

妇产科疾病研究专题

血栓前状态相关基因检测在预测不良妊娠中的价值

沈 晔, 钱芳波, 尹婷婷

(江苏省无锡市妇幼保健院 计划生育科, 江苏 无锡, 214000)

摘要: 目的 探讨血栓前状态(PTS)相关基因检测在预测不良妊娠中的价值。方法 选取发生过不良妊娠结局的女性患者154例,采用聚合酶链式反应(PCR)和毛细管电泳测序方法分析凝血因子V(FV)基因、凝血因子II(FII)基因、纤溶酶原激活剂抑制物-1(PAI-1) 5G/4G、亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因677位点基因型、MTHFR基因1298位点基因型和甲硫氨酸合成还原酶(MTRR)突变位点。对妊娠结局进行后续跟踪,分析不同基因多态性发生的频率。结果 检测结果显示,PTS低风险者18例,中风险者91例,高风险者45例。本研究发现FV基因1691位点基因型及FII基因20210位点基因型均为GG,而风险等级与FV、FII基因型无相关性,与民族、年龄也无相关性,而与胎停史有相关性。随着风险等级的升高,有胎停史患者、PAI-1基因-675位点基因型5G/5G、MTHFR基因677位点基因型TT的比率逐渐增高。以中风险和高风险患者例数计算PTS阳性率,结果为88.31%,与自然流产及复发性流产有显著相关性($P < 0.01$)。结论 早期自然流产和复发性流产与PTS基因突变密切相关。

关键词: 血栓前状态; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 甲硫氨酸合成酶还原酶; 纤溶酶原激活物抑制物-1; 凝血因子II; 凝血因子V

中图分类号: R 714.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2020)20-058-03 DOI: 10.7619/jcmp.202020016

Value of detection of related genes of prethrombotic state in predicting adverse pregnancy

SHEN Ye, QIAN Fangbo, YIN Tingting

(Department of Family Planning, Wuxi City Maternal and Child Health Care

Hospital in Jiangsu Province, Wuxi, Jiangsu, 214000)

Abstract: Objective To explore the value of detection of related genes of prethrombotic state (PTS) in predicting adverse pregnancy. **Methods** Totally 154 female patients with history of adverse pregnancy outcomes were selected. Polymerase chain reaction (PCR) and capillary electrophoresis (CE) sequencing method were used to analyze coagulation factor V (FV), coagulation factor II (FII), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 5G/4G, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 genotype, MTHFR 1298 genotype and mutation sites of methionine synthase reductase (MTRR). The pregnancy outcome was followed up to analyze the frequency of different gene polymorphisms. **Results** The results showed that there were 18 cases with low risk, 91 cases with medium risk and 45 cases with high risk. In this study, we found that the genotype of FV gene 1691 and genotype of FII gene 20210 were GG, but the risk level had no correlation with FV and FII genotypes, nationality and age, but had correlation with the history of fetal arrest. With the increase of risk level, the ratios of cases with the history of fetal arrest, PAI-1 gene-675 genotype 5G/5G and MTHFR gene 677 genotype TT increased gradually. Calculated by the number of patients with moderate and high risks, the positive rate of PTS was 88.31%, which was significantly correlated with spontaneous abortion and recurrent abortion ($P < 0.01$). **Conclusion** Early spontaneous abortion and recurrent abortion are closely related to PTS gene mutation.

Key words: prethrombotic state; methylenetetrahydrofolate reductase; methionine synthase reductase; plasminogen activator inhibitor-1; coagulation factor II; coagulation factor V

收稿日期: 2020-08-23

基金项目: 江苏省妇幼健康重点学科资助项目(FXK2017)

通信作者: 钱芳波, E-mail: 191529771@qq.com

目前,导致复发性流产(RSA)的因素很多,主要包括遗传因素、免疫功能异常、血栓前状态等^[1-3]。以妊娠12周为分界线,≤12周的流产多由遗传、免疫及血栓等因素引起; >12~28周的流产则多因血栓、感染等因素引起。值得注意的是,血栓是导致流产的重要因素。血栓前状态(PTS)是指血液系统持续处于高凝状态而导致机体处于易栓状态。研究^[4]报道妊娠合并静脉血栓栓塞症(VTE)的发病率约为0.1%。当血栓发生于子宫胎盘循环过程中时,可能形成子宫胎盘血管的微血栓,引起不良妊娠结局,如RSA、妊娠期高血压疾病、胎盘早剥,甚至胎死宫内。安宏亮等^[5]发现PTS与不明原因复发性自然流产具有相关性。本研究收集本院154例早期胚胎停育患者的临床资料,采用基因检测的方法评估PTS,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年6月—2019年5月本院计划生育门诊收治的154例有早期自然流产(妊娠12周内发生的非人为因素引起的流产)病史的患者,年龄21~43岁,平均(29.90±4.50)岁;自然流产次数1~6次,平均1.84次;主要表现为停经后出现阴道出血和腹痛,经B超检查确诊。排除存在生殖道畸形、合并内外科急慢性疾病者。

1.2 研究方法

采集受试者外周血并放置于含乙二胺四乙酸(EDTA)的试管中。采用德国罗氏MagNA pure LC 2.0核酸分离纯化及加样系统,对200 μL全血中基因组DNA进行纯化。采用德国罗氏公司生产的Light Cycler 2.0仪器,从100 ng DNA中对凝血因子V(FV)基因、凝血因子II(FII)基因、纤溶酶原激活剂抑制物-1(PAI-1)5G/4G、亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因677位点基因型、MTHFR基因1298位点基因型和甲硫氨酸合成还原酶(MTRR)突变位点进行分析。对妊娠结局进行后续跟踪,分析不同基因多态性发生的频率,并进行数据统计和相关性分析。

2 结果

检测结果显示,PTS低风险者18例,中风险者91例,高风险者45例。154例早期自然流产史患者资料见表1。作者发现FV基因1691位点

基因型及FII基因20210位点基因型也均为GG,而风险等级与FV、FII基因型无相关性,与民族、年龄也无相关性,而与胎停史有相关性。随着风险等级的升高,有胎停史患者、PAI-1基因-675位点基因型5G/5G、MTHFR基因677位点基因型TT的比率逐渐增高。见表2、3、4。以中风险和高风险患者例数计算PTS阳性率,结果为88.31%,与自然流产及复发性流产有显著相关性($P < 0.01$)。

表1 154例早期自然流产史患者资料($\bar{x} \pm s$) [n(%)]

风险等级	患者数	民族(汉族)	年龄/岁	胎停史
低风险	18(11.69)	18(100.00)	30.38±3.71	5(27.78)
中风险	91(59.09)	87(96.70)	30.40±0.51	31(34.44)
高风险	45(29.22)	45(97.82)	28.91±0.53	19(41.30)

表2 PAI-1基因-675位点基因型与风险等级的关系[n(%)]

-675位点基因型	低风险	中风险	高风险
4G/4G	0	25(27.78)	15(32.60)
4G/5G	13(72.22)	54(60.00)	7(15.22)
5G/5G	5(27.28)	11(12.22)	24(52.17)

表3 MTHFR基因677位点基因型与风险等级的关系[n(%)]

677位点基因型	低风险	中风险	高风险
CC	18(100.00)	20(22.22)	7(15.22)
CT	0	70(77.78)	5(10.87)
TT	0	0	34(73.91)

表4 MTHFR基因1298位点基因型与风险等级的关系[n(%)]

1298位点基因型	低风险	中风险	高风险
AA	18(100.00)	46(51.11)	36(78.26)
AC	0	44(48.89)	3(6.52)
CC	0	0	7(15.22)

3 讨论

随着基因序列检测技术的发展和临床应用,临床发现携带突变基因的人群往往具有较高的血栓发病率,且在妊娠时易诱发血栓。PTS可分遗传性PTS和获得性PTS,前者多由凝血、抗凝血及纤溶有关的基因发生突变导致,如FV突变、凝血酶原基因突变等;后者主要由抗磷脂抗体综合征(APS)、获得性高半胱氨酸血症以及机体存在各种引起血液高凝状态等疾病等导致。正常妊娠期孕妇血液处于高凝状态,如果同时存在遗传性PTS等因素,可以导致胎盘微血栓、血流灌注不足,从而引发不良妊娠结局,包括自然流产、复发

性流产、胎儿宫内发育迟缓、胎盘早剥及胎死宫内等。通过基因检测评估血栓形成风险,依据不同基因型及风险级别实施相应的抗凝治疗,可以有效减少不良妊娠结局的发生。

相关研究^[6]显示,与 RSA 相关的主要 PTS 遗传因素包括 FV 基因突变、蛋白 C、S 缺陷症、高同型半胱氨酸血症、PAI-1 增多等,其中凝血因子 V Leiden (FVL)、凝血酶原 G20210A 基因 (PTG)、MTHFR 突变相关性更强。叶酸代谢中最重要的 2 个基因是 MTHFR 和 MTRR,他们也与 PTS 的发生密切相关。MTHFR 是调节半胱氨酸和四氢叶酸代谢的关键酶。1994 年,GOYETTE P 等^[7]最先将 MTHFR 基因克隆,发现多种基因多态性位点存在于 MTHFR 及 MTRR 基因,其中以 MTHFR 基因的 C 677 T、A 1298 C 和 MTRR 的 A 66 G 最为常见^[8],这些基因的突变与维生素 B₁₂、叶酸及同型半胱氨酸水平关系密切^[9]。研究^[10]发现 MTHFR 第 677 位核苷酸发生 C→T 突变,表现为 MTHFR 丙氨酸被缬氨酸取代,导致其活性和耐热性下降,引起高同型半胱氨酸血症,进而引起胎盘动脉栓塞和胚胎供血不足,从而引发绒毛坏死,而这一过程是发生自然流产的重要原因。

PAI-1 活性升高可引发低纤维蛋白溶解,导致血液处于高凝状态,是发生 PTS 的重要诱因。PAI-1 基因型有 3 种,即 4G/4G、5G/5G、4G/5G 型。研究^[11]表明,RSA 患者 PAI-1 基因中携带 4G 等位基因和 4G/4G 基因型时,发生自然流产的风险分别增加 2.0 倍和 4.8 倍,提示 RSA 与 PAI-1 4G/5G 基因型的多态性相关。FV 有 GG、GA、AA 共 3 种基因型,具有抗凝、促凝的双重作用^[12],FV 突变可减弱人体抗凝系统功能,其中发生 1 个基因突变 (GA) 时伴发血液高凝的概率是正常人的 5~10 倍,而发生 2 个基因突变 (AA) 时伴发血液高凝的概率是正常人的 80 倍。在凝血过程中,FII 突变 (杂合子) 会导致血液中 FII 含量升高,进而被凝血因子 Va 转变为凝血酶,导致血栓形成^[13]。FII 基因突变增高了自然流产的发生概率。一项 Meta 分析^[14]发现 FII 变异与习惯性流产的发生有相关性,发生 FII 突变的患者伴发血液高凝的概率是正常人的 2~3 倍,因此 FII 可作为预测早期习惯性流产的关键因素之一。研究^[15]证实,MTHFR、MTRR、FV、FII 和 PAI-1 基因多态性都会促进血栓形成,进而诱发习惯性流产。

本研究还发现,同时携带 2 种血栓易感基因型患者较携带 1 种血栓易感基因型患者更容易发生 RSA,这表明同时携带 PAI-1 4G/4G 基因型和 MTHFR TT 基因型可增高自然流产的发生概率。因此,RSA 患者若检测出携带 4G/4G 基因型和/或 MTHFR TT 基因型,应在孕前和孕期进行抗凝治疗,并适量补充叶酸和维生素 B₁₂,以预防流产的发生。

参考文献

- [1] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98 (5): 1103 - 1111.
- [2] Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage (Green-top Guideline No. 17). April 2011 [EB/OL]. [2015 - 06 - 08]. https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gtg_17.pdf.
- [3] 谢幸,苟文丽. 妇产科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 3 - 8.
- [4] CATHERINE N P. Handbook of venous thromboembolism [M]. Oxford: John Wiley, 2018: 131 - 144.
- [5] 安宏亮,江海燕,张劲丰,等. Logistic 回归联合 ROC 曲线分析对不明原因复发性自然流产的血栓前状态的诊断价值 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28 (20): 3303 - 3307.
- [6] 曾蔚越,杨霄. 妊娠期易栓症的病因 [J]. *实用妇产科杂志*, 2009, 25 (3): 129 - 131.
- [7] GOYETTE P, SUMNER J S, MILOS R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification [J]. *Nat Genet*, 1994, 7 (4): 551 - 557.
- [8] PURI, KAUR L, WALIA G K, et al. MTHFR C677T polymorphism, folate, vitamin B₁₂ and homocysteine in recurrent pregnancy losses: a case control study among North Indian women [J]. *J Perinat Med*, 2013, 41 (5): 549 - 554.
- [9] 刘英华,陈瑛. 叶酸代谢基因与出生缺陷和不良妊娠的关系 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20 (8): 6 - 8.
- [10] 曾蔚越,杨霄. 妊娠期易栓症的病因 [J]. *实用妇产科杂志*, 2009, 25 (3): 129 - 131.
- [11] 熊雯,谢聪,黄娟,等. 复发性流产患者叶酸代谢水平及叶酸干预对妊娠的影响研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24 (1): 77 - 80.
- [12] 宋绿茵,史文静,陈盛强. 凝血因子 V 基因 Leiden 突变与反复自然流产的关系 [J]. *广州医学院学报*, 2005, 33 (4): 11 - 13.
- [13] LINO F L, TRAINA É, BARRETO J A, et al. Thrombophilic mutations and polymorphisms, alone or in combination, and recurrent spontaneous abortion [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2015, 21 (4): 365 - 372.
- [14] GAO H, TAO F B. Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis update [J]. *Thromb Res*, 2015, 135 (2): 339 - 346.
- [15] MIERLA D, SZMAL C, NEAGOS D, et al. Association of prothrombin (A20210G) and factor V Leiden (A506G) with recurrent pregnancy loss [J]. *Maedica*, 2012, 7 (3): 222 - 226.