

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:49 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.027.html>

## ANXA5 单核苷酸多态性 rs2306413 在中国汉族人群中不明原因性复发性流产的相关性研究

刘云云, 向卉芬, 曹云霞

**摘要** 目的 探讨膜联蛋白 A5 (ANXA5) 基因内含子 2 单核苷酸多态性 (SNP) 位点 rs2306413 与中国汉族人群不明原因性复发性流产 (URSA) 之间的关系。方法 采用病例-对照研究的方法, 对 213 例 URSA 患者和 170 例健康对照者 ANXA5 基因内含子 2 区域的 SNP 位点 rs2306413 进行等位基因频率和基因型分布分析。数据检验方法采用 Pearson  $\chi^2$  检验。结果 rs2306413 的等位基因在病例组和对照组中的分布差异有统计学意义 ( $P=0.006$ ); rs2306413 在病例组和

对照组中的基因型分布差异有统计学意义 ( $P=0.005$ ); 携带 GG 纯合基因型的患者患 URSA 的风险增加 ( $OR=3.039$ ,  $95\% CI: 1.499 \sim 6.159$ )。结论 ANXA5 的单核苷酸多态性 rs2306413 可能是中国汉族人群中 URSA 发生的一个危险因素。

**关键词** 不明原因性复发性流产; 膜联蛋白 A5; 单核苷酸多态性; 关联分析

中图分类号 R 714.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1517-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.027

2016-07-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81370691); 安徽医科大学国家创新研究群体科学基金获得者培育计划(编号: GJXQT-1403)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心, 安徽医科大学生殖与遗传研究所, 安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心, 合肥 230022

作者简介: 刘云云, 女, 硕士研究生;

曹云霞, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: caoyunxia6@126.com

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 一般被定义为: 与同一配偶连续发生的 2 次或 2 次以上的自然流产<sup>[1]</sup>。RSA 是临床上比较常见的妊娠并发症, 发生率大约为全部妊娠女性的 1% ~ 5%<sup>[2]</sup>。其病因复杂多样, 目前已知的病因包括染色体异常、生殖道解剖异常、内分泌和免疫因素、感

## Correlation analysis of anisometropia and stereopsis

Lin Huimin, Chen Yao, Feng Lixia

(Dept of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the correlation between degree of anisometropia and stereoacuity and influencing factors of stereoacuity. **Methods** 59 cases of anisometropia were collected and were divided into group of hyperopia (10 cases) and group of myopia (49 cases) on the basis of refraction state and were divided into group of wearing glasses (33 cases) and group without glasses (26 cases) on the basis of wearing glasses ordinarily or not. Stereoacuity was measured by the Titmus stereotests, Randot stereotest and Frisby stereotest with patients wearing glasses. The aim was analyzing whether there was any association between the degree of anisometropia and stereoacuity and whether there was a statistically significant difference between the block. **Results** Correlation analysis of anisometropia and stereoacuity showed that there was a significant correlation between them ( $P < 0.05$ ). There were statistical significance between the differences of the effects on stereoacuity by hyperopic anisometropia and myopic anisometropia ( $F = 3.250$ ,  $P = 0.029$ ). Hyperopic anisometropia had a greater impact on stereoacuity than myopic anisometropia ( $F = 11.586$ ,  $P = 0.001$ ). And there was no statistical significance between the effects on stereoacuity by patients wearing glasses ordinarily or not. **Conclusion** A correlation exists between the degree of anisometropia and stereoacuity and stereopsis deteriorates as anisometropia increases. Hyperopic anisometropia has a greater damage on stereoacuity than myopic anisometropia.

**Key words** anisometropia; stereopsis; stereoacuity; hyperopia; myopia

染因素等。流行病学研究<sup>[3]</sup>显示,约有近半数的 RSA 患者,即便对上述已知的病因进行全面、仔细的排查后,仍不能确定其发病原因。这部分患者则被称为不明原因性复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)。RSA 有较高的发病率,而临床上目前尚没有统一有效的治疗方法,给育龄期妇女的身心及其家庭带来了极大的打击。因此,对于 RSA 进行病因学研究,以便有的放矢地制定统一、有效的诊疗方法显得尤为重要。膜联蛋白 A5(annexin A5, ANXA5)是膜联蛋白(annexin, ANX)家族中少数具有抗凝活性的一员,其功能多样,研究<sup>[4]</sup>显示其与细胞凋亡、凝血过程、骨骼的生长发育以及部分肿瘤如宫颈癌和子宫内膜癌的发生相关。国外有不少相关文献<sup>[5-7]</sup>对膜联蛋白 A5 基因(ANXA5)单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)及相关单体型与 RSA 之间的关系进行了探讨。研究<sup>[8]</sup>显示 ANXA5 抗体在 RSA 患者中的水平下降。然而国内目前对于 ANXA5 的研究大多停留在分子水平,鲜有关于 ANXA5 基因多态性的研究。该研究试图从基因水平探讨 ANXA5 基因内含子 2 SNP 与中国汉族人群 URSA 的关系,为认识和了解 URSA 提供新的科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取 2013 年 1 月~2014 年 6 月于安徽医科大学第一附属医院生殖中心就诊的 213 例 URSA 患者和 170 例有活产史、无流产史的对照者分别纳入病例组和对照组。对于 URSA 患者的诊断严格按照以下标准:①同一对夫妇连续发生 2 次或者 2 次以上的自然流产;②夫妻双方染色体核型均正常;③超声检查无子宫、生殖道解剖异常;④血清学检查已排除内分泌因素(糖尿病、甲状腺功能亢进、高泌乳素血症)、免疫因素(抗心磷脂抗体、抗核抗体、抗淋巴细胞毒试验)、凝血异常(血栓性疾病或者血栓形成倾向)、感染(Torch 病毒系列)等因素引起的复发性流产。对照者的入组标准为:有至少 1 次正常分娩史;无自然流产病史;夫妻双方染色体核型均正常。本实验严格遵守《赫尔辛基宣言》及其修正案的相关伦理条例,并顺利通过安徽医科大学伦理审查委员会的伦理审查。所有纳入本实验的患者在详细知情后签署知情同意书。

**1.2 标本采集及储存** 每位被纳入本研究的患者均由实验人员采集 5 ml 的静脉血于 5 ml EDTA 抗凝真空管中,并储存在  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱作为实验

标本来源。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 提取基因组 DNA** 使用 QIAamp DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司),按照试剂盒内所提供的说明书从全血标本中提取基因组 DNA。

**1.3.2 设计引物** 从 UCSC 数据库(<http://genome.ucsc.edu/>)中下载人 ANXA5 基因内含子 1 区域 5'端附近包含 rs2306413 在内的 1 000 bp 的碱基序列,利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物。并参照引物设计的基本原则,从软件生成的引物中挑选出最合适的一对(上游引物:5'-GAT-GATTTTGTCTCGCC-3';下游引物:5'-ATGTGAG-GCGAACGCA-3')送至北京三博远志生物有限公司进行合成。

**1.3.3 目的片段扩增** 采用 25  $\mu\text{l}$  PCR 体系对目的片段进行扩增。PCR 参数设置如下:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,然后 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,52.3  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 30 s,循环 35 次,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延长 8 min。取 2  $\mu\text{l}$  PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶-溴化乙锭染色法电泳。

**1.3.4 测序** 通过紫外线凝胶成像分析仪观测记录 PCR 产物电泳结果,将显带清晰且位置正确的 PCR 产物送至北京六合华大基因公司测序。

**1.4 统计学处理** 采用 STATA 16.0 软件进行分析,对对照组样本基因型分布频率进行 Hardy-Weinberg 平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)检验,若  $P > 0.05$  提示样本代表性好。对病例组和对照组样本 rs2306413 位点的等位基因频率和基因型频率进行  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

**2.1 临床资料分析** 病例组 URSA 患者的平均年龄为( $28.66 \pm 4.27$ )岁,平均流产次数( $2.48 \pm 0.59$ )次。对照组平均年龄为( $31.23 \pm 4.19$ )岁,平均流产次数 0 次。

**2.2 HWE 检验** 经 STATA 软件计算出对照组样本中的基因型分布 HWE 检验  $P = 0.142$ 。 $P > 0.05$  提示对照组 rs2306413 位点的基因型分布均符合人群正常遗传规律,样本代表性好。

**2.3 等位基因频率和基因型频率的关联分析** rs2306413 的等位基因分布在病例组和对照组中差异有统计学意义( $P = 0.006$ ),且 G 等位基因为危险等位基因[比值比(odds ratio, OR) = 1.526, 95% 置信区间(confidence interval, CI): 1.127 ~ 2.066]。

rs2306413 的基因型在病例组和对照组中的分布差异有统计学意义 ( $P = 0.005$ )。见表 1。隐性模型下, rs2306413 的基因型在病例组和对照组中的分布差异有统计学意义 ( $P = 0.001$ ), 含 GG 纯合基因型的妇女患 URSA 的风险显著升高 ( $OR = 3.039$ , 95%  $CI: 1.499 \sim 6.159$ )。而显性模型下, rs2306413 的基因型在病例组和对照组中差异无统计学意义。见表 2。

表 1 rs2306413 等位基因和基因型在病例组和对照组中的分布 ( $n$ )

rs2306413	病例组 ( $n = 213$ )	对照组 ( $n = 170$ )	$\chi^2$ 值	$P$ 值	OR 值 (95% $CI$ )
等位基因					
A	259	239	7.496	0.006	1.526
G	167	101			(1.127 ~ 2.066)
基因型					
AA	83	80	10.584	0.005	
AG	93	79			-
GG	37	11			

表 2 不同遗传模式下 rs2306413 基因型在病例组和对照组中的分布 ( $n$ )

rs2306413	病例组 ( $n = 213$ )	对照组 ( $n = 170$ )	$\chi^2$ 值	$P$ 值	OR 值 (95% $CI$ )
显性模型					
GG + AG	130	90	2.532	0.112	1.392
AA	83	80			(0.926 ~ 2.094)
隐性模型					
GG	37	11	10.248	0.001	3.039
AA + AG	176	159			(1.499 ~ 6.159)

### 3 讨论

妊娠期间母体血容量增加, 血液中凝血因子和纤溶酶原数量改变, 凝血系统和抗凝系统达到新的平衡, 使得血液呈高凝状态, 称为妊娠期生理性高凝状态。而当血液中的凝血系统和抗凝系统失衡, 则很容易导致血栓形成倾向。对于血栓形成倾向或者遗传性易栓症与 RSA 之间的关系已经有很多人都进行了探讨<sup>[9-12]</sup>。ANXA5 作为膜联蛋白家族中数量最多、分布最广的一类, 广泛存在于滋养细胞、单核细胞、巨噬细胞、毛细血管内皮细胞等多种组织中。其结构呈凹凸两面的圆盘状, 凸面上有可以和钙离子以及磷脂结合的位点, 其功能多种多样, 与细胞凋亡、凝血过程、骨骼的生长发育、钙离子通道作用等多种生理过程以及部分肿瘤如宫颈癌和子宫内膜癌的发生相关<sup>[4]</sup>。本研究最关注的是 ANXA5 的

抗凝作用。

不论是内源性凝血途径还是外源性凝血途径, 凝血因子复合物的形成必须要依赖磷脂, 尤其是磷脂中的磷脂酰丝氨酸的存在。妊娠时胎盘滋养细胞和血管内皮细胞大量表达 ANXA5<sup>[13]</sup>, 在钙离子存在的情况下, ANXA5 与胎盘绒毛膜表面的磷脂结合, 在细胞膜表面排列成二维的晶体结构, 形成一道保护屏障, 使凝血因子接触不到磷脂, 凝血因子复合物形成受阻, 从而起到抗凝、维持正常妊娠的作用。一旦 ANXA5 在细胞膜表面形成的这种保护性屏障遭到破坏, 或者由于抗磷脂抗体的拮抗使得细胞膜表面 ANXA5 数量减少, 就有可能引起早期的流产<sup>[14-15]</sup>。研究<sup>[16]</sup>显示, RSA 患者的血浆 ANXA5 水平较对照组降低, 也从侧面证实了这一理论。此外, ANXA5 还可以与被激活的血小板表面的磷脂结合, 通过抑制血小板的活性, 而起到抗凝作用。

近年来不少国外学者都对 ANXA5 基因的 SNP 及其基因型和 RSA 之间的关系进行了探讨。Miyamura et al<sup>[5]</sup> 研究发现, ANXA5 基因启动子区的 rs1050606 位点在 RSA 患者中的次要等位基因频率明显高于对照组 ( $P = 0.002$ )。Hayashi et al<sup>[17]</sup> 在一项病例对照研究中发现, rs1050606 位点的等位基因频率在 RSA 患者和对照组中差异有统计学意义; 且首次运用该多态性位点来评估 RSA 患者的妊娠结局。而国内目前对于 ANXA5 的研究多在分子水平, 鲜有关于 ANXA5 基因多态性的研究。ANXA5 基因位于染色体 4q27, 共包含 13 个外显子和 12 个内含子。由于外显子的突变可以直接改变基因的转录和翻译过程, 影响氨基酸的合成和蛋白质的功能, 因此一直以来对外显子的研究比较多, 涉及内含子的功能研究相对较少。然而内含子序列占人类基因组的绝大部分, 其也可通过影响 mRNA 剪切和增强基因表达等方式对疾病的发生发展产生重要的影响。因此, 对内含子上基因遗传多态性的研究也具有重要意义。本实验通过对 ANXA5 基因内含子 2 上的多态性位点 rs2306413 和 URSA 之间的关系进行关联分析, 结果显示 rs2306413 位点的等位基因和基因型分布在病例组和对照组中差异均有统计学意义。隐性遗传模式下, rs2306413 位点 GG 纯合基因型增加 URSA 的患病风险。这些都提示 ANXA5 基因上的多态性位点 rs2306413 和 URSA 相关, 且 G 等位基因是 URSA 的危险基因。

综上所述, URSA 是一个多因素影响的复杂性疾病。虽然本实验证实 rs2306413 位点和中国汉族

人群的 URSA 发生相关,然而其对 ANXA5 基因转录和翻译过程的调控机制以及可能引起 URSA 的发病机制目前尚不清楚。今后应扩大样本量并加大研究深度,从 SNP 的功能验证和调控机制等方面继续研究该位点与 URSA 之间的关系,为完善 URSA 的病因研究和寻找治疗方法提供新思路。

### 参考文献

- [1] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion[J]. *Fertil Steril* 2013, 99(1): 63.
- [2] Lin Q D, Qiu L H. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of recurrent spontaneous abortion with immune type[J]. *Front Med*, 2010, 4(3): 275-9.
- [3] Ford H B, Schust D J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy[J]. *Rev Obstet Gynecol* 2009, 2(2): 76-83.
- [4] 王小杰,李欣,武彦秋等.膜联蛋白 A5 的结构与功能研究进展[J]. *承德医学院学报*, 2010, 27(4): 413-5.
- [5] Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, et al. Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss[J]. *Mol Hum Reprod* 2011, 17(7): 447-52.
- [6] Tiscia G, Colaizzo D, Chinni E, et al. Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications[J]. *Thromb Haemost* 2009, 102(2): 309-13.
- [7] Tüttelmann F, Ivanov P, Dietzel C, et al. Further insights into the role of the annexin A5 M2 haplotype as recurrent pregnancy loss factor, assessing timing of miscarriage and partner risk[J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(5): 1321-5.
- [8] 杨 婷. 抗膜联蛋白 V 抗体与反复自然流产的关系探讨[D]. 中南大学 2007.
- [9] Pauer H U, Burfeind P, Köstering H, et al. Factor XII deficiency is strongly associated with primary recurrent abortions[J]. *Fertil Steril* 2003, 80(3): 590-4.
- [10] Bogdanova N, Markoff A. Hereditary thrombophilic risk factors for recurrent pregnancy loss[J]. *J Community Genet*, 2010, 1(1): 47-53.
- [11] Rey E, Kahn S R, David M, et al. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis[J]. *Lancet* 2003, 361(9361): 901-8.
- [12] Motha M B, Palihawadana T S, Perry D J. Recurrent pregnancy loss and thrombophilia[J]. *Ceylon Med J* 2014, 59(1): 1-3.
- [13] Krikun G, Lockwood C J, Wu X X, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and *in vitro* regulation[J]. *Placenta*, 1994, 15(6): 601-12.
- [14] Rand J H, Wu X X, Guller S, et al. Reduction of annexin-V (placental anticoagulant protein-I) on placental villi of women with antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 171(6): 1566-72.
- [15] Rand J H, Wu X X, Andree H A, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome—a possible thrombogenic mechanism[J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(3): 154-60.
- [16] Rand J H, Arslan A A, Wu X X, et al. Reduction of circulating annexin A5 levels and resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with recurrent spontaneous pregnancy losses[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 194(194): 182-8.
- [17] Hayashi Y, Sasaki H, Suzuki S, et al. Genotyping analyses for polymorphisms of ANXA5 gene in patients with recurrent pregnancy loss[J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(4): 1018-24.

## SNP in the intron 2 of ANXA5 gene may be a risk factor for URSA in the Han Chinese population

Liu Yunyun, Xiang Huifen, Cao Yunxia

(*Reproductive Medicine Center, Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Institute of Reproductive Genetics, Anhui Medical University, Anhui Provincial Engineering Technology Research Center for Biopreservation and Artificial Organs, Hefei 230022*)

**Abstract Objective** To investigate the association between SNP rs2306413 and URSA in the Han Chinese population. **Methods** A total of 213 Han Chinese women with URSA and 170 fertile healthy controls were recruited in this case-control study. Allele frequency and genotype distribution of URSA patients and controls were determined. The Pearson chi-square test was used for analysis. **Results** rs2306413 showed a significant association with URSA cases compared with the controls ( $P=0.006$ ). Genotype distribution of rs2306413 in the case group and the control group was statistically different ( $P=0.005$ ). The GG genotype increased the risk for URSA ( $OR=3.039$ , 95%  $CI: 1.499\sim 6.159$ ). **Conclusion** rs2306413 may be a risk factor for URSA in the Han Chinese population. **Key words** URSA; ANXA5; SNP; association study