

论著·临床研究

普通叶酸与活性叶酸补充对于 *MTHFR* 677TT 型不明原因反复流产患者红细胞叶酸水平的影响卢永杰¹, 侯树辰², 常亮¹, 刘平¹

1. 北京大学第三医院妇产科, 生殖医学中心, 女性生育力促进全国重点实验室, 国家妇产疾病临床医学研究中心(北京大学第三医院), 辅助生殖教育部重点实验室(北京大学), 北京市生殖内分泌与辅助生殖技术重点实验室(北京大学第三医院), 北京 100191; 2. 北京中医药大学研究生院, 北京 100029

[摘要] **目的**·研究普通叶酸与活性叶酸补充对亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) 677TT型不明原因反复流产(unexplained recurrent pregnancy loss, URPL)患者红细胞叶酸水平的影响。**方法**·选取2021年1—12月于北京大学第三医院生殖医学中心就诊的*MTHFR* 677TT型URPL患者45例。按照叶酸补充方式将其分为3组, 包括A组16例(研究开始前尚未接受任何形式的叶酸补充, 研究开始后进行活性叶酸补充), B组15例(研究开始前进行过普通叶酸的补充, 研究开始后进行活性叶酸补充), 以及C组14例(研究开始前进行过普通叶酸的补充, 研究开始后进行普通叶酸与活性叶酸联合补充)。分别于入组时(第一次)、入组补充后(第二次)对3组患者的红细胞5-甲基四氢叶酸(5-methyltetrahydrofolate, 5-MTHF)浓度进行检测, 并开展比较。**结果**·在3组患者中, 任意2组的第一次红细胞5-MTHF浓度间差异均无统计学意义。与第一次红细胞5-MTHF浓度相比, 3组患者的第二次红细胞5-MTHF浓度均有提高(均 $P=0.000$), 且B组患者的红细胞5-MTHF浓度的增幅高于A组($t=2.373$, $P=0.049$), 但与C组间差异无统计学意义。**结论**·与补充普通叶酸相比, 补充活性叶酸可以更好地在短时间内提高*MTHFR* 677TT型URPL患者的红细胞叶酸水平。

[关键词] 亚甲基四氢叶酸还原酶基因; 不明原因反复流产; 5-甲基四氢叶酸

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.06.009 **[中图分类号]** R714.21 **[文献标志码]** A

Impact of folic acid and active folate supplementation on red blood cell folate levels in patients with unexplained recurrent pregnancy loss and *MTHFR* 677TT genotypeLU Yongjie¹, HOU Shuchen², CHANG Liang¹, LIU Ping¹

1. State Key Laboratory of Female Fertility Promotion, Center for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University Third Hospital; National Clinical Research Center for Obstetrics and Gynecology (Peking University Third Hospital); Key Laboratory of Assisted Reproduction (Peking University), Ministry of Education Beijing; Key Laboratory of Reproductive Endocrinology and Assisted Reproductive Technology, Beijing 100191, China; 2. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

[Abstract] **Objective**·To study the effects of folic acid and active folate supplementation on red blood cell folate levels in patients with unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) and methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677TT genotype. **Methods**·A total of 45 patients with *MTHFR* 677TT genotype and URPL in the Center for Reproductive Medicine of Peking University Third Hospital from January to December 2021 were selected. They were divided into three groups according to folic acid supplementation, including 16 cases in Group A (who had not received any form of folic acid supplementation before the study began, but received active folic acid supplementation after the study began), 15 cases in Group B (who had received ordinary folic acid supplementation before the study began, and active folic acid supplementation after the study began), and 14 cases in Group C (ordinary folic acid was supplemented before the start of the study, and after the start of the study, ordinary folic acid and active folic

[基金项目] 北京大学临床医学+X青年专项(PKU2023LCXQ039); 辅助生殖教育部重点实验室(北京大学)开放课题(BYSYSZKF2023003); 国家妇产疾病临床医学研究中心(北京大学第三医院)开放课题(BYSYSZKF2021004)。

[作者简介] 卢永杰(1988—), 男, 助理研究员, 博士; 电子信箱: luyongjieyichuan@163.com。

[通信作者] 常亮, 电子信箱: changliangchina@163.com。

[Funding Information] Clinical Medicine Plus X-Young Scholars Project of Peking University (PKU2023LCXQ039); Funding from Key Laboratory of Assisted Reproduction (Peking University), Ministry of Education (BYSYSZKF2023003); Funding from National Clinical Research Center for Obstetrics and Gynecology (Peking University Third Hospital) (BYSYSZKF2021004)。

[Corresponding Author] CHANG Liang, E-mail: changliangchina@163.com。

acid were supplemented together). The concentration of 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) in red blood cells was measured and compared at the time of enrollment (first measurement) and after supplementation (second measurement). **Results**·There was no statistically significant difference in the first measurement of 5-MTHF concentrations in red blood cells between any two groups of patients in the three groups. Compared with the first measurement of 5-MTHF concentrations in red blood cells, the second increased (all $P=0.000$); the increase in 5-MTHF concentrations in red blood cells in Group B was higher than that in Group A (all $P=0.000$); the increasing 5-MTHF concentration in Group B was higher than that in Group A ($t=2.373$, $P=0.049$), but there was no significant difference between Group B and Group C. **Conclusion**·Compared with folic acid supplementation, active folate supplementation can better improve red blood cell folate levels in patients with *MTHFR* 677TT genotype and URPL in a short period.

[Key words] methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*); unexplained recurrent pregnancy loss (URPL); 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF)

反复流产 (recurrent pregnancy loss, RPL) 是指连续发生2次或以上的自然流产^[1-3]; 其常见原因包括胚胎染色体异常以及女方生殖道解剖畸形、内分泌及代谢异常、药物毒物接触、病原体感染、自身免疫性疾病、凝血功能异常等^[4-6]。不明原因反复流产 (unexplained recurrent pregnancy loss, URPL) 是指连续发生2次及以上且无法找到明确原因的自然流产。目前URPL尚无法进行有效治疗, 会严重影响患者的身心健康, 也是现代妇产科学研究的难点及热点^[7]。

相关研究^[8-9]发现, 叶酸代谢障碍可增加URPL的风险。普通叶酸 (folic acid) 又名维生素B9、蝶酰谷氨酸, 是一种水溶性B族维生素, 在体内可被亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) 代谢为5-甲基四氢叶酸 (5-methyltetrahydrofolate, 5-MTHF)。而5-MTHF不仅可作为核酸合成的甲基供体, 还可参与同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 的代谢过程。当叶酸摄入减少或发生代谢障碍导致5-MTHF的生成减少, 则会影响核酸和蛋白质的合成, 同时也会使Hcy发生堆积形成高Hcy血症, 从而对孕妇妊娠过程产生不良影响^[10]。大量前期研究^[8-9]表明, 叶酸缺乏会导致胎儿神经管缺陷、孕妇流产等多种不良妊娠结局。有研究^[10-12]发现, *MTHFR*基因677位点的多态性会导致*MTHFR*活性降低, 影响人体对叶酸的代谢能力; 野生型的*MTHFR*基因677位点为CC, 而677TT纯合突变型患者的叶酸代谢能力仅为677CC型个体的30%, 且其叶酸代谢能力的下降可增加URPL的发生风险。对于*MTHFR*677CC型孕妇而言, 已有研究显示大剂量^[13]或长时间^[14]的普通叶酸补充可降低其流产风险。而对于*MTHFR*677TT型孕妇, 由于叶酸代谢能力下

降, 使得其补充普通叶酸的效果并不理想。同时有研究^[8]发现, 活性叶酸的主要成分为5-MTHF, 即能够不经*MTHFR*代谢直接被机体吸收和利用。为探索对*MTHFR*677TT型URPL患者更有效的叶酸补充方案, 本研究比较了普通叶酸和活性叶酸在该类患者中的补充效果。考虑到常规的血浆叶酸浓度仅能反映瞬时叶酸水平, 本研究采用更能反映体内长期叶酸储备情况的红细胞5-MTHF浓度来评估患者的叶酸水平, 以期对*MTHFR*677TT型URPL患者提供更有效的叶酸补充策略。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择2021年1—12月在北京大学第三医院生殖医学中心就诊的URPL患者。纳入标准: ①符合URPL的诊断标准, 即与同一配偶连续发生2次及以上的妊娠丢失, 且2次均发生在妊娠28周之前; 具体原因及发病机制不明确, 未发现男女任一方的染色体或基因突变 (不包括*MTHFR*基因多态性), 未发现女方生殖道解剖结构异常、患自身免疫性疾病、患内分泌疾病 (如甲状腺功能异常等)、存在病毒感染等。②*MTHFR*基因分型为677TT型。排除标准: ①叶酸补充情况不明。②研究过程中自愿退出或发生数据缺失。最终, 本研究共纳入45例URPL患者。

1.2 研究方法

1.2.1 入组后的叶酸补充方案及患者分组 根据患者在入组前的自主补充叶酸情况, 以及入组后的叶酸补充方案, 将其分为如下3组: ①A组 ($n=16$), 即

入组前未补充过叶酸,入组后补充活性叶酸 800 μg/d、持续 7~8 周。②B 组 ($n=15$),即入组前已补充了 7~8 周的普通叶酸 (400~800 μg/d),入组后改为补充活性叶酸 800 μg/d、持续 7~8 周。③C 组 ($n=14$),即入组前已补充了 7~8 周的普通叶酸 (400~800 μg/d),入组后改为普通叶酸 400~800 μg/d 及活性叶酸 400 μg/d 的联合补充、持续 7~8 周。

1.2.2 红细胞 5-MTHF 浓度的检测 分别于入组时(第一次)和入组按计划补充叶酸后(第二次),采用液相色谱-串联质谱联用 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 技术对 3 组患者的红细胞 5-MTHF 浓度进行检测^[15]。将第一次、第二次的红细胞 5-MTHF 浓度分别记为浓度 1 和浓度 2。A 组、B 组、C 组中,第二次与第一次红细胞 5-MTHF 浓度的差值分别计为 ΔA 、 ΔB 、 ΔC 。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件对所有数据进行统计分析。定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验进行 2 组间比较,并根据检验次数进行 Bonferroni 校正。本研究均为双侧检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者第一次红细胞 5-MTHF 浓度的比较分析

对患者入院时的红细胞 5-MTHF 浓度进行检测及比较,结果发现 B 组、C 组患者的第一次红细胞 5-MTHF 浓度与 A 组间差异均无统计学意义 ($t=1.370$, $P=0.544$; $t=0.834$, $P=1.000$),且 B 组、C 组患者的第一次红细胞 5-MTHF 浓度间差异亦无统计学意义 ($t=0.400$, $P=1.000$)。

2.2 患者 2 次红细胞 5-MTHF 浓度的变化及比较分析

对患者第二次的红细胞 5-MTHF 浓度进行检测,结果(表 1)发现 A 组、B 组、C 组患者的第二次红细胞 5-MTHF 浓度高于其对应的第一次浓度(均 $P=0.000$);同时,3 组的 2 次浓度的差值 ΔA 、 ΔB 、 ΔC 分别为 (202.1 ± 160.6) nmol/L、(372.3 ± 234.1) nmol/L、(621.2 ± 374.8) nmol/L,其中 A 组的增幅少于 B 组增幅 ($t=2.373$, $P=0.049$)、C 组增幅与 B 组增幅间的差异无统计学意义 ($t=2.162$, $P=0.079$)。

表 1 3 组患者 2 次红细胞 5-MTHF 浓度比较

Tab 1 Comparison of 5-MTHF concentrations in red blood cells at two time points among the three groups

Group	Concentration 1/ (nmol·L ⁻¹)	Concentration 2/ (nmol·L ⁻¹)	<i>t</i> value	<i>P</i> value
Group A	427.3±162.6	629.4±243.2	5.033	0.000
Group B	356.6±120.1	728.9±253.1	6.159	0.000
Group C	377.7±162.5	998.9±444.0	6.202	0.000

3 讨论

本研究的结果发现,B 组、C 组患者的第一次红细胞 5-MTHF 浓度与 A 组患者间差异均无统计学意义;提示对于 *MTHFR* 677TT 型 URPL 患者而言,补充普通叶酸 400~800 μg/d、持续 7~8 周并不能显著改变其体内的红细胞 5-MTHF 水平。而后,本研究对 2 次红细胞 5-MTHF 浓度进行组内分析,结果显示 A 组、B 组患者在持续 7~8 周补充了活性叶酸后,其红细胞 5-MTHF 浓度有了较明显的提升,提示补充活性叶酸可在短时间内有效提高红细胞 5-MTHF 水平,但这并不说明前期补充的普通叶酸没有效果。接着,我们对 2 次红细胞 5-MTHF 浓度的差值进行了组间比较,发现 B 组患者的浓度增幅高于 A 组,提示先补充普通叶酸 400~800 μg/d、持续 7~8 周,再继续补充活性叶酸 800 μg/d、持续 7~8 周,比仅补充活性叶酸 800 μg/d 持续 7~8 周的效果好;同时,B 组、C 组患者的增幅间差异无统计学意义,提示每天补充活性叶酸 800 μg/d、持续 7~8 周与每天联合补充普通叶酸 400~800 μg 和活性叶酸 400 μg/d、持续 7~8 周之间的效果无明显区别。

关于普通叶酸的补充效果,本研究获得了与既往研究相一致的结果。已有研究显示,正常孕妇连续补充普通叶酸 1 个月可显著提高其血浆叶酸水平,但对红细胞叶酸水平的提升效果并不明显,需连续补充 3 个月才能将红细胞叶酸水平提高至可以预防神经管缺陷的水平^[16];这提示普通叶酸并不能很好地满足快速提升红细胞叶酸水平的需求。由于 *MTHFR* 677TT 型患者的叶酸代谢能力下降了将近 70%^[17-18],且该类患者普通叶酸的补充效果相对较差,使得其更易发生叶酸缺乏和高 Hcy 血症,这可能是 *MTHFR* 677TT 型患者流产发生的重要因素^[19]。本研究针对 *MTHFR* 677TT 型 URPL 患者进行了活性叶酸补充实验,创新性地采用了单独、序贯、联合等多种补充方案;同时,由于血浆 5-MTHF 受饮食等其他因素的影



响较大,我们采用红细胞5-MTHF浓度(即受其他因素影响相对较小^[20])对叶酸补充水平进行评估,以更准确地反映叶酸补充效果。

与此同时,本研究尚存在一定的局限性:①样本量有限,后续需继续细化分组、增加红细胞叶酸检测的时间点并在更大的样本量人群中进行验证。②研究结果可能受潜在的混杂因素的影响,在后续研究中我们将控制影响叶酸吸收、代谢的其他因素,如体质量指数、其他维生素的摄入等。

综上所述,本研究发现活性叶酸的补充效果优于普通叶酸,活性叶酸与普通叶酸序贯应用具有一定的累积作用,且活性叶酸与普通叶酸联合应用的效果与单纯补充活性叶酸类似。该结果为MTHFR 677TT型URPL患者的叶酸水平的有效提升提供了一定的依据,同时也为改善其临床妊娠结局提供了新的方向,值得进一步探究。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究经北京大学第三医院医学科学研究伦理委员会的审核批准(审批号:2019-431-02)。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。All the protocols in this study were reviewed and approved by Ethics Committee of Peking University Third Hospital (Approval Letter No. 2019-431-02). Consent letters have been signed by the research participants or their relatives.

作者贡献/Authors' Contributions

卢永杰负责数据分析及论文撰写,侯树辰负责临床资料收集,常亮负责课题设计及论文撰写,刘平负责论文修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

LU Yongjie analyzed the clinical data and wrote the manuscript. HOU Shuchen collected the clinical data. CHANG Liang designed the study and wrote the manuscript. LIU Ping revised the manuscript. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-12-26
- Accepted: 2024-06-14
- Published online: 2024-06-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] GREEN D M, O'DONOGHUE K. A review of reproductive outcomes of women with two consecutive miscarriages and no living child[J]. J Obstet Gynaecol, 2019, 39(6): 816-821.
- [2] VAN DIJK M M, KOLTE A M, LIMPENS J, et al. Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis[J]. Hum Reprod Update, 2020, 26(3): 356-367.
- [3] 赵一芳,周涛. 影响育龄期妇女复发性流产的相关危险因素 logistic 回归分析[J]. 现代预防医学, 2019, 46(7): 1153-1155, 1175. ZHAO Y F, ZHOU T. Risk factors of recurrent spontaneous abortion among women of childbearing age: a logistic regression analysis[J]. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(7): 1153-1155, 1175.
- [4] CYPRIAN F, LEFKOU E, VAROUDI K, et al. Immunomodulatory effects of vitamin D in pregnancy and beyond[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2739.
- [5] DIMITRIADIS E, MENKHORST E, SAITO S, et al. Recurrent pregnancy loss[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 98.
- [6] TICCONI C, PIETROPOLLI A, SIMONE N D, et al. Endometrial immune dysfunction in recurrent pregnancy loss[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5332.
- [7] 范俊丽. 地屈孕酮+绒毛膜促性腺激素治疗不明原因习惯性流产的效果[J]. 实用中西医结合临床, 2020, 20(5): 84-85. FAN J L. The effect of dydrogesterone and human chorionic gonadotropin in the treatment of unexplained habitual miscarriage[J]. Practical Clinical Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2020, 20(5): 84-85.
- [8] LIU H Y, LIU S M, ZHANG Y Z. Maternal folic acid supplementation mediates offspring health via DNA methylation[J]. Reprod Sci, 2020, 27(4): 963-976.
- [9] KANASAKI K, KUMAGAI A. The impact of micronutrient deficiency on pregnancy complications and development origin of health and disease[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2021, 47(6): 1965-1972.
- [10] RUSHING B R, FOGLE H M, SHARMA J, et al. Exploratory metabolomics underscores the folate enzyme ALDH1L1 as a regulator of glycine and methylation reactions[J]. Molecules, 2022, 27(23): 8394.
- [11] ZARFESHAN FARD Y, KOOSHKAKI O, KORDI TAMMANDANI D, et al. Investigation of the association between C677T polymorphism of the MTHFR gene and plasma homocysteine level in recurrent fetal miscarriage[J]. J Obstet And Gynaecol, 2019, 45(8): 1442-1447.
- [12] MO H, RAO M, WANG G, et al. Polymorphism of MTHFR 1298A>C in relation to adverse pregnancy outcomes in Chinese populations[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(5): e642.
- [13] SAYYAH-MELLI M, GHORBANIAGHJO A, ALIZADEH M, et al. The effect of high dose folic acid throughout pregnancy on homocysteine (Hcy) concentration and pre-eclampsia: a randomized clinical trial[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0154400.
- [14] VAN DER LINDEN I J, AFMAN L A, HEIL S G, et al. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk[J]. Proc Nutr Soc, 2006, 65(2): 204-215.
- [15] SOWMYA S, AYYALI A, KR V, et al. Genetic variation of folate metabolic pathway in recurrent pregnancy loss: a systematic review[J]. Int J Med Rev Case Rep, 2022, 6(19): 50-53.
- [16] WANG X, THOMAS P, XUE J L, et al. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21[J]. Mutat Res, 2004, 551(1/2): 167-180.
- [17] HAO L, YANG Q H, LI Z, et al. Folate status and homocysteine response to folic acid doses and withdrawal among young Chinese women in a large-scale randomized double-blind trial[J]. Am J Clin

- Nutr, 2008, 88(2): 448-457.
- [18] CRIDER K S, ZHU J H, HAO L, et al. *MTHFR* 677C→T genotype is associated with folate and homocysteine concentrations in a large, population-based, double-blind trial of folic acid supplementation[J]. Am J Clin Nutr, 2011, 93(6): 1365-1372.
- [19] BOR M V, WULFF A M, NEXO E, et al. Infrequency of low red blood cell (RBC) folate levels despite no folate fortification program: a study based on results from routine requests for RBC folate[J]. Clin Chem Lab Med, 2008, 46(3): 401-404.
- [20] 陈朴, 潘柏申. 血清叶酸和红细胞叶酸检测的临床应用[J]. 检验医学, 2016, 31(3): 232-236.
- CHEN P, PAN B S. Clinical application of serum folate and red blood cell folate determinations[J]. Laboratory Medicine, 2016, 31(3): 232-236.
- [21] DALY L E, KIRKE P N, MOLLOY A, et al. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention[J]. JAMA, 1995, 274(21): 1698-1702.
- [22] 梅瑾, 王昊, 卢莎, 等. 活性叶酸对不良妊娠治疗效果研究[J]. 中国妇幼健康研究, 2017, 28(12): 1659-1661.
- MEI J, WANG H, LU S, et al. Treatment effect of active folate on adverse pregnancy[J]. Chinese Journal of Woman and Child Health Research, 2017, 28(12): 1659-1661.

[本文编辑] 邢宇洋

学术快讯

上海交通大学基础医学院高小玲课题组构建“类细胞基质”仿生纳米载体实现蛋白质治疗药物脑内递送

2024年5月8日,上海交通大学基础医学院药理学与化学生物学系高小玲教授在《先进材料》(*Advanced Materials*)发表题目为 *Brain delivery of protein therapeutics by cell matrix-inspired biomimetic nanocarrier* 的研究论文。

该研究模拟蛋白质天然存在环境和天然纳米载体体内转运模式,采用仿生的类细胞基质核心和重组高密度脂蛋白(reconstituted high density lipoprotein, rHDL)分别模拟细胞基质和HDL结构,构建仿生蛋白质治疗药物载体,模拟生物体内转运蛋白质的囊泡结构,实现蛋白质药物的体内长循环,并借助rHDL的靶向递送特性,实现多种不同理化性质蛋白质的脑内靶细胞递送。动物实验结果表明:载过氧化氢酶(catalase, CAT)功能蛋白的仿生纳米制剂能显著改善控制性皮质损伤模型小鼠脑内细胞病理形态、减少神经元丢失、降低胶质细胞增生,促进模型小鼠空间学习记忆能力恢复;同时该制剂也能显著减少肌萎缩侧索硬化症模型小鼠脊髓神经元丢失、改善脊髓组织病理形态、降低胶质细胞增生,改善模型小鼠运动功能并延长其生存期。