

• 短篇论著 •

长寿地区 73 例结节性甲状腺肿患者 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 多态性研究*

沈良贤¹, 范原铭^{2#}, 李 泉³, 陈祖翼⁴, 邱孝兰², 周学刚⁵, 陶 凤^{3△}

重庆市长寿区人民医院: 1. 科教科; 2. 普外二科; 3. 检验科, 重庆 401220; 4. 遵义医科大学附属医院检验科, 贵州遵义 563000; 5. 重庆市长寿区人民医院超声科, 重庆 401220

摘要:目的 研究重庆长寿地区人群中结节性甲状腺肿(NG)与亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T(rs1801133)、A1298C(rs1801131)位点单核苷酸多态性的关系。方法 选取重庆市长寿区人民医院 73 例 NG 患者(病例组)和 76 例体检健康者(对照组), 采用一代 Sanger 测序技术对受试者的全血标本进行 DNA 测序。结果 病例组中年龄 >30 岁的患者占 96.05%, >60 岁的占 23.68%。对照组中年龄 >30 岁的占 97.56%, >60 岁的占 19.51%。病例组与对照组年龄、性别比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。病例组、对照组及病例组+对照组基因型 C677T、A1298C 男女分布比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。MTHFR (A1298C)C 等位基因($OR = 0.397, 95\% CI: 0.161 \sim 0.981, P = 0.041$)和 CC 基因型($OR = 0.116, 95\% CI: 0.014 \sim 0.978, P = 0.027$)降低 NG 发生的风险, MTHFR C677T 多态性与 NG 的发生没有相关性。结论 A1298C 基因多态性与 NG 发生风险有关; MTHFR 基因 C677T 位点的多态性与 NG 发生风险无关。

关键词: 结节性甲状腺肿; 亚甲基四氢叶酸还原酶; C677T; A1298C; 单核苷酸多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.06.023

中图分类号: R581.3

文章编号: 1673-4130(2021)06-0737-04

文献标志码: A

结节性甲状腺肿(NG)是单纯性甲状腺肿的后期表现形式。据报道, NG 的发病率为 6%~7%, 且病史较长的 NG 可发生癌变^[1-2]。有研究表明, 瑞典长期实施的补碘计划并没有影响缺碘或碘丰富地区甲状腺肿及甲状腺癌的发生趋势^[3]。因而除碘外, 仍有其他多种因素参与 NG 的发生与发展。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是叶酸和同型半胱氨酸代谢的一个关键酶。目前研究最多, 且与疾病关系密切的 MTHFR 基因单核苷酸突变位点为 C677T 和 A1298C, 可导致热不稳定性和(或)酶活性降低^[4]。相关研究认为, 这个基因的遗传变异会影响 DNA 合成、修复及甲基化过程, 从而影响甲状腺癌及自身免疫性甲状腺疾病(AITD)的易感性^[5-7]。然而, MTHFR 基因多态性与 NG 的相关研究鲜见报道, 为此本研究旨在寻找 MTHFR C677T 和 A1298C 基因多态性与 NG 的相关性, 为 NG 的预防及治疗提供理论依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集重庆市长寿区人民医院 2018 年 8 月至 2019 年 11 月经术后病理确证的甲状腺功能正常的 NG 患者 73 例作为病例组。另选取经高

晰超声检查甲状腺组织正常及甲状腺功能正常的 76 例体检健康者作为对照组。纳入标准: 根据 2015 年最新出版的美国甲状腺协会关于甲状腺结节和分化型甲状腺癌的管理指南进行病理诊断。排除标准: (1)代谢性疾病(高血压、糖尿病、血脂异常); (2)甲状腺疾病(甲状腺炎、甲状腺良恶性肿瘤); (3)其他恶性肿瘤; (4)精神障碍。本研究符合人体试验伦理学标准, 并得到重庆市长寿区人民医院伦理委员会的批准及患者知情同意。

1.2 仪器与试剂 Hema3200PCR 扩增仪、HemaT-GL-16R 冷冻离心机购自珠海黑马公司; 一次性乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)真空抗凝管; 血液基因组 DNA 抽提试剂盒升级款和 PCR 扩增试剂购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 抽取外周静脉血 2 mL, EDTA- Na_2 抗凝, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。采用 Ezup 柱式血液基因组 DNA 抽提试剂盒升级款提取 DNA。

1.3.2 引物设计及合成 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, rs1801133 上游引物 5'-AA-CAATGTTTAATCCGGTGCC-3', 下游引物 5'-

* 基金项目: 重庆市长寿区科技计划项目(CS2018030)。

共同第一作者。△ 通信作者, E-mail: jeaytf@163.com。

ATCCTTTGGGATCTTT-3'; rs1801131 上游引物 5'-CACTCCAGCATCACTCACTTTG-3', 下游引物 5'-AAGAAGTTTGCATGCTTGTGG-3'。

1.3.3 PCR 扩增 反应体系 25.0 μ L, ddH₂O 18.3 μ L、10.0 \times 缓冲液 (含 MgCl₂) 2.5 μ L、dNTP (10 mmol/L) 1.0 μ L、模板 DNA 1.0 μ L、Taq 酶 0.2 μ L、Primer mix 2.0 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后按 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 38 次, 末次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3.4 基因测序 PCR 产物送上海生工生物工程股份有限公司, 利用一代 Sanger 测序的方法, 对 PCR 产物进行测序。

1.3.5 基因型分析 通过 sequence analysis 软件对序列质量进行初步分析, 并通过 DNAMAN 6.0.3.99 软件与 GenBank (MTHFR NG_013351) 的基因序列进行比较。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行处理分析, 应用 Hardy-Weinberg 平衡分析基因型和等位基因频率, 采用拟合优度 χ^2 检验, 以防偏离 Hardy-Weinberg 平衡。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料以例数和百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法进行评估。比值比

(OR) 和 95% 可信区间 (95% CI) 用于测量 MTHFR 基因型/等位基因与 NG 之间的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组年龄、性别情况比较 病例组中, 男 11 例, 女 62 例; 年龄 21~80 岁, 平均 (51.37 \pm 10.92) 岁, 其中年龄 > 30 岁的占 96.05%, > 60 岁的占 23.68%。对照组中, 男 40 例, 女 36 例; 年龄 17~92 岁, 平均 (52.29 \pm 16.46) 岁, 其中年龄 > 30 岁的占 97.56%, > 60 岁的占 19.51%。病例组与对照组年龄、性别比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 两组男女基因型分布比较 病例组、对照组及 NG 组 + 对照组基因型 C677T、A1298C 男女分布比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 MTHFR C677T 和 A1298C 基因型或等位基因的分布情况 两组 MTHFR C677T 和 A1298C 基因型频数均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。病例组 A1298C 多态性 CC 基因型频数及 C 等位基因频数与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。病例组和对照组 C677T 多态性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 两组男女基因型分布比较 (*n*)

性别	MTHFR C677T									MTHFR A1298C								
	对照组			病例组			对照组+病例组			对照组			病例组			对照组+病例组		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AC	CC
男	10	26	4	5	5	1	15	31	5	30	8	2	9	2	0	39	10	2
女	18	15	3	22	29	11	40	44	14	18	13	5	58	12	1	76	25	6
χ^2	5.184			0.580			3.392			5.157			0.754			0.479		
<i>P</i>	0.08			0.83			0.18			0.07			1.00			0.78		

表 2 MTHFR C677T 和 A1298C 基因型或等位基因的分布情况 [*n* (%)]

SNP	基因型或等位基因	病例组	对照组	χ^2	<i>P</i>	OR (95% CI)
C677T	CC	27 (36.98)	28 (36.84)	1	—	—
	CT	34 (46.58)	41 (53.95)	0.180	0.671	0.860 (0.428~1.727)
	TT	12 (16.44)	7 (9.21)	1.121	0.290	1.778 (0.609~5.191)
	C	44 (60.27)	48.5 (63.82)	1	—	—
	T	29 (39.73)	27.5 (36.18)	0.180	0.672	1.153 (0.596~2.231)
A1298C	AA	59 (80.82)	48 (63.15)	1	—	—
	AC	13 (17.81)	21 (27.63)	2.951	0.086	0.504 (0.229~1.109)
	CC	1 (1.37)	7 (9.21)	5.424	0.027	0.116 (0.014~0.978)
	A	65.5 (89.73)	58.5 (76.97)	1	—	—
	C	7.5 (10.27)	17.5 (23.03)	4.180	0.041	0.397 (0.161~0.981)

注: —表示该项无数据。

3 讨 论

MTHFR 位于第 1 号染色体 1p36.22, 全长 27.374 kb, 共有外显子 12 个, 其编码 656 个氨基酸残基组成的蛋白, 负责催化 5,10-亚甲基四氢叶酸不可逆地还原为 5-甲基四氢叶酸。自 2003 年人类基因组计划发现 MTHFR 以来, 在世界范围内已发表许多关于 MTHFR 的分子和流行病学研究, 但其与甲状腺功能不全之间的关系的相关研究较少, 且结果存在争议。

甲状腺激素是酪氨酸碘化物, 当 MTHFR 基因突变时, MTHFR 酶活性降低, 可通过影响酪氨酸合成, 从而影响甲状腺激素的合成; 其还可通过影响甲状腺互向三碘甲状腺原氨酸的转化, 导致甲状腺功能减退。促甲状腺激素(TSH)是主要的有丝分裂因子, 任何使 TSH 水平升高的物质都会刺激结节的形成^[8], 提示 MTHFR 基因多态性有可能是 NG 形成的原因之一。ARAKAWA 等^[5]研究表明, 在日本人群中未发现 C677T 或 A1298C 多态性与导致甲状腺功能减退或亢进的 AITD 相关; 且 C677T 和 A1298C 的基因型和等位基因频率也不影响 AITD 的预后。ABU-HASSAN 等^[7]研究发现, 约旦女性人群 C677T 多态性与甲状腺功能减退或亢进的 AITD 无关, 而 A1298C 多态性可能是影响甲状腺功能减退或亢进的 AITD 发生的因素, 且 CC、TA 和 TC 单倍型可能是甲状腺功能减退发生的影响因素。CHEN 等^[6]的荟萃分析显示, MTHFR C677T 多态性与甲状腺疾病之间没有相关性, MTHFR C677T 纯合子 TT 基因型多态性与白种人和亚洲人的甲状腺癌发生风险明显相关。而本研究发现 C677T 多态性与 NG 没有相关性, 提示 C677T 多态性与甲状腺癌相关, 而与 NG 可能没有相关性。本研究结果显示, A1298C 基因多态性可降低 NG 发生的风险, 与 ABU-HASSAN 等^[7]和 ARAKAWA 等^[5]的结果相反。上述研究中的研究对象是自身免疫性甲状腺疾病患者, 因此, 导致结果不一致的原因可能跟种族、地理及纳入、排除标准等因素的不同有关^[9], 而本研究中的 NG 是不伴有甲状腺功能异常的非毒性甲状腺肿的后期表现形式, 可能与甲状腺激素水平降低, TSH 水平反馈性升高及 TSH 长期慢性刺激甲状腺组织有关^[2], 表明 MTHFR 基因 A1298C 位点多态性可能通过影响甲状腺激素的合成、转化来降低 NG 发生的风险。

本研究中 NG 患者年龄 >30 岁的占 96.05%, >60 岁的占 23.68%, 全国自 1996 年开始普遍实行食盐碘化, 说明大部分患者可能在中青年时期缺碘, 甲状腺已发生病理改变或已经有结节形成, 在食盐碘化后 NG 可能仍旧在发生, 或并未得到治疗, 或也没有向恶性发展。因此, 除碘外, 还可能其他因素影响 NG 的发生、发展。也有研究表明, 补碘后结节性甲状

腺肿 DNA 指数、异倍体率、增殖指数均明显增高^[10]。而 MTHFR 除了可以影响甲状腺激素的合成及转化外, 还可以为体内嘌呤、嘧啶的合成及 DNA 甲基化提供甲基, 从而影响 DNA 的合成、修复及 DNA 甲基化, 而甲基化和 DNA 合成在癌症的发展中起着至关重要的作用^[11]。本研究发现, MTHFR 基因 A1298C 位点多态性与对照组比较差异有统计学意义, 表明 A1298C 位点多态性对 NG 可能是一种保护因子。

本研究对照组中 C677T 的 T 等位基因频率、A1298C 的等位基因频率(分别为 36.18%、23.03%)与 YANG 等^[9]报道的中国人群的等位基因频率(分别为 36.9%、22.4%)接近, 说明对照组选择无偏差。病例组、对照组及病例组+对照组 C677T、A1298C 基因型男女分布比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$), 这与李丹丹等^[12]、VIDUDALA 等^[13]报道的变异频率没有性别特异性的结果一致。

本研究的局限性在于:(1)样本量相对较小, 单核苷酸多态性位点少且只选择了两个单核苷酸多态性位点进行分析;(2)环境风险因素的缺乏限制了基因与环境相互作用的分析;(3)排除标准中, 除了通过甲状腺超声影像检查及血清学检测甲状腺功能外, 仅依靠其既往病史、空腹血糖排除代谢性疾病。在今后的研究中还应扩大样本量, 评估基因、基因环境和同一基因中不同单核苷酸多态性位点之间的相互作用, 执行更严格的纳入、排除标准, 将 MTHFR 多态性纳入易感个体的筛选和检查。

综上所述, MTHFR 基因 A1298C 位点单核苷酸多态性可能通过影响甲状腺激素的合成转化及 DNA 甲基化、合成修复等影响 NG 发生风险, 而 C677T 位点单核苷酸多态性与 NG 的发生无相关性。

参考文献

- [1] 吴纯东, 秦科宇, 刘建君. 结节性甲状腺肿合并甲状腺癌的临床诊断与治疗效果分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 95(19): 44-45.
- [2] 王惠斌, 李瑞平, 曾沛强. 结节性甲状腺肿与甲状腺癌关系的临床分析[J]. 中国肿瘤外科杂志. 2010, 2(5): 311-312.
- [3] PETERSSON B, COLEMAN M P, RON E, et al. Iodine supplementation in sweden and regional trends in thyroid cancer incidence by histopathologic type[J]. Int J Cancer, 1996, 65(1): 13-19.
- [4] TRIMMER E E. Methylenetetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(14): 2574-2593.
- [5] ARAKAWA Y, WATANABE M, INOUE N, et al. Association of polymorphisms in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR and MTRR genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid

disease[J]. Clin Exp Immunol, 2012, 170(2):194-201.

[6] CHEN Y, WANG B, YAN S, et al. Significant association between MTHFR C677T polymorphism and thyroid cancer risk; evidence from a Meta-analysis[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2014, 18(10):695-702.

[7] ABU-HASSAN D W, ALHOURI A N, ALTORK N A, et al. MTHFR gene polymorphisms in hypothyroidism and hyperthyroidism among Jordanian females[J]. Arch Endocrinol Metab, 2019, 63(3):280-287.

[8] YILDIRIM S I, CETINKALP S, KABALAK T. Review of factors contributing to nodular goiter and thyroid carcinoma[J]. Med Princ Pract, 2020, 29(1):1-5.

[9] YANG B, FAN S, ZHI X, et al. Geographical and ethnic distribution of MTHFR gene polymorphisms and their associations with diseases among Chinese population[J]. Clin Genet, 2017, 92(3):243-258.

[10] 赵吉生, 盖宝东, 房学东, 等. 食盐碘化前后结节性甲状腺肿临床流行病学变化[J]. 中国地方病防治杂志, 2003, 18(5):287-288.

[11] NAZKI F H, SAMEER A S, GANAIE B A. Folate; metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases[J]. Gene, 2014, 533(1):11-20.

[12] 李丹丹, 叶阿里, 甘勇, 等. 北京地区汉族人群 MTHFR C677T 基因多态性分析[J]. 临床检验杂志. 2019, 37(2):156-160.

[13] VIDUDALA V P. Harpreet wilkhoo. association of the functional polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with colorectal, thyroid, breast, ovarian, and cervical cancers[J]. Onkologie, 2011, 34(8):422-426.

(收稿日期:2020-09-04 修回日期:2020-12-27)

• 短篇论著 •

柳州地区 2 863 例成年女性抗核抗体谱的分析研究*

杨金玲, 黄 诚, 陆碧玉, 黄李霜, 黄丽华, 陈大宇[△]

柳州市妇幼保健院医学遗传科/柳州市出生缺陷预防与控制重点实验室, 广西柳州 545001

摘要:目的 探究女性保健机构成年女性抗核抗体谱(ANAs)的检测结果。方法 应用流式荧光免疫法检测 2 863 例成年女性 ANAs, 并对其进行分析。结果 柳州地区成年女性 ANAs 阳性率为 15.75%; 随着年龄增长, ANAs 阳性率呈逐渐升高趋势, 但 3 个年龄分组 ANAs 阳性率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。ANAs 中抗 SSA、RNP 和 dsDNA 抗体阳性率分别为 3.18%、3.07% 和 3.63%, 其余抗核抗体阳性率均在 3.0% 以下。抗 SSA、SSB、RNP 抗体异常率 $> 80%$, 抗 Scl、Cent B 抗体异常率 $> 70%$, 其余抗核抗体阳性异常率 $< 70%$ 。可疑自身免疫性疾病的 ANAs 阳性率最高, 为 24.23%, 易栓症、不良妊娠史、复发性流产/习惯性流产、不孕症 ANAs 阳性率高于其他妇科疾病等疾病患者。结论 ANAs 检测可筛查成年女性自身免疫性疾病, 亦可评估免疫因素对成年女性生殖方面的影响, 为临床诊断治疗提供依据。

关键词:成年女性; 抗核抗体谱; 自身抗体; 自身免疫性疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.06.024

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2021)06-0740-04

文献标志码:A

抗核抗体谱(ANAs)包括最常见的自身免疫性抗体, ANAs 中的抗体与细胞核中的大分子物质, 如核糖体、DNA、RNA、组蛋白或这些物质的分子复合物结合, 对机体造成损伤。有研究认为, ANAs 中的各种自身抗体可与核成分结合, 从而影响受精卵细胞的分裂, 导致妊娠失败; 多种妊娠不良事件, 如反复自然流产、不孕、胚胎植入失败与 ANAs 密切相关^[1-3]。ANAs 是诊断和评价自身免疫性疾病预后的重要指标, 而自身免疫性疾病常见于女性, 因此, 对成年女性

进行 ANAs 检测具有重要意义。本文通过流式荧光免疫法检测柳州地区成年女性 ANAs, 并进行结果分析, 以期临床诊断治疗提供依据^[4]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 8 月至 2020 年 2 月在柳州市妇幼保健院就诊的 2 863 例成年女性的血清。按年龄分为 3 个组: 19~30 岁组、30~40 岁组和 > 40 岁组。按疾病类型分为 9 个组: 可疑自身免疫性疾病组、易栓症组、其他不良妊娠疾病组、复发性流产/

* 基金项目: 广西壮族自治区医疗卫生课题资助项目(Z2016546); 柳州市科技重大专项项目(2018AF10501)。

[△] 通信作者, E-mail: Cdsoft@163.com。

本文引用格式: 杨金玲, 黄诚, 陆碧玉, 等. 柳州地区 2 863 例成年女性抗核抗体谱的分析研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(6): 740-