

# PROS1 基因多态性与包头地区汉族人群复发性流产的关联性

赵萍萍<sup>1,2</sup>, 吴 涤<sup>3</sup>, 李得春<sup>2</sup>, 王艳国<sup>4</sup>(内蒙古科技大学包头医学院<sup>1</sup> 研究生院、<sup>3</sup> 基础医学与法医学院、<sup>4</sup> 护理学院, 包头 014040;<sup>2</sup> 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院检验科, 包头 014010)

**摘要** 目的 探究 PROS1 基因单核苷酸多态性(SNP)与包头地区汉族人群复发性流产(RSA)发生风险之间的相关性。方法 选取 RSA 患者及对照人群各 158 例作为研究对象,测定蛋白 S、蛋白 C、抗凝血酶-Ⅲ活性;使用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术对 PROS1 基因 rs13062355、rs6441600 和 rs12634349 位点进行基因分型。采用非条件性 Logistic 回归分析 PROS1 基因三种 SNP 与 RSA 发生风险的相关性。结果 RSA 患者的蛋白 S、抗凝血酶-Ⅲ活性下降( $P < 0.05$ );PROS1 SNP rs13062355 在显性模型下与 RSA 发病风险相关;与携带 TT 基因型患者比较,携带 CT + CC 基因型的患者 RSA 发病风险下降( $OR = 0.398, 95\% CI: 0.249 \sim 0.638$ )。SNP rs6441600、rs12634349 与 RSA 的发病风险无关联。在 PROS1 rs13062355、rs6441600、rs12634349 构建的单体型中,单体型 C-C-C 在两组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );三阶交互模型 rs13062355-rs6441600-rs12634349 与 RSA 发病风险相关。结论 PROS1 SNP rs13062355 可能与包头地区汉族女性 RSA 患病风险相关;PROS1 rs13062355、rs6441600、rs12634349 的单体型 C-C-C 降低了 RSA 发病风险;三阶模型 rs13062355-rs6441600-rs12634349 的交互作用在 RSA 的发生中具有协同效应。

**关键词** 蛋白 S;PROS1;单核苷酸多态性;复发性流产;PCR-RFLP;关联研究

**中图分类号** R 714.21

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0240-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.008

近年来,复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)的患病率逐渐攀升,已然成为女性生殖健康领域中不可忽视的重大难题之一。根据我国最新专家共识<sup>[1]</sup>,RSA 是指同一配偶连续经历 2 次及以上 28 周前的妊娠丢失。RSA 发病原因涉及很多因素,研究<sup>[2-3]</sup>表明,血栓前状态(prethrombotic state, PTS)及其导致的长期血栓栓塞与 RSA 发病存在显著关联。遗传性 PTS 是指凝血、抗凝以及纤溶系统等相关基因缺陷而容易发生异常血栓形成的遗传性疾病。

在我国汉族人群中,抗凝蛋白缺陷是最常见的遗传性 PTS 类型<sup>[4]</sup>,其诊断和治疗需要监测蛋白 S (protein S, PS)、蛋白 C (protein C, PC)、抗凝血酶-Ⅲ (antithrombin-Ⅲ, AT-Ⅲ) 活性。其中 PS 是由

PROS1 基因编码的维生素 K 依赖性丝氨酸蛋白酶原,作为活化 PC 的辅助因子在抗凝-纤溶途径中发挥重要调节作用。研究<sup>[2]</sup>表明,PS 活性下降及缺乏是患者发生 RSA 的一个风险因素。PROS1 基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)可能与血栓形成密切相关<sup>[5]</sup>。因此,该研究首次探究包头地区 PROS1 基因多态性与 RSA 发病风险的关系,为 RSA 的诊疗提供新方向。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 参考相关研究<sup>[6]</sup>及预实验基因型频率结果,以  $\alpha = 0.05$ ,使用 PASS15.0 计算样本量,检验效能 80%,最终按照纳入排除标准,共收集了 2019 年 10 月—2023 年 4 月在包头医学院第一附属医院就诊的 158 例 RSA 患者为 RSA 组,158 例健康妇女为对照组,研究对象均为汉族人群。RSA 组纳入标准:① 妊娠 28 周前连续发生 2 次及以上自然流产的患者,并符合 RSA 的诊断标准<sup>[1]</sup>;② 通过妇科彩超与宫腔镜检查排除生殖系统畸形;③ 排除其他不良妊娠结局。RSA 组排除标准:① 双方染色体异常;② 肝肾疾病及甲状腺功能异常、黄体功能不全等内分泌功能异常;③ 血栓性疾病及抗磷脂综

2024-09-26 接收

基金项目:内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(编号:202201429);包头医学院青年科技人才发展计划(编号:BYJJ-QNGG 2022044)

作者简介:赵萍萍,女,硕士研究生;

李得春,女,主任技师,硕士生导师,通信作者,E-mail:lidechun2009@126.com;

王艳国,男,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:wangyanguo7975@163.com

合征等自身免疫性疾病;④患者配偶精液常规异常。对照组均无流产史、血栓史且至少成功分娩一次。本研究经包头医学院第一附属医院医学伦理委员会审批同意,批准编号:2024 伦理审查第 L013、L014 号。

## 1.2 方法

**1.2.1 样本采集及 PTS 筛查指标活性检测** 记录每位患者的研究资料即个人基本信息,空腹抽取 RSA 组和对照组所有研究对象 2 ml EDTA 抗凝血用于 DNA 提取,标记后置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存;采集 3 ml 枸橼酸钠抗凝血检测血浆 AT-III、PC、PS 活性,所用设备为 ACLTOP 750 型全自动凝血仪。试剂说明书参考值:AT-III 活性为 80.0% ~ 120.0%,PC 活性为 70.0% ~ 140.0%,PS 活性为 63.5% ~ 149.0%。

**1.2.2 PROS1 基因 SNP 的选择、纳入** 根据 PROS1 相关 SNPs 的研究报道<sup>[5,7]</sup>,结合美国国家生物技术信息中心 SNP 数据库 (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) 确认位置信息,共纳入可能与此疾病相关的 rs13062355 (T/C)、rs6441600 (C/G)、rs12634349 (C/T) 三个标签 SNP (tagSNP) 作为本研究的多态性位点,在中国汉族人群中最小等位基因频率均  $>5\%$ 。

**1.2.3 血液基因组 DNA 提取、检测** 应用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 提取研究对象外周血基因组 DNA,所获标本使用 Nanodrop one/onec 分光光度计 (赛默飞世尔科技中国有限公司) 进行浓度、纯度检测,260 nm 和 280 nm 波长下吸光度比值在 1.8 ~ 2.0 范围内的样本符合纯度要求,剔除不符合的样本。

**1.2.4 基因分型** 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术对外周血 DNA 进行基因分型。PROS1 各位点引物序列及 PCR 产物长度如表 1 所示,引物均由 primer premier 5 软件设计,由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。PCR 反应采用 25  $\mu\text{l}$  体系,包含 DNA 模板 2  $\mu\text{l}$ ,上、下游引物各 1  $\mu\text{l}$  (5  $\mu\text{mol/L}$ ),12.5  $\mu\text{l}$

2  $\times$  Taq PCR mix,8.5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O。PROS1 rs13062355 位点 PCR 条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,66  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。PROS1 rs6441600、rs12634349 位点 PCR 条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,64  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增情况。RFLP 反应采取 10  $\mu\text{l}$  体系:1  $\mu\text{l}$  10  $\times$  NE buffer,3  $\mu\text{l}$  PCR 纯化产物、0.5  $\mu\text{l}$  限制性内切酶、5.5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O。酶切产物通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行基因型分型。各 SNP 位点引物与限制性内切酶均为首次使用,为验证 RFLP 结果准确性,随机选取不同基因型结果的标本进行 Sanger 测序。各限制性内切酶、酶切反应条件及产物片段详见表 2。

表 1 PROS1 基因各 SNP 引物序列及 PCR 产物长度

Tab. 1 Primer sequences and PCR product size for each SNP of PROS1 gene

| SNP        | Primer sequence (5'-3')                                     | PCR product size (bp) |
|------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------|
| rs13062355 | F:AGAGAGGAAGGAAGGAGC<br>R:TGGGAAGTGTCTTCCGGCA               | 315                   |
| rs6441600  | F:TACCCTCACTTTGTGATCCAGAGATTC<br>R:TAGTGTGCTATTTGAAGGTTTGGG | 279                   |
| rs12634349 | F:AAGCCACAAAGCCCCATC<br>R:AGTGTCTTGCCACCCCT                 | 394                   |

**1.3 统计学处理** 相关数据录入 SPSS 27.0 软件进行分析处理,年龄、抗凝蛋白活性服从正态分布,用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用独立样本  $t$  检验分析其在对照组和 RSA 组中的分布有无差异。应用拟合优度  $\chi^2$  检验分析对照组 PROS1 基因 SNP rs13062355、rs6441600 和 rs12634349 位点基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡。采用非条件性 Logistic 回归方法计算 OR 值及 95% CI 来评估在共显性、显性、隐性、超显性 4 种模型下 PROS1 基因与 RSA 发病风险的相关性;同时计算赤池信息准则 (akaike information criterion, AIC) 以及贝叶斯信息准则 (bayesian information criteria, BIC) 用来评价不同遗传模型拟合优良性,二者值最小的模型被认为是最

表 2 PROS1 基因各 SNP 的酶切条件及酶切产物片段

Tab. 2 Restriction conditions and restriction product fragments of each SNP in PROS1 gene

| SNP        | Restriction enzyme | Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Time (min) | Fragment of product (bp)         |
|------------|--------------------|------------------------------------|------------|----------------------------------|
| rs13062355 | BsmI               | 65                                 | 40         | TT;315;CC;211,104;CT;315,211,104 |
| rs6441600  | HpyCH4IV           | 37                                 | 60         | CC;279;GG;224,55;GC;279,224,55   |
| rs12634349 | SfcI               | 37                                 | 60         | CC;394;TT;274,120;CT;394,274,120 |

佳模型。使用 SHEsis 软件进行连锁不平衡和单体型构建并分析结果;采用广义多因子降维方法分析 SNP-SNP 的交互作用是否为 RSA 发病风险因素。对于不同遗传模型下基因型分布频率、单体型结果分析均采用 Bonferroni 多重比较校正。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 RSA 组与对照组年龄比较** 年龄符合正态分布,对照组孕妇年龄为 $(30.58 \pm 2.89)$ 岁,RSA 组孕妇年龄为 $(30.48 \pm 3.12)$ 岁,两组比较差异无统计学意义( $t = 0.299, P > 0.05$ )。

**2.2 RSA 组与对照组 PC、PS、AT-III 活性的比较** RSA 组 PS、AT-III 活性均低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两组间 PC 活性比较差异无统计学意义,见表 3。

表 3 RSA 组与对照组 PC、PS、AT-III 活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Comparison of PC, PS and AT-III activity between RSA group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group          | Number of cases | PC                | PS                | AT-III            |
|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| RSA            | 158             | 90.91 $\pm$ 17.10 | 71.89 $\pm$ 18.98 | 92.21 $\pm$ 12.83 |
| Control        | 158             | 93.59 $\pm$ 16.27 | 80.19 $\pm$ 17.55 | 95.56 $\pm$ 11.37 |
| <i>t</i> value |                 | 1.426             | 4.037             | 2.460             |
| <i>P</i> value |                 | 0.155             | <0.001            | 0.014             |

**2.3 PROS1 基因各 SNP 的 PCR 结果** 使用相应引物对所有样本基因组 DNA 进行 PCR 反应,PROS1 基因 SNP rs13062355、rs6441600、rs12634349 的 PCR 产物长度分别为 315、279、394 bp,见图 1。

**2.4 PROS1 基因各 SNP 的 PCR-RFLP、Sanger 测序结果** PROS1 基因 SNP rs13062355、rs6441600、

rs12634349 分别经内切酶 BsmI、HpyCH4IV、SfcI 酶切后,呈现电泳结果见图 2。将研究对象酶切结果与 Sanger 测序结果进行基因型比对,结果一致,SNP rs13062355、rs6441600 为反向测序,SNP rs12634349 为正向测序,测序峰图见图 3。

**2.5 不同遗传模型下 PROS1 基因 SNP 与 RSA 发病风险的关系** 在对照组中,PROS1 基因 3 个多态性位点基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡(rs13062355: $\chi^2 = 1.924, P = 0.382$ ;rs6441600: $\chi^2 = 0.076, P = 0.963$ ;rs12634349: $\chi^2 = 0.053, P = 0.974$ )。

在所检测样本中,SNP rs13062355 位点在共显性、显性、超显性模型下结果与 RSA 发病风险相关。经 Bonferroni 校正后,SNP rs13062355 位点显性、超显性及共显性模型中 TT/CT 分布频率与 RSA 仍有关联性,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中显性遗传模型 AIC 和 BIC 的值最小,是最佳模型。携带 CT + CC 基因型的患者比携带 TT 基因型的患者 RSA 发病风险低( $OR = 0.398, 95\% CI: 0.249 \sim 0.638$ );两组间 PROS1 基因 SNP rs6441600、rs12634349 在不同遗传模型下的基因型分布差异无统计学意义,与 RSA 发病风险不相关,见表 4。

**2.6 PROS1 基因单体型与 RSA 发病风险的关系**

对 PROS1 基因三个 SNP 进行连锁不平衡分析,rs13062355 与 rs6441600( $LOD = 4.41, r^2 = 0.062$ )、rs13062355 与 rs12634349( $LOD = 5.27, r^2 = 0.087$ )、rs6441600 与 rs12634349( $LOD = 1.16, r^2 = 0.018$ )之间连锁程度低,均未构成单体型块。然而,对 rs13062355、rs6441600、rs12634349 三个位点进行单体型构建并分析各单体型与 RSA 发病风险的相关性,结果显示在 8 种单体型中,C-C-C 单体型为保护

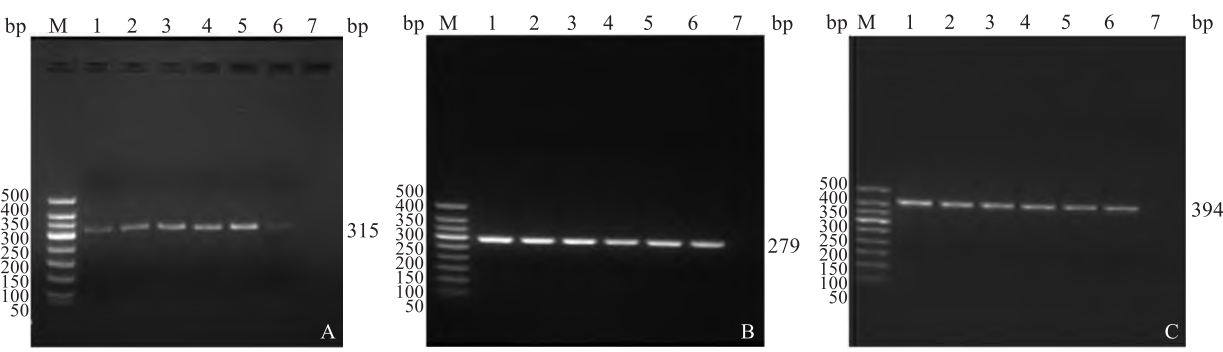


图 1 PROS1 基因 SNP rs13062355、rs6441600、rs12634349 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PROS1 gene SNP rs13062355, rs6441600 and rs12634349 PCR products

M: 50 bp ladder; A1-6: PCR product of SNP rs13062355; B1-6: PCR product of SNP rs6441600; C1-6: PCR product of SNP rs12634349; A7, B7, and C7: Negative controls.

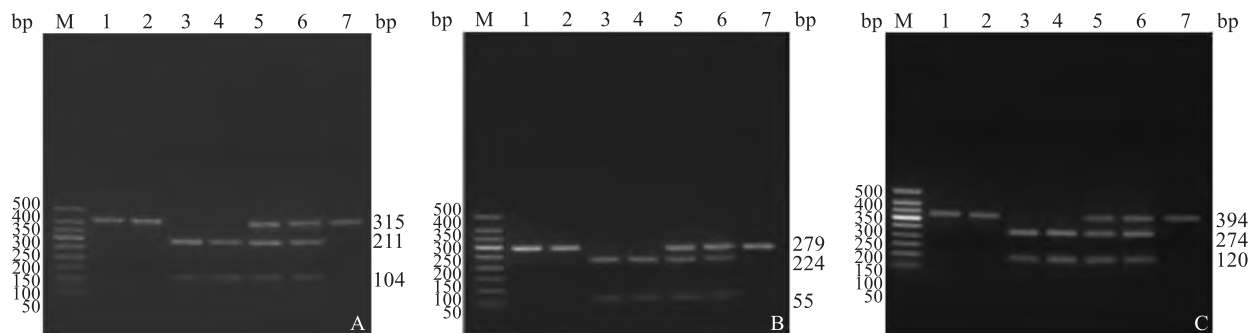


图2 PROS1 基因 SNP rs13062355、rs6441600、rs12634349 酶切产物电泳图

Fig.2 Electrophoresis of PROS1 gene SNP rs13062355, rs6441600, rs12634349 digestion products

M: 50 bp ladder; A1-2,3-4,5-6: SNP rs13062355 TT,CC,CT genotypes; A7: PCR product of SNP rs13062355; B1-2,3-4,5-6: SNP rs6441600 CC,GG,CG genotypes; B7: PCR product of SNP rs6441600; C1-2,3-4,5-6:SNP rs12634349 CC,TT,CT genotypes; C7: PCR product of SNP rs12634349.

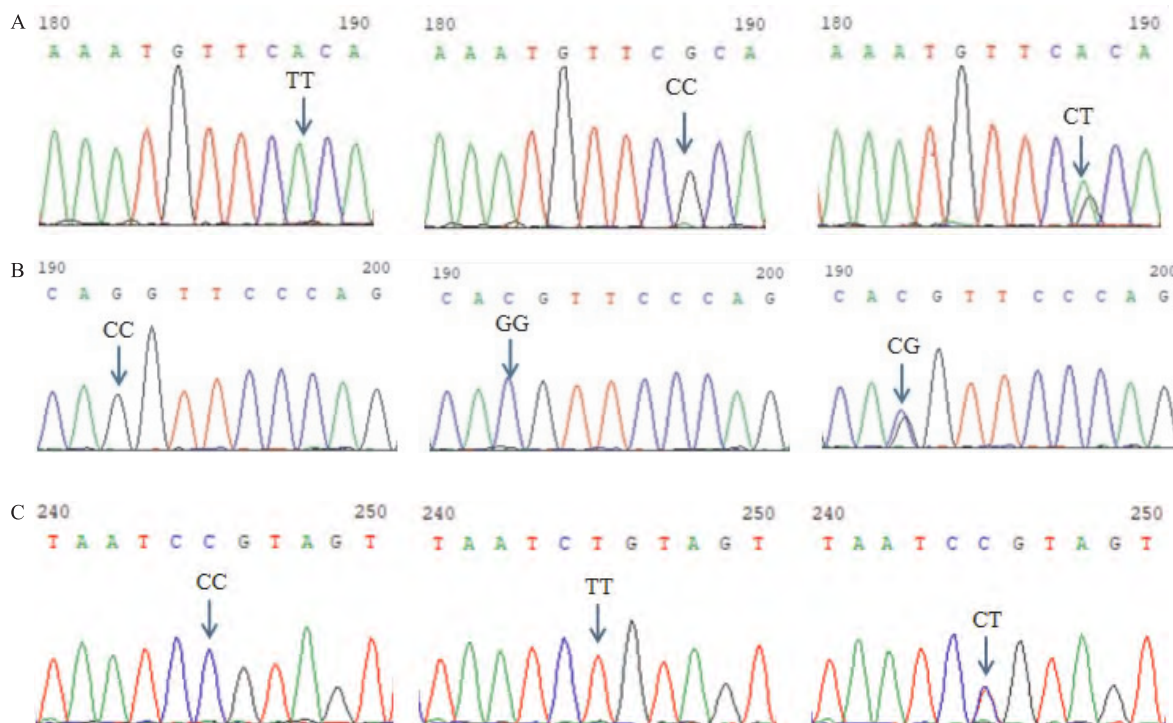


图3 PROS1 基因 SNP rs13062355、rs6441600、rs12634349 产物测序图

Fig.3 Product sequencing at SNP rs13062355,rs6441600,rs12634349 of PROS1 gene

A: SNP rs13062355 TT, CC, CT genotypes; B: SNP rs6441600 CC, GG, CG genotypes; C: SNP rs12634349 CC, TT, and CT genotypes.

因素,降低了RSA的发生风险;T-C-T、T-G-T两种单体型为风险因素,增加了RSA的发生风险,经多重校正后,仅单体型 C-C-C 与RSA有关联,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表5。

## 2.7 SNP-SNP 对 RSA 发病风险的交互作用分析

年龄纳入协变量,对PROS1基因的三个SNP进行交互作用分析,获取交叉验证一致性最大、准确率最高的交互模型。三阶模型(rs13062355-rs6441600-rs12634349)在RSA的发生风险中存在交

互作用,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表6。

## 3 讨论

血栓形成是多种因素协同作用的产物,凝血、抗凝血途径及纤溶系统等都是重要的影响因素<sup>[8]</sup>。如果妊娠期间发生凝血因子Ⅶ、Ⅷ、Ⅹ,血管性血友病因子和纤维蛋白原增加以及抗凝因子活性的降低,这些变化会伴随下肢静脉淤积,导致妊娠期间静脉血栓栓塞发生率增加<sup>[9]</sup>。血栓发生在胎盘血管

表 4 不同遗传模型型下 PROS1 基因 SNP 与 RSA 发生风险的关联分析[*n*(%) ]

Tab.4 Association analysis between SNP of PROS1 gene and the risk of RSA under different genetic models[*n*(%) ]

| SNP        | Genetic model  | Genotype | Control group | RSA group  | <i>P</i> value | <i>P</i> value <sup>a</sup> | OR (95% CI) <sup>b</sup> | AIC     | BIC     |
|------------|----------------|----------|---------------|------------|----------------|-----------------------------|--------------------------|---------|---------|
| rs13062355 | Co-dominant    | TT       | 45 (28.5)     | 79 (50.0)  |                |                             | 1                        | 430.202 | 445.225 |
|            |                | CT       | 90 (56.9)     | 60 (38.0)  | <0.001         | <0.003                      | 0.379 (0.231 – 0.622)    |         |         |
|            |                | CC       | 23 (14.6)     | 19 (12.0)  | 0.043          | 0.129                       | 0.477 (0.232 – 0.978)    |         |         |
|            | Dominant       | TT       | 45 (28.5)     | 79 (50.0)  |                |                             | 1                        | 424.790 | 439.813 |
|            |                | CT + CC  | 113 (71.5)    | 79 (50.0)  | <0.001         | <0.003                      | 0.398 (0.249 – 0.638)    |         |         |
|            | Recessive      | TT + CT  | 135 (85.4)    | 139 (88.0) |                |                             | 1                        | 439.546 | 454.569 |
|            |                | CC       | 23 (14.6)     | 19 (12.0)  | 0.547          | 1.000                       | 0.817 (0.422 – 1.582)    |         |         |
|            | Hyper-dominant | TT + CC  | 68 (43.0)     | 98 (62.0)  |                |                             | 1                        | 428.494 | 443.517 |
|            |                | CT       | 90 (57.0)     | 60 (38.0)  | 0.001          | 0.003                       | 0.460 (0.292 – 0.725)    |         |         |
|            |                | CC       | 23 (14.6)     | 19 (12.0)  | 0.547          | 1.000                       | 0.817 (0.422 – 1.582)    |         |         |
|            | Co-dominant    | CC       | 97 (61.4)     | 110 (69.6) |                |                             | 1                        | 437.555 | 452.578 |
|            |                | CG       | 53 (33.5)     | 42 (26.6)  | 0.140          | 0.420                       | 0.690 (0.421 – 1.130)    |         |         |
|            |                | GG       | 8 (5.1)       | 6 (3.8)    | 0.434          | 1.000                       | 0.642 (0.212 – 1.948)    |         |         |
| rs6441600  | Co-dominant    | CC       | 97 (61.4)     | 110 (69.6) |                |                             | 1                        | 437.388 | 452.411 |
|            |                | CG + GG  | 61 (38.6)     | 48 (30.4)  | 0.114          | 0.342                       | 0.683 (0.426 – 1.095)    |         |         |
|            |                | CC + CG  | 150 (94.9)    | 152 (96.2) |                |                             | 1                        | 439.562 | 454.585 |
|            | Recessive      | CC + CG  | 150 (94.9)    | 152 (96.2) |                |                             | 1                        | 439.562 | 454.585 |
|            |                | GG       | 8 (5.1)       | 6 (3.8)    | 0.560          | 1.000                       | 0.721 (0.241 – 2.163)    |         |         |
|            | Hyper-dominant | CC + GG  | 105 (66.5)    | 116 (73.4) |                |                             | 1                        | 437.992 | 453.015 |
|            |                | CG       | 53 (33.5)     | 42 (26.6)  | 0.168          | 0.504                       | 0.709 (0.435 – 1.156)    |         |         |
|            |                | CT       | 52 (32.9)     | 40 (25.3)  | 0.317          | 0.951                       | 1.308 (0.773 – 2.214)    |         |         |
|            | Co-dominant    | CT       | 76 (48.1)     | 80 (50.6)  | 0.317          | 0.951                       | 1.308 (0.773 – 2.214)    |         |         |
|            |                | TT       | 30 (19.0)     | 38 (24.1)  | 0.131          | 0.393                       | 1.634 (0.864 – 3.094)    |         |         |
|            |                | CC       | 52 (32.9)     | 40 (25.3)  |                |                             | 1                        | 438.116 | 453.139 |
|            | Dominant       | CT + TT  | 106 (67.1)    | 118 (74.7) | 0.182          | 0.546                       | 1.401 (0.854 – 2.299)    |         |         |
| rs12634349 | Co-dominant    | CC + CT  | 128 (81.0)    | 120 (75.9) |                |                             | 1                        | 438.550 | 453.573 |
|            |                | TT       | 30 (19.0)     | 38 (24.1)  | 0.246          | 0.738                       | 1.381 (0.801 – 2.384)    |         |         |
|            |                | CC + TT  | 82 (51.9)     | 78 (49.4)  |                |                             | 1                        | 439.841 | 454.864 |
|            | Hyper-dominant | CC + TT  | 82 (51.9)     | 78 (49.4)  |                |                             | 1                        | 439.841 | 454.864 |
|            |                | CT       | 76 (48.1)     | 80 (50.6)  | 0.799          | 1.000                       | 1.060 (0.677 – 1.660)    |         |         |
|            | Co-dominant    | CC       | 52 (32.9)     | 40 (25.3)  |                |                             | 1                        | 437.556 | 452.579 |
|            |                | CT       | 76 (48.1)     | 80 (50.6)  | 0.317          | 0.951                       | 1.308 (0.773 – 2.214)    |         |         |
|            |                | TT       | 30 (19.0)     | 38 (24.1)  | 0.131          | 0.393                       | 1.634 (0.864 – 3.094)    |         |         |
|            | Dominant       | CC       | 52 (32.9)     | 40 (25.3)  |                |                             | 1                        | 438.116 | 453.139 |
|            |                | CT + TT  | 106 (67.1)    | 118 (74.7) | 0.182          | 0.546                       | 1.401 (0.854 – 2.299)    |         |         |
|            | Recessive      | CC + CT  | 128 (81.0)    | 120 (75.9) |                |                             | 1                        | 438.550 | 453.573 |
|            |                | TT       | 30 (19.0)     | 38 (24.1)  | 0.246          | 0.738                       | 1.381 (0.801 – 2.384)    |         |         |
|            | Hyper-dominant | CC + TT  | 82 (51.9)     | 78 (49.4)  |                |                             | 1                        | 439.841 | 454.864 |
|            |                | CT       | 76 (48.1)     | 80 (50.6)  | 0.799          | 1.000                       | 1.060 (0.677 – 1.660)    |         |         |

<sup>a</sup>: *P* value corrected by Bonferroni; <sup>b</sup>: The factors of age and AT-III activity were adjusted.

表 5 PROS1 基因单体型与 RSA 发病的相关性[*n*(%) ]

Tab.5 Association between haplotype of PROS1 gene and RSA [ *n*(%) ]

| Haplotype | RSA group     | Control group | $\chi^2$ value | <i>P</i> value | <i>P</i> value <sup>a</sup> | OR (95% CI)           |
|-----------|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| C-C-C     | 20.15 (6.4)   | 40.86 (12.9)  | 7.783          | 0.005          | 0.040                       | 0.459 (0.262 – 0.801) |
| C-C-T     | 45.29 (14.3)  | 51.72 (16.4)  | 0.505          | 0.478          | 1.000                       | 0.855 (0.554 – 1.318) |
| C-G-C     | 5.34 (1.7)    | 12.83 (4.1)   | 3.179          | 0.075          | 0.600                       | 0.406 (0.146 – 1.128) |
| C-G-T     | 27.23 (8.6)   | 30.59 (9.7)   | 0.215          | 0.643          | 1.000                       | 0.880 (0.512 – 1.512) |
| T-C-C     | 123.62 (39.1) | 105.43 (33.4) | 2.265          | 0.132          | 1.000                       | 1.283 (0.927 – 1.776) |
| T-C-T     | 69.95 (22.1)  | 48.99 (15.5)  | 4.551          | 0.033          | 0.264                       | 1.550 (1.034 – 2.321) |
| T-G-C     | 10.90 (3.4)   | 20.88 (6.6)   | 3.303          | 0.069          | 0.552                       | 0.505 (0.239 – 1.068) |
| T-G-T     | 13.54 (4.3)   | 4.70 (1.5)    | 4.409          | 0.036          | 0.288                       | 2.964 (1.026 – 8.567) |

<sup>a</sup>: *P* value corrected by Bonferroni.

表 6 SNP-SNP 交互作用与 RSA 发病的相关性分析

Tab.6 Association analysis between SNP-SNP interaction and the incidence of RSA

| Model                           | Training accuracy | Testing accuracy | CV consistency | <i>P</i> value |
|---------------------------------|-------------------|------------------|----------------|----------------|
| rs13062355                      | 0.607 6           | 0.607 5          | 10/10          | 0.054 7        |
| rs13062355-rs6441600            | 0.619 6           | 0.575 6          | 8/10           | 0.054 7        |
| rs13062355-rs6441600-rs12634349 | 0.641 0           | 0.606 2          | 10/10          | 0.001 0        |

中,形成子宫胎盘微循环血栓,影响氧气和营养物质交换,使胎儿发育受阻从而增加流产风险<sup>[4]</sup>。但遗传性 PTS 与 RSA 之间的关系尚不明确<sup>[10-11]</sup>。

遗传性 PS 缺乏症是由 PROS1 基因变异引起的

一种血栓性疾病<sup>[12]</sup>,许多变异已通过对基因外显子和侧翼内含子区域的测序成功鉴定,PROS1 基因显著缺失或重复现象会导致血栓形成<sup>[13]</sup>。其中,PROS1 基因内含子中隐蔽剪接位点发生突变,出现

错误折叠使 PS 分泌缺陷导致 PS 缺乏症<sup>[14]</sup>。近年, PROS1 内含子区基因多态性的研究匮乏,有研究<sup>[5]</sup>发现 rs13062355、rs6441600、rs12634349 三个位于 PROS1 基因内含子区的标签 SNP 可能与静脉血栓形成相关。目前国内外只有一项研究<sup>[7]</sup>表明 rs13062355 在中国汉族人群中可能与 RSA 无显著关联。因此,本研究选取 rs13062355、rs6441600、rs12634349 共 3 个多态性位点进行包头地区 RSA 发病风险的研究。

本实验结果显示:与对照组比较,RSA 组 PS、AT-Ⅲ活性下降,两组间差异有统计学意义,与之前的研究结果相同<sup>[6]</sup>。校正年龄、AT-Ⅲ活性等协变量后,PROS1 SNP rs13062355 与 RSA 发病风险相关,携带 CT+CC 基因型的患者比携带 TT 基因型的患者 RSA 发病风险低,经 Bonferroni 校正后,差异仍有统计学意义。因此,在包头地区汉族人群中,与基因型 TT 比较,PROS1 rs13062355 基因型 CT+CC 可能是 RSA 发生的保护因素。与 Xu et al<sup>[7]</sup>在中国汉族人群中对 SNP rs13062355 与 RSA 发生无相关性的研究结果相悖,可能是由于不同地区人群的遗传亚结构和样本数量差异。在本研究中,SNP rs6441600、rs12634349 与 RSA 的发生风险均无关联,而 Wu et al<sup>[5]</sup>研究认为 rs6441600 的突变等位基因可能会导致血栓形成,rs12634349 的突变等位基因则是血栓形成的一个保护因素。但血栓形成并不是导致 RSA 发生的必然因素,两项结果存在差异可能是由于研究的疾病结局不同。

在该研究中,首次分析 PROS1 基因多态性位点 rs13062355-rs6441600-rs12634349 构建的单体型及 SNP-SNP 交互作用,结果显示单体型 C-C-C 可能与包头地区 RSA 的发生有关,降低了 RSA 的发病风险。同时,三阶模型在 RSA 的发生中存在交互作用,表明 PROS1 基因可能为 RSA 的易感基因。虽然,本研究选取了三种 tagSNP 作为研究位点,初步实验分析 PROS1 基因型分布频率、组成的单体型结果及 SNP-SNP 交互作用与 RSA 发生风险的关联性,但因 SNP 在内含子区调控转录和基因表达的未知性,只有进行功能分析才能了解多态性位点如何调控基因功能及具体调控机制。另外,本研究存在多重校正后差异无统计学意义的情况,需要加大样本量继续验证。因此,后期将继续分析 rs13062355 导致 RSA 易感性的原因和 PROS1 基因内含子中多态性变化是否影响转录调控、基因表达及血栓形成,进一步验证 SNP 及交互作用与 RSA 发生的关系。

## 参考文献

- [1] 中华医学会妇产科学分会产科学组,复发性流产诊治专家共识编写组.复发性流产诊治专家共识(2022)[J].中华妇产科杂志,2022,57(9):653-67. doi:10.3760/cma.j.cn112141-20220421-00259.
- [1] Obstetrics Subgroup of Chinese Society of Obstetrics and Gynecology Chinese Medical Association, Chinese Expert Consensus Group on Diagnosis and Management of Recurrent Spontaneous Abortion. Chinese expert consensus on diagnosis and management of recurrent spontaneous abortion (2022)[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2022, 57(9): 653-67. doi: 10.3760/cma.j.cn112141-20220421-00259.
- [2] Rey E, Kahn S R, David M, et al. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis[J]. Lancet, 2003, 361(9361): 901-8. doi:10.1016/S0140-6736(03)12771-7.
- [3] 何英明,张哲慧,薛吟霜,等.不同受孕方式复发性流产患者的临床特征分析[J].安徽医科大学学报,2023,58(2):297-301. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.022.
- [3] He Y M, Zhang Z H, Xue Y S, et al. Clinical characteristics analysis of recurrent pregnancy loss with different modes of fertilization[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(2): 297-301. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.022.
- [4] 国家妇幼健康研究会生殖免疫学专业委员会专家共识编写组.复发性流产合并血栓前状态诊治中国专家共识[J].中华生殖与避孕杂志,2021,41(10):861-75. doi:10.3760/cma.j.cn101441-20210715-00310.
- [4] Experts Consensus Group on Reproductive Immunology, Maternal and Child Health Research Association. Chinese experts consensus on the diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion with prethrombotic state[J]. Chin J Reprod Contracept, 2021, 41(10): 861-75. doi:10.3760/cma.j.cn101441-20210715-00310.
- [5] Wu D, Zhong Z, Chen Y, et al. Analysis of PROC and PROS1 single nucleotide polymorphisms in a thrombophilia family[J]. Clin Respir J, 2019, 13(8): 530-7. doi:10.1111/crj.13055.
- [6] 禚坚艳,刘奕珊,宋悦,等.血浆抗凝血酶Ⅲ及蛋白 C、蛋白 S 活性与复发性流产的关联性[J].中国计划生育学杂志,2022,30(7):1648-50,1654. doi:10.3969/j.issn.1004-8189.2022.07.041.
- [6] Xuan J Y, Liu Y S, Song Y, et al. Correlation between the changes of plasma antithrombin Ⅲ, activity of protein C and protein S of women and their recurrent spontaneous abortion[J]. Chin J Fam Plan, 2022, 30(7): 1648-50, 1654. doi:10.3969/j.issn.1004-8189.2022.07.041.
- [7] Xu Z, Zhang Y, Liu W, et al. Polymorphisms of F2, PROC, PROZ and F13A1 genes are associated with recurrent spontaneous abortion in Chinese Han women[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2018, 24(6): 894-900. doi:10.1177/1076029617750487.
- [8] Wu Y, Xin M, Han Q, et al. Extensive serum biomarker analysis in the prethrombotic state of recurrent spontaneous abortion[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(14): 6679-94. doi:10.1111/jcmm.

- 16671.
- [9] Alecsandru D, Klimczak A M, Garcia Velasco J A, et al. Immunologic causes and thrombophilia in recurrent pregnancy loss[J]. *Fertil Steril*, 2021, 115(3): 561–6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.01.017.
- [10] Grandone E, Piazza G. Thrombophilia, inflammation, and recurrent pregnancy loss: a case-based review[J]. *Semin Reprod Med*, 2021, 39(1–02): 62–8. doi:10.1055/s-0041-1731827.
- [11] Deng Y J, Liu S J, Zhao M, et al. Research trends and hotspots of recurrent pregnancy loss with thrombophilia: a bibliometric analysis[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2022, 22(1): 944. doi:10.1186/s12884-022-05210-z.
- [12] Makris M, Leach M, Beauchamp N J, et al. Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S[J]. *Blood*, 2000, 95(6): 1935–41.
- [13] Wang X, Tang N, Wang X, et al. PROS1 IVS10 +5G > A mutation causes hereditary protein S deficiency in a Chinese patient with pulmonary embolism and venous thromboembolism[J]. *Thromb Res*, 2019, 174: 1–4. doi:10.1016/j.thromres.2018.12.009.
- [14] Nagaya S, Togashi T, Akiyama M, et al. Protein S deficiency caused by cryptic splicing due to the novel intron variant c.346 + 5G > C in PROS1[J]. *Thromb Res*, 2023, 229: 26–30. doi: 10.1016/j.thromres.2023.06.020.

## Association between PROS1 gene polymorphism and recurrent spontaneous abortion in Baotou Han population

Zhao Pingping<sup>1,2</sup>, Wu Di<sup>3</sup>, Li Dechun<sup>2</sup>, Wang Yanguo<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School, <sup>3</sup>School of Basic Medicine and Forensic Medicine, <sup>4</sup>Nursing School, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040;

<sup>2</sup>Dept of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010)

**Abstract Objective** To investigate the association between single nucleotide polymorphism (SNP) of PROS1 gene and recurrent spontaneous abortion (RSA) in Baotou Han population. **Methods** 158 RSA patients and 158 control subjects were selected as the study subjects, and the activities of protein S, protein C and antithrombin-III were measured. The rs13062355, rs6441600 and rs12634349 loci of PROS1 gene were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Non-conditional Logistic regression was used to analyze the correlation between three SNPs of PROS1 gene and the risk of RSA. **Results** The protein S and antithrombin-III activities of RSA patients decreased significantly ( $P < 0.05$ ). PROS1 SNP rs13062355 was associated with the risk of RSA under the dominant model: compared with genotype TT, patients with CT + CC genotypes had a reduced risk of RSA ( $OR = 0.398$ , 95%  $CI$ : 0.249–0.638); SNP rs6441600 and rs12634349 were not associated with the risk of RSA ( $P > 0.05$ ). In the haplotypes constructed by PROS1 rs13062355, rs6441600 and rs12634349, Haplotype C-C-C was statistically different between the two groups ( $P < 0.05$ ). The third-order interaction model rs13062355-rs6441600-rs12634349 was associated with the risk of RSA. **Conclusion** PROS1 SNP rs13062355 may be associated with the risk of RSA in Han women in Baotou area. Haplotype C-C-C of PROS1 rs13062355, rs6441600 and rs12634349 reduces the risk of RSA. The third-order model rs13062355-rs6441600-rs12634349 interaction has a synergistic effect on the occurrence of RSA.

**Key words** protein S; PROS1; single nucleotide polymorphism; recurrent spontaneous abortion; PCR-RFLP; association study

**Fund programs** Health Science and Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 202201429); Young Sci-Tech Talents Development Program of Baotou Medical College (No. BYJJ-QNGG 2022044)

**Corresponding authors** Li Dechun, E-mail: lidechun2009@126.com; Wang Yanguo, E-mail: wangyanguo7975@163.com