

## · 临床流行病学 ·

## MTHFR 基因、CBS 基因、环境因素与先天性心脏病的病例对照研究

仇小强 钟秋安 曾小云 李永红 聂绍发

**【摘要】 目的** 探讨父母亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T、胱硫醚  $\beta$ -合酶(CBS)基因 T833C、环境因素与子代先天性心脏病(CHD)发生之间的关联。**方法** 采用1:1配对病例对照研究方法,分析 115 对 CHD 患儿与对照儿父母的环境暴露因素,并检测其 MTHFR 与 CBS 基因型,对 CHD 可能的危险因素进行单因素及多因素条件 logistic 回归分析。**结果** 母亲怀孕早期接触农药( $OR = 8.62$ )、妊娠合并症( $OR = 2.069$ )、孕早期感冒( $OR = 4.125$ )、孕期情绪状况( $OR = 4.653$ )、母亲 MTHFR 基因 677TT 型( $OR = 3.872$ )共 5 个因素为子代发生 CHD 的危险因素。**结论** 母亲 MTHFR 基因 677TT 型与子代 CHD 发生有关,未发现父母 CBS 基因 T833C 与子代 CHD 存在关联,母亲怀孕早期接触农药、妊娠合并症、孕早期感冒、孕期情绪紧张或忧郁可能增加子代发生 CHD 的危险。

**【关键词】** 先天性心脏病;亚甲基四氢叶酸还原酶;胱硫醚  $\beta$ -合酶;基因;环境因素

**A case-control study on congenital heart diseases with methylenetetrahydrofolate reductase gene, cystathionine  $\beta$ -synthase gene, and environmental factors** QIU Xiao-qiang\*, ZHONG Qiu-an, ZENG Xiao-yun, LI Yong-hong, NIE Shao-fa. \*Department of Epidemiology and Statistics, Public Health School, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: QIU Xiao-qiang. Department of Epidemiology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

**【Abstract】 Objective** To explore congenital heart diseases(CHD) in their offsprings in association with parental methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene C677T, cystathionine  $\beta$ -synthase(CBS) gene T833C, and environmental factors. **Methods** A 1:1 case-control study was carried out to investigate 115 pairs of case and controled children and their parents, and the parents' MTHFR gene 677 C $\rightarrow$ T mutation and CBS gene 833 T $\rightarrow$ C mutation were also identified. The possible risk factors were analysed by simple and multiple factors logistic regression methods. **Results** Results revealed that 5 factors were related to the occurrence of CHD in the offsprings: maternal exposures to pesticides in the early stage of pregnancy ( $OR = 8.62$ ), suffering from diseases during pregnancy( $OR = 2.069$ ), catching cold in the early stage of pregnancy( $OR = 4.125$ ), under depressed or nervous condition during pregnancy( $OR = 4.653$ ), maternal MTHFR 677TT genotype( $OR = 3.872$ ). **Conclusion** These results suggested that maternal MTHFR 677TT genotype was one of the risks to the occurrence of CHD in offspring but parents' CBS gene 833 T $\rightarrow$ C mutation did not get involved in CHD. In addition, the occurrence of CHD was related to maternal exposures to pesticides, catching a cold, suffering from diseases, depressed or under nervous condition in the early stage of pregnancy or during pregnancy.

**【Key words】** Congenital heart disease; Methylenetetrahydrofolate reductase; Cystathionine  $\beta$ -synthase; Gene; Environmental factors

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)发病率波动范围为活产婴儿的4‰~50‰<sup>[1]</sup>,目前认为大多数 CHD 是环境因素与遗传因素共同作用所致的多基因遗传病。研究表明高同型半胱氨酸

(homocysteine, Hcy)血症能诱发鸡胚或鼠胚早期的心血管系统产生畸形<sup>[2,3]</sup>, N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-亚甲基四氢叶酸还原酶(5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)和胱硫醚 $\beta$ -合酶(cystathionine  $\beta$ -synthase, CBS)为 Hcy 代谢途径的关键酶,两者的活性降低均可能导致高 Hcy 血症<sup>[4,5]</sup>,而 MTHFR 和 CBS 的活性则受其基因突变的影响, MTHFR 基因 C677T、CBS 基因 T833C 为各自酶最常见的突变位点, MTHFR 基因 C677T 与 CHD 的研究鲜有报道,两

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金资助项目(0448049)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院公共卫生学院流行病学与卫生统计学系(仇小强、聂绍发);广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室(钟秋安、曾小云、李永红)

第一作者工作单位:530021 南宁,广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室

者的关系尚无一致定论,故未见有 CBS 基因 T833C 与 CHD 关系的研究报道,因此本项研究同时考虑环境暴露因素的影响,对父母 MTHFR 基因 C677T、CBS 基因 T833C、环境因素与子代 CHD 发生风险的关系作进一步的综合研究,旨在明确父母三方面因素与子代 CHD 的关系。

### 对象与方法

1. 研究对象:2003 年 11 月至 2004 年 12 月间在广西医科大学第一附属医院、南宁市第二人民医院、广西区妇幼保健院、广西区人民医院就诊的 132 例单纯性 CHD 患儿,患儿来自南宁市、柳州市、桂平市、邕宁县、平南县等广西各地市县乡镇,均经过临床诊断、超声心动图确诊且排除心脏血管之外的其他畸形。按 1:1 配对在相同医院病区选取对照,且符合出生日期  $\pm 6$  个月以内、性别相同、无遗传和出生缺陷疾病、患其他与出生缺陷无关的疾病者。

2. 分析因素的定义:接触农药指在无保护措施下农业作业持续喷洒液体农药或以手接触固体农药施放于植物处或由于意外一次较大剂量接触某种农药。妊娠合并症指妊娠时患心脏病、糖尿病、慢性肾炎、甲状腺功能亢进和性传播疾病等。精神刺激事件指突然遭到强烈刺激引起的精神紧张和内心矛盾,如一级亲属的死亡或与他人存在激烈的矛盾冲突、丢失贵重物品等。情绪状况为母亲对整个妊娠过程主导的情绪的概括。

3. 现场调查及血样 DNA 提取:对病例及对照儿的亲生父母进行访谈式问卷调查,调查前向父母提供知情同意书并获签字。现场调查各环节始终采用严格的质量控制措施,保证信息的可靠性和完整性,调查内容有子女出生体重、母亲职业、母亲怀孕早期(妊娠第 1 周始至 12 周结束)是否感冒、有无妊娠合并症、孕早期是否经历精神刺激事件、母亲孕期情绪状况、父亲是否吸烟等备查项目和分析项目共 45 项,包括待分析的父母 MTHFR 及 CBS 基因型实验项目。调查结束后抽取父母静脉血 3 ml,血样经柠檬酸钠抗凝,用苯酚/氯仿法提取基因组 DNA,其纯度用核酸测试仪检测,吸光度  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.6~1.8 之间,DNA 样本  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

#### 4. 基因型检测:

(1)试剂:各引物由大连 TaKaRa 宝生物公司合成,Taq DNA 聚合酶、dNTP mixture、Hinf I 限制酶、标志物购自大连 TaKaRa 宝生物公司,琼脂糖等

试剂购自上海生物工程公司。

(2)MTHFR 基因 C677T:应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析,扩增引物序列上游:5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3',下游:5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'<sup>[4]</sup>;反应体系 25  $\mu\text{l}$ : 10 $\times$  buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  15 mmol/L) 2.5  $\mu\text{l}$ , dNTP(0.2 mmol/L) 1.0  $\mu\text{l}$ , 上游引物(0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 2.92  $\mu\text{l}$ , 下游引物(0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ , 基因组 DNA(0.1~1  $\mu\text{g}$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶(1 U) 0.7  $\mu\text{l}$ , 灭菌双蒸水 14.38  $\mu\text{l}$ ; PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, (95 $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 62 $^{\circ}\text{C}$  退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 55 s)  $\times 30$  个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min; PCR 产物用限制性内切酶 Hinf I 37 $^{\circ}\text{C}$  消化过夜后,行 12% (W/V) 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳观察结果,基因型的判定参考文献[4]。

(3)CBS 基因 T833C:应用 PCR-扩增阻滞突变体系 (ARMS) 分析,扩增引物序列上游:5'-GGA GAA GTG TCC TGG ATG CA-3',下游:(野生型) 5'-CCC TTC GGG ATC CAC CCC AA-3', (突变型) 5'-CCC TTC GGG ATC CAC CCC AG-3'<sup>[5]</sup>;反应体系 30  $\mu\text{l}$ : 10 $\times$  buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  15 mmol/L) 3.0  $\mu\text{l}$ , dNTP(0.2 mmol/L) 2.4  $\mu\text{l}$ , 上下游及内对照引物各(0.2  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.2  $\mu\text{l}$ , 基因组 DNA(0.1~1  $\mu\text{g}$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶(1.5 U) 1.0  $\mu\text{l}$ , 灭菌双蒸水 16.8  $\mu\text{l}$ ; PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min (95 $^{\circ}\text{C}$  变性 60 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  退火 75 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 120 s)  $\times 30$  个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min; PCR 产物直接经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果,基因型的判定参考文献[5]。

5. 统计学分析:资料完整的 CHD 患儿与对照儿为 115 对,整理出 24 个 CHD 可能的危险因素,应用 SAS V8 统计软件对因素进行条件 logistic 回归分析,先对可能的危险因素作单因素分析,将有统计学意义的因素作多因素 logistic 逐步回归分析。其他数据分析作  $\chi^2$  检验。

### 结 果

1. 基本情况:115 对 CHD 患儿与对照儿,其中男性 88 对、女性 27 对。CHD 患儿年龄在 0.02~9.25 岁之间,中位年龄 2.54 岁;对照儿年龄在 0.01~9.83 岁之间,中位年龄 2.03 岁。115 例患儿 CHD 各类型百分比其中室间隔缺损 40% (46 例)、动脉导管未闭 12.2% (14 例)、法洛氏四联症 11.3% (13 例)、房间隔缺损 5.2% (6 例)、其他单纯类型 7% (8 例)、复杂型

CHD(合并有至少 2 种类型者)24.3%(28 例)。

2. 均衡性比较:病例组与对照组父母文化程度、职业、民族、居住地、遗传病史、母亲孕龄及流产史比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),认为两组具有较好的可比性。

3. 基因型:MTHFR 目的基因长度为198 bp,根据 Hinf I 酶切后片段长度的不同分为三种基因型,即 C/C 型(野生型纯合子)、T/T 型(突变型纯合子)、C/T 型(突变型杂合子)。CBS 目的基因长度为 870 bp,根据与不同引物结合后扩增的结果分为 T/T 型(野生型纯合子)、C/C 型(突变型纯合子)、T/C 型(突变型杂合子)。

4. 单因素分析:在 $\alpha = 0.1$ 水平从 24 个分析因素中初筛出 11 个 CHD 可疑的危险因素,见表 1。

5. 多因素分析:对初筛出 11 个因素进行多因素条件 logistic 逐步回归分析,按选入  $\alpha = 0.1$ ,剔除  $\alpha = 0.15$ 水平筛选出 5 个 CHD 的危险因素,各因素参数值及相对危险度见表 2。

### 讨 论

CHD 的预防工作面临着如何鉴别高风险母亲个体的困难,如果能鉴别母亲为高风险个体,再通过对环境因素或母体本身因素进行干预,就有可能避免胎儿致病<sup>[6]</sup>。国内外有研究表明,母亲 Hcy 水平

升高与子女 CHD 发生相关<sup>[7,8]</sup>,因此研究亲代 Hcy 代谢途径关键酶基因多态性与子代发生 CHD 的关系具有为判断高风险亲代个体提供科学依据的意义。以往的研究仅单独分析某个基因或环境因素与 CHD 的关系,这存在一定的局限性,CHD 为多基因遗传病,较全面的判断高风险个体及研究其病因需要考虑遗传与环境因素的作用,本项研究为 MTHFR 基因、CBS 基因、环境因素的综合研究,多因素分析结果表明母亲怀孕早期接触农药、妊娠合并症、孕早期感冒、孕期情绪状况、母亲 MTHFR 基因 677TT 型为子代发生 CHD 的危险因素。

怀孕早期接触农药在各危险因素中最高( $OR = 8.62, 95\% CI: 1.160 \sim 62.238$ ),表明接触农药的母亲较未接触农药的母亲娩出 CHD 患儿的风险高出 8.62 倍。某些农药的成分已被毒理实验证实具有致畸作用,流行病学调查表明母亲孕早期暴露于除草剂(herbicides)和灭鼠剂(rodenticides)与胎儿发生大动脉错位(transposition of the great arteries, TGA)有关<sup>[9]</sup>,亦有动物实验用除草醚(nitrofen)成功诱导小鼠胚胎发生 CHD<sup>[10]</sup>。本次调查对象接触农药的主要方式为在无保护措施下田间作业持续喷洒液体农药或以手接触固体农药,某些农药成分可经呼吸道或皮肤黏膜吸收进入人体,继而以化合物的形式影响胚胎心血管系统发育。

表1 CHD 危险因素的单因素分析

因 素	$\beta$	$s_x$	Wald $\chi^2$ 值	P 值	OR 值(95% CI)
孕早期接触农药	1.504	0.782	3.702	0.0544	4.500(0.972~20.825)
妊娠合并症	0.956	0.372	6.594	0.0102	2.600(1.254~5.391)
妊娠剧吐	1.674	0.629	7.078	0.0078	5.332(1.554~18.297)
孕早期发热	1.609	0.775	4.317	0.0377	4.999(1.095~22.814)
孕早期感冒	1.099	0.320	11.768	0.0006	3.000(1.601~5.620)
孕早期服抗生素	0.762	0.458	2.771	0.0960	2.142(0.874~5.254)
孕早期使用孕激素	0.876	0.532	2.705	0.1000	2.400(0.846~6.812)
孕早期服中成药	0.669	0.268	6.215	0.0127	1.952(1.154~3.303)
孕早期精神刺激事件	1.022	0.389	6.907	0.0086	2.778(1.297~5.951)
孕期情绪状况	1.085	0.259	17.621	<0.0001	2.960(1.783~4.912)
母亲 MTHFR 基因型			5.093	0.0783	
C/T 型	0.096	0.296	0.105	0.7450	1.101(0.616~1.968)
T/T 型	1.225	0.543	5.088	0.0246	3.403(1.174~9.862)

注:孕期情绪状况为有序分类变量,分 3 个等级,赋值为愉快=1,一般=2,紧张或忧郁=3;母亲 MTHFR 基因型为无序分类变量,其赋值为 C/C 型=1, C/T 型=2, T/T 型=3,分析时采用伪变量处理,以 C/C 型作为参照;其他变量均为二项分类变量

表2 CHD 危险因素的多因素分析

因 素	$\beta$	$s_x$	Wald $\chi^2$ 值	P 值	OR 值(95% CI)
孕早期接触农药	2.512	1.089	7.365	0.0160	8.620(1.160~62.238)
妊娠合并症	0.879	0.358	6.258	0.0325	2.069(1.027~6.103)
孕早期感冒	0.962	0.589	15.322	0.0001	4.125(2.026~10.569)
孕期情绪状况	1.681	0.452	18.302	<0.0001	4.653(2.216~8.945)
母亲 MTHFR 基因型			5.177	0.0752	
C/T 型	0.223	0.335	0.446	0.5040	1.250(0.649~2.409)
T/T 型	1.354	0.609	4.937	0.0260	3.872(1.173~12.780)

孕妇患妊娠合并症 ( $OR = 2.069$ ,  $95\% CI: 1.027 \sim 6.103$ ) 处于病理条件下妊娠, 孕期母亲患糖尿病、苯丙酮尿症等疾病已被确认与子代先天性心血管畸形发生有关, 本次调查对象患贫血、甲状腺功能亢进、浅表性胃炎、慢性胆囊炎等疾病, 异常妊娠直接导致系统机制紊乱, 且机体暴露于药物和病原体的概率增加, 此外, 这些个体的情绪往往处于紧张或忧郁状态中, 有协同作用造成胚胎发育所需要的内环境恶化的可能性, 影响心血管发育。

与王束玫等<sup>[11]</sup>的分析一致, 本次分析亦表明母亲孕早期感冒为 CHD 发生的危险因素 ( $OR = 4.125$ ,  $95\% CI: 2.026 \sim 10.569$ )。引起人类感冒的病原体有鼻病毒、微小病毒属的柯萨奇和埃可病毒、腺病毒等, 有研究显示在 CHD 患者心肌组织中检测到微小病毒 B19 DNA 存在, 定位于细胞核内, 提示宫内感染该病毒与 CHD 发生有关<sup>[12]</sup>。

母亲孕期情绪状况的  $OR$  值为  $4.653$  ( $95\% CI: 2.216 \sim 8.945$ ), 表明母亲孕期情绪从愉快到紧张或忧郁每增加一级, 则子女发生 CHD 的危险性就上升  $4.653$  倍。孕早期母亲经历精神刺激事件可能增加胎儿发生 CHD 的风险<sup>[13,14]</sup>, 但本研究该因素并未被选入多因素方程中。经历精神刺激事件的母亲情绪必然导致紧张或忧郁, 但情绪紧张或忧郁的母亲未必经历精神刺激事件, 本次调查对象有的处于家庭不和、生育男婴的压力、个人情绪易紧张发怒等状态下, 这种状态尚不构成精神刺激事件, 但却有贯穿整个孕期持续时间久的特点, 长期紧张或忧郁使孕妇机体激素分泌及代谢紊乱, 影响胚胎正常发育的概率增加, 这可能是孕期情绪状况被筛选作为危险因素, 而精神刺激事件未被选入的原因之一。

MTHFR 基因 C677T 已成为近年来的研究热点, 与之有关的疾病研究有出生缺陷、孕妇不明原因流产、冠状动脉血栓形成等, 其中与出生缺陷相关的研究主要集中在神经管畸形<sup>[15]</sup>, 亦有为数不多与 CHD 关系的研究, 如刘虹等<sup>[7]</sup>认为母亲 MTHFR 第 677 位的突变与子女 CHD 的发生无相关性, 而 Wenstrom 等<sup>[8]</sup>研究表明母亲 C677T 突变型与后代 CHD 发生有关。本项研究显示母 MTHFR 基因 677TT 型为子代 CHD 发生的危险因素之一 ( $OR = 3.872$ ,  $95\% CI: 1.173 \sim 12.780$ ), 这与 Wenstrom 等<sup>[8]</sup>的研究相似, 该基因型的作用可能是由于突变导致该酶的活性下降, 从而引起 Hcy 浓度升高有关。本项研究认为父母 CBS 基因型与子女发生

CHD 无关联。机体内 Hcy 浓度水平除了受到 MTHFR 基因和 CBS 基因影响外, 还有甲硫氨酸合酶基因及体内叶酸、VitB6、VitB12 等因素的影响, 且本项研究的两个基因各自尚有多位点多态性存在, 因此 MTHFR 基因 C677T 是否在 Hcy 代谢途径中起着主导作用, 为引起 Hcy 水平升高的主要内因尚有待进一步研究。

本项研究经多因素分析明确父母 MTHFR 基因 C677T、CBS 基因 T833C、环境暴露因素与子代 CHD 的关系, 这对今后更好地开展该病一级预防和进一步研究其病因具有一定的参考价值。但研究受样本含量及基因位点的代表性限制, 要全面阐明 MTHFR 基因、CBS 基因、环境因素与 CHD 之间的内在联系, 仍需增加样本量及基因位点进一步研究。

#### 参 考 文 献

- Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39: 1890-1900.
- Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15227-15232.
- 赵如冰, 李勇, 陈星. 同型半胱氨酸对体外培养大鼠胚胎生长发育的影响. *卫生研究*, 2001, 30: 34-36.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 1995, 10: 111-113.
- Tsai MY, Garg U, Key NS, et al. Molecular and biochemical approaches in the identification of heterozygotes for homocystinuria. *Atherosclerosis*, 1996, 122: 69-77.
- Chien KR. Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature*, 2000, 407: 227-232.
- 刘虹, 李松, 叶鸿瑁, 等. 血浆同型半胱氨酸、叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与先天性心脏病的相关性研究. *中华围产医学杂志*, 2002, 5: 102-104.
- Wenstrom KD, Johanning GL, Johnston KE, et al. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 184: 806-817.
- Loffredo CA, Silbergeld EK, Ferencz C, et al. Association of transposition of the great arteries in infants with maternal exposures to herbicides and rodenticides. *Am J Epidemiol*, 2001, 153: 529-536.
- Kim WG, Suh JW, Chi JG. Nitrofen-induced congenital malformations of the heart and great vessels in rats: an animal model. *J Pediatr Surg*, 1999, 34: 1782-1786.
- 王束玫, 李绍忱, 赵跃进, 等. 儿童单纯性先天性心脏病之危险因素及作用方式的探讨. *中华流行病学杂志*, 1994, 15: 304-307.
- Wang X, Zhang G, Liu F, et al. Prevalence of human parvovirus B19 DNA in cardiac tissues of patients with congenital heart diseases indicated by nested PCR and in situ hybridization. *J Clin Virol*, 2004, 31: 20-24.
- Carmichael SL, Shaw GM. Maternal life event stress and congenital anomalies. *Epidemiology*, 2000, 11: 30-35.
- 张泽峰, 李竹, 季成叶, 等. 孕早期精神受刺激对出生儿单纯性先心病发病的影响. *中国公共卫生*, 1999, 15: 307-308.
- Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 2000, 151: 862-877.

(收稿日期: 2005-08-25)

(本文编辑: 张林东)