

# 外周血凝血指标、MTHFR 和 MTRR 基因多态性在易栓症反复自然流产中的诊断价值

高翔, 朱云霞, 孟君, 张双霞, 熊霞鹂, 张志红, 马晓鹏, 王金花

(首都医科大学附属北京佑安医院产科, 北京 100069)

**【摘要】目的:** 探究外周血凝血指标、亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)和甲硫氨酸合成酶还原酶(MTRR)的基因多态性在易栓症反复自然流产中的诊断价值。**方法:** 选取流产次数 $\geq 2$ 次的自然流产的非妊娠妇女为观察组( $n=98$ );同期进行孕前检查的健康非妊娠妇女作为对照组( $n=80$ )。提取两组妇女血样DNA,采用荧光定量PCR法检测其MTHFR、MTRR基因位点,同时检测记录外周血D-二聚体(D-D)水平、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、凝血活酶时间(aPTT)。**结果:** 两组对象年龄、民族、居住地、人工助孕史及体质质量指数(BMI)、外周血TT、PT、aPTT水平等一般资料比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),观察组血浆D-D浓度高于对照组( $P<0.05$ )。两组MTHFR A1298C、MTHFR C677T、MTRR A66G基因分布符合Hardy-Weinberg平衡定律,同时两组MTHFR A1298C基因型(A/C)、MTRR A66G基因型(A/G)比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),观察组MTHFR C677T等位基因T及TT基因型占比均高于对照组( $P<0.05$ )。Logistic分析结果显示,血浆D-D、MTHFR C677T位点的TT基因型为易栓症反复自然流产的影响因素( $P<0.05$ )。**结论:** 易栓症反复自然流产患者血清凝血指标D-D异常升高,同时MTHFR C677T位点以TT型较为常见,对易栓症反复自然流产的早期诊断具有一定应用价值。

**【关键词】** 易栓症;反复自然流产;MTHFR和MTRR基因多态性;D-二聚体;诊断价值

**【中图分类号】** R714.2 **【文献标志码】** A

## Diagnostic value of peripheral blood coagulation index and MTHFR and MTRR gene polymorphism in recurrent spontaneous abortion with thromboembolism

GAO Xiang, ZHU Yun-xia, MENG Jun, ZHANG Shuang-xia, XIONG Xia-li, ZHANG Zhi-hong, MA Xiao-peng, WANG Jin-hua

(Department of Obstetrical, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the diagnostic value of peripheral blood coagulation index and methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionate synzyme reductase (MTRR) gene polymorphism in recurrent spontaneous abortion with thromboembolism. **Methods:** 98 non-pregnant women with spontaneous abortion  $\geq 2$  times were included as study subjects and counted as observation group. In addition, 80 healthy non-pregnant women who underwent pre-pregnancy examination during the same period were selected as the control group. Extract DNA from two groups of women's blood samples, use fluorescence quantitative PCR to detect their MTHFR and MTRR gene loci, and record peripheral blood D-dimer (D-D) levels, prothrombin time (PT), thrombin time (TT), and thrombin time (aPTT). **Results:** There were no difference between the two groups in age, nationality, residence, artificial pregnancy history and body mass index (BMI), and TT, PT and aPTT in peripheral blood ( $P>0.05$ ). The plasma D-D concentration in the observation group was higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). The distribution of MTHFR A1298C, MTHFR C677T and MTRR A66G genes in the two groups conformed to Hardy-Weinberg equilibrium law. At the same time, there was no significant difference in the MTHFR A1298C genotype (A/C) and MTRR A66G genotype (A/G) between the two groups ( $P>0.05$ ). The proportion of MTHFR C677T allele T and TT genotype in the observation group was higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). Logistic analysis showed that the TT genotype of D-D and MTHFR C677T sites in plasma was an influential factor for recurrent spontaneous abortion in thrombolytic disease ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Serum clotting index D-D is abnormally elevated in patients with recurrent spontaneous abortion with thrombolism, and TT type of MTHFR C677T site is more common, which has certain application value for early diagnosis of recurrent spontaneous abortion with thrombolism.

**基金项目:** 白求恩·生育调控与优生研究计划项目(2021-012)

**作者简介:** 高翔(1976-),女,硕士,副主任医师。E-mail:gaoxiang.1976@163.com

**通讯作者:** 张双霞。E-mail:zsx13611096034@163.com

**[Key words]** Thrombolysis; Recurrent spontaneous abortion; MTHFR and MTRR gene polymorphism; D-dimer; Diagnostic value

易栓症孕妇胎盘内凝血和纤溶平衡状态的失调,及绒毛微小血管和子宫螺旋动脉病变率的增加,会提高胎盘血栓和梗死的风险,导致反复自然流产<sup>[1-2]</sup>。叶酸为B族维生素,参与DNA甲基化、合成及其它重要代谢反应,因而孕妇体内叶酸的代谢失调是导致反复流产的原因之一<sup>[3-4]</sup>。亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylene tetrahydrofolate reductase, MTHFR)和甲硫氨酸合成酶还原酶(methionine synthase reductase, MTRR)是两种重要的叶酸代谢酶,它们能够调节机体中维生素B9和B12的表达,维持体内同型半胱氨酸水平,防止高凝状态的发生<sup>[5]</sup>。缺乏叶酸和维生素B12的孕妇,体内同型半胱氨酸过多,损伤血管内皮功能,促进血管平滑肌细胞增殖,最终造成高凝状态。本研究旨在探讨外周血凝血指标水平、MTHFR和MTRR基因多态性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2021年3月至2022年11月首都医科大学附属北京佑安医院收治的98例反复自然流产患者(流产次数 $\geq 2$ 次)的非妊娠妇女为研究对象;另选取同时期行孕前检查的健康非妊娠妇女80名作为对照组。本研究经医院伦理委员会批准。纳入标准:(1)观察组妇女连续自然流产次数 $\geq 2$ 次,且其生殖系统解剖学正常,确诊为易栓症<sup>[6]</sup>;(2)患者的认知正常,可配合相关检查;(3)患者自愿参与此次研究,并签署知情同意书。排除标准:(1)合并有甲状腺疾病、心脑血管疾病、自身免疫性疾病或血栓类疾病者;(2)不明原因自然流产者;(3)患者有吸烟、酗酒等嗜好;(4)入组前服用过抗凝药物者。

### 1.2 方法

(1)根据患者的就诊资料,整理记录每位患者的年龄、民族、居住地、体质量指数(BMI)、人工助孕史。(2)采集所有入选者的晨起外周静脉血3 mL,置于抗凝试管中保存。后采用全自动血细胞分析仪检测D-二聚体(D-D)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)及凝血活酶时间(aPTT)。(3)采用荧光定量PCR技术,检测MTHFR基因C677T、A1298C和MTRR基因A66G位点单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分型。每个反应体系10  $\mu$ L,包含2  $\times$  Taqman Universal Master Mix 5  $\mu$ L、DNA模板1  $\mu$ L、去离子水3.5  $\mu$ L和20  $\times$  Taqman-MGB探针0.5  $\mu$ L,进行PCR扩增,通过荧光定量PCR仪读取终点荧光,确定样本基因分型结果。其中MTHFR C677T基因位点引物:F序列为AAGCT-

GCGTGATGATGAAATCG, R序列为CTCCCCGAGACACCTTCTCC。MTHFR A1298C基因位点引物:F序列为AACGAAGACTTCAAAGACACTT, R序列为CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCC。MTRR A66G引物:F序列GGCAAAGGCCATCGCAGAAGAAAT, R序列TGTGAGCAAGCTGTGGTACAT。

### 1.3 统计学分析

用SPSS20.0软件对数据进行处理与分析。计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,组间比较采用独立样本 $\chi^2$ 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用独立样本 $t$ 检验。用HaploView4.0软件进行Hardy-Weinberg平衡分析,同时用 $\chi^2$ 检验对比两组的基因型和等位基因频率。采用Logistic模型分析引起易栓症反复自然流产的影响因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组对象一般资料比较

两组对象年龄、民族、BMI、居住地及人工助孕史比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 两组对象一般资料比较 $[\bar{x} \pm s, n(\%)]$

资料	观察组( $n=98$ )	对照组( $n=80$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	28.63 $\pm$ 2.77	29.04 $\pm$ 3.75	0.838	0.403
民族			0.058	0.810
汉族	62(63.27)	52(65.00)		
其他民族	36(36.73)	28(35.00)		
居住地			2.566	0.109
城市	51(52.04)	32(40.00)		
乡镇	47(47.96)	48(60.00)		
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	21.60 $\pm$ 1.19	21.45 $\pm$ 2.90	0.466	0.641
人工助孕史			2.782	0.095
存在	29(29.59)	15(18.75)		
不存在	69(70.41)	65(81.25)		

### 2.2 两组对象血清凝血指标、MTHFR和MTRR基因多态性比较

两组对象外周血凝血指标PT、TT、aPTT比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),观察组血浆D-D高于对照组( $P < 0.05$ )。Hardy-Weinberg平衡定律检验结果显示,入组妇女的三种基因多态性都符合遗传平衡。观察组人群的MTHFR A1298C、MTHFR C677T及MTRR A66G的 $\chi^2$ 值为1.667、3.294、3.248( $P > 0.05$ );对照组基因型的 $\chi^2$ 值分别为1.563、0.061、1.098( $P > 0.05$ )。两组MTHFR A1298C、MTRR A66G的基因型比较差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ ),而观察组MTHFR C677T的

TT 型基因及等位基因 T 表达高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 两组对象血清凝血指标、MTHFR 和 MTRR 基因多态性比较 [ $\bar{x} \pm s, n(\%)$ ]

指标	观察组 ( $n=98$ )	对照组 ( $n=80$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
D-D (mg/L)	0.24 ± 0.07	0.15 ± 0.05	9.661	0.001
PT (s)	12.30 ± 1.68	12.02 ± 0.60	1.418	0.158
TT (s)	15.23 ± 2.07	14.80 ± 1.02	1.697	0.092
aPTT (s)	29.68 ± 2.01	30.01 ± 2.54	0.968	0.335
MTHFR A1298C				
AA	6(6.39)	50(62.50)	1.051	0.592
AC	25(25.51)	24(30.00)		
CC	5(5.10)	6(7.50)		
A	161(82.14)	124(77.50)		
C	35(17.86)	36(22.50)		
MTHFR C677T				
CC	30(30.61)	32(40.00)	5.815	0.016
CT	40(40.82)	38(47.50)		
TT	28(28.57)	10(12.50)		
C	100(51.02)	102(63.75)		
T	96(48.98)	58(36.25)		
MTRR A66G				
AA	55(56.12)	42(48.84)	3.920	0.141
AG	32(32.65)	39(45.35)		
GG	11(11.22)	5(5.81)		
A	142(72.45)	123(71.51)		
G	54(27.55)	49(28.49)		

### 2.3 血浆 D-D、MTHFR C677T 基因型与易栓症自然流产的 Logistic 回归分析

血浆 D-D 高表达、MTHFR C677T 基因型 TT 是易栓症反复自然流产 (易栓症反复自然流产 = 1, 健康 = 0) 的独立危险因素 ( $P < 0.05$ )。见表 3 及表 4。

表 3 多因素 Logistic 回归分析的变量赋值表

变量	赋值
血浆 D-D	实际值
MTHFR C677T 基因型	CC = 1; CT = 2; TT = 3
MTHFR C677T 等位基因型	C = 1; T = 2

表 4 易栓症自然流产发生影响因素的 Logistic 回归分析

指标	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	$P$ 值	OR 值	95% CI
血浆 D-D	0.645	0.085	57.581	0.001	1.906	1.613 ~ 2.252
MTHFR C677T 基因型						
CT	0.534	0.715	0.558	0.456	1.706	0.420 ~ 6.927
TT	0.982	0.381	6.643	0.010	2.670	1.265 ~ 5.634
MTHFR C677T 等位基因						
T	1.523	0.862	3.122	0.078	4.586	0.847 ~ 24.842

### 3 讨论

引起反复自然流产的因素多样,而易栓症是其重要原因之一<sup>[7]</sup>。易栓症可分为获得性和遗传性两大类,遗传性易栓症流产是由产妇凝血基因突变或凝血基因缺陷而导致的胎盘微循环障碍引起,而获得性则是因为高同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 血症和磷脂抗体的存在<sup>[8]</sup>。外周血凝血指标可直接反应产妇的凝血功能<sup>[9]</sup>,同时 MTHFR 和 MTRR 基因的 SNP 分型与叶酸代谢有关<sup>[10-11]</sup>,或可协助预估易栓症性反复自然流产发生风险。

本研究表明,两组外周血 PT、aPTT、TT 无差异,但血浆 D-D 水平在反复流产患者中有升高。有关研究<sup>[12]</sup>表明,血浆 D-D 升高可能是复发流产的危险因素之一,可能是由于血小板在受到内源或外源性刺激物作用下被激活,导致缺血或血栓,影响血液循环。血浆 D-D 水平升高是血栓形成和高凝状态的重要指标<sup>[13]</sup>,它通过纤维蛋白原凝血酶转变成交联纤维蛋白单体,再由活化因子 X III 作用形成交联纤维蛋白,最后被纤维酶水解产生<sup>[14-15]</sup>,因此,它的升高可能暗示身体存在明显的继发性纤溶过程。因此本研究认为,监测血浆 D-D 的表达有利于易栓症反复自然流产的早期诊断。

MTRR 和 MTHFR 是叶酸代谢过程中的关键酶,而其位点基因突变会导致酶活性降低。本研究通过使用荧光定量 PCR 技术检测 MTHFR 基因 C677T、A1298C 位点及 MTRR 基因 A66G 位点的 SNP 分型,结果发现,两组 MTHFR A1298C、MTRR A66G 基因型并无差异,但两组的 MTHFR C677T 基因多态性存在统计学差异。在观察组中,MTHFR C677T 位点 TT 基因型、等位基因 T 占比为 28.57% 和 48.98%,分别均高于对照组的占比 12.50% 和 36.25%,前者较高。这可能是因为 MTHFR C677T 位点 C 被 T 取代后,编码的丙氨酸被缬氨酸代替,从而导致酶的耐热性和活性下降,导致血浆中 Hcy 的异常表达。在潘银平等<sup>[16]</sup>的研究中也认为 MTHFR C677T 中的 TT 基因型会增加不良妊娠风险,本研究结果与其一致。也有研究<sup>[17]</sup>表明,MTRR、MTHFR 基因型均可影响妊娠结局,MTHFR C677T 与 A1298C 协同作用也能导致酶活性减弱,使得 Hcy 浓度增加,引发流产及出生缺陷。在国外学者研究<sup>[18]</sup>中,MTRR、MTHFR 基因多态性被证实还可影响唐氏综合征等多种疾病的发生风险。可见,MTHFR 和 MTRR 基因的多态性可能导致叶酸代谢的异常,从而引发不同的疾病。因此,通过检测 MTHFR 基因 C677T、A1298C 位点和 MTRR 基因

A66G 位点的 SNP 分型,可以帮助临床医生进行更有针对性的疾病干预,有效地改善母婴结局。本研究还显示,Logistic 分析表明 MTHFR C677T 位点 TT 基因型及血浆 D-D 均为易栓症反复自然流产发生的影响因素,可协助临床评估妊娠风险。

综上,MTHFR 基因多态性、外周血 D-D 表达影响易栓症反复自然流产的发生,而 MTRR 基因型影响并无差异。但需要注意的是,易栓症流产是受多种因素影响的综合结果,由于条件限制,本研究的入选样本数量较少,因此研究结果可能存在一定的误差。未能控制其他变量也是本研究的另一个限制。在今后的研究中,会进一步扩大样本量,完善研究方案,提高结果的科学性。

#### 参考文献

- [1] 陈兰勤,殷菊,徐保平,等. 遗传性易栓症 5 例临床特征及基因分析[J]. 中华实用儿科临床杂志,2022,37(12):934-938.
- [2] 张秀玲,杨春. 易栓症不良妊娠患者的发病机制和血液学变化[J]. 国际检验医学杂志,2022,43(15):1894-1899.
- [3] 宋金龙,陈萍萍,王鹏鲲,等. 复发性流产患者血栓前状态分析及其与 MTHFR 基因 C677T 位点多态性的相关性研究[J]. 中国医药导报,2020,17(31):16-20.
- [4] 张译爻,王玉贤,崔向荣. 复发性流产与遗传性易栓症的研究进展[J]. 中国临床研究,2022,35(10):1449-1453.
- [5] 李彦荣,惠旭东,魏建勋. MTHFR 基因 rs1801131 多态性与反复自然流产易感性的相关性[J]. 西部医学,2021,33(5):731-734.
- [6] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 易栓症诊断与防治中国指南(2021年版)[J]. 中华血液学杂志,2021,42(11):881-888.
- [7] Akbari S, Shamsavar F, Karami R, et al. Recurrent spontaneous abortion (RSA) and maternal KIR genes: a comprehensive meta-analysis [J]. JBRA Assisted Reproduction, 2020, 24 ( 2 ): 197-213.
- [8] Kjaergaard AD, Wu Y, Ming WK, et al. Homocysteine and female fertility, pregnancy loss and offspring birthweight: a two-sample Mendelian randomization study [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2022, 76(1):40-47.
- [9] 陈利侠,吴惠芹,张莉萍,等. 外周血检验指标在复发性流产诊断中的应用价值[J]. 山西医药杂志, 2021, 50(19): 2774-2776.
- [10] 韩亚,霍晓桐,张新艳,等. 河北省涞水县育龄女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性与自然流产的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(13): 3104-3106.
- [11] Zhang Y, Zhan W, Du Q, et al. Variants c. 677 C>T, c. 1298 A>C in MTHFR, and c. 66 A>G in MTRR affect the occurrence of recurrent pregnancy loss in Chinese women [J]. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2020, 24(11):717-722.
- [12] 安晓娜,王立娟. 妊娠期易栓症孕妇凝血指标以及血小板相关参数变化水平及意义[J]. 血栓与止血学, 2022, 28(3): 649-650.
- [13] 牟莎莎,杨慧丽,温凤云. 肠溶阿司匹林治疗 D-二聚体升高先兆流产临床效果[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(8): 1610-1613.
- [14] 邱爽,张蓓. D-二聚体、激活素 A 及孕酮预测早期稽留流产价值[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(11): 2363-2366.
- [15] 林涛,沈晓露,汪海,等. 子宫动脉血流动力学参数与 D-二聚体预测孕早期不明原因复发性流产的价值[J]. 浙江医学, 2019, 41(9): 930-932.
- [16] 潘银平,马欣,党莉婷,等. MTHFR, MTRR 基因多态性与不良妊娠结局的相关性[J]. 西部医学, 2021, 33(5): 735-739.
- [17] 陈雪,刘小晖,王兴,等. MTHFR 和 MTRR 基因多态性及增补叶酸与早产的相关性分析[J]. 中国生育健康杂志, 2021, 32(5): 412-417.
- [18] O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to down syndrome? [J]. American Journal of Medical Genetics, 2002, 107(2): 151-155.

(收稿日期:2023-01-19

修回日期:2023-03-12)