

FMR1 基因 CGG 重复数目在有不良孕产史育龄妇女中的分布

石娟, 张勇, 于文亮, 代晶, 潘长青, 王亮, 王凤玲, 王丹

四川省绵阳市中心医院妇产科, 四川 绵阳 621000

摘要: **目的** 探讨脆性 X 染色体智力缺陷 1 (FMR1) 基因胞嘧啶 - 鸟嘌呤 - 鸟嘌呤 (CGG) 重复数目在有不良孕产史育龄妇女中的分布。**方法** 随机选取 2018 年 8 月至 2019 年 11 月就诊于绵阳市中心医院产前门诊的 521 例孕妇作为研究对象, 根据研究对象是否有异常生育史分为两组。其中 261 例有不良孕产史 (研究组), 260 例无不良孕产史 (对照组)。对每位研究对象抽取 2 ml 静脉血并提取 DNA, 通过荧光 PCR 技术和毛细管电泳技术进行检测, 统计并分析 FMR1 基因 CGG 重复序列。**结果** 在接受检测的 521 例孕妇中, 共检测出 35 种不同的 CGG 重复数目, CGG 重复数目的变异范围为 20 ~ 200。521 例中, 最常见的 CGG 重复数目是 31 (170 例, 占 32.63%); 其次为 28 (145 例, 占 27.83%); 第三位常见的 CGG 重复数目是 35 (78 例, 占 14.97%); 此外, CGG 重复数目 < 28 的有 20 例 (3.84%), CGG 重复数目是 29、30、32、33、34 的共有 78 例 (14.97%), CGG 重复数目 > 35 的有 30 例 (5.76%)。研究组有 4 例前突变和 3 例灰区, 对照组未见前突变及灰区, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。研究组中有 3 例样本 CGG 重复数目 > 100。本研究中发现, FMR1 基因异常均为突变杂合型。**结论** 有不良孕产史的妇女发生 FMR1 基因前突变携带的风险较高, 对该人群进行 FMR1 基因筛查, 一定程度上可从基因角度为其提供更好的生育咨询。

关键词: 不良孕产史; 脆性 X 染色体智力缺陷 1 基因; 胞嘧啶 - 鸟嘌呤 - 鸟嘌呤重复数目; 前突变; 灰区

中图分类号: R714.2 R596 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 8182 (2021) 01 - 0048 - 04

Distribution of CGG repeat number of FMR1 gene in women of childbearing age with history of adverse pregnancy

SHI Juan, ZHANG Yong, YU Wen-liang, DAI Jing, PAN Chang-qing, WANG Liang, WANG Feng-ling, WANG Dan

Department of Gynecology and Obstetrics, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China

Corresponding author: WANG Dan, E-mail: 7582862@qq.com

Abstract: Objective To investigate the distribution of the number of cytosine-guanine-guanine (CGG) repeats located in fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene in women of child-bearing age with adverse pregnancy and childbirth history.

Methods A total of 521 pregnant women admitted to Mianyang Central Hospital from August 2018 to November 2019 were randomly selected and divided into study group (with history of adverse pregnancy and childbirth, $n = 261$) and control group (without history of adverse pregnancy and childbirth, $n = 260$). After drawing venous blood (2 ml) and extracting DNA in each subject, CGG repeats in FMR1 gene were detected by fluorescence polymerase chain reaction (PCR) and capillary electrophoresis. **Results** There were 35 different CGG repeat number with variation range between 20 - 200 in 521 cases. The most common CGG repeat number was 31 (32.63%, 170 cases), and the others respectively were 28 (27.83%, 145 cases), 35 (14.97%, 78 cases), less than 28 (3.84%, 20 cases), 29, 30, 32, 33, 34 (14.97%, 78 cases in total) and more than 35 (5.76%, 30 cases). There were 4 cases of premutation and 3 cases of grey-zone in study group, while there were 0 case of premutation and 0 case of grey-zone in control group, with significant differences in them between two groups ($P < 0.05$). In study group, CGG repeats number was more than 100 in 3 cases. In this research, all abnormalities of FMR1 gene presented with heterozygous mutations. **Conclusion** The risk of premutation carrying of FMR1

gene is higher in women with adverse pregnancy and childbirth history, in whom the screening of FMR1 gene can provide better reproductive counseling for them from the perspective of gene expression.

Keywords: Adverse pregnancy and childbirth history; Fragile X mental retardation 1 gene; Cytosine/Guanine/Guanine repeat number; Premutation; Gray-zone

Fund program: Sichuan Medical Research Project (S15046); Clinical Research Special Fund Project of Wu Jieping Medical Foundation (320.6750.18255)

不良孕产史是指具有2次及2次以上自然流产,且发生胎儿生长受限、早产、胎停育、死胎、死产、生育畸形和智力低下等的生育异常^[1]。研究表明,不良孕产史与内分泌异常、解剖畸形、免疫、染色体核型和感染等因素有关,但目前仍有30%~50%的不孕或不良孕产史的病因尚未明确。

脆性X综合征(fragile X syndrome, FXS)所导致的遗传性智力低下的发病率仅次于唐氏综合征,是X连锁不完全显性遗传病。FXS是由位于脆性X染色体智力缺陷1基因(fragile X mental retardation 1, FMR1)的5'UTR的三核苷酸胞嘧啶-鸟嘌呤-鸟嘌呤(CGG)重复序列在Xq27.3处异常扩增引起FMR1蛋白(fragile X mental retardation 1 protein, FMRP)合成减少而导致^[2]。正常人CGG重复数目范围为6~44,灰区(gray-zone)为45~54,前突变(premutation)携带者为55~199,>200即为全突变(full mutation)^[3]。前突变携带者存在4种主要的临床表现^[4]:(1)早期神经发育问题,包括神经发育迟缓、儿童癫痫、社会行为缺陷如注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)、孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)等;(2)脆性X相关的原发性卵巢功能不全(fragile X-associated primary ovarian insufficiency, FXPOI);(3)成年期易患抑郁症和强迫症等精神问题;(4)脆性X相关的震颤/共济失调综合征(fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, FXTAS)。流行病学调查显示,13%~26%的前突变携带者会发生卵巢早衰,因此FMR1基因前突变是发生卵巢早衰的危险因素^[5]。

卵巢早衰、卵巢储备功能下降等卵巢功能紊乱可导致不良孕产史^[6]。据报道,携带 ≥ 100 个CGG的女性后代中约有100%的全突变遗传风险^[7]。并且约21%女性易发生FXPOI,这种疾病会导致不育和更年期提前^[8]。说明FMR1基因CGG重复数目可能与不良孕产史有关,但目前临床对两者相关性的研究较少。本研究通过探讨FMR1基因CGG重复数目在有不良孕产史育龄妇女中的分布,客观的分析FMR1基因CGG重复数目与不良孕产史之间的联系,以期

为临床提供可参考的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取2018年8月至2019年11月就诊于绵阳市中心医院产前门诊的521例孕妇作为研究对象,年龄18~46岁。根据研究对象是否有异常孕产史分为两组。研究组包括261例具有不良孕产史(2次及以上自然流产史,2次及以上稽留流产史,有早产史、胎停育史、死胎史、死产史,有生育严重出生缺陷患儿史,出生28d内新生儿死亡史)的孕妇;对照组包括260例没有任何内外科合并症及自身免疫性疾病,无不良孕产史的孕妇。排除标准:(1)不良孕史;(2)内外科合并症和腹腔手术史;(3)患有自身免疫性疾病;(4)患有内分泌疾病的孕妇。全部受检者于采样前均签署了知情同意书。本研究已经由医院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

1.2.1 全血基因组DNA提取 每位孕妇取2ml静脉血,使用RelaxGene Blood DNA System血液基因组DNA提取试剂盒(天良,上海),按照试剂盒说明提取基因组DNA。

1.2.2 聚合酶链式反应(PCR)扩增 使用AmplideX试剂盒(Asuragen,美国),其中PCR体系包括高GC扩增缓冲液、高GC聚合酶溶液、FAM标记的FMR1引物(引物序列见表1)。解冻除了高GC聚合酶试剂以外所有所需试剂并进行涡旋,按照说明书要求剂量添加后进行离心、涡旋混匀。向96孔PCR检测板内加入2 μ l的20 ng/ μ l DNA模板,充分混匀、密封,再次涡旋、离心。然后使用ABI 7500扩增仪进行PCR扩增。扩增条件为:98 $^{\circ}$ C热变形5 min,25个循环(97 $^{\circ}$ C 35 s,62 $^{\circ}$ C 35 s,72 $^{\circ}$ C 4 min),72 $^{\circ}$ C延伸10 min。将PCR产物避光保存(-30 $^{\circ}$ C~-15 $^{\circ}$ C)。

表1 FMR1引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
FMR1-F	TGAGGCCGTGACCTCGCTTAGCCTTTGA
FMR1-R	ATGCCGATAGGACGGCGACTTGC
FMR1-CGG	ACGCTGTAGTCTGTCCGCACTGC-GGCGGGCGCCGCC

1.2.3 毛细管电泳 使用 ABI 的 3730XL 毛细管电泳仪和 Genemapper 4.0 分析软件 (3730XL Genetic Analyzers, Life Technology, 日本) 对扩增产物进行分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 27.0 软件对正常人群与患者之间的 CGG 重复数目分布差异进行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGG 重复序列分布情况 据检测结果统计,在接受检测的 521 例孕妇中,共检测出 35 种不同的 CGG 重复数目,CGG 重复数目的变异范围为 20 ~ 200。其中最常见的是 31 (170 例,占 32.63%);其次为 28 (145 例,占 27.83%);第三位常见的 CGG 重复数目是 35 (78 例,14.97%);此外 CGG 重复数目 > 28 的有 20 例 (3.84%),CGG 重复数目是 29、30、32、33、34 的共有 78 例 (14.97%),CGG 重复数目 > 35 的有 30 例 (5.76%)。各 CGG 重复数目分布见图 1。

2.2 不良孕产史人群前突变及灰区分布情况 据检测结果统计,研究组有 4 例前突变和 3 例灰区,对照组未见前突变及灰区,两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。研究组有 3 例 CGG 重复数目 > 100 的样本,两组前突变核型的具体 CGG 重复数见表 3。

2.3 FMR1 基因型分布 根据两个等位基因 (CGG) 重复数目的不同, FMR1 基因可分为 3 种基因型:

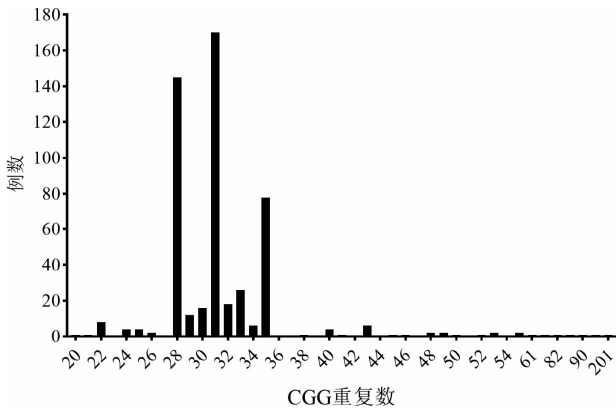


图 1 CGG 重复数目分布情况

表 2 不同人群的前突变和灰区分布情况 [例(%)]

组别	例数	前突变	灰区	正常
研究组	261	4 (1.53)	3 (1.15)	254 (97.32)
对照组	260	0	0	260 (100.00)
χ^2 值			7.068	
P 值			0.029	

表 3 研究人群前突变核型的 CGG 重复数目

组别	前突变例数	具体 CGG 重复数
研究组	4	70,106,133,138
对照组	0	0

(1)两个等位基因重复数目均在正常范围内的“野生型”;(2)两个等位基因重复数目中一个等位基因在正常范围,而另外一个等位基因重复数目超出正常范围的“突变杂合型”(简称杂交型);(3)两个等位基因均超出正常范围的则称为“突变纯合型”(简称纯合型)。在本研究中, FMR1 基因异常均为突变杂合型。

3 讨论

不良孕产史是卵巢储备功能低下的一种表现^[9]。卵巢储备功能又称卵巢储备,是指卵巢产生卵子数量和质量的潜能,间接反映卵巢的功能。卵巢储备功能是影响卵巢反应众多因素中最重要的因素,它与妇女生育能力和妊娠结局具有密切的联系。卵巢内存留的卵泡质量和数量下降意味着妇女的卵巢储备能力下降^[10-11]。目前相关研究表明,卵巢储备能力下降与 FMR1 基因具有密切的联系,CGG 序列的重复数目对卵巢功能损伤程度有重要预测意义,但两者并非呈线性相关。临床数据统计发现,在 CGG 重复数目为 80 ~ 100 时,原发性卵巢功能不全的发生率最高,发生年龄最小,同时绝经年龄也最低;而 59 ~ 79 和 100 ~ 199 时卵巢受损相对缓慢^[12]。2012 年, Hoffman 等^[13]首次在小鼠前突变模型 ($n = 130$) 中详细描述卵巢的功能,证实前突变并不影响卵巢的发育,但影响卵泡的成熟和颗粒细胞的数量;此外,在卵巢组织中检测到 FMR1 的 mRNA 过表达,然而 FMR1 蛋白却减少,推测 FXPOI 的形成可能与过量表达的 mRNA 有关。FMR1 相关蛋白水平下降、FMR1 mRNA 水平上升,会导致出生前卵泡池的卵泡数量下降的细胞毒性^[14-15]。在卵巢早衰的动物模型研究中发现,前突变对后期卵泡的成熟和凋亡起到一定的作用,因此在一定程度上, FMR1 基因可作为除抗苗勒管激素、卵泡刺激素和抑制素基因外预测卵巢储备功能的指标之一。

本次纳入研究的 521 例患者中,共检测出 35 种不同的 CGG 重复数目,CGG 重复数目的变异范围为 20 ~ 200。其中最常见的是 31 (170 例,占 32.63%);其次为 28 (145 例,占 27.83%);第三位常见的 CGG 重复数目是 35 (78 例,14.97%);此外,CGG 重复数目 < 28 的有 20 例 (3.84%),CGG 重

复数目是 29、30、32、33、34 的共有 78 例 (14.97%)，CGG 重复数目 >35 的有 30 例 (5.76%)。可见本研究的 CGG 重复数目表现为双峰现象，与亚洲正常人群的 CGG 分布状况基本相同 (CGG 重复数 34~36)，国外研究不同地区、不同种族的正常人群 CGG 重复序列最大峰值为 29、30^[16-17]。本研究结果还显示，研究组有 4 例前突变和 3 例灰区，对照组未见前突变及灰区，在不良孕产史人群中 FMR1 基因异常发生率明显高于正常人群，说明 FMR1 基因在不良孕产史人群中的筛查具有重要意义。

综上所述，本研究通过测定有不良孕产史的妇女与正常人群 FMR1 基因的分布情况显示，有不良孕产史妇女发生 FMR1 基因前突变携带的风险较高，对该人群进行 FMR1 基因筛查，一定程度上可从基因角度为其提供更好的生育咨询。

参考文献

- [1] Dean DD, Agarwal S, Kapoor D, et al. Molecular characterization of FMR1 gene by TP-PCR in women of reproductive age and women with premature ovarian insufficiency [J]. *Mol Diagn Ther*, 2018, 22 (1): 91 - 100.
- [2] Bagni C, Tassone F, Neri G, et al. Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122 (12): 4314 - 4322.
- [3] Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ, et al. Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee [J]. *Genet Med*, 2011, 3 (3): 200 - 205.
- [4] Tassone F, Hagerman PJ, Hagerman RJ. Fragile X premutation [J]. *J Neurodev Disord*, 2014, 6 (1): 22.
- [5] Bouali N, Hmida D, Mougou S, et al. Analysis of FMR1 gene premutation and X chromosome cytogenetic abnormalities in 100 Tunisian patients presenting premature ovarian failure [J]. *Ann D'endocrinologie*, 2015, 76 (6): 671 - 678.
- [6] Pastore LM, Young SL, Manichaikul A, et al. Distribution of the FMR1 gene in females by race/ethnicity: women with diminished ovarian reserve versus women with normal fertility (SWAN study) [J]. *Fertil Steril*, 2017, 107 (1): 205 - 211. e1.
- [7] Nolin SL, Brown TW, Glicksman A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles [J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72 (2): 454 - 464.
- [8] Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome [J]. *Am J Med Genet*, 2000, 97 (3): 189 - 194.
- [9] Zhou Y, Tang K, Law HY, et al. FMR1 CGG repeat patterns and flanking haplotypes in three Asian populations and their relationship with repeat instability [J]. *Ann Hum Genet*, 2006, 70 (pt 6): 784 - 796.
- [10] 张雄. FMR1 基因突变在中国大陆 PD 人群中的研究与分析 [D]. 福州: 福建医科大学, 2012.
- [11] Ma Y, Wei X, Pan H, et al. The prevalence of CGG repeat expansion mutation in FMR1 gene in the northern Chinese women of reproductive age [J]. *BMC Med Genet*, 2019, 20 (1): 81.
- [12] Tejada MI, García-Alegría E, Bilbao A, et al. Analysis of the molecular parameters that could predict the risk of manifesting premature ovarian failure in female premutation carriers of fragile X syndrome [J]. *Menopause*, 2008, 15 (5): 945 - 949.
- [13] Hoffman GE, Le WW, Entezam A, et al. Ovarian abnormalities in a mouse model of fragile X primary ovarian insufficiency [J]. *J Histochem Cytochem*, 2012, 60 (6): 439 - 456.
- [14] Gustin SL, Ding VY, Desai M, et al. Evidence of an age-related correlation of ovarian reserve and FMR1 repeat number among women with "normal" CGG repeat status [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32 (11): 1669 - 1676.
- [15] Voorhuis M, Onland-Moret NC, Fauser BC, et al. The association of CGG repeats in the FMR1 gene and timing of natural menopause [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28 (2): 496 - 501.
- [16] Voorhuis M, Onland-Moret NC, et al. The association of CGG repeats in the FMR1 gene and timing of natural menopause [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28 (2): 496 - 501.
- [17] Wang YC, Li C, et al. Molecular diagnosis of fragile X syndrome and distribution of CGG repeats in the FMR-1 gene in Taiwanese [J]. *Formos Med Assoc*, 2000, 99 (5): 402 - 407.

收稿日期: 2020 - 04 - 07 修回日期: 2020 - 06 - 04 编辑: 王海琴