10.1016/s0021-9150(00)00739-5.
- 7 WHETSTONE J R, MATHERLY L H. The basal promoters for the human reduced folate carrier gene are regulated by a GC-box and a cAMP-response element/AP-1-like element. Basis for tissue-specific gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (9): 6350-6358. DOI: 10.1074/jbc.M008074200.
- 8 WALD N J, BOWER C. Folic acid and the prevention of neural tube defects [J]. *BMJ*, 1995, 310 (6986): 1019-1020. DOI: 10.1136/bmj.310.6986.1019.
- 9 FIGUEIREDO R F, FIGUEIREDO N, FEGURI A, et al. The role of the folic acid to the prevention of orofacial cleft: an epidemiological study [J]. *Oral Dis*, 2015, 21 (2): 240-247. DOI: 10.1111/odi.12256.
- 10 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部中国出生缺陷防治报告[R]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2012.
- 11 于玲,鲁衍强,汤萍,等. 山东临淄地区女性叶酸代谢相关基因位点多态性与胚胎停育相关性研究[J]. 中国生育健康杂志, 2016, 27 (6): 534-536, 543. DOI: 10.3969/j.issn.1671-878X.2016.06.008.
- 12 王欣业,李采青,王义成,等. 神经管畸形发病率及相关预防措施的探讨[J]. 河北医药, 2010, 32 (21): 3058-3059. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2010.21.060.
- 13 厉传琳. 我国产前诊断和筛查技术服务的规制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- 14 王艳春,雒雪. MTHFR C677T 基因与妇幼疾病相关性研究新进展[J]. 实用检验医师杂志, 2015, 7 (4): 249-250, 206. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.04.014.
- 15 李才明,张成,卢锡林,等. N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-亚甲基四氢叶酸还原酶基因与缺血性脑卒中发病的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (5): 264-267.
- 16 何燕霞,巩姣梅,沈勇,等. 河南省育龄女性叶酸利用能力现状研究[J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4 (1): 6-10. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.01.002.

(收稿日期: 2021-09-14)

(本文编辑: 邵文)