

· 现场调查 ·

还原叶酸载体基因多态性与神经管畸形
关联的父母-病例对照研究

裴丽君 李智文 任爱国 张卫 朱慧萍 朱江辉 郑晓颖 杜宝芝
刘育红 肖燕萍 魏子庚 李竹

【摘要】 目的 对神经管畸形(NTDs)发病危险和还原叶酸载体基因(RFC1)A80G多态性进行关联研究,为寻找NTDs的遗传易感标志物提供流行病学依据。**方法** 采用RFLP-PCR方法,对104例NTDs儿及其父母和99名正常儿童及其父母的外周血DNA进行RFC1第80位SNP检测,对核心家庭基因型进行病例对照研究,对NTDs杂合子父母G等位基因进行传递不平衡检验(TDT)。**结果** NTDs儿G等位基因频率高于对照儿,OR值为1.64(95%CI:1.08~2.49);GG基因型的患儿发生NTDs危险高于AA基因型(OR=2.56,95%CI:1.04~6.36);TDT结果显示,RFC1等位基因G与NTDs之间存在关联($\chi^2=5.2364, P<0.05$),携带G等位基因发生NTDs的危险是非携带者的1.56倍(95%CI:1.07~2.28)。**结论** 发现在中国人群中RFC1基因多态性与NTDs存在关联,初步表明该基因G等位基因可能是NTDs发生的遗传易感基因之一。

【关键词】 神经管畸形;还原叶酸载体基因;传递不平衡检验

A parental case control study on the association between reduced folate carrier gene polymorphism and neural tube defects PEI Li-jun*, LI Zhi-wen, REN Ai-guo, ZHANG Wei, ZHU Hui-ping, ZHU Jiang-hui, ZHENG Xiao-ying, DU Bao-zhi, LIU Yu-hong, XIAO Yan-ping, WEI Zi-geng, LI Zhu. *Institute of Reproductive and Child Health, National Reference Laboratory on Reproductive Health Research Ministry of Health, Peking University, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To study the association between reduced folate carrier gene(RFC1 A80G) polymorphism and the risk for child with neural tube defects(NTDs), and to provide epidemiological evidence for the existence of NTDs genetic marker. **Methods** RFC1(A80G) genotypes were detected using RFLP-PCR for blood DNA of 104 families with NTDs-affected children and 100 control families with no history of child-affected birth defects. Case-control study and transmission/disequilibrium test(TDT) for the RFC1 genotype of NTDs pedigree were carried out. **Results** The G allele frequency of children with NTDs was higher than that of controls when compared to A allele(OR=1.64,95%CI:1.08-2.49). The offspring of the GG genotype were associated with a 2.56-fold increased risk of NTDs when compared to the AA genotype(OR=2.56,95%CI:1.04-6.36) in our study population. There was evidence of association between G allele and the risk of parent having a child with NTDs(OR=1.56,95%CI:1.07-2.28) in the TDT analysis. **Conclusion** Our findings indicated that there was potential association between offspring RFC1 GG genotype and the risk of NTDs, and the G allele was a possible susceptible gene marker for an increased NTDs risk in the Chinese population.

【Key words】 Neural tube defects; Reduced folate carrier gene; Transmission/disequilibrium test

增补叶酸可以有效降低神经管畸形(NTDs)的

初发和再发^[1,2]。但叶酸可以减少这些疾病危险的机制目前尚不清楚,因此,许多研究者将焦点集中于研究影响叶酸吸收、转运和代谢的基因上。大量研究证实,叶酸代谢酶MTHFR C677T热敏感性纯合突变及A1298C突变是NTDs发生的遗传易感因素^[3,4]。然而,在叶酸被吸收转运进入细胞过程中涉及到的还原叶酸载体基因(reduced folate carrier gene, RFC1)的突变或表达异常可能成为叶酸正常代谢过程的重要影响因素。本研究的目的是探索

基金项目:国家重点基础研究专项基金(G1999055905);国家“十五”科技攻关课题资助项目(2002BA709B11)

作者单位:100083 北京大学生育健康研究所 卫生部生育健康重点实验室(裴丽君、李智文、任爱国、张卫、朱江辉、李竹);美国得克萨斯州农工大学环境与遗传医学中心生物科学技术研究所(朱慧萍);河北省唐山市丰润区妇幼保健院(郑晓颖);河北省满城县妇幼保健院(杜宝芝);河北省乐亭县妇幼保健院(刘育红);山西省太谷县妇幼保健院(肖燕萍);河北省元氏县妇幼保健院(魏子庚)

RFC1 G 等位基因与 NTDs 发生危险之间是否存在关联,为 NTDs 的病因研究寻找遗传易感标志物提供流行病学依据。

对象与方法

1. 标本来源与研究对象的确定:104 例 NTDs 病例主要来自 1996 - 2003 年北京大学生育健康研究所在对河北省 5 个市县和山西省 5 市县进行出生缺陷监测中确诊的 NTDs 病例;在与病例相同的现场、同时期出生、不患任何缺陷的正常儿童及其亲生父母中选择了 100 个核心家庭作为对照。规定每个病例和对照家庭成员无明显的心血管疾病、牛皮癣、未接受过各种癌症后化疗和抗惊厥药物治疗。对上述研究对象进行问卷调查和采集血标本前,必须征得本人同意后在知情同意书上签字。本研究经北京大学医学部伦理学委员会审查批准后备实施。

2. 研究对象:104 例 NTDs 病例家庭中,母亲 99 名,父亲 93 名;无脑畸形占 43.3%,脊柱裂 45.2%,脑膨出 11.5%;NTDs 病例平均年龄为 2.6 岁,年龄范围 4 月龄至 8.8 岁;病例中男性 48 例,女性 56 例。100 个对照家庭中,有 1 名儿童血标本未采集到,所以儿童 99 名,母亲 100 名,父亲 97 名;对照是与病例在同一时期募集;平均年龄为 5.88 岁,年龄范围 1.9~9.4 岁;对照中男性 48 名,女性 52 名。NTDs 组和与对照组比较,在性别上均无差别。上述个体之间无血缘关系。

3. 检测方法:抽取静脉血约 0.5 ml,滴于 S&S 公司生产的 ISOCODE 采血卡片上,卡片晾干后于室温下保存。利用美国生产的 Puregene Cat # D-5000A Gentra System 试剂从干燥血片中提取基因组 DNA, Taq DNA 聚合酶和内切酶 Hha I 均为 Promega 产品,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,dNTPs 购自华美生物工程公司。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 ccg cgt gaa gtt ctt-3'^[5];反应体系:10× PCR buffer、25 mmol/L MgCl₂ (Mg²⁺ 的终浓度为 1.5 mmol/L)、25 mmol/L dNTPs、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 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。结果分析:目的基因长度为 230 bp, RFC1 基因多态性表现为 GG 纯合子 (125 bp, 68 bp, 37 bp)、AA 纯合子 (162 bp, 68 bp) 和 GA 杂合子 (162 bp, 125 bp, 68 bp, 37 bp),电泳结果图参见文献[6]。

4. 统计学分析:利用 SPSS 11.0 软件估计 RFC1 基因型与 NTDs 关联之间的 OR 值及其 95% CI;病例-父母对照研究即为 1:2 匹配病例对照研究,是以子女的等位基因作为病例组,以其父母的等位基因作为对照组,计算可能的突变等位基因“G”与正常等位基因“A”的传递失衡 (transmission/disequilibrium test, TDT) 检验统计量,即配对资料 χ² 检验统计量及 OR 值。

结 果

1. NTDs 核心家庭和对照家庭 RFC1 基因型构成及等位基因频率比较:表 1 显示 NTDs 儿与对照、NTDs 父亲与对照父亲的基因型构成比较,差异均无统计学意义,而 NTDs 母亲与对照母亲基因型构成比较,差异具有统计学意义 (χ² = 8.108, P = 0.0175);NTDs 儿 G 等位基因与对照儿比较,差异具有统计学意义 (χ² = 5.905, P < 0.05), OR 值为 1.64 (95% CI: 1.08~2.49)。

表1 NTDs 核心家庭和对照家庭 RFC1 基因型构成及等位基因频率比较

组别	例数	基因型			等位基因频率	
		AA	GA	GG	A	G
后代						
NTDs 儿	104	14 (13.46)	46 (44.23)	44 (42.31)	74 (35.58)	134 (64.42)*
对照儿	99	22 (22.22)	50 (50.51)	27 (27.27)	94 (47.47)	104 (52.53)
父亲						
病例	93	15 (16.13)	50 (53.76)	28 (30.11)	80 (43.01)	106 (56.99)
对照	97	19 (19.59)	46 (47.42)	32 (32.99)	84 (43.30)	110 (56.70)
母亲						
病例	99	8 (8.08)	60 (60.61)	31 (31.31)	76 (38.38)	122 (61.62)
对照	100	22 (22.00)	47 (47.00)	31 (31.00)	91 (45.50)	109 (54.50)

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比(%); * NTDs 儿 G 等位基因与对照儿比较:χ² = 5.905, P < 0.05, OR = 1.64 (95% CI: 1.08~2.49)

2. NTDs 核心家庭和对照家庭 RFC1 基因型病例对照研究:表 2 显示,携带 RFC1 GG 基因型发生

NTDs 的危险是 AA 基因型的 2.56 倍 (95% CI: 1.04~6.36)。母亲携带 GA 基因型生育 NTDs 儿危险是 AA 基因型的 3.51 倍 (95% CI: 1.34~9.89)。

表2 NTDs 核心家庭和对照家庭 RFC1 基因型 病例对照研究

基因型	病例组	对照组	OR 值(95% CI)
子代			
AA	14(13.46)	22(22.22)	1.00
GA	46(44.23)	50(50.51)	1.45(0.62~3.40)
GG	44(42.31)	27(27.27)	2.56(1.04~6.36)
父亲			
AA	15(16.13)	19(19.59)	1.00
GA	50(53.76)	46(47.42)	1.38(0.58~3.28)
GG	28(30.11)	32(32.99)	0.99(0.44~2.82)
母亲			
AA	8(8.08)	22(22.00)	1.00
GA	60(60.61)	47(47.00)	3.51(1.34~9.89)
GG	31(31.31)	31(31.00)	2.75(0.98~8.20)

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比 (%)

3. RFC1 基因多态性与 NTDs 病例-父母对照研究: 表 3 可见, 病例组有 110 个有信息杂合子传递, G 等位基因传递比例是 67(67/110 = 60.9%), 以父母杂合子基因型作 TDT 检验, 其差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.2364, P < 0.05$), 提示与 A 等位基因携带者比较, 病例父母的 G 等位基因更可能传递给 NTDs 儿 (OR = 1.56, 95% CI: 1.07~2.28)。而在对照核心家庭的 TDT 分析中, 有 90 个有信息杂合子传递, G 等位基因传递比例是 37(37/110 = 41.1%), 以父母杂合子基因型作 TDT 检验, 其差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.84, P > 0.05$), 提示与 A 等位基因比较, 对照组亲代 G 等位基因传递给正常的子代未偏离 50%。

表3 RFC1 基因多态性与 NTDs 病例-父母对照研究

TDT 检验	病例组	对照组
杂合子有信息传递数*	110	90
G 等位基因有信息传递数	67(60.9)	37(41.1)
χ^2 值	5.24	2.84
P 值	0.02	0.09
OR 值	1.56	0.70
95% CI	1.07~2.28	0.45~1.08

* 来自一个完整核心家庭双亲杂合子的传递数; 括号内数据为构成比 (%)

讨 论

目前, 本项研究是国内第一个对 RFC1 基因多态性与 NTDs 之间关联的分子流行病学研究, 在提出 NTDs 是否与 RFC1 存在关联的假设之前, 我们首先进行中国人群 RFC1 基因 A80G 多态性分布研

究^[6], 结果初步认为 RFC1 基因型分布与北方 NTDs 率高于南方的分布特点一致, 这一结果为进一步开展 RFC1 基因与 NTDs 等重大出生缺陷之间关联的假设提供了基础资料。

传统的病例对照研究在选择对照时要求其遗传背景一致, 而且由于候选基因与疾病之间的种族或地区差异而产生虚假关联, 这种差异就是通常提到的群体分层 (population stratification)^[7], 病例对照研究最常见的影响因素就是混杂偏倚, 而疾病候选基因研究中常见的偏倚就是基因型分布的群体差异, 这种混杂偏倚不同于其他环境因素引起的偏倚, 对于这类偏倚采用传统的分层分析或多因素回归分析不能得到有效的控制, 最终可能高估或低估基因在疾病中的作用。利用核心家系数据进行传递不平衡检验是基于寻找假定的致病等位基因有杂合子父母传递给患病子女的不平衡传递性, 从而推测致病基因是否存在。研究结果显示, 等位基因 G 在父母和子代之间存在不平衡传递, 即 G 等位基因与发生 NTDs 危险之间存在关联, 由此初步推测, RFC1 第 80 位单核苷酸基因 G 等位基因可能是 NTDs 的遗传易感基因。

Falk, Rubinstein^[8] 早在 1987 年就提出利用具有一个患病子代的家系, 以父母未传递给患病子代的等位基因作为对照, 进行单体型相对风险分析 (haplotype relative risk, HRR)。1993 年 Spielman 等^[9] 在 HRR 基础上提出了 TDT 分析, 当标记基因座与疾病存在群体关联时用于检验是否存在连锁。本次对 NTDs 群体关联研究结果为 RFC1 基因 A80G 多态性与 NTDs 存在关联, 在此基础上, 首先利用核心家系资料进行经典的 TDT 分析, 检验该基因座是否与中国人群 NTDs 存在连锁, 结果发现杂合子父母传递给患病子女的 G 等位基因频率偏离 50%, 提示该标记基因座与疾病基因座存在连锁。

在对 NTDs 的胚胎发育研究中, 调查叶酸通道候选基因, 如叶酸吸收、转运方面的基因非常重要^[10]。虽然大多数 NTDs 与叶酸通道基因的关联研究已经集中在叶酸代谢酶上, 但叶酸结合和转运中涉及到的基因可能是 NTDs 发病危险的重要基因^[11]。

参 考 文 献

- 1 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.
- 2 Berry RJ, Li Z, Erickson DJ, et al. Prevention of neural tube defects

with folate acid in China. *N Engl J Med*, 1999, 341:1485-1490.

3 Volcik KA, Blanton SH, Tyerman GH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotype risk in Hispanics. *Am J Med Genet*, 2000, 95:21-27.

4 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.

5 Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, et al. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet*, 2002, 108:1-6.

6 裴丽君, 朱慧萍, 任爱国, 等. 中国南北方人群还原叶酸载体基因多态性分布研究. *中华流行病学杂志*, 2004, 25:499-502.

7 Tu IP, Balise RR, Whittemore AS. Detection of disease genes by use of family data II. Application to nuclear families. *Am J Hum Genet*, 2000, 66:1341-1350.

8 Falk CT, Rubinstein T. Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet*, 1987, 51:227-233.

9 Spielman RS, McGinnis RE, Ewenst WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 1993, 52:506-516.

10 Gazali LI, Padmanabhan R, Melnyk S, et al. Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect. *Am J Med Genet*, 2001, 103:128-132.

11 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.

(收稿日期:2004-11-04)
(本文编辑:张林东)

· 疾病控制 ·

浙江省绍兴市急救中心急诊伤害流行病学调查

朱文琴 方强 俞士梅 赵晖

2001 年绍兴市人民医院参加了全国性的大规模中毒与伤害调查,现将该市急救中心 2001 年 7 月 1 日 0 时到 2002 年 6 月 30 日 24 时的急诊伤害情况分析报道如下。

1. 对象与方法:根据 13 所调查点医院 2000 年急诊伤害人数统计。将 12 个月分成 3 份计算伤害的急诊量分布:① 1、4、7、10 月占 33.3%;② 2、5、8、11 月占 32.8%;③ 3、6、9、12 月占 34.1%。取①分别与②、③用假设均一分布进行检验,结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。确定 2001 年的 7、10 月和 2002 年的 1、4 月每月的 1-15 日为抽样点,对就诊的患者填写调查表。所有数据用“中毒伤害谱调查应用软件”处理。其中中毒患者全年登记。

2. 结果:共调查伤害病例 2746 例,其中男 1801 例,女 945 例,男女比例为 1.9:1。从伤害年龄分布可见,30~35 岁年龄段为最高发,依次向两边递减,按构成比排列前三位分别为 30~35 岁年龄组 441 例(16.06%);35~40 岁组 387 例(14.09%);25~30 岁组 340 例(12.38%);20~40 岁这一年龄段的人几乎占了伤害总人数的 50%。在 5~10 岁组及 >65 岁组有一个小幅上升。从事农林牧渔业为最主要的受伤害人群,计 827 例(30.12%),几乎占了伤害总人数的三分之一,其次为从事生产运输业 573 例(20.87%),再次为学生 248 例(9.03%),以下依次为专业技术人员、服务业、家务、办公管理、其他等。伤害类型中,前三位原因分别为机械性损伤(925 例,占 33.69%)、交通事故(884 例,占 32.19%)、

跌倒(334 例,占 12.16%),以下按构成比分别为烧烫伤、其他、溺水、触电及自然和环境因素损伤。中毒患者全年登记,计 546 例,男女比例为 1.1:1。意外中毒为主,以 20~40 岁年龄段多见,最高发为 30~35 岁年龄组。职业主要以农林牧渔业及生产运输业为主。毒物按发生构成顺位,前三位分别为其他化学品中毒、农药中毒及药物中毒。从伤害地点分布看,2746 例伤害患者中,发生于公共场所 2058 例,占 74.95%;其中又以发生于街道公路的为最多,计 1039 例,职业环境 630 例,公共娱乐场所 281 例,发生于家中的 686 例,其他 2 例。

3. 讨论:绍兴市人群伤害发生年龄、地点及职业分布与全国其他地区无明显地区差异。机械性损伤、交通事故和跌倒分别为绍兴市急性伤害前三位原因。这是因为绍兴市的各种纺织及纺织机械企业众多,大量的外来人口在企业工作时没有相应的操作培训并忽视劳动保护,导致受伤事件频发。急救中心的登记资料表明,近年来因车祸就诊人数每年均在递增,车祸死亡率也一直居高不下。按此情况发展,交通事故的排名将会超过机械性损伤。绍兴市中毒前三位原因(化学品、农药、药物)与深圳前三位排名(食物、其他化学品和药物)不同,除绍兴市的气候原因外,与绍兴人喜食霉、腌等不易腐烂变质且易贮存的食物有关。而近年来纺织企业的增多使与染料直接接触及污染水或食品等引起的中毒增加,故化学品中毒占了首位。另一方面,与工业发达的深圳市相比,绍兴市农业及种植业人口相对较多,大部分农民在进工厂的同时仍不辍耕种,由此引起的农药中毒仍较常见。

基金项目:国家科技部 2000 年度科技基础性工作专项基金资助项目(116)

作者单位:310006 杭州,浙江大学医学院附属第一医院重症监护室[朱文琴(现工作单位:312000 绍兴市人民医院)、方强];绍兴市人民医院急诊科(俞士梅、赵晖)

(收稿日期:2004-12-16)
(本文编辑:尹廉)