

• 论 著 •

叶酸基因多态性和唐氏综合征高危风险之间的相关性研究

侯书宁

(江苏省扬州大学医学院附属医院/江苏省扬州市妇幼保健院 225002)

摘 要:**目的** 探讨唐氏综合征高危风险与叶酸基因多态性间的相关性。**方法** 采用化学发光法对 679 例孕中期妇女血清中甲胎蛋白(AFP)、人类绒毛膜性腺激素(β -HCG)和游离雌三醇(uE3)进行检测;采用分析软件综合计算胎儿唐氏综合征风险性;通过聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性法对受试孕妇进行叶酸代谢相关基因检测,包括亚甲基四氢叶酸还原酶 MTHFR A1298C、甲硫氨酸合成还原酶 MTRR A66G 和 RFC1 A80G;分析 2 组唐氏综合征风险水平中 3 种叶酸代谢基因分布频率及等位基因频率。**结果** (1)在唐氏综合征的高、低危组中,采用 χ^2 检验 MTHFR A1298C、MTRR A66G 和 RFC1 A80G 不同基因型和等位基因频率,仅 MTHFR A1298C 基因型比较差异有统计学意义($P<0.05$)。(2)高危组中孕妇血清 β -HCG 的 MOM 值大于低危组,而 AFP 和 uE3 的 MOM 值小于低危组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(3)经 Logistic 回归分析,AFP、 β -HCG、uE3 和 MTHFR A1298C 可能与唐氏综合征高危风险相关($P<0.05$),OR 值分别为 0.076、43.224、0.071 和 0.306。**结论** 叶酸代谢酶 MTHFR A1298C 的基因多态性可能与唐氏高危风险具有一定相关性,而 MTRR A66G 和 RFC1 A80G 可能不具有相关性。

关键词: 叶酸; 基因多态性; 唐氏综合征; 等位基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.010 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)22-3120-03

Study on correlation between folate gene polymorphism and high risk of Down's syndrome

HOU Shuning

(Affiliated Hospital of Medical College, Yangzhou University/Yangzhou Maternal and Child Health Care Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225002, China)

Abstract:**Objective** To explore the correlation between folate gene polymorphism and high risk of Down's syndrome(DS).**Methods** The chemoluminescence immunoassay was adopted to detect the levels of serum AFP, β -HCG and uE3 in 679 mid-pregnancy women; the risk of fetal DS was calculated by using the analytical software; the polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism(PCR-RFLP) was employed to detect the folate metabolism related genes, including MTHFR A1298C, MTRR A66G and RFC1 A80G; the distribution frequency of three kinds of folate metabolic gene and allele frequencies were analyzed in the two groups of DS risk level. **Results** (1) In different genotypes and allele frequency by adopting the chi-square test, only the MTHFR A1298C genotype had statistical difference between the high-risk and low-risk DS groups($P<0.05$). (2) The multiple of median (MOM) value of serum β -HCG level in the high-risk group was higher than that in the low risk group, while which of AFP and uE3 was smaller than that in the low risk group, the difference was statistically significant($P<0.05$). (3) The Logistic analysis showed that AFP, β -HCG, uE3 and MTHFR A1298C could be related with high DS risk($P<0.05$), the OR values were 0.076, 43.224, 0.071 and 0.306 respectively. **Conclusion** Polymorphism of folate metabolism gene MTHFR A1298C may have certain correlation with the high-risk of DS, while MTRR A66G and RFC1 A80G have no correlation.

Key words: folate; Gene Polymorphism; Down's syndrome; allele

唐氏综合征,又称为 21-三体综合征,是由染色体异常(多 1 条 21 号染色体)而导致的遗传性疾病。本病在新生儿中发病率为 1/800~1/600。由于多余的 21 号染色体打破了基因组遗传物质间的平衡,导致胎儿发育异常,在临床上表现为显著的智力落后、特殊面容、生长发育障碍和多发畸形^[1]。

叶酸,属于 B 族维生素,由对氨基苯甲酸、喋啶和 L-谷氨酸组成。由于人体自身不能合成叶酸,所以必须依赖外源性供给。孕妇在整个妊娠期间血清叶酸水平显著低于非孕妇,并随孕周增加逐渐下降。有研究表明,孕妇叶酸代谢异常促使基因组低甲基化,影响染色体分离,从而导致唐氏综合征和神经管缺陷症的发生^[2]。本研究选取叶酸 3 个代谢相关基因:亚甲基四氢叶酸还原酶 MTHFR A1298C 基因,甲硫氨酸合成还原酶 MTRR A66G 和 RFC1 A80G 基因。通过分析叶酸代谢基因在孕中期妇女中的分布频率及唐氏筛查风险性,初步探讨叶

酸基因的多态性与唐氏综合征高危风险间的相关性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 4~7 月本院产前门诊建卡孕妇 679 例,孕周为 15~20 周,年龄为 18~43 岁,入选孕妇均行叶酸代谢基因联合检测和唐氏风险筛查。

1.2 方法 采用含乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集受试孕妇的外周血,置于-20℃保存(外送于上海联合基因生物医药有限公司检测)。同时采集孕妇静脉全血 3~5 mL,分离血清,置于-20℃保存待测。采用化学发光法检测血清中甲胎蛋白(AFP)、人类绒毛膜性腺激素(β -HCG)和游离雌三醇(uE3)水平,结合孕妇的体质量、年龄和 B 超孕周,采用分析软件综合计算唐氏综合征风险率(风险切割值:21-三体综合征高风险为 1:380,18-三体综合征高风险为 1:334,神经管缺陷高风险为

2.2 MOM)。

1.3 统计学处理 采用基因技术法计算基因型和等位基因的频率,确认其符合 Hardy-Winberg 平衡定律。采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计数资料采用例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立 t 检验,Logistic 回归进行唐氏风险分析。所有数据为双侧概率检测,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTHFR A1298C、MTRR A66G 和 RFC1 A80G 基因型及等位基因频率的比较 根据唐氏筛查结果将受试孕妇分为高危组和低危组。其中高风险组孕妇 51 例,包括 21-三体综合征高风险 43 例,18-三体综合征高风险 2 例和神经管缺陷高风险 6 例。采用 χ^2 检验对高危组和低危组中 MTHFR A1298C、MTRR A66G 和 RFC1 A80G 的基因型和等位基因频率进行分析,结果发现 2 组间,MTHFR A1298C 的基因型比较差异有统计学意义($P<0.05$),而 MTRR A66G 和 RFC1 A80G 的基因型比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 MTHFR A1298C、MTRR A66G 和 RFC1 A80G 基因型及等位基因频率的比较[<i>n</i> (%)]				
基因型/等位基因	基因组别		χ^2	<i>P</i>
	高危组	低危组		
MTHFR A1298C				
AA	37(72.55)	432(68.79)	10.672	0.005
AC	10(19.61)	186(29.62)		
CC	4(7.84)	10(1.59)		
A	84(83.33)	1 050(83.60)		
C	18(16.67)	206(16.40)	0.106	0.781
MTRR A66G				
AA	29(56.86)	368(58.60)	0.649	0.723
AG	20(39.22)	221(35.19)		
GG	2 (3.92)	39(6.21)		
A	78(76.47)	957(76.19)		
G	24(23.53)	299(23.81)	0.004	0.950
RFC1 A80G				
AA	18(35.29)	180(28.66)	1.296	0.523
AG	19(37.25)	280(44.59)		
GG	14(27.46)	168(26.75)		
A	55(53.92)	640(50.96)		
G	47(46.08)	616(49.04)	0.332	0.564

2.2 血清标志物的比较 679 例孕妇进行唐氏筛查,得到 AFP、 β -HCG 和 uE3 血清学结果,通过相对应的孕周血清标志物中位数值,计算出其 MOM 值。采用 MOM 值,运用独立样本 t 检验进行统计学分析。结果表明,高危组孕妇血清中 β -HCG 的 MOM 值大于低危组孕妇,差异有统计学意义($P<0.05$),而 AFP 和 uE3 的 MOM 值低于低危组孕妇,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 唐氏高危风险的 Logistic 回归分析 将叶酸代谢酶 MTHFR A1298C、MTRR A66G 和 RFC1 A80G 按等位基因分

别划分为 C 等位基因携带者(非 C 等位基因携带者)和 G 等位基因携带者(非 G 等位基因携带者),对具有统计学意义变量 AFP、 β -HCG 和 uE3 的 MOM 值,按照低值、中值和高值重新赋值,从而进行唐氏综合征高危风险的 Logistic 回归分析。结果表明,血清中高水平 β -HCG 和低水平 uE3、AFP 及叶酸代谢基因 MTHFR A1298C 的多态性是唐氏综合征发生的高危因素($P<0.05$),而 MTRR A66G 和 RFC1 A80G 的多态性可能不是唐氏综合征发生的高危因素。见表 3。

表 2 高、低危组中 AFP、 β -HCG 和 uE3 比较				
项目	低危组	高危组	t	P
AFP(MOM)	1.03 $\pm$ 0.31	0.79 $\pm$ 0.27	5.025	<0.05
β -HCG(MOM)	1.12 $\pm$ 0.57	2.04 $\pm$ 1.14	-5.718	<0.05
uE3(MOM)	1.07 $\pm$ 0.28	0.77 $\pm$ 0.30	7.293	<0.05

表 3 唐氏综合征高危风险的 Logistic 回归分析			
因素	OR	95%CI	P
AFP	0.076	0.031~0.183	0.000
β -HCG	43.224	14.444~129.350	0.000
uE3	0.071	0.030~0.164	0.000
MTHFR A1298C	0.306	0.096~0.974	0.045
MTRR A66G	1.288	0.482~3.411	0.613
RFC1 A80G	0.907	0.334~2.467	0.849

3 讨 论

叶酸是一种水溶性维生素,人体自身不能合成,必须完全依赖于外源性供给,从食物或服用合成叶酸进行补充。叶酸在肝脏中在二氢叶酸还原酶作用下生成有活性的四氢叶酸,成为代谢中间产物。四氢叶酸的重要功能是作为体内一碳单位载体,同时参与到体内的甲硫氨酸循环中。因此,当体内叶酸水平下降,可间接影响到 DNA 和 RNA 的生成;另外,N5-甲基四氢叶酸水平低下,影响到 S-腺苷甲硫氨酸甲基化活性,导致 DNA 低甲基化,影响染色体的分离^[3]。

叶酸有多个代谢关键酶,其中 mthfr c677t 已被研究发现:当 mthfr 的 677 位点发生点突变(C→T),酶活性下降,导致 DNA 的低甲基化,影响染色体分离,目前已有多项研究表明 T 等位基因是唐氏风险的高危因素^[4-5]。本研究以 MTHFR A1298C、MTRR A66G 和 RFC1 A80G 作为研究对象。研究发现:(1)MTHFR A1298C 是除 mthfr c677t 外又一多态性位点,突变位点位于酶活性调控区域,可将谷氨酸转变为丙氨酸,但未能改变酶蛋白的热稳定性^[6]。本研究中,高、低危组 MTHFR A1298C 的不同基因型有显著差异;另外经 Logistic 回归分析,MTHFR A1298C 中的 C 等位基因与高水平 β -HCG 及低水平 AFP、uE3 可能都是唐氏风险性的高危因素。(2)MTRR 是一种黄素蛋白相关的酶,能保持甲硫氨酸合成酶的活性状态,使得同型半胱氨酸甲基化成为甲硫氨酸,对体内的甲硫氨酸起到调节作用。66A→G 是酶催化区域内第 66 号位点上出现点突变,蛋氨酸转变为异亮氨酸,目前被认为与增加脊椎裂的风险性相关^[7]。Barbosa 等^[8] 研究表明,MTRR A66G 多态性单独存在与叶酸代谢水平的改变不相关,而与 mthfr c677t 基因联合出现时(mthfr 677tt/mtrr 66gg),体内同型半胱氨酸氨基酸水平大于其他基因型。RFC1 A80G 点突变对

胞内叶酸吸收、转运、和代谢产生作用,进而可能影响胎儿正常的组织发育^[9]。裴丽君等^[10]研究发现,当胎儿携带有 rfc1 gg 突变基因型且母体不能利用补充的叶酸时,胎儿患神经管缺陷的风险性增加。本研究中,MTRR A66G 和 RFC1 A80G 基因多态性在唐氏高、低危组中的分布比较差异无统计学意义($P>0.05$),可能不是唐氏风险的高危因素。

综上所述,叶酸代谢基因单独突变可以成为唐氏综合征的高风险因素,不同基因间的协同突变可能也是引起唐氏综合征高风险的危险因素。本研究通过对孕中期妇女叶酸代谢基因的联合检测,采用 Logistic 回归进行基因与唐氏综合征高风险的相关分析,初步筛选出相关突变基因,为孕妇根据基因型进行合理个体化叶酸补充提供理论依据,对降低唐氏综合征高危风险性起到一定作用。

参考文献

[1] Zampieri BL, Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, et al. Maternal risk for Down syndrome is modulated by genes involved in folate metabolism[J]. Dis Markers, 2012, 32(2):73-81.

[2] Al-Gazali LI, Padmanabhan R, Melnyk S, et al. Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect[J]. Am J Med Genet, 2001, 103(2):128-32.

[3] James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome[J]. Am J Clin Nutr, 1999, 70(4):495-501.

[4] Liao YP, Bao MS, Liu CQ, et al. Folate gene polymorphism and the risk of Down syndrome pregnancies in

young Chinese women[J]. Yi Chuan, 2010, 32(5):461-466.

[5] Sadiq MF, Al-Refai EA, Al-Nasser A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms C677T and A1298C as maternal risk factors for Down syndrome in Jordan[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2011, 15(1/2):51-57.

[6] Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(5):1044-1051.

[7] Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome[J]. Am J Hum Genet, 2000, 67(3):623-630.

[8] Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women[J]. Eur J Clin Nutr, 2008, 62(8):1010-1021.

[9] Prasad PD, Ramamoorthy S, Leibach FH, et al. Molecular cloning of the human placental folate transporter[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 206(2):681-687.

[10] 裴丽君, 朱慧萍, 李智文, 等. 神经管畸形患儿还原叶酸载体基因和叶酸之间交互作用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(3):284-287.

(收稿日期:2016-04-08 修回日期:2016-07-03)

(上接第 3119 页)

间的关系,揭示了 MM 细胞中 JNK 信号通路活化和 BCMA 表达间存在正反馈回路,为 MM 的治疗提供了 1 个新的免疫靶点。

参考文献

[1] Comert M, Gunes AE, Sahin F, et al. Quality of life and supportive care in multiple myeloma[J]. Turk J Haematol, 2013, 30(3):234-246.

[2] Andrews SW, Kabrah S, May JE, et al. Multiple myeloma: the bone marrow microenvironment and its relation to treatment[J]. Br J Biomed Sci, 2013, 70(3):110-120.

[3] Terpos E, Christoulas D. Effects of proteasome inhibitors on bone cancer[J]. Bonekey Rep, 2013, 14(2):395.

[4] Fragioudaki M, Boula A, Tsiarakis G, et al. B cell-activating factor: its clinical significance in multiple myeloma patients[J]. Ann Hematol, 2012, 91(9):1413-1418.

[5] Fragioudaki M, Tsiarakis G, Pappa CA, et al. Serum BAFF levels are related to angiogenesis and prognosis in patients with multiple myeloma[J]. Leuk Res, 2012, 36(8):1004-1008.

[6] Shen X, Zhu W, Zhang X, et al. A role of both NF- B pathways in expression and transcription regulation of

BAFF-R gene in multiple myeloma cells[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 357(1/2):21-30.

[7] Garfall AL, Fraietta JA, Maus MV. Immunotherapy with Chimeric Antigen Receptors for Multiple Myeloma[J]. Discov Med, 2014, 91(17):37-46.

[8] Orlowski RZ. Why proteasome inhibitors cannot ERADicate multiple myeloma[J]. Cancer Cell, 2013, 24(3):275-277.

[9] Hengeveld PJ, Kersten MJ. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy[J]. Blood Cancer J, 2015, 5(2):e282.

[10] Richardson PG, Lonial S, Jakubowiak AJ, et al. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma[J]. Br J Haematol, 2011, 154(6):745-754.

[11] Donk NW, Kamps S, Mutis T, et al. Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma[J]. Leukemia, 2012, 26(2):199-213.

[12] Xu G, Shen XJ, Pu J, et al. BLyS expression and JNK activation May form a feedback loop to promote survival and proliferation of multiple myeloma cells[J]. Cytokine, 2012, 60(2):505-513.

(收稿日期:2016-03-21 修回日期:2016-06-18)