

# 腺苷脱氨酶基因多态性与反复自然流产的相关性

孙丽芳, 郑秀丽, 陈光雪, 王新宓, 刘静芳

北京积水潭医院妇产科, 北京 100035

**摘要:** **目的** 探讨腺苷脱氨酶(ADA)基因多态性与反复自然流产(RSA)的相关性。**方法** 随机选取 2016 年 1 月至 2018 年 1 月北京积水潭医院医院收治的孕妇 300 例,其中 RSA 患者 120 例作为试验组,无 RSA 患者 180 例作为对照组,收集患者临床资料,采集患者静脉血,以聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 ADA G22A 基因多态性。**结果** 试验组和对照组 ADA 基因型和等位基因的频率无统计学差异( $P > 0.05$ )。并存糖尿病、高血压、多囊卵巢综合征、子宫畸形、抗磷脂抗体阳性、子宫内膜异位症的 RSA 孕妇 120 例中 ADA 基因型频率分布无统计学差异( $P > 0.05$ )。在年龄  $\leq 35$  岁者中,两组 ADA 基因型和等位基因的频率分布无统计学差异( $P > 0.05$ )。在年龄  $> 35$  岁者中,两组 ADA 基因型频率分布有统计学差异( $P = 0.005$ ),GG 基因型相对于 GA 基因型 RSA 的危险度( $OR = 0.113, 95\% CI = 0.022 \sim 0.585$ );两组等位基因频率分布有统计学差异( $P = 0.001$ ),G 等位基因相对于 A 等位基因的 RSA 危险度( $OR = 9.774, 95\% CI = 2.051 \sim 46.574$ )。**结论** 年龄超过 35 岁的高龄孕妇中,ADA 基因多态性与 RSA 的发生密切相关,对高龄孕妇是否会发生流产具有一定的预判价值。

**关键词:** 腺苷脱氨酶; 基因多态性; 反复自然流产; 年龄

中图分类号: R 714.21 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2020)08-1080-04

## Relationship between adenosine deaminase gene polymorphism and recurrent spontaneous abortion

SUN Li-fang, ZHENG Xiu-li, CHEN Guang-xue, WANG Xin-mi, LIU Jing-fang

Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Corresponding author: ZHENG Xiu-li, E-mail: zhengxiuli@163.com

**Abstract: Objective** To explore the relationship between adenosine deaminase(ADA) gene polymorphism and recurrent spontaneous abortion(RSA). **Methods** A total of 300 patients admitted to Beijing Jishuitan Hospital from January 2016 to January 2018 were randomly selected, including 120 RSA patients as experimental group and 180 non-RSA patients as control group. After collecting the patients's venous blood, ADA G22A gene polymorphism was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** There were no significant differences in genotype and allele frequencies of ADA between two groups ( $P > 0.05$ ); and also no significant differences found in frequency distribution of ADA genotype of pregnant women complicated with diabetes mellitus, hypertension, polycystic ovary syndrome, uterine malformation, positive anti-phospholipid antibody and endometriosis in experimental group ( $P > 0.05$ ). There was no significant difference in genotype and allele frequency distribution of ADA in the patients aged less than 35 years between two groups ( $P > 0.05$ ), but statistical differences were observed in them for the patients aged more than 35 years between two groups ( $P = 0.005$ ). Compared with GA genotype, GG genotype significantly increased the risk for RSA ( $OR = 0.113, 95\% CI = 0.022 - 0.585$ ). There was a statistical difference in allele frequency distribution between two groups ( $P = 0.001$ ). Compared with A allele, G allele showed a statistically increased risk for RSA ( $OR = 9.774, 95\% CI = 2.051 - 46.574$ ). **Conclusions** The polymorphism of ADA gene is closely related to the occurrence of RSA in the pregnant women over 35 years old, which has a certain predictive value for the possibility of abortion in older pregnant women.

**Key words:** Adenosine deaminase; Gene polymorphism; Recurrent spontaneous abortion; Age

**Fund program:** Wu Jieping Medical Foundation-Special Project on Genetics and Eugenics Fund (320.6750.17022)

妊娠不足 28 周、胎儿体重不足 1 000 g 而终止妊娠者称流产。复发性自然流产(RSA)是指连续两次或两次以上的流产。腺苷脱氨酶(ADA)能通过催化腺苷和脱氧腺苷的脱氨基作用,影响甲基化过程、细胞生长和分化、细胞凋亡、DNA 复制和免疫功能<sup>[1-3]</sup>。ADA 是嘌呤代谢的关键酶,通过不可逆地将腺苷脱氨基为肌苷来调节细胞外和细胞内的腺苷浓度<sup>[4]</sup>。ADA 可通过改变腺苷的浓度调节卵母细胞的成熟,ADA 活性对维持正常妊娠至关重要<sup>[5]</sup>。正常孕妇血清 ADA 活性较非妊娠妇女降低<sup>[6]</sup>。ADA 由位于染色体 20q13.11 上的多态性 ADA 基因编码<sup>[7]</sup>。ADA 基因最常见的单核苷酸多态性之一是外显子 1 中的单核苷酸多态性 G22A,ADA 第 8 位的天冬酰胺氨基酸 ADA 1(G)等位基因被天冬氨酸 ADA 2(A)等位基因替换,这种氨基酸取代降低了 ADA 的催化活性<sup>[8]</sup>。由于 ADA 活性可能受到基因多态性的影响,因此 ADA 基因中的单核苷酸多态性可能影响相关疾病的易感性。本研究探讨 ADA G22A 基因多态性对 RSA 的影响。

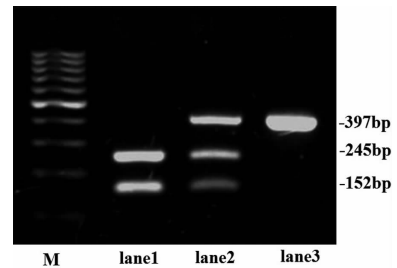
## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 随机选取 2016 年 1 月至 2018 年 1 月本院建档的孕妇 300 例,年龄 22~39(28.1±4.1)岁。孕妇中 RSA 患者 120 例作为试验组,无 RSA 患者 180 例作为对照组。对照组患者年龄 22~39(28.4±4.9)岁,其中≤35 岁 154 例,>35 岁 26 例;试验组年龄 23~33(27.2±3.0)岁,其中≤35 岁 82 例,>35 岁 38 例。两组患者年龄比较无统计学差异( $P>0.05$ )。本研究得到本院伦理委员会批准。所有患者均签署了知情同意书,对实验内容了解。

**1.2 方法** 所有参与的患者均完成了一份流行病学调查问卷,从中收集患者并存症情况(包含糖尿病、高血压、多囊卵巢综合征、子宫畸形、抗磷脂抗体和子宫内位症等)。全面的临床检查,包括体重、身高,并计算体质指数(BMI)。测定患者空腹血糖、胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和促卵泡激素等。

采集患者外周血,EDTA 抗凝,硅胶吸附法提取血液样本中的 DNA。DNA 样品 A260/280 吸光度在 1.8~2.0 质量合格。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 ADA G22A 基因多态性。设计 PCR 引物:5'-GCC CGG CCG TTA AGA GAC G-3' 和 5'-GGT CAA GGG AGC AGA-3'<sup>[9]</sup>。25 μl PCR 反应体系:5 μl DNA,12.5 预混酶,上下游引物各 1 μl,5.5 μl ddH<sub>2</sub>O。反应条件:94 °C 变性

15 min,94 °C 40 s,66 °C 80 s,36 个循环,72 °C 延伸 8 min。回收 PCR 产物,65 °C 限制性内切酶 TaqI,酶切 20 min。2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,成像拍照。ADA G/G 基因型具有 245 bp 和 152 bp 条带,ADA G/A 基因型具有 245 bp 和 152 bp、397 bp 条带。见图 1。



注:M 为 DNA ladder;lane 1 为 ADA G/G;lane 2 为 ADA G/A;lane 3 为 PCR 产物。

图 1 酶切产物琼脂糖凝胶电泳

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据。计数资料采用 $\chi^2$  检验。人群代表性采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律进行检验。采用 95% 置信区间(CI)的 OR 进行风险评估。Fisher 精确检验用于检测 ADA 基因型和等位基因分布的差异。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 有和无 RSA 史的妇女中 ADA 基因型和等位基因的频率比较** 试验组和对照组 ADA 基因型和等位基因的频率分布无统计学差异( $P>0.05$ )。见表 1。

**2.2 是否高龄的有和无 RSA 妇女 ADA 基因型和等位基因的频率比较** 以年龄>35 岁定义为高龄产妇,300 例产妇中,年龄≤35 岁者 236 例,年龄>35 岁者 64 例。在年龄≤35 岁者中,试验组和对照组 ADA 基因型和等位基因的频率分布无统计学差异( $P>0.05$ )。见表 2。在年龄>35 岁者中,试验组和对照组 ADA 基因型频率分布具有统计学差异( $P=0.005$ ),GG 基因型相对于 GA 基因型 RSA 的危险度( $OR=0.113,95\% CI=0.022\sim 0.585$ ),试验组和对照组等位基因频率分布有统计学差异( $P=0.001$ ),G 等位基因相对于 A 等位基因 RSA 的危险度( $OR=9.774,95\% CI=2.051\sim 46.574$ )。见表 3。

**2.3 有不同并存症的 RSA 妇女 ADA 基因型差异比较** 合并糖尿病、高血压、多囊卵巢综合征、子宫畸形、抗磷脂抗体阳性、子宫内位症等的 RSA 孕妇为 120 例,其中基因型 GG 为 110 例,基因型 GA 为 10 例;其各种并存症者的基因型 GG 和基因型 GA 分布无统计学差异( $P$  均>0.05)。见表 4。

表 1 有和无 RSA 妇女中 ADA 基因型和等位基因的频率比较 [例(%)]

项目	试验组 (n=120)	对照组 (n=180)	OR 值	95% CI	P 值
基因型					
GG	110(91.7)	162(90.0)	1.178	0.537~2.587	0.844
GA	10(8.3)	18(10.0)			
等位基因					
G	230(95.8)	342(95.0)	1.238	0.579~2.647	0.705
A	10(4.2)	18(5.0)			

表 2 年龄≤35 岁的有和无 RSA 妇女 ADA 基因型和等位基因的频率比较 [例(%)]

项目	试验组 (n=82)	对照组 (n=154)	OR 值	95% CI	P 值
基因型					
GG	73(89.0)	145(94.1)	0.521	0.199~1.367	0.240
GA	9(11.0)	9(5.9)			
等位基因					
G	155(94.5)	299(97.1)	0.535	0.209~1.375	0.213
A	9(5.5)	9(2.9)			

表 3 年龄>35 岁的有和无 RSA 妇女 ADA 基因型和等位基因的频率比较 [例(%)]

项目	试验组 (n=38)	对照组 (n=26)	OR 值	95% CI	P 值
基因型					
GG	37(97.4)	17(65.4)	0.113	0.022~0.585	0.005
GA	1(2.6)	9(34.6)			
等位基因					
G	75(98.7)	43(82.7)	9.774	2.051~46.574	0.001
A	1(2.3)	9(17.3)			

表 4 RSA 孕妇不同并存症 ADA 基因型差异比较 [例(%)]

并存症	基因型 GG (n=110)	基因型 GA (n=10)	P 值
糖尿病	3(2.7)	1(10.0)	0.303
高血压	16(14.5)	1(10.0)	1.000
多囊卵巢综合征	18(16.4)	0	0.361
子宫畸形	6(5.5)	0	1.000
抗磷脂抗体阳性	9(8.2)	1(10.0)	1.000
子宫内膜异位症	14(12.7)	3(30.0)	0.160

### 3 讨论

流产有多种不同类型,其中包括早期、晚期、自然、医疗性流产和先兆流产等<sup>[10]</sup>。本研究考察和分析了本地区人群中 ADA G22A 基因多态性与 RSA 的关系。研究结果显示,试验组和对照组 ADA G22A 基因型和等位基因频率无统计学差异,然而,35 岁及以上 ADA 2(A) 等位基因孕妇具有更低的 RSA 风险,表明 ADA 2(A) 等位基因在 RSA 中具有一个年龄依赖性的保护价值。

本研究结果与 Nunes 等<sup>[11]</sup>的研究结果一致,ADA G22A 基因型和等位基因频率在 RSA 孕妇和非 RSA 孕妇中无统计学差异。Nicotra 等<sup>[12]</sup>在研究中发

现 RSA 孕妇的 ADA 2(A) 等位基因频率低于非 RSA 孕妇,表明 ADA 2(A) 等位基因对于 RSA 具有保护作用,且该作用和年龄无关。Nunes 等<sup>[11]</sup>在控制产妇年龄后,比较了 RSA 孕妇和非 RSA 孕妇 ADA 基因型和等位基因,结果显示 35 岁或 35 岁以下人群中 ADA 2(A) 等位基因频率无统计学差异,而 35 岁以上女性的 ADA 2(A) 等位基因频率与 RSA 低风险之间存在相关性。与纯合子 ADA1/ADA1(GG) 基因型相比,ADA 2(A) 等位基因可使 ADA 酶的表达水平降低至 15%~20%,腺苷水平增加,ADA 2(A) 等位基因携带者具有更高水平细胞内腺苷<sup>[13]</sup>。Chen 等<sup>[14]</sup>发现 ADA G22A 基因多态性可导致 ADA 酶活性下降 30%,进而引起腺苷浓度增高。子宫和胎盘中存在腺苷可降低受精卵和胎儿的早期丢失率,这可能是因为是腺苷是一种有效的血管扩张剂,可调节血流、神经传递和血小板聚集。Bahadir 等<sup>[15]</sup>报道 ADA 活性和腺苷水平的改变可用于高危妊娠的临床诊断和观察,携带至少一个 ADA 2(A) 等位基因的患者,ADA 酶表达降低,腺苷水平增加,患 RSA 的风险降低。ADA 在男性生殖中也扮演了重要作用,如通过降低腺苷浓度来调节腺苷酸环化酶的活性,有助于前列腺素与精子的相互作用<sup>[16-17]</sup>。Fattahi 等<sup>[18]</sup>研究比较正常和不育男性中 ADA G22A 基因多态性,不育男性中 GG 基因型频率更高。

综上所述,高龄孕妇中(>35 岁),ADA 基因多态性与 RSA 的发生密切相关,对高龄孕妇是否会发生流产具有一定的预判价值。但是本研究中纳入样本有限,大样本、多区域的研究有助于获得更为客观的研究结果。此外对于 ADA 活性对于妊娠的影响有待进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Garcia-Gil M, Tozzi MG, Balestri F, et al. Mitochondrial damage and apoptosis induced by adenosine deaminase inhibition and deoxyadenosine in human neuroblastoma cell lines[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2016, 117(7):1671-1679.
- [2] Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, et al. Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors[J]. Med Res Rev, 2015, 21(2):105-128.
- [3] Garciagil M, Tozzi MG, Varani S, et al. The combination of adenosine deaminase inhibition and deoxyadenosine induces apoptosis in a human astrocytoma cell line[J]. Neurochem Int, 2015, 80:14-22.
- [4] Sauer AV, Hernandez RJ, Fumagalli F, et al. Alterations in the brain adenosine metabolism cause behavioral and neurological impairment in ADA-deficient mice and patients[J]. Sci Rep, 2017, 7:40136.
- [5] Taylor DM, Ray PF, Ao A, et al. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detecta-

- ble in the human preimplantation embryo at the three-to four-cell stage[J]. *Mol Rep Develop*, 2015, 48(4):442-448.
- [6] Giorgi VS, Witkin SS, Bannwart-Castro CF, et al. Elevated circulating adenosine deaminase activity in women with preeclampsia: association with pro-inflammatory cytokine production and uric acid levels [J]. *Pregnancy Hypertension*, 2016, 6(4):400-411.
- [7] Baldissera MD, Bottari NB, Mendes RE, et al. Activity of cholinesterases, pyruvate kinase and adenosine deaminase in rats experimentally infected by *Fasciola hepatica*; influences of these enzymes on inflammatory response and pathological findings [J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(11):871-876.
- [8] He HR, Li YJ, He GH, et al. The adenosine deaminase gene polymorphism is associated with chronic heart failure risk in Chinese [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9):15259-15271.
- [9] Amoli MM, Amiri P, Namakchian M, et al. Adenosine deaminase gene polymorphism is associated with obesity in Iranian population [J]. *Obes Res Clin Pract*, 2007, 1(3):173-177.
- [10] 刘念, 阎炯, 宋婕萍, 等. 染色体多态性与复发性流产的关系研究[J]. *实用妇产科杂志*, 2015, 31(1):75-77.
- [11] Nunes DP, Spegiolin LC, Mattos CC, et al. The ADA 2 allele of the adenosine deaminase gene (20q13.11) and recurrent spontaneous abortions: an age-dependent association [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011, 66:1929-1933.
- [12] Nicotra M, Bottini N, La Torre M, et al. Repeated spontaneous abortion. Cooperative effects of ADA and ACP1 genetic polymorphisms [J]. *Am J Rep Immunol*, 2007, 58:1-10.
- [13] Napolioni V, Lucarini N. Gender-specific association of ADA genetic polymorphism with human longevity [J]. *Biogerontol*, 2010, 11:457-462.
- [14] Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets-what are the challenges? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12:265-286.
- [15] Bahadir G, Doventa Y, Turkal R, et al. Serum adenosine deaminase and its isoenzyme activities in pregnancy [J]. *Turk Ger Gynecol Assoc*, 2011, 12:209-213.
- [16] Nicotra M, Bottini N, Grasso M, et al. Adenosine deaminase and human reproduction: a comparative study of fertile women and women with recurrent spontaneous abortion [J]. *Am J Rep Immunol*, 2011, 39(4):266-270.
- [17] Feroze-Zaidi F, Fusi L, Takano M, et al. Role and regulation of the serum-and glucocorticoid-regulated kinase 1 in fertile and infertile human endometrium [J]. *Endocrinol*, 2007, 148(10):5020-5029.
- [18] Fattahi A, Khodadadi I, Amiri I, et al. The role of G22 A adenosine deaminase 1 gene polymorphism and the activities of ADA isoenzymes in fertile and infertile men [J]. *Urology*, 2015, 86:730-734.

收稿日期:2019-10-30 修回日期:2019-11-08 编辑:石嘉莹

(上接第 1079 页)

- [12] Xu RT, Chang QX, Wang QQ, et al. Association between hypertensive disorders of pregnancy and risk of autism in offspring: a systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1):1291-1301.
- [13] 徐智立, 肖磊, 冯敏清, 等. 妊娠期高血压综合征患者产后动脉血管功能的变化 [J]. *中国临床研究*, 2018, 31(2):176-179.
- [14] 刘颖菊, 阮和云, 许丽湖, 等. COOK 子宫颈扩张球囊在晚期妊娠孕妇促宫颈成熟中的应用价值 [J]. *医学临床研究*, 2018, 35(4):661-663.
- [15] 邓丽娟, 柴丽芬. 地诺前列酮与缩宫素促宫颈成熟及引产的效果比较 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2017, 39(2):235-237.
- [16] 邓翠平, 丁昭宁. 对足月产妇实施缩宫素、球囊合并引产的促宫颈成熟有效率观察 [J]. *重庆医学*, 2019, 48(5):883-885.
- [17] 吴雯君, 丁秀丽. COOK 宫颈扩张球囊和地诺前列酮栓对妊娠期高血压疾病孕妇引产效果分析 [J]. *中国生化药物杂志*, 2017, 37(6):358-360.
- [18] 王文慧, 郝榆霞, 张凤格, 等. 地诺前列酮常规放置时间与缩短放置时间用于促宫颈成熟引产临床效果比较 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(4):390-394.
- [19] 郁玲珏, 于淼淼. 一次性宫颈球囊扩张器在足月妊娠促宫颈成熟及引产中的临床应用价值 [J]. *中国性科学*, 2017, 26(4):128-131.
- [20] 胡丽文, 于慧, 张程程, 等. 足月妊娠高血压孕妇应用 cook 球囊和米索前列醇的分娩情况与母儿结局 [J]. *中华全科医学*, 2019, 17(9):1533-1535, 1542.
- [21] 王小兰, 范玲, 周莉, 等. 一次性子宫颈扩张器 Lamiken-R 与地诺前列酮用于足月妊娠促宫颈成熟的临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(21):2503-2506.

收稿日期:2019-12-29 编辑:王娜娜