

论著·临床研究

男性叶酸代谢功能与辅助生殖技术结局的相关性研究

吴正沐¹, 陈松长², 徐晨明², 金 丽¹

1. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院辅助生殖科, 上海 200030; 2. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院生殖遗传科, 上海 200030

[摘要] **目的**·研究男性叶酸代谢相关基因亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) C677T 多态性及同型半胱氨酸 (homocysteine, HCY) 水平对辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART) 妊娠结局的影响。**方法**·观察接受辅助生殖治疗的 285 对不孕不育夫妇, 收集男方精液质量、血清 HCY 浓度和 *MTHFR* 基因型等资料, 并对他们助孕情况进行回顾性分析。根据 HCY 水平分为高 HCY 组和正常 HCY 组, 根据 *MTHFR* 基因型结果分为叶酸代谢障碍高风险 (TT) 组和非 TT 组, 两两组合, 以非 TT 正常 HCY 组为参照组进行比较。**结果**·各组精液质量对比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。非 TT 高 HCY 组及 TT 高 HCY 组与参照组比较, 受精率显著降低 ($P=0.001$, $P=0.002$); 非 TT 高 HCY 组的优胚率明显低于参照组 ($P=0.038$)。妊娠率及流产率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论**·高 HCY 血症可能会影响辅助生殖技术的受精率, *MTHFR* 基因多态性的检测结果有助于提醒受孕人群及时补充叶酸。

[关键词] 亚甲基四氢叶酸还原酶; 同型半胱氨酸; 辅助生殖技术; 结局

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.10.017 **[中图分类号]** R714 **[文献标志码]** A

Association between folate metabolism in males and outcome of assistant reproductive technology

WU Zheng-mu¹, CHEN Song-chang², XU Chen-ming², JIN Li¹

1. Department of Reproductive Medicine, International Peace Maternity and Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; 2. Key Laboratory of Reproductive Genetics, International Peace Maternity and Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the association between polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), serum homocysteine (HCY) concentration and outcome of assistant reproductive technology (ART). **Methods**·A retrospective study was conducted in 285 infertile couples who underwent ART. Sperm quality, serum HCY concentration and *MTHFR* genotype of the males in these couples were collected. According to the results of *MTHFR* C677T and serum HCY of males, they were divided into four groups, i.e., TT+high HCY, TT+normal HCY, NOT TT+high HCY, and NOT TT+normal HCY (as control). **Results**·There was no significant difference in the frequency distribution of oligoasthenozoospermia of four groups ($P>0.05$). The fertilization rates were significantly lower in patients with high plasma HCY levels ($P<0.05$). The rates of effective embryo in NOT TT+high HCY group were significantly lower ($P<0.05$). Accumulated pregnancy rates and early abortion rates were not significantly different among four groups ($P>0.05$). **Conclusion**·High serum HCY of males may affect outcome of ART. The detection of *MTHFR* gene polymorphisms helps to remind supplement folic acid in time.

[Key words] methylenetetrahydrofolate reductase; homocysteine; assistant reproductive technology; outcome

男性不育原因的基因研究发现亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) 多态性会降低精子的密度和活率^[1-2], 进而影响男性生育能力^[3]。研究最多的基因型是 C677T, 它影响男性不育的主要途径为引起高同型半胱氨酸血症^[4]。目前发表的文章多为分别讨论 C677T 多态性或血清同型半胱氨酸 (homocysteine, HCY) 水平与精子质量的关系, 尚无分析这些因素与辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART) 助孕结局关系的文章。本研究收集了 2016—2017 年这方面的临床资料, 进行初步分析, 现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

研究对象为 2016 年 1 月至 2017 年 6 月在上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院接受 ART 助孕的不孕症患者。纳入标准: 女性配偶年龄 ≤ 38 岁; 体质指数在正常范围 ($18 \sim 24 \text{ kg/m}^2$); 不孕原因为女方输卵管因素; 促排卵使用促性腺激素释放激素拮抗剂 (gonadotropin releasing hormone antagonist, GnRH-ant); 促排卵后实际

[作者简介] 吴正沐 (1979—), 男, 副主任医师, 硕士; 电子信箱: wuzhengmu@126.com。

[通信作者] 金 丽, 电子信箱: jinli96@163.com。



获卵数 ≥ 4 枚。排除标准:男女任意一方有染色体异常;男方有隐睾、附睾炎、精索静脉曲张病史;男方有抽烟、酗酒等不良生活习惯。共计纳入 285 对不育配偶,即 285 个促排卵周期。

1.2 分组

入组的男性进行 *MTHFR* 基因和血清 HCY 浓度检测。使用罗氏 Modular P800 生化分析仪,采用酶循环法测定 HCY,严格按照试剂盒(武汉生之源生物科技股份有限公司)的说明书进行操作。采用聚合酶链反应-限制性片段长度及多态性技术检测 *MTHFR* 基因多态性,试剂盒由上海百傲科技股份有限公司提供。提取基因组 DNA 后,采用 PCR 扩增出 *MTHFR* 基因中包含 677 位点的片段,扩增产物用限制性内切酶消化后,经聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,溴化乙锭染色后紫外灯下观察酶切结果。

MTHFR 基因型结果有 3 种:纯合子突变型(TT)、杂合子突变(TC)及野生纯合型(CC)。TT 基因型会导致 *MTHFR* 酶活性低,叶酸转化能力低下;对于检测出基因型为 TT 的患者,及时通知患者进行叶酸补充,剂量为 $4\text{ mg/d}^{[5]}$ 。按 *MTHFR* 基因型结果将受试者分为 TT 和非 TT(包含 TC 和 CC)2 组;按 HCY 浓度 $\leq 15\text{ }\mu\text{mol/L}$ 为基准,分为正常 HCY 组和高 HCY 组。将 2 个指标组合形成 TT 高 HCY 组、TT 正常 HCY 组、非 TT 高 HCY 组、非 TT 正常 HCY 组,共计 4 组。以非 TT 正常 HCY 组为参照组进行比较。

1.3 精子质量检测

使用计算机辅助精子分析仪(computer-aided sperm analysis, CASA)进行精液质量分析。按照《WHO 人类精液检验与处理实验室手册》(第 5 版)要求,密度低于 $15\times 10^6/\text{mL}$ 或前向运动精子率(progressively motile sperm rate, PR)低于 32% 为少弱精子症。

1.4 辅助生殖助孕

采用拮抗剂方案促排卵。从月经周期第 2 日或第 3 日开始,给予患者人绝经期促性腺激素(urinary-derived human menopausal gonadotropin, HMG) 150 U/d ,使用剂量根据卵泡发育情况进行调整;当优势卵泡直径 $\geq 14\text{ mm}$ 时,给予 GnRH-ant(Baxter Oncology GmbH, 德国) 0.25 mg/d 。当观察到有 2 枚以上卵泡直径 $\geq 18\text{ mm}$ 时,给予人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG) $6\text{ }000\text{ U}$ 。34~36 h 后,女方阴道 B 超引导下取卵,根据男方精子密度和活率行常规体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)/单精子卵细胞质内注射(*intra*

cytoplasmic sperm injection, ICSI)。授精后观察受精情况,并分别记录第 2、3 日胚胎发育情况,根据第 3 日胚胎的卵裂球数量、大小均一性及碎片程度进行评分,挑选优质胚胎移植或冷冻,记录受精率、卵裂率和优胚率。冷冻胚胎移植方案主要为人工周期、自然周期 2 种,根据患者内膜和排卵情况决定,当患者内膜厚度 $\geq 8\text{ mm}$ 时进行内膜转化,解冻胚胎后进行评级并移植,移植后每日给予 60 mg 的黄体酮注射液行黄体支持。以胚胎移植后 4 周超声观察见胎心为临床妊娠,随访移植后 12 周超声,记录早期流产情况。记录每个促排卵周期全部胚胎移植后的妊娠情况,如移植后成功妊娠则为受孕周期,跟踪后续的流产情况,如移植后失败则记录为未孕周期。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析,定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;定性资料以百分比表示,比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入组的男女基本特征比较

纳入研究的 285 个周期中,各组进入周期的患者男女年龄、不育年数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。女方的月经期第 3 日促卵泡激素水平(D3FSH 值)、获卵数、移植次数以及累计移植胚胎数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。各组患者受精方式构成比对比,差异无统计学意义($P>0.05$) (表 1)。

表 1 285 对不育配偶一般资料比较

Tab 1 Comparisons of basic characteristics of 285 infertile couples

项目	TT 高 HCY 组	TT 正常 HCY 组	非 TT 高 HCY 组	非 TT 正常 HCY 组
周期数/ <i>n</i>	38	33	15	199
男方年龄/岁	32.99 ± 4.94	30.20 ± 4.72	32.64 ± 3.61	32.24 ± 4.81
女方年龄/岁	30.98 ± 3.52	30.93 ± 4.54	31.15 ± 3.37	30.24 ± 3.69
不育年数/年	3.81 ± 2.00	3.93 ± 1.79	3.58 ± 2.21	3.66 ± 2.04
女方 D3FSH/(U/L)	7.97 ± 3.12	7.94 ± 2.34	7.88 ± 1.76	7.89 ± 1.93
受精方式/ <i>n</i> (%)				
IVF	28 (73.68)	26 (78.79)	13 (86.67)	152 (76.38)
ICSI	10 (26.32)	7 (22.21)	2 (13.33)	47 (23.62)
获卵数/个	12.84 ± 7.29	15.13 ± 6.70	12.97 ± 7.28	14.03 ± 8.19
移植次数/次	1.08 ± 0.32	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.06 ± 0.24
累计移植胚胎数/个	2.05 ± 0.71	1.86 ± 0.36	1.90 ± 0.31	1.94 ± 0.54

2.2 各组精子质量参数比较

对各组之间少弱精子症的频率分布情况进行比较, 差异均没有统计学意义 ($P>0.05$) (表 2)。

表 2 各组少弱精子症频率分布比较 [n (%)]
Tab 2 Comparison of frequency distribution of oligoasthenozoospermia [n (%)]

分组	正常	少弱精子症
TT 高 HCY 组	27 (71.1)	11 (28.9)
TT 正常 HCY 组	26 (78.8)	7 (21.2)
非 TT 高 HCY 组	12 (80.0)	3 (20.0)
非 TT 正常 HCY 组	150 (75.4)	49 (24.6)

2.3 胚胎发育情况比较

各组卵裂率相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。TT 高 HCY 组和非 TT 高 HCY 组的受精率低于非 TT 正常 HCY 组 ($P<0.05$); 非 TT 高 HCY 组的优胚率明显低于非 TT 正常 HCY 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 3)。

表 3 4 组胚胎发育情况比较
Tab 3 Comparisons of embryonic development of four groups

项目	TT 高 HCY 组	TT 正常 HCY 组	非 TT 高 HCY 组	非 TT 正常 HCY 组
周期数 / n	38	33	15	199
受精率 /% (n/n)	70.61 ^① (346/490)	78.94 (315/399)	66.96 ^② (152/227)	77.29 (1 868/2 417)
卵裂率 /% (n/n)	96.82 (335/346)	96.83 (305/315)	92.76 (141/152)	96.04 (1 794/1 868)
优胚率 /% (n/n)	54.33 (182/335)	52.79 (161/305)	49.65 ^③ (70/141)	58.58 (1 051/1 794)

注: ^① $P=0.002$, ^② $P=0.001$, ^③ $P=0.038$, 与非 TT 正常 HCY 组对比。

2.4 早期妊娠结局比较

非 TT 高 HCY 组的妊娠率低于其他各组, 但差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。非 TT 正常 HCY 组的流产率最低 (8.97%), 但差异无统计学意义 (均 $P>0.05$) (表 4)。

表 4 4 组早期妊娠结局比较
Tab 4 Comparisons of early pregnancy outcome of four groups

项目	TT 高 HCY 组	TT 正常 HCY 组	非 TT 高 HCY 组	非 TT 正常 HCY 组
周期数 / n	38	33	15	199
妊娠率 /% (n/n)	42.11 (16/38)	42.42 (14/33)	26.67 (4/15)	39.20 (78/199)
流产率 /% (n/n)	12.50 (2/16)	24.43 (3/14)	25.00 (1/4)	8.97 (7/78)

3 讨论

我们的研究将 *MTHFR* 多态性和血清 HCY 浓度组合

起来, 在辅助生殖周期中, 观察这 2 个指标对 ART 结局的影响, 通过病例筛选尽可能地保证相同的促排卵、移植方案。随后我们对分组后少弱精子症分布频率情况进行观察, 发现精子质量分布不存在差异。在此基础上得出的结论提示高 HCY 血症对受精率有影响, 我们认为具有较高的可信度; 可能的原因是高 HCY 血症对精子的功能有内在的影响, 但在精子的活率和密度上没有直接反映出来。

国内外文献报道目前基本达成共识: 氧化应激对男性生育能力有重要的影响^[6]。研究发现 HCY 作为机体产生甲基的唯一前体, 参与多种需甲基化反应, 高水平的 HCY 可反映细胞内甲硫氨酸分泌、代谢紊乱程度, 产生多种氧化自由基, 对血管内皮细胞的形态、结构及功能均构成损害^[7], 最终影响精子功能。另外有研究^[8]认为 HCY 是甲硫氨酸代谢的重要中间产物, 影响谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和牛磺酸 (taurine, Tau) 的生成, 破坏精液中活性氧的动态平衡, 影响精子功能。此外, 高 HCY 血症与心脑血管疾病关系密切, 并且与病变的严重程度呈正相关^[9]; 如果引起睾丸中的动脉发生硬化, 血液供应不足会影响生精功能。MTHFR 作为 HCY 循环代谢途径的关键酶之一, 是催化 5,10- 亚甲基四氢叶酸转变成 5- 甲基四氢叶酸的关键酶。MTHFR 活性降低可限制体内 HCY 向甲硫氨酸的转化, 导致血浆 HCY 水平升高^[10]。MTHFR 叶酸代谢障碍高危的 TT 型易引发各种其他疾病 (心血管疾病、癌症、糖尿病、牛皮癣、神经系统疾病等), 发现后均需补充维生素 B12 和叶酸进行营养支持^[11]。

我们的结果中高 HCY 组 (TT 和非 TT) 的受精率低于参照组, 非 TT 高 HCY 组的优胚率明显低于参照组。推测原因可能是 *MTHFR* 多态性的检测结果为 TT 的人群, 了解到 *MTHFR* 多态性与男性特发性不育有较显著的关联^[12], 在医师的建议下都会主动地进行足量的叶酸补充。叶酸是一种抗氧化剂^[13], 当体内呈高 HCY 水平时, 通过大量摄入叶酸可以减弱高 HCY 产生的氧化应激作用, 减轻精子的 DNA 损伤, 保护生育功能。而非 TT 组的人群往往会忽略叶酸的补充。

我们得出的结果显示早期妊娠结局各组之间没有差别, 胚胎移植后会更多地受到女方因素的影响, 男方的影响被大幅削弱。不过从数值上, 参考组 (非 TT 正常 HCY) 的流产率 (8.97%) 远远低于其他有异常结果的各组。

本研究通过限定女方年龄、基础 D3FSH 值、获卵数, 尽量减少女方因素对 ART 结局的影响; 但受限于入选人数以及男性少弱精子症病例的构成比, 可能存在一定的误

差。其次,关于 *MTHFR* 的分组,将高危的 TT 单独列出,而 CT 和 CC 未再进一步细分,可能会削弱了该因素的影响力。尽管如此,我们认为进行 ART 助孕的男性人群,

不管 *MTHFR* 多态性的检测结果如何,当发现为高 HCY 血症时,需要及时足量地补充叶酸,减少高 HCY 血症对精子质量的影响,有助于提高 ART 的成功率。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] A ZC, Yang Y, Zhang SZ, et al. Single nucleotide polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene might be a genetic risk factor for infertility for Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia[J]. Asian J Androl, 2007, 9(1): 57-62.
- [2] 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.
- [3] Ren Z, Ren P, Yang B, et al. *MTHFR* C677T, A1298C and *MS* A2756G gene polymorphisms and male infertility risk in a Chinese population: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169789.
- [4] Paracchini V, Garte S, Taioli E. *MTHFR* C677T polymorphism, *GSTM1* deletion and male infertility: a possible suggestion of a gene-gene interaction?[J]. Biomarkers, 2006, 11(1): 53-60.
- [5] Wilson RD, Genetics C, Wilson RD, et al. Pre-conception folic acid and multivitamin supplementation for the primary and secondary prevention of neural tube defects and other folic acid-sensitive congenital anomalies[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2015, 37(6): 534-552.
- [6] Agarwal A, Bui AD. Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: correlation to male infertility[J]. Investig Clin Urol, 2017, 58(6): 385-399.
- [7] Beard RS Jr, Reynolds JJ, Bearden SE. Metabotropic glutamate receptor 5 mediates phosphorylation of vascular endothelial cadherin and nuclear localization of β -catenin in response to homocysteine[J]. Vascu Pharmacol, 2012, 56(3-4): 159-167.
- [8] Pexa A, Herrmann M, Taban-Shomal O, et al. Experimental hyperhomocysteinaemia: differences in tissue metabolites between homocysteine and methionine feeding in a rat model[J]. Acta Physiol (Oxf), 2009, 197(1): 27-34.
- [9] Wu YL, Hu CY, Lu SS, et al. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T/A1298C polymorphisms and essential hypertension: a systematic review and meta-analysis[J]. Metabolism, 2014, 63(12): 1503-1511.
- [10] Hou N, Chen S, Chen F, et al. Association between premature ovarian failure, polymorphisms in *MTHFR* and *MTRR* genes and serum homocysteine concentration[J]. Reprod Biomed Online, 2016, 32(4): 407-413.
- [11] Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases[J]. Eur J Med Genet, 2015, 58(1): 1-10.
- [12] Wu W, Shen Q, Qin Y, et al. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e13884.
- [13] Shiralizadeh J, Barmaki H, Haiaty S, et al. The effects of high and low doses of folic acid on oxidation of protein levels during pregnancy: a randomized double-blind clinical trial[J]. Horm Mol Biol Clin Investig, 2017, 33(3): 1868-1891.

[收稿日期] 2018-03-19

[本文编辑] 邵碧云