●论

MTHFR C677T基因、血清同型 半胱氨酸与特发性男性不育症 的关系研究

邵丽佳 朱德胜 陈伟 沈利洪

【 关键词 】 同型半胱氨酸 亚甲基四氢叶酸还原酶 不育症

Relationships among MTHFR C677T genotype, serum homocysteine and idiopathic male infertility SHAO Lijia, ZHU Desheng, CHEN Wei, et al. Department of Clinical Laboratory, Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000, China

[Abstract] Objective To analyze the relationships among the polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T, serum homocysteine (Hcy) and idiopathic male infertility. Methods One hundred and sixty seven male patients with idiopathic infertility (case group) and 65 healthy male subjects with normal reproductive history (control group) were enrolled in the study. MTHFR C677T genotype and serum Hcy levels were detected and the relationship among MTHFR C677T genotype, serum Hcy level and idiopathic male infertility was analyzed. Results The frequency of MTHFR TT genotype and T allele in the case group was higher than that in the control group (both P < 0.05). The serum Hcy levels was not significant different in different MTHFR C677T genotypes of control group (P > 0.05). However, there were significant differences in serum Hcy levels among the patients with different MTHFR C677T genotypes (P < 0.05). The serum Hcy level with TT genotype was higher than that in patients with CG genotype of case group (P < 0.05). Univariate logistic regression analysis showed that the risk of idiopathic male infertility in subjects with hyperhomocysteinemia was 24.46 times higher than that of non-hyperhomocysteinemia patients (95% $CI:5.79 \sim 103.31$, P < 0.05). Multivariate logistic regression analysis showed that high Hcy level was an independent risk factor of idiopathic male infertility (OR=22.38, 95% $CI:5.27 \sim 95.128$, P < 0.05). Conclusion Serum Hcy level may be associated with the risk of idiopathic male infertility, independent to the MTHFR C677T polymorphism, indicating

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.10.2018-3172

基金项目:金华市科学技术研究计划公益类项目(2017-4-064)

作者单位:321000 金华市中心医院检验科(邵丽佳、陈伟、沈利洪),泌尿外科(朱德胜)

通信作者:沈利洪,E-mail:shenlihong000@126.com

that detecting Hcy levels may be of value in the diagnosis of idiopathic male infertility.

[Key words] Homocysteine Methylene tetrahydrofolate reductase Infertility

随着人类基因组计划顺利完成及男科学研究迅速发展,与特发性男性不育症相关的基因逐步被发现,其中亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 677 位点的单核苷酸突变与男性不育的发生有关[1-4],该过程可能是由于MTHFR 基因位点突变导致高同型半胱氨酸(Hey)血症,从而导致男性不育[5]。但 MTHFR 基因与血清 Hey 水平之间的关系目前尚缺乏验证,且高 Hey 血症与男性不育之间的关系尚存在争议。基于此,本研究通过检测特发性男性不育症患者 MTHFR C677T 基因型和血清Hey 水平,分析 MTHFR C677T 基因多态性、血清 Hey 水平与特发性男性不育症的关系,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2017 年 4 月至 2018 年 9 月本院收治的特发性男性不育症患者 167 例,设为病例组,纳入标准:年龄 20~39 岁,夫妇婚后同居至少 1 年、正常性生活未避孕未育、排除女方不孕,无特殊既往史和家族史;排除染色体核型异常,Y 染色体无精症因子区微缺失,精索静脉曲张,隐睾,附睾损伤,阻塞性无精症,生殖系统感染。另择同期来院体检,有正常生育史且身体健康者65 例,设为对照组,纳入标准:年龄 20~39 岁,至少生育过 1 个孩子,身体健康,无特殊既往史和家族史;排除通过辅助生殖技术生育子女者。病例组患者年龄 20~39 (29.4±3.1)岁,对照组受检者年龄 21~39(28.8±2.8)岁,两组年龄比较差异无统计学意义(P>0.05)。本研究经金华市中心医院医学伦理委员会批准,且所有受检者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 精液质量分析 依据 WHO 第五版《人类精液检查与处理实验室检查手册》,采用 CASA 计算机辅助精子分析系统,对病例组患者行精液质量分析。精液质量评价指标包括精子总数、精子活力和精子形态,其中精子总数≤39×10%每次射精为精子总数异常,前向精子运动率≤32%为精子活力异常,正常形态精子≤4%为精子形态异常。根据精液质量将特发性男性不育症分为8个亚型:精液质量正常型,仅精子总数异常为少精子症,仅精子活力异常为弱精子症,仅精子形态异常为畸精子症,精子总数和精子活力异常为少畸精子症,精子活力和精子形态异常为弱畸精子症,精子总数、精子活力及精子形态

均异常为少弱畸精子症。

1.2.2 MTHFR C677T 基因型检测 采用 RT-PCR 法 抽取病例组患者与对照组受检者 2 ml 全血至 EDTA 抗 凝试管中,充分混匀后使用北京天根生化科技有限公司 生产的 TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒抽提全血 DNA。使用上海之江生物有限公司生产的 MTHFR C677T Mutation Real Time PCR Kit 试剂盒进行 MTHFR C677T基因多态性检测。制作反应体系为 40 μl。循环参 数:37℃ 2min,94℃ 2min,循环 1次;93℃10s,62℃40s,循 环 30 次。4℃终止。信号收集在 62℃。荧光检测通道为 FAM 和 VIC。FAM 通道阴性、VIC 通道阳性为野生型(CC 型),FAM 通道和 VIC 通道均阳性为突变杂合子(CT型), FAM 通道阳性、VIC 通道阴性为突变纯合子(TT型)。 1.2.3 血清 Hev 水平检测 抽取病例组患者与对照组 受检者空腹静脉血 2ml,用促凝真空管留置静脉血标 本,血液凝固后以 3 500 r/min 离心,使用奥林帕斯 AU 5400 生化全自动分析仪检测血清 Hev 水平。血清 Hev 水平≤15μmol/L 定义为正常 Hey, 血清 Hey 水平> 15µmol/L 定义为高 Hey 血症。

1.3 观察指标 (1)观察病例组患者精液质量分析结果;(2)比较两组对象 MTHFR C677T 基因型;(3)比较两组血清 Hey 水平;(4)比较不同 MTHFR C677T 基因型的两组血清 Hey 水平;(5)单因素分析 MTHFR C677T 基因型与特发性男性不育症的关系;(6)单因素分析血清 Hey 水平与特发性男性不育症的关系;(7)多因素分析 MTHFR C677T 基因型、血清 Hey 水平与特发性男性不育症的关系;

1.4 统计学处理 应用 SPSS 21.0 统计软件;正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验;非正态分布的计量资料以 $M(P_{25},P_{75})$ 表示,多组间比较用 Kruskal-Wallis H 秩和检验,两组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,组内同一指标比较用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以频数和构成比表示,两组比较采用 χ^2 检验,组内同一指标两两比较采用 Bonferroni 方法进行多重检验校正;采用 logistic 回归分析 MTHFR C677T 基因型、血清 Hey 水平与特发性男性不育症的关系;P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组患者精液质量分析结果 见表 1。

表 1 病例组患者精液质量分析结果[例(%)]

	精子活力正常		精子活力异常			
指标	精子形态	精子形态	精子形态	精子形态	合计	
	正常	异常	正常	异常		
精子总数正常	13(7.8)	15(9.0)	37(22.2)	62(37.1)	127(76.0)	
精子总数异常	2(1.2)	3(1.8)	14(8.4)	21(12.6)	40(24.0)	
合计	15(9.0)	18(10.8)	51(30.5)	83(79.7)	167(100.0)	

由表 1 可见,病例组患者中精液质量正常型 13 例、少精子症 2 例、弱精子症 37 例、畸精子症 15 例、少弱精子症 14 例、少畸精子症 3 例、弱畸精子症 62 例、少弱畸精子症 21 例。

2.2 两组对象 MTHFR C677T 基因型比较 见表 2。

表 2 两组对象 MTHFR C677T 基因型比较[例(%)]

组别			基因型			等位基因	
组剂	n	CC 型	CT 型	TT 型	С	Т	
病例组	167	52(31.1)	71(42.5)	44(26.3)	175(52.4)	159(47.6)	
对照组	65	30(46.2)	28(43.1)	7(10.7)	88(67.7)	42(32.3)	
P值		< 0.05			<0.0)5	

由表 2 可见,两组对象 *MTHFR C677T* 基因型分布情况存在统计学差异(*P*<0.05),病例组患者 TT 基因型比例高于对照组。两组对象 *MTHFR C677T* 基因的等位基因分布情况存在统计学差异(*P*<0.05),病例组患者T等位基因频率高于对照组。

- 2.3 两组对象血清 Hey 水平比较 病例组患者血清 Hey 水平为 13.8(10.4,18.4)µmol/L,对照组受检者血清 Hey 水平为 11.1(9.9,12.4)µmol/L。两组对象血清 Hey 水平比较差异有统计学意义(P<0.05),病例组患者血清 Hey 水平高于对照组受检者。
- 2.4 不同 *MTHFR C677T* 基因型的两组对象血清 Hey 水平比较 见表 3。

表 3 不同 *MTHFR C677T* 基因型的两组对象血清 Hcy 水平 比较(μmol/L)

组别	n/	CC 型	CT 型	TT 型	P值
病例组	167 1	2.2(9.3,16.7)	14.9(10.6,18.3)	15.6(10.7,19.4)*	< 0.05
对照组	165 11	.9(10.2,12.7)	10.7(9.4,12.1)	10.3(9.4,11.6)	>0.05
注:	与 CC :	基因型比较,	P<0.05		

由表 3 可见,不同 MTHFR C677T 基因型的对照组 受检者间血清 Hey 水平比较差异无统计学意义 (P>0.05)。不同 MTHFR C677T 基因型的病例组患者血清 Hey 水平比较差异有统计学意义 (P<0.05),不同基因型患者血清 Hey 水平两两比较,TT 基因型的病例组患者血清 Hey 水平高于 CC 基因型的病例组患者,且差异

有统计学意义(P<0.05)。

2.5 *MTHFR C677T* 基因型与特发性男性不育症的关系分析 见表 4。

表 4 MTHFR C677T 基因型与特发性男性不育症的关系分析

变量	回归系数	标准差	P值	95%CI
CC 型	-	-	-	$\overline{\mathcal{O}}$
CT 型	0.38	0.32	>0.05	0.78~2.74
TT 型	1.29	0.47	< 0.05	1.45~9.06

注:单因素 logistic 回归分析

由表 4 可见, CT 基因型的研究对象(包括病例组患者与对照组受检者)患特发性男性不育症的风险是CC 基因型的 1.46 倍,但这一关系无统计学意义(95% CI:0.78~2.74, P > 0.05),而 TT 基因型的研究对象患特发性男性不育症的风险是 CC 基因型的 3.63 倍(95% CI:1.45~9.06, P < 0.05)。

2.6 血清 Hey 水平与特发性男性不育症的关系分析 见表 5。 •

表 5 血清 Hey 水平与特发性男性不育症的关系分析

变量	回归系数	标准差	P 值	OR 值	95%CI
Hey≤15µmol/L	_	_	_	1.00	-
Hcy>15µmol/L	3.20	0.74	< 0.05	24.46	5.79~103.31

注:单因素 logistic 回归分析

由表 5 可见,高 Hey 血症者患特发性男性不育症的风险是非高 Hey 血症者的 24.46 倍(95% CI: 5.79~103.31, P<0.05)。

2.7 *MTHFR C677T* 基因型、血清 Hey 水平与特发性男性不育症的关系分析 见表 6。

表 6 MTHFR C677T 基因型、血清 Hey 水平与特发性男性不育 症的关系分析

变量	回归系数	标准差	P值	OR 值	95%CI
CC 型	-	-	-	1.00	-
CT 型	0.11	0.35	>0.05	1.11	0.56~2.19
TT 型	0.90	0.50	>0.05	2.46	0.93~6.52
$\mathrm{Hcy}\!\leqslant\!15\mu\mathrm{mol/L}$	-	-	-	1.00	-
$Hcy>15\mu mol/L$	3.11	0.74	< 0.05	22.38	5.27~95.128

注:多因素 logistic 回归分析

由表 6 可见,CT、TT 基因型研究对象与 CC 基因型相比,其特发性男性不育症的患病风险增加,但无统计学意义(均 P > 0.05);高 Hcy 血症仍然是特发性男性不育症患病风险增大的危险因素,OR = 22.38(95%CI: 5.27~95.128, P < 0.05)。

3 讨论

MTHFR 是一种黄素依赖酶,相对分子量为74.5kD,在机体中主要介导5,10-亚甲基四氢叶酸转变成5-甲基四氢叶酸,后者在DNA和蛋白质甲基化的甲基供体S-腺苷甲硫氨酸的形成过程中发挥关键作用^[6]。目前,人类基因组研究已发现*MTHFR*基因存在多个多态性位点,其中*MTHFR C677T*为CC型、CT型和TT型,MTHFR的酶活性依次下降^[7-8]。

Hey 是一种含硫氨基酸,可在 N⁵-甲基四氢叶酸转甲基酶及其辅酶维生素 B₁₂ 的作用下生成蛋氨酸,也可在胱硫醚-β-合成酶的催化下生成半胱氨酸。Hey 再甲基化时由 5-甲基四氢叶酸提供甲基,而 MTHFR 正是介导 5,10-亚甲基四氢叶酸转变成 5-甲基四氢叶酸的关键酶。

据中国、德国、印度等多个国家的研究发现,MTHFR C677T 位点的单核苷酸多态性与当地人群的男性不育发生存在关系[1-4]。有学者提出,MTHFR C677T 位点的突变导致 MTHFR 基因出现异常,可能引起血液中Hey 的堆积形成高 Hey 血症,高 Hey 血症会导致男性不育[5]。本研究结果显示,病例组患者 TT 基因型比例高于对照组,且病例组患者 T 等位基因频率高于对照组。这说明 T 等位基因可能是特发性男性不育症的危险等位基因,这一结果与既往研究结果相符[9-10]。

血清 Hey 水平与特发性男性不育症之间的关系尚无定论。赵铭佳等凹的研究发现血清 Hey 水平与男性精液量、精子浓度和精子活力均无关系,但戈一峰等[12]、何海洪等[13]的研究提示血清 Hey 水平与精子浓度、精子活力均呈负相关。本研究结果显示,病例组患者血清 Hey 水平高于对照组受检者。

本研究中,不同 MTHFR C677T 基因型的对照组受检者间血清 Hey 水平比较差异无统计学意义。将MTHFR C677T 基因、血清 Hey 水平分别与特发性男性不育进行单因素 logistic 回归分析,结果分别肯定了这两个因素与疾病的关联,但是在多因素 logistic 回归分析中,高 Hey 血症仍然是特发性男性不育症患病的危险因素,而 MTHFR C677T 基因与患病之间的关系没有统计学意义。这些结果提示,MTHFR C677T 基因对血清Hey 水平的影响可能很有限,血清 Hey 水平可能受多种因素调节,而真正影响特发性男性不育症的因素更可能是多种因素导致的高 Hey 血症,而非 MTHFR C677T 基因多态性。即血清 Hey 水平可能是独立于 MTHFR C677T 基因的影响特发性男性不育症的因素,且高 Hey

血症者的特发性男性不育症患病风险是非高 Hey 血症者的 22.38 倍。

血清 Hey 水平影响特发性男性不育症发生的机制可能是体内高 Hey 可抑制谷胱甘肽合成,谷胱甘肽为活性氧的清除物质,当谷胱甘肽减少时,精液中活性氧产生与清除的动态平衡被破坏,造成精子生成减少、精子 DNA 损伤等,最终导致精液质量降低[14];此外高 Hey血症可能引起睾丸中的血管过早发生动脉硬化,影响睾丸的血液供应,导致生精功能障碍[15]。

综上所述,MTHFR C677T 基因的 T 等位基因、高 Hey 血症均是特发性男性不育症发病的危险因素,而血 清 Hey 水平可能是独立于 MTHFR C677T 基因的影响 特发性男性不育症发病的因素。在常规生育前体检、不 育男性检查中增加血清 Hey 水平检测可能对特发性男 性不育症的病因发现和治疗、实现优生优育有重要的现 实意义。

4 参考文献

- [1] Singh K, Singh SK, Sah R, et al. Mutation C677T in the methylen– etetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertil– ity in an Indian population[J]. Int J Androl, 2005, 28(2):115–119.
- [2] Bezold G, Lange M, Peter RU. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility[J]. N Engl J Med,2001, 344(15): 1172–1173.
- [3] Lee HC, Jeong YM, Lee SH, et al. Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with nonobstructive male infertility[J]. Hum Reprod, 2006, 21(12): 3162–3170.
- [4] Liu L, Yang L, Zhang YC, et al. [Polymorphisms of drug-metabol-izing enzymes genes in a Han Chinese population][J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi,2009, 89(38): 2675–2681.
- [5] Han IB, Kim OJ, Ahn JY, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T and 1298A>C) polymorphisms and haplotypes with silent brain infarction and homocysteine levels in a Korean population[J]. Yonsei Med J,2010, 51(2): 253–260.
- [6] 刘玲, 钱卫平. 亚甲基四氢叶酸还原酶及甲硫氨酸合成酶基因多态性与男性不育[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2011(3): 222–225.
- [7] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydr– ofolate reductase[J]. Nat Genet, 1995, 10(1): 111–113.
- [8] Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, et al. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/ phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency[J]. Am J Hum Genet, 1995, 56(5):1052–1059.
- [9] 胡斐, 艾继辉, 谷龙杰. 186 例少弱精子症患者 MTHFR C677T 基因 多态性观察[J]. 生殖医学杂志, 2017(3): 269-271.
- [10] 刘玲, 蔡志明, 冷慧敏, 等. MTHFR C677T 和 MS A2756G 基因多

(下转第1020页)

(3):21-33.

- [2] 路瑾.多发性骨髓瘤诊断标准的变迁及其对治疗的影响[J].中国肿瘤 临床,2014,41(13):819-822.
- [3] Bergsagel PL.Where we were, where we are, where we are going: progress in multiple myeloma[J]. Am Soc clin Oncol Educ Book, 2014,34:199–203.
- [4] Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of Multiple Myeloma[J]. Lancet Oncol, 2014,15(12):e538–548.
- [5] 汪英颖,刘尚勤.多发性骨髓瘤诊治指南解读(2018年)[J].临床内科 杂志,2018,35(7):503-504.
- [6] Palumbo A,Rajkumar SV, San Miguel JF, et al. International Myeloma Working Group consensus statement for the manage-

ment treatment, and supportive care of patients with myeloma noteligible for standare autologous stem-cell transplantation[J]. J Clin. Oncol, 2014, 32(6):587-600.

- [7] Lokhorst HM, van der HB, Zweegman S, et al. A randomized phase 3 study on the effect of thalidomide combined with adriamycin, dexamethasone, and high – dose melphalan, followed by thalidomide maintenance in patients with multiple myeloma[J]. Blood, 2010, 115(6):1113–1120.
- [8] 金丽娜,杜鹃.诱导治疗序贯自体外周造血干细胞移植治疗后 201 例 多发性骨髓瘤患者的疗效和预后影响因素[J].中华血液学杂志,2016, (1):14-19.

(收稿日期:2018-12-24) (本文编辑:李媚)

(上接第 1016 页)

态性与精液质量相关性研究[J]. 中南大学学报(医学版), 2012, 10 (37): 1054-1059.

- [11] 赵铭佳, 周善杰, 袁冬, 等. 正常成年男性精浆同型半胱氨酸浓度及 其与精液参数关联性研究[J]. 生殖医学杂志,2014,23(2): 116-120.
- [12] 戈一峰, 汪春晖, 欧阳罗璇, 等. 少和/或弱精子症患者血浆同型半胱 氨酸的测定及意义[J]. 中华男科学杂志,2008,14(12): 1112–1114.
- [13] 何海洪, 郭伟权, 兰希, 等. 严重生精障碍患者精子 DNA 碎片指数 与血清 Hcy 水平的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2017(4):

83-86.

- [14] Rossato M. A genetic polymorphism and male fertility[J]. Fertil Steril,2004, 81(5):1429–1431.
- [15] Chan D, Cushnie DW, Neaga OR, et al. Strain-specific defects in testicular development and sperm epigenetic patterns in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice[J]. Endocrinology,2010, 151(7): 3363-3373.

(收稿日期:2018-12-19) (本文编辑:李娟)

2019 年本刊推荐直接采用缩写的常用词汇

AIDS:获得性免疫缺陷综合征

ALP:碱性磷酸酶

ALT:丙氨酸转氨酶

APTT:活化部分凝血活酶时间

TT:凝血酶时间

PT:凝血酶原时间

AST:天冬氨酸转氨酶

AUC:曲线下面积

BMI:体重指数

CV:变异系数

DBil:直接胆红素

ELISA:酶联免疫吸附测定

ESR:红细胞沉降率

FBS:胎牛血清

GFR:肾小球滤过率

Hb:血红蛋白

HBeAg: 乙型肝炎病毒 e 抗原

HBsAg:乙型肝炎病毒表面抗原

HBV: 乙型肝炎病毒

HCV: 丙型肝炎病毒

HDL-C:高密度脂蛋白胆固醇

HIV:人类免疫缺陷病毒

HLA:人类白细胞抗原

ICU:重症监护病房

IFN:干扰素

IL:白细胞介素

LDL-C:低密度脂蛋白胆固醇

MIC:最小抑菌浓度

MRI:磁共振成像

NF-κB:核因子-κB

NK 细胞:自然杀伤细胞

PaCO2:动脉血二氧化碳分压

PaO2:动脉血氧分压

PBS:磷酸盐缓冲液

PET:正电子发射断层扫描

PLT: 血小板计数

PPD:精制结核菌素试验

RBC:红细胞计数

RCT:随机对照试验

ROC 曲线:接受者操作特征曲线

RT-PCR:逆转录-聚合酶链反应

SARS:严重急性呼吸综合征

T3:三碘甲状腺原氨酸

T4:甲状腺素

TBil: 总胆红素

TC:总胆固醇

TG:甘油三酯

Th:辅助性T淋巴细胞

TNF:肿瘤坏死因子

WBC:白细胞计数

WHO:世界卫生组织

抗-HBc:乙型肝炎病毒核心抗体

抗-HBe:乙型肝炎病毒 e 抗体

抗-HBs:乙型肝炎病毒表面抗体

抗-HCV:丙型肝炎病毒抗体

抗-HIV:人类免疫缺陷病毒抗体