

· 现场调查 ·

中国南北方人群还原叶酸载体基因多态性分布研究

裴丽君 任爱国 朱慧萍 郝玲 赵文睿 李竹 侯广旺 张伯兰
蒋琰瑛 吴立民 潘玉娟 张梦兰

【摘要】 目的 描述中国人群还原叶酸载体(*RFC1*)基因型频率、等位基因频率在南北方、不同性别人群中的分布。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法,对 720 份正常人外周血片 DNA 进行 *RFC1* 第 80 位 SNP 检测。结果 北方人群 *RFC1*(A80G)基因的 AA、GG 和 GA 基因型频率分别为 22.28%、31.09% 和 46.63%,南方人群 *RFC1*(A80G)基因型频率分别为 18.56%、22.75% 和 58.68%。南北方基因型频率差异存在统计学意义($P < 0.01$)。南北方人群 G 等位基因频率(分别为 52.10% 和 54.40%)差异无统计学意义($P > 0.05$)。男性 *RFC1*(A80G)基因的 AA、GG 和 GA 基因型频率分别为 24.88%、25.85% 和 49.27%,女性分别为 18.83%、27.77% 和 53.40%,不同性别人群 *RFC1* 基因型频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。男女性别 G 等位基因频率(分别为 50.49% 和 54.47%)差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 初步认为 *RFC1* 基因型分布与北方神经管畸形率高于南方的分布特点一致。人群 *RFC1* 基因型分布研究可为 *RFC1* 基因突变与叶酸代谢相关疾病病因研究假设提供遗传学数据。

【关键词】 还原叶酸载体基因;基因多态性;遗传流行病学

Study on reduced folate carrier gene(*RFC1*) polymorphism in the southern and northern Chinese population PEI Li-jun*, REN Ai-guo, ZHU Hui-ping, HAO Ling, ZHAO Wen-rui, LI Zhu, HOU Guang-wang, ZHANG Bo-lan, JIANG Yan-ying, WU Li-min, PAN Yu-juan, ZHANG Meng-lan.
*Institute of Reproductive and Child Health, National Reference Laboratory on Reproductive Health Research Ministry of Health, Peking University, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To describe the distribution of reduced folate carrier gene(*RFC1*) genotype and allele frequency between southern and northern, female and male Chinese population. **Method** *RFC1* (A80G) genotype was detected, using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) on 720 blood spot DNA from the normal subjects. **Results** The frequencies of the northern population with AA, GG and GA genotypes were 22.28%, 31.09% and 46.63%, and the frequencies of the southern population were 18.56%, 22.75% and 58.68%, respectively. Findings showed that there were significant differences between southerners and northerners in *RFC1* (A80G) genotype ($P < 0.01$). There was no significant difference between G allele frequency of the northern (52.10%) and southern population (54.40%). The frequencies of male with *RFC1*(A80G) AA, GG and GA genotype were 24.88%, 25.85% and 49.27%, and among female were 18.83%, 27.77% and 53.40%, respectively. There were no significant differences between male and female in *RFC1* genotype ($P > 0.05$), or between G allele frequency in female (50.49%) and that in male (54.47%). **Conclusions** The distribution of *RFC1* genotype seemed to be consistent with neural tube defects (NTDs) while its prevalence among the northerners was higher than that of southerners, with female having a higher NTDs prevalence. This study provided genetic epidemiological data for etiological hypothesis between *RFC1* and diseases relative to folate metabolism.

【Key words】 Reduced folate carrier gene; Gene polymorphism; Genetic epidemiology

基金项目:国家重点基础研究专项基金资助(G1999055905)

作者单位:100083 北京大学医学部生育健康研究所卫生部生育健康重点实验室(裴丽君、任爱国、郝玲、赵文睿、李竹);美国得克萨斯州大学环境与遗传医学中心生物科学技术研究所(朱慧萍);河北省妇幼保健院(侯广旺);河北省香河县妇幼保健院(张伯兰);浙江省嘉兴市妇幼保健院(蒋琰瑛);浙江省平湖市妇幼保健院(吴立民);浙江省海盐县妇幼保健院(潘玉娟);江苏省太仓市妇幼保健院(张梦兰)

叶酸对神经管畸形 (NTDs) 先天性心脏病的预防效果使许多学者从叶酸吸收、代谢和利用全过程寻找候选基因,已证实 MTHFR 基因第 677 位热敏感性纯合突变可导致高同型半胱氨酸血症,进而增加 NTDs 发病危险, MTHFR 基因是 NTDs 发生的遗传易感因素之一^[1,2]。然而,在叶酸通道中的其他候选基因也逐渐引起人们的关注^[3],如叶酸受体、还原叶酸载体 (reduced folate carrier, RFC) 等叶酸结合蛋白的基因表达异常也会影响叶酸的正常代谢过程。RFC1 基因点突变同样可引起叶酸转运缺陷,进而可能导致与叶酸代谢有关的出生缺陷发病危险性增加。本研究首次在中国人群中进行了 RFC1 基因多态性分布研究,为研究叶酸转运、代谢过程的遗传易感标志物和出生缺陷相关基因提供可靠的群体遗传学数据。

材料与方 法

1. 标本来源与研究对象的确定:从 1993 年 10 月开始,中美预防神经管畸形合作项目在中国北方河北、山西,南方江苏、浙江 4 省 30 个市、县、区建立了出生缺陷和围产保健监测系统^[4],在收集监测数据的同时,募集婚检妇女,用纸片法采集婚检妇女及其丈夫 15 万份外周血片标本,并建立标本库。本研究以现有血片标本库为抽样总体,分南北方两部分,分别随机抽样作为研究对象。

2. 选择标本的条件及率的样本量估计:选择无明显心血管疾病、不患牛皮癣、无癫痫病史、无抗惊厥药物史、未接受过各种癌症后化疗的婚检妇女及其丈夫外周血片标本^[5]。根据国外报道,不同地区、不同种族人群 RFC1 基因型频率存在差异,加拿大正常人 RFC1 突变纯合子 GG 频率为 27.1%^[6],中国人群没有这方面的资料,为保证样本量,以估计 30% 作为纯合突变的期望频率,容许误差为 0.05,则南北方共抽取 724 份血片标本。

3. DNA 模板的制备:利用美国生产的 Puregene D-5000A Gentra System 试剂盒制备血纸片 DNA 模板, Taq DNA 聚合酶和内切酶 Hha I 均为 Promega 产品,引物由上海生工合成, dNTPs 购自华美生物公司。

4. 聚合酶链反应 (PCR) 酶切反应及聚丙烯酰胺凝胶电泳:在 PE 9600 扩增仪上扩增 RFC1 基因第 2 外显子部分序列,引物序列上游为 5'-agt gtc acc ttc gtc ccc tc-3',下游为 5'-ctc cgg cgt gaa gtt ctt-

3';反应体系:10×PCR buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl (Mg²⁺ 的终浓度为 1.5 mmol/L), 25 mmol/L dNTPs 0.2 μl (200 μmol/L), 上游引物 (10 μmol/L) 0.5 μl, 下游引物 (10 μmol/L) 0.5 μl, Taq DNA polymerase (5 U/μl) 0.2~0.4 μl (1.0~2.0 U), DNA 模板 1~2 μl, 加水使总体积至 25 μl; PCR 反应条件:95℃ 5 min (95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 20 s) 共 35 个循环, 72℃ 5 min。

限制性内切酶:Hha I (20 U/μl) 0.5 μl 消化 PCR 扩增产物,总体积 15 μl, 37℃ 约 8 h。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果目的基因长度为 230 bp, RFC1 基因多态性表现为 GG 纯合子 (3 条带:125 bp, 68 bp, 37 bp), AA 纯合子 (2 条带:162 bp, 68 bp) 和 GA 杂合子 (4 条带:162 bp, 125 bp, 68 bp, 37 bp) (图 1)。

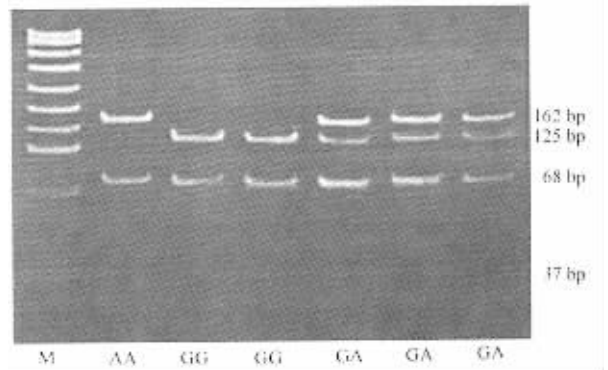


图1 RFC1 基因第 80 位单核苷酸多态性

5. 统计学分析:用 Foxpro 5.0 建立数据库,用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。计算 RFC1 基因型频率、等位基因频率并进行 χ^2 检验,对等位基因频率在中国人群、南北方人群的 Hardy-Weinberg 平衡 (H-W 平衡) 吻合度分别进行检验^[7]。将 GG、GA 与 AA 基因型比较,并计算 χ^2 值、比值比 (OR) 及 OR 95% 可信区间 (CI)。

结 果

1. 南北方正常人群 RFC1 基因型频率及等位基因频率分布:本研究共随机抽取血片标本 724 份,剔除 DNA 不合格标本 4 份,即参与分析的标本 720 份,占抽样总人数的 99.4%。RFC1 基因型频率在南方 ($\chi^2 = 5.281, P = 0.133$) 北方 ($\chi^2 = 0.758, P = 0.685$) 和总体人群 ($\chi^2 = 0.860, P = 0.650$) 中均符合 H-W 平衡。中国南、北方人群 RFC1 基因型频率 (表 1) 经 χ^2 检验差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);

南、北方人群 G 等位基因频率分别为 52.10% 和 54.40%, 经 χ^2 检验差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表1 中国南北方人群 *RFC1* 基因型频率

地区	AA 纯合型	GG 纯合型	GA 杂合型	合计
北方	8(22.28)	12(31.09)	18(46.63)	38(100.0)
南方	6(18.56)	7(22.75)	19(58.68)	33(100.0)
合计	14(20.56)	19(27.22)	37(52.28)	72(100.0)

注:括号外数据为人数,括号内数据为构成比(%); $\chi^2 = 10.7508, P = 0.0046$

2. 不同性别人群 *RFC1* 基因型及等位基因频率分布 表 2 为中国人群男女性别 *RFC1* 基因型频率比较,正常人群 720 人中,男性 205 人,女性 515 人,分别占 28.5% 和 71.5%;男性中以 GA 杂合子占较高比例 49.27%, GG 和 AA 纯合子比例非常接近,分别为 25.85% 和 24.88%;女性中 GG 比 AA 基因型高出大约 9%,经 χ^2 检验三种基因型在男女性别间差异无显著性 ($P > 0.05$),认为不同性别人群 *RFC1* 基因型差异无显著性。

表2 中国人群不同性别 *RFC1* 基因型频率比较

性别	AA 纯合型	GG 纯合型	GA 杂合型	合计
男	5(24.88)	5(25.85)	10(49.27)	20(100.0)
女	9(18.83)	14(27.77)	27(53.40)	51(100.0)
合计	14(20.56)	19(27.22)	37(52.22)	72(100.0)

注:同表 1 $\chi^2 = 3.2811, P = 0.1939$

讨 论

国外对 *RFC1* 的研究多为动物实验和药物基础研究,关于 *RFC1* 基因多态性在人群中的分布研究很少,加拿大学者非随机选择 169 名正常人,检测 *RFC1* 基因型,发现纯合子 GG、AA 频率分别是 27.2% 和 21.9%;*RFC1* 多态性 GG 和 MTHFR 纯合突变 TT 可使总同型半胱氨酸(tHcy)中度升高^[6]。本次研究从中国南北方 15 万人群中随机选择 720 名婚检妇女及其丈夫的血片标本进行 *RFC1* 基因型鉴定,发现人群中 GG 和 AA 纯合子频率分别是 27.22% 和 20.56%,与加拿大人的很接近。然而,中国北方人群 GG 纯合子频率高于南方的特点,与北方 NTDs 率显著高于南方的分布特点一致^[8]。提示这些观察对于叶酸和同型半胱氨酸水平的遗传学研究极为有用,如果将 GG 基因型看作是导致 NTDs 等缺陷的突变基因,该研究结果提示:人群中 *RFC1* 突变基因 GG 与叶酸水平、同型半胱氨酸水平之间可能存在生态学相关性。今后可以考虑进行人群 *RFC1* 基因、MTHFR 基因及其他叶酸通道基

因多态性与叶酸、同型半胱氨酸水平和 NTDs、先天性心脏病等出生缺陷的遗传学研究,进一步确定叶酸通道基因在出生缺陷发病中的作用,这对叶酸代谢相关疾病病因研究具有重要的影响。

本研究是一项样本量大、严格设计的人群 *RFC1* 基因多态性分布研究,对人群 *RFC1* 等位基因频率 H-W 平衡检验结果表明:第一,该基因在所研究群体中比较稳定;第二,本资料具有较高的可靠性和精确性^[7]。因此,这一研究结果可为 NTDs、先天性心脏病等叶酸代谢相关缺陷的病因研究假设提供线索。

人类 *RFC1* 定位在 21 染色体(21q 22.2~22.3)上^[6],并且编码一个相对分子质量(M_r)为 $80 \times 10^3 \sim 120 \times 10^3$ 的完整膜蛋白。在 *RFC1* 第 2 外显子第 80 位基因上,具有高频率的 A→G 单核苷酸多态性(SNP)。目前国外关于 *RFC1* 基因的研究主要是针对癌症患者使用叶酸类似物氨甲碟呤(MTX)化疗过程中产生的抗药性而进行的各种实验研究。大量研究证明,*RFC1* 基因不同位点的突变,可导致明显的 MTX 转运缺陷^[9];主动转运 MTX 进入细胞是通过与正常情况下转运 5-甲基四氢叶酸及其他叶酸的机制完全一致,均由相同的 RFC 调节机制完成^[10]。因此,*RFC1* 基因点突变同样可以引起叶酸转运缺陷。*RFC1* 对正发育的胚胎,特别是叶酸穿过胎盘的运输具有重要影响;*RFC1* 基因低水平表达能影响正常组织发育,可能导致出生缺陷发病危险性增加^[11]。因此,研究 *RFC1* 基因多态性的人群分布,将对叶酸预防神经管畸形、先天性心脏病等出生缺陷病因机制具有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 朱慧萍,李竹. 中国人 MTHFR 基因多态性与神经管畸形遗传易感性. 遗传 2000 22:236-238.
- 2 Mark L, Ioannis D, David B, et al. Altered folate metabolism and disposition in mother affected by a spina bifida pregnancy: influence of 677 C→T Methylene tetrahydro-folate reductase and 275A→G Methionine synthase genotypes. Mol Gen Metab 2000 70:27-44.
- 3 Richard HF, Kimberly AG, Robert CB, et al. Neural tube defects and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. Crit Rev Oral Bio Med 1998 9:38-53.
- 4 李竹, Robert JB, 李松, 等. 中国妇女妊娠前后单纯服用叶酸对神经管畸形的预防效果. 中华医学杂志 2000 80:493-498.
- 5 Guo W, Healey JH, Meyers PA, et al. Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. Clin Cancer Res 1999 5:621-627.
- 6 Abalo C, Nathalie EF, Genevieve P deC, et al. A polymorphism (80G→A) in the reduced folate carrier gene and its associations

with folate status and homocysteinemia. *Mol Gene Metab*, 2000, 70:310-315.

7 Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. 医学遗传学原理. 孙开来, 译. 北京: 科学出版社, 2001. 4-62.

8 裴丽君, 李竹, 李松, 等. 中国神经管畸形高低发地区季节及性别分布特征. *中华流行病学杂志*, 2003, 24:465-470.

9 Gerrit J, Robert M, Stavits D, et al. A structurally altered human reduced folate carrier with increased folic acid transport mediates a novel mechanism of antifolate resistance. *J Biol Chem*, 1998, 276: 30189-30198.

10 Long Z, Wong SC, Larry HM. Structure and organization of the human reduced folate carrier gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1442: 389-393.

11 Johnathan RW, Larry HM. The basal promoters for the human reduced folate carrier gene are regulated by a GC-box and a cAMP-response element/AP-1-like element. *J Biol Chem*, 2001, 276: 6350-6358.

(收稿日期: 2003-07-03)

(本文编辑: 张林东)

· 疾病控制 ·

发热门诊患者自我措施及就医行为调查

左惠娟 姚崇华 林桂洪 董磊 苏江莲

早期发现和隔离严重急性呼吸综合征(SARS)患者是控制传染源的关键。我们对北京市安贞医院 SARS 期间发热患者采取措施和就医行为、就医过程存在的问题进行了调查。

1. 调查对象及方法 ①调查对象为北京市安贞医院 2003 年 5 月 3~7 日就诊的发热患者, 排除标准: 当日确诊或医院留观的患者、没有留下电话的患者、75 岁以上老年患者、15 岁以下患者。放弃调查对象的标准: 电话为空号、非同日拨打电话 3 次无人应答者、拨打手机 3 次故意不接者。②制定统一调查表, 内容包括基本情况、目前体温、可能发热原因、主要接触史、发热后采取的措施、就医行为等。以上问题均为开放式问题。由统一培训的调查员通过电话进行询问, 每天就诊的患者一周内完成调查。资料用 Foxpro 6.0 软件建立数据库, SPSS 10.0 软件进行统计学分析。

2. 结果:

(1) 门诊发热患者情况: 2003 年 5 月 3~7 日, 安贞医院共记录发热患者 260 例, 符合条件并且可供电话调查者 149 例, 接受调查 106 例, 应答率为 71.1%。其中 5 例因 SARS 或疑似 SARS 住院。101 例患者中男性占 56.4%, 女性占 43.6%。15~34 岁年龄组所占比重最大, 为 65.3%, 35~54 岁年龄组占 20.8%, 55~74 岁年龄组占 13.9%。北京市户口占 57.4%, 外地户口占 40.6%。95% 发热患者接受调查时体温恢复正常, 4% 被诊断为 SARS。发热最高体温超过 38℃ 者占 83.2%。

(2) 发热后自我行为及措施: 95.0% 发热患者拥有体温计。85.1% 不舒服时马上测量体温, 7.9% 不舒服超过 1 天测量体温, 5.9% 每天测量体温, 1% 在医院或小区门口体温测量时发现体温升高。31.7% 患者发热后首先自己服药, 43.6% 直接去医院, 15.8% 拨打急救电话, 5.9% 先进行咨询, 3% 先观察体温变化。其中 47.5% 发热患者发热期间采

取家庭自我隔离措施, 其中发热第 1 天进行隔离者占 77.1%。医生建议是发热患者采取家庭内隔离措施的影响因素(获得医生建议隔离者采取率为 92.9%, 未获得建议者采取率为 35.0%, $\chi^2 = 13.89, P = 0.000$)。而体温高低并不影响患者采取家庭内隔离措施, 体温超过 38℃ 者采取率为 53.1%, 体温低于 38℃ 者采取率为 37.8% ($\chi^2 = 2.197, P = 0.138$)。

(3) 发热患者初次去医院的平均时间为发热第 1.68 天, 发热当天就诊率为 60.4%、未当天就诊者 37.5% 担心到院会感染 SARS。就医时自我保护行为和社会责任感: 95.1% 患者就医时戴口罩, 66.3% 患者候诊时距其他患者 1 m 以上距离, 初次就诊时 15.8% 患者乘坐 120 急救车, 31.7% 患者步行或骑车, 31.7% 乘公交车或出租车, 20.8% 自己或家人开车。

(4) 患者在发热门诊获得的建议中 13.9% 患者被要求进行家庭隔离, 26.7% 患者被要求 2~3 天随访, 20.8% 被要求监测体温, 45.5% 没有获得指导性建议。

3. 讨论 SARS 期间监测体温是早期发现发热患者的重要措施, 社区居民监测体温措施得到良好执行, 不舒服时马上测体温率达到 85.1%, 但是发热患者发热期间采取家庭自我隔离措施率仅 47.5%。社区居民调查说明家庭隔离具有可行性, 医生的建议对于患者采取措施具有重要影响, 但是仅 13.9% 的患者曾从医生那里获得家庭自我隔离建议。SARS 流行期间应倡导发热患者自觉实施家庭内隔离, 同时发热门诊医生应根据患者病情向发热患者提供家庭隔离的建议和要求。本次调查结果表明, 发热患者具有较强的自我保护意识以及对他人的社会责任感。但医院方对发热患者就医环境和支持性环境方面还有待改善, 以杜绝患者在医院内的传播。

(收稿日期: 2003-06-19)

(本文编辑: 尹廉)