

引用本文:孔令娟,李恩彩,崔广树.妊娠期合并心脏病病人血清中MTHFR基因C677T位点多态性与母婴结局关系[J].安徽医药,2022,26(2):369-372.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.02.038.

◇临床医学◇



妊娠期合并心脏病病人血清中MTHFR基因C677T位点多态性与母婴结局关系

孔令娟¹,李恩彩¹,崔广树²

作者单位:¹德州市妇女儿童医院产科,山东 德州 253000;²德州市人民医院产科,山东 德州 253000

摘要: 目的 探讨妊娠期合并心脏病病人血清中MTHFR基因C677T位点多态性与母婴结局关系。方法 选取2018年2月至2019年10月德州市妇女儿童医院就诊的妊娠期合并心脏病病人88例(妊娠期心脏病组)及同期健康孕妇92例(对照组),通过聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RELP)法检测受试者血清MTHFR基因C677T位点多态性分布频率,并分析MTHFR基因单核苷酸各基因型与符合妊娠结局的关系。结果 MTHFR基因C677T位点基因型有CC野生型、CT杂合子型、TT纯合子型;对照组与妊娠期合并心脏病组MTHFR基因C677T位点各基因型符合Hardy-Weinberg平衡定律;与对照组相比,妊娠期心脏病组MTHFR基因C677T位点CT、TT基因型及T等位基因频率分布显著升高($P<0.05$);妊娠期心脏病组孕妇CT型、TT型病人巨大儿、新生儿低血糖、新生儿窒息、早产儿发生率均高于CC型;TT型病人巨大儿、新生儿低血糖、新生儿窒息、早产儿发生率均高于杂合子CT型($P<0.05$);二元logistic回归分析显示,MTHFR基因C677T位点杂合子CT型、纯合子突变TT型是妊娠期合并心脏病病人不良妊娠结局发生的危险因素($P<0.05$)。结论 血清中MTHFR基因C677T位点多态性与妊娠期心脏病母婴结局关系密切。

关键词: 妊娠并发症,心血管; 妊娠期合并心脏病; MTHFR基因; C677T位点多态性; 母婴结局

Relationship between C677T polymorphism of MTHFR gene and maternal and infant outcomes in pregnant women with heart disease

KONG Lingjuan¹, LI Encai¹, CUI Guangshu²

Author Affiliations:¹Department of Obstetrics, Dezhou Women's and Children's Hospital, Dezhou, Shandong 253000, China;²Department of Obstetrics, Dezhou People's Hospital, Dezhou, Shandong 253000, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between C677T polymorphism of MTHFR gene in serum and maternal and infant outcomes in pregnant women with heart disease. **Methods** 88 pregnant women with heart disease during pregnancy and 92 healthy pregnant women in the same period were selected as the study objects in Dezhou Women's and Children's Hospital from February 2018 to October 2019, the distribution frequency of C677T locus on MTHFR gene was detected by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RELP), and the relationship between MTHFR single nucleotide genotypes and pregnancy outcomes was analyzed. **Results** The genotypes of C677T locus on MTHFR gene included CC wild type, CT heterozygote and TT homozygote; the genotypes of C677T locus on MTHFR gene in the control group and the heart disease during pregnancy group conformed to Hardy-Weinberg equilibrium law; compared with the control group, the frequencies of CT, TT genotypes and T allele in C677T locus of MTHFR gene in heart disease during pregnancy group were significantly increased ($P<0.05$); the incidences of fetal macrosomia, neonatal hypoglycemia, asphyxia neonatorum and premature in pregnant women of CT type and TT type in heart disease during pregnancy group were higher than those in CC group; the incidences of fetal macrosomia, neonatal hypoglycemia, asphyxia neonatorum and premature in pregnant women of TT type were higher than those in heterozygote CT type ($P<0.05$); and binary logistic regression analysis showed that CT heterozygote and TT homozygote mutation at C677T locus on MTHFR gene were risk factors for adverse pregnancy outcome in patients with heart disease during pregnancy ($P<0.05$). **Conclusion** The C677T polymorphism of MTHFR gene in serum is closely related to the maternal and infant outcomes of heart disease during pregnancy.

Key words: Pregnancy complications, cardiovascular; Heart disease during pregnancy; MTHFR gene; C677T polymorphism; Maternal and infant outcomes

妊娠合并心脏病是产科危重症,其会使孕妇脆弱的循环系统代谢失偿,进一步造成母体和胎儿死亡、巨大儿、新生儿窒息、早产等不良妊娠结局^[1-3],

给家庭带来严重影响。近年来对不良妊娠结局研究从遗传、环境因素等层面上上升到了分子生物学层面,研究发现5,10-亚甲基叶酸还原酶(5,10-methy-

lene folate reductase, MTHFR)与叶酸代谢有关,其基因突变与自然流产、早产、新生儿窒息等、心血管疾病等不良妊娠结局有关^[4]。Al-Achkar等^[5]研究发现MTHFR基因的C677T多态性是复发性流产的危险因素,具有C677T突变型TT型孕妇流产风险高。Dekker等^[6]研究显示母体受孕期间过度服用叶酸对儿童肺功能产生不利影响,可能与MTHFR基因位点C677T突变有关。然而,有关妊娠期合并心脏病病人血清中MTHFR基因C677T位点多态性与母婴结局关系研究鲜有报道,因此本研究探讨妊娠期合并心脏病病人血清中MTHFR基因C677T位点多态性与母婴结局关系,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年2月至2019年10月德州市妇女儿童医院妊娠合并心脏病病人88例为妊娠期心脏病组,年龄范围为22~38岁,年龄(28.52±2.35)岁;另同期选取与妊娠合并心脏病组相近年龄段的92例健康孕妇为对照组,年龄范围为23~36岁,年龄(29.06±2.87)岁。两组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。所有入选对象均为单胎妊娠,均按时进行常规产前检查至分娩,并由专人随访记录相应妊娠结局。诊断标准:参考中华医学会妇产科学分会产科学组编撰的《妊娠合并心脏病的诊治专家共识(2016)》^[7]。纳入标准:(1)符合NYHA心功能分级I、II、III、IV级者;(2)临床资料完整者;(3)汉族人。排除标准:(1)伴有其它严重并发症者;(2)中途退出者;(3)依从性差者;(4)严重肝、肾等脏器功能不全者。所有研究对象及近亲属均签署知情同意书。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 试剂与仪器 全血基因组DNA快速抽提试剂盒(货号NG-8647)购自美国OMEGA公司,Taq DNA聚合酶(货号68N25)、dNTP(货号NQ2056)、100bp DNA ladder(货号SM0321)、限制性内切酶Hnif I(货号SM8937)均购自赛默飞世尔生物科技有限公司,C677T多态性位点PCR引物(货号NM-2130)由上海英骏生物工程公司合成并提供;PCR分析仪(型号ABI7500)购自北京智杰方远科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组DNA提取及扩增 孕妇待产前,收集两组所有研究对象空腹静脉血2 mL于抗凝管中置-80℃冰箱保存待用。后经常规解冻后采用全血基因组DNA快速抽提试剂盒提取外周血基因组DNA,严格按照操作说明书进行。PCR扩增反应体系:灭菌双蒸水14.2 μL,10×PCR缓冲液2 μL,dNTP 1.6 μL,正向引物与反向引物各0.5 μL,DNA模板1 μL,

TaqDNA聚合酶0.2 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,60℃退火45 s,72℃延伸45 s,以上三个步骤循环35次,最后72℃延伸10 min。反应结束后取出离心备用,对产物进行纯化。采用限制性内切酶Hnif I酶切鉴定。酶切反应体系:10×Buffer 1.5 μL,0.1×BSA 1.5 μL,Hnif I 0.8 μL,PCR产物DNA 6 μL,ddH₂O 5.2 μL。单管反应体积15 μL。反应条件:37℃下温浴2 h,10×Buffer 1.5 μL终止反应。酶切产物以3.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,采用凝胶成像系统分析单核苷酸多态性基因型结果。C677T多态性位点引物序列见表1。

表1 基因多态性位点引物设计

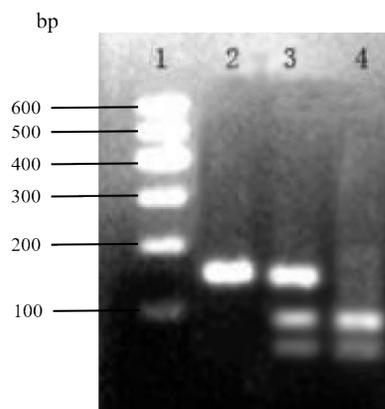
基因多态性位点	C677T	产物/bp
正向引物 5'-3'	ACGTTGGATGGCTGGACTCTCTTTT- GGAGG	152
反向引物 5'-3'	ACGTTGGATGAGGAATTGTATG- GAGCTGGG	

1.3.2 观察指标 记录并比较两组孕产妇不良母婴结局:巨大儿、新生儿低血糖、新生儿窒息、早产儿事件发生率。

1.4 统计学方法 采用统计学软件SPSS 19.0进行数据统计分析,符合正态分布的计数资料以例(%)表示,两组间比较采用 χ^2 检验;采用Hardy-Weinberg平衡检测平衡程度。所有数据均以 $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTHFR 基因 C677T 位点基因型多态性 Hnif I酶切结果显示,C677T位点基因型包括:仅有152 bp片段的为野生型(CC),有98 bp和54 bp片段的为纯合子(TT),既有152 bp又有98 bp、54 bp片段的是杂合子(CT),见图1。



注:1—DNA ladder(100-600 bp);2—CC野生型;3—CT杂合子;4—TT纯合子。

图1 C677T位点基因型检测

2.2 Hardy-Weinberg 平衡定律检验 根据 Hardy-Weinberg 平衡定律, 对照组与妊娠期心脏病组 MTHFR 基因 C677T 位点各基因型的期望值和观察值进行 χ^2 检验, 均 $P>0.05$, 符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 提示群体来自同一孟德尔群体, 所选样本进行群体遗传学研究具有代表性。见表 2。

表 2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验两组 MTHFR 基因 C677T 位点各基因型期望值和观察值结果/例

基因型	对照组(n=92)		妊娠期心脏病组(n=88)	
	观测值	期望值	观测值	期望值
野生 CC 型	56	53.26	28	27.28
杂合子 CT 型	28	33.48	42	43.43
纯合子 TT 型	8	5.26	18	17.28
χ^2 值	2.46		0.10	
P 值	0.291		0.953	

2.3 MTHFR 基因 C677T 位点多态性分析 与对照组相比, 妊娠期心脏病组 MTHFR 基因 C677T 位点 CT、TT 基因型及 T 等位基因频率显著升高 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 对照组与妊娠期心脏病组 MTHFR 基因 C677T 位点多态性分析/例(%)

组别	例数	基因型			等位基因	
		野生 CC 型	杂合子 CT 型	纯合子 TT 型	C	T
对照组	92	56 (60.87)	28 (30.43)	8(8.70)	140 (76.09)	44 (23.91)
妊娠期心脏病组	88	28 (31.82)	42 (47.73)	18 (20.45)	98 (55.68)	78 (44.32)
χ^2 值		15.25	5.66	5.03	16.72	
P 值		0.000	0.017	0.025	0.000	

2.4 MTHFR 基因 C677T 位点多态性与妊娠结局关系 与野生 CC 型比较, 妊娠期心脏病组孕妇突变型杂合子 CT 型、纯合子 TT 型病人巨大儿、新生儿低血糖、新生儿窒息、早产儿发生率均升高; 与杂合子 CT 型比较, 纯合子 TT 型病人巨大儿、新生儿低血糖、新生儿窒息、早产儿发生率升高。见表 4。

2.5 妊娠期心脏病病人不良妊娠结局的影响因素分析 以是否发生不良妊娠结局为因变量, 以 MTHFR 基因 C677T 位点野生 CC 型、杂合子 CT 型、纯合子突变 TT 型为自变量进行二元 logistic 回归分析显示, 与 MTHFR 基因 C677T 位点野生 CC 型比较, 杂合子 CT 型、纯合子突变 TT 型发生不良妊娠结局的风险分别为 2.033 倍、1.753 倍。见表 5、6。

表 4 MTHFR 基因 C677T 位点多态性与妊娠结局关系/例(%)

组别	例数	巨大儿 (n=13)	新生儿低血 糖(n=14)	新生儿窒 息(n=20)	早产儿 (n=15)
野生 CC 型	28	1(3.57)	1(3.57)	3(10.71)	2(7.14)
杂合子 CT 型	42	5(11.90)	5(11.90)	7(16.67)	4(9.52)
纯合子 TT 型	18	7(38.88)	8(42.11)	10(50.00)	9(42.86)
χ^2 值		12.00	0.95	0.93	0.94
P 值		0.035	0.028	0.044	0.034

表 5 变量赋值表

因素	赋值说明
因变量 不良妊娠结局	未发生=0, 发生=1
自变量 MTHFR 基因 C677T 位点	野生 CC 型=0, 杂合子 CT 型=1, 纯合子突变 TT 型=2

表 6 妊娠期心脏病病人不良妊娠结局的危险因素分析

影响因素	β 值	SE 值	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
野生 CC 型			12.14	0.000		
杂合子 CT 型	0.317	0.131	5.86	0.007	2.033	1.607~2.574
纯合子突变 TT 型	0.561	0.210	7.14	0.002	1.753	1.153~2.666

3 讨论

妊娠合并心脏病是严重妊娠并发症, 如未使用恰当的处理方法可能会造成严重不良妊娠结局。王宏丽等^[8]研究发现, 心功能分级越高, 自然分娩率越低, 早产、新生儿窒息、低体重儿等不良结局发生率越高。因此为了有效改善不良妊娠结局, 对妊娠合并心脏病病人妊娠结局相关影响因素进行深入分析在临床上意义重大。随着分子生物学技术的快速发展, MTHFR 基因及其基因突变与不良妊娠结局的关系越来越受到关注。

MTHFR 基因位于染色体 1p36.3, 是叶酸代谢过程中关键酶类。MTHFR 首先将 5, 10-亚甲基四氢叶酸转化为 5, 10-甲基四氢叶酸, 5, 10-甲基四氢叶酸使同型半胱氨酸甲基化为蛋氨酸^[9-11]。MTHFR 基因突变使 MTHFR 活性降低, 使 5, 10-亚甲基四氢叶酸向 5, 10-甲基四氢叶酸的转化减弱, 进一步导致同型半胱氨酸甲基化为蛋氨酸受阻, 从而使同型半胱氨酸堆积, 最终引起高同型半胱氨酸血症^[12]。高同型半胱氨酸升高使甲基转移酶受抑制, 进一步造成低甲基化, 最终使染色体不分离, 从而导致不良妊娠结局(如唇腭裂、新生儿畸形、早产等)发生^[13]。郭从从等^[14]研究发现, MTHFR 基因 C677T 位点多态性可能与先天性心脏病发生发展密切相关。本研

究结果显示, MTHFR 基因 C677T 位点多态性有野生型(CC)、纯合子型(TT)、杂合子型(TC), 且 C677T 位点多态性分布频率服从 Hardy-Weinberg 平衡定律, 提示所选样本均来自同一孟德尔群体, 所选样本进行群体遗传学研究具有代表性。

研究发现, 与正常妊娠孕妇相比, 不良妊娠孕妇 MTHFR C677T 位点 C/C 型基因频率、C 等位基因频率明显降低, C/T、T/T 基因型频率及 T 等位基因频率明显升高, 提示 MTHFR 基因多态性与不良妊娠结局关系密切^[15]。本研究发现, 妊娠期心脏病组 MTHFR 基因 C677T 位点 CT、TT 基因型及 T 等位基因频率分布显著高于对照组。与吴素琴等研究结果一致, 也说明 MTHFR 基因 C677T 位点多态性与不良妊娠结局有密切关系。再次研究发现, 妊娠期心脏病组中 MTHFR 基因 C677T 位点杂合子 CT 型、纯合子 TT 型病人巨大儿、新生儿低血糖、新生儿窒息、早产儿发生率均高于野生 CC 型; 纯合子 TT 型病人巨大儿、新生儿低血糖、新生儿窒息、早产儿发生率均高于杂合子 TC 型。提示妊娠期心脏病组中携带突变 T 基因突变病人不良妊娠结局发生率高于无 T 突变基因病人。研究发现, MTHFR C677 TT 型是导致育龄期女性不良妊娠结局发生的独立危险因素^[16]。提示 MTHFR C677 能够明显增加不良妊娠结局的发生。最后二元 logistic 回归分析结果发现, MTHFR 基因 C677T 位点杂合子 CT 型、纯合子突变 TT 型发生不良妊娠结局的风险分别是野生 CC 型的 2.033 倍、1.753 倍。进一步提示 MTHFR 基因多态性不仅与妊娠期心脏病相关, 且 C677T 纯合突变与不良妊娠结局关系密切。卜春艳等^[17]研究显示, MTHFR 基因 C677T 位点杂合子 CT 型、纯合子突变 TT 型与妊娠孕妇产前发病风险有一定相关性, 在子痫前期高风险孕妇中进行 MTHFR 基因 C677T 多态性分析, 及时补充叶酸, 有助于预防子痫前期发生。以此推测临床上对妊娠期心脏病确诊或可疑孕妇结合 MTHFR C677T 位点多态性检测, 且对 TT 高风险及 CT 中风险孕妇补充不同剂量叶酸可能有助于降低不良妊娠发生率。

综上所述, MTHFR 基因多态性不仅与妊娠期心脏病相关, 且与妊娠期心脏病不良妊娠结局关系密切。研究也存在一定不足, 样本选择受制于地区、例数、人群, 需进一步扩大地区、扩大样本进一步证实 MTHFR 基因突变与妊娠期心脏病病人母婴结局的关系。

参考文献

[1] SILVERSIDES CK, GREWAL J, MASON J, et al. Pregnancy outcomes in women with heart disease: the carpreg II study[J]. J

Am Coll Cardiol, 2018, 71(21):2419-2430.

- [2] 于晓丽, 范颖, 李斌, 等. 心力衰竭对晚期妊娠合并心脏病孕妇母婴妊娠结局的影响[J]. 吉林医学, 2019, 40(8):1760-1762
- [3] 郑玉霞, 孙秀云. 妊娠合并先天性心脏病相关肺动脉高压患者围产期结局及影响因素分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2018, 26(6):478-482.
- [4] LIU Y, ZHANG F, DAI L. C677T polymorphism increases the risk of early spontaneous abortion [J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(8):1737-1741.
- [5] AL-ACHKAR W, WAFA A, AMMAR S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in syrian women[J]. Reprod Sci, 2017, 24(9):1275-1279.
- [6] DEKKER HTDEN, JADDOE V, REISS IK, et al. Maternal folic acid use during pregnancy, methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism, and child's lung function and asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2018, 48(2):175-185.
- [7] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠合并心脏病的诊治专家共识(2016)[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(6):401-409.
- [8] 王宏丽. 妊娠合并心脏病患者不同心功能状态对母婴结局的影响[J]. 临床研究, 2017, 25(2):218-219.
- [9] FERNÁNDEZ-VEGA B, ÁLVAREZ L, GARCÍA M, et al. Association study of high-frequency variants of MTHFR gene with retinal vein occlusion in a Spanish population [J]. Ophthalmic Genet, 2019, 40(4):342-349.
- [10] KHALIGHI K, CHENG G, MIRABBASI S, et al. Opposite impact of Methylene tetrahydrofolate reductase C677T and Methylene tetrahydrofolate reductase A1298C gene polymorphisms on systemic inflammation [J/OL]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(5):e22401. DOI: 10.1002/jcla.22401.
- [11] BAHADIR A, EROZ R, DIKICI S. Investigation of MTHFR C677T gene polymorphism, biochemical and clinical parameters in Turkish migraine patients: association with allodynia and fatigue[J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(8):1055-1063.
- [12] AŞLAR D, ÖZDİLER E, ALTUĞ AT, et al. Determination of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene polymorphism in Turkish patients with nonsyndromic cleft lip and palate [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2013, 77(7):1143-1146.
- [13] ABHINAND PA, MANIKANDAN M, MAHALAKSHMI R, et al. Meta-analysis study to evaluate the association of MTHFR C677T polymorphism with risk of ischemic stroke [J]. Bioinformation, 2017, 13(6):214-219.
- [14] 郭从从, 韩佳, 冷振香. MTHFR、PITX2 基因多态性与先天性心脏病的关系探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(6):651-653.
- [15] 吴素勤, 王鹰, 吴建发, 等. 育龄期女性叶酸代谢酶 MTHFR、MS 基因多态性与不良妊娠及子代出生缺陷的关系[J]. 中国医师杂志, 2017, 19(11):1717-1719.
- [16] 李艳, 贾丽丽. 育龄期女性叶酸代谢基因与不良妊娠结局的关系分析[J]. 中外女性健康研究, 2018, 7(13):128-129.
- [17] 卜春艳, 王颖, 王微, 等. MTHFR 基因检测及孕期补充叶酸与子痫前期发病风险的相关分析[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(11):1414-1418.

(收稿日期:2020-02-05, 修回日期:2020-03-23)