

## · 现场调查 ·

## 山西省神经管畸形影响因素的病例对照研究

王芳 杨艳芳 李佩珍

**【摘要】** 目的 探索山西省神经管畸形(NTDs)患儿发生的影响因素。方法 采用1:1匹配的病例对照研究设计,对医院收集的病例组和对照组孕妇进行问卷调查,采集肘静脉血标本2 ml,检测亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性。使用条件 logistic 回归模型,对 MTHFR 基因及其他因素进行单因素及多因素分析,筛选山西省 NTDs 患儿发生的影响因素。结果 MTHFR 基因 677 位点有 3 种基因型,即野生型 CC、杂合突变型 CT 和纯合突变型 TT,3 种基因型在病例组和对照组间分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 14.61, P = 0.001$ ),病例组 T 等位基因频率(60.6%)高于对照组(41.4%),差异有统计学意义( $\chi^2 = 14.59, P < 0.001$ )。经单因素条件 logistic 回归分析有统计学意义的变量 15 项引入多因素条件 logistic 回归,最终进入模型的变量有 4 项,分别为既往孕次( $OR = 2.87, 95\% CI: 1.28 \sim 6.44$ )、孕早期接触化肥( $OR = 16.18, 95\% CI: 1.18 \sim 221.59$ )和经常食用发芽土豆( $OR = 4.66, 95\% CI: 1.78 \sim 12.17$ )以及 MTHFR 基因 677 位点突变( $OR = 2.13, 95\% CI: 1.08 \sim 4.21$ )。结论 孕次、孕早期接触化肥、食用发芽土豆和 MTHFR 基因 677 位点突变是山西省 NTDs 患儿发生的主要危险因素。

**【关键词】** 神经管畸形; 影响因素; 病例对照研究

A case-control study on the risk factors of neural tube defects in Shanxi province WANG Fang\*, YANG Yan-fang, LI Pei-zhen. \*Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China  
Corresponding author: LI Pei-zhen, Email: lipz228@sina.com

**【Abstract】** Objective To explore the risk factors of neural tube defects (NTDs) in Shanxi province where the incidence of NTDs had been the highest in China. Methods 1:1 matched case-control study was used. All the objects collected from hospitals were investigated in standardized questionnaires about susceptible risk factors for NTDs and were genotyped for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism by PCR-RFLP method. The risk factors of NTDs were analyzed by conditional logistic regression and by SPSS 11.5 statistical software. We also analyzed the univariable and multi-variables in order to independently investigate the MTHFR genotype and maternal periconceptional adverse factors influencing on NTDs. Results Comparing MTHFR gene frequency between case group and control group, our results showed that three genotypes were found in MTHFR C677T. There was significant difference between two groups at 0.01 level ( $\chi^2 = 14.61, P = 0.001$ ) about the three genotypes. The MTHFR T allele frequency of mother with NTDs (60.6%) was higher than that of the control (41.4%), and there was significant difference between them ( $\chi^2 = 14.59, P < 0.001$ ). By univariate conditional logistic regression analysis, it was indicated that 15 factors were correlated with NTDs ( $P < 0.05$ ) in the level  $\alpha = 0.05$ . By multi-variables conditional logistic regression analysis, four factors were connected to NTDs: frequency of pregnancy ( $OR = 2.87, 95\% CI: 1.28-6.44$ ), contacting chemical combination in early pregnancy ( $OR = 16.18, 95\% CI: 1.18-221.59$ ), frequent taking of germinated potato ( $OR = 4.66, 95\% CI: 1.78-12.17$ ) and MTHFR C677T mutation ( $OR = 2.13, 95\% CI: 1.08-4.21$ ). Conclusion Factors as 'frequency of pregnancy', 'history of contacting chemicals', 'taking germinated potatoes in early pregnancy', as well as 'MTHFR C677T mutation' in mothers were important risk factors affecting the occurrence of NTDs in Shanxi province.

**【Key words】** Neural tube defects; Risk factors; Case-control study

神经管畸形(NTDs)是指在胚胎发育早期,由于

基金项目:国家“973”发展规划资助项目(2007CB511901);山西省自然科学基金资助项目(200601113)

作者单位:100020 北京,首都儿科研究所分子免疫室(王芳);山东大学公共卫生学院(杨艳芳);遵义医学院珠海校区预防医学系(李佩珍)

通讯作者:李佩珍,Email:lipz228@sina.com

遗传倾向与一些致畸因素的影响,导致神经管闭合不全而产生的一组出生缺陷,主要包括无脑儿、脊柱裂、脑或脑脊膜膨出等<sup>[1]</sup>。我国是世界上 NTDs 的高发国家,山西省又是全国 NTDs 的最高发地区<sup>[2]</sup>。因此,在山西省进行 NTDs 影响因素的研究并探索病因,不仅可为降低山西省 NTDs 的发生率提供重

要的理论依据,而且可为降低我国 NTDs 的发生率提供参考依据。

**对象与方法**

1. 对象的选择:采用 1:1 匹配的病例对照研究,选取 2003 年 1 月至 2004 年 10 月在山西省 6 个地区的医院生育 NTDs 患儿或 B 超诊断为 NTDs 患儿而引产的母亲 99 例为病例组,同期生育正常儿的母亲或与病例组孕周相近的 B 超诊断为正常的孕妇 99 名为对照组。配比条件为:两组母亲该次妊娠时年龄相差  $\pm 3$  岁,孕周相差  $\pm 4$  周,同民族、同县乡。99 例 NTDs 患儿中男性 52 例,女性 47 例;无脑儿 41 例,脊柱裂 27 例,脑膨出 15 例,复合畸形 16 例。

2. 方法:对病例组孕妇在分娩或终止妊娠(对照组在分娩或 B 超诊断为正常)后 24 h 内进行问卷调查,并采集肘静脉血 2 ml,提取 DNA,采用 PCR-RFLP 方法检测调查对象  $N_5-N_{10}$  亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 677 位点多态性。引物参照文献<sup>[3]</sup>,分别为 P1:5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3';P2:5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'。调查内容:①一般情况;②NTDs 可疑影响因素(既往史、家族疾病史、孕早期饮食、患病以及接触有害物质情况等),可疑影响因素赋值见表 1;③新生儿情况/B 超检测情况。

**表 1** NTDs 可疑影响因素及赋值方式

影响因素	赋值
文化程度	文盲=1,小学=2,初中=3,高中及中专=4,大专及大学以上=5
孕次	1~5 次,规定:≥5 次,按 5 次处理
产次	0~4 次,规定:≥4 次,按 4 次处理
生育缺陷儿史	无=0,有=1
流产史	无=0,有=1
妊娠发热	无=0,有=1
妊娠剧吐	无=0,轻=1,重=2
先兆流产	无=0,有=1
孕期贫血	无=0,有=1
农药	无=0,有=1
化肥	无=0,有=1
抗菌药物	无=0,有=1
叶酸制剂	无=0,有=1
新鲜蔬菜	未吃=0,1~2 次/周=1,≥3 次/周=2
新鲜水果	<3 次/周=0,≥3 次/周=1
发芽土豆	未吃=0,1~2 次/周=1,≥3 次/周=2
丈夫吸烟	无=0,有=1
MTHFR 基因突变	野生型=0,杂合突变型=1,纯合突变型=2
孕早期 BMI	<24=0,24~ =1,26~ =2
NTDs	对照=0,病例=1

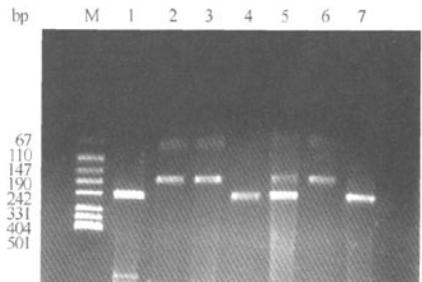
3. 统计学分析:将调查资料与实验室检测结果核查,建立数据库,用 SPSS 11.5 统计分析软件对数据进行分析。统计方法为  $\chi^2$  检验、条件 logistic 回

归单因素及多因素分析。

**结 果**

1. 一般情况:本研究按 1:1 配对共调查 99 例病例和 99 名对照。其中 60.6% 为农村人口,26.8% 为城镇人口,12.6% 为城市人口。病例组妇女分娩年龄在 20~41 岁,平均 28.3 岁  $\pm 4.44$  岁;对照组年龄为 20~44 岁,平均 27.9 岁  $\pm 4.09$  岁,两组年龄差异无统计学意义(配对  $t = 0.72, P > 0.1$ )。

2. MTHFR 基因扩增、酶切结果及基因分布:用设计的引物序列对 MTHFR 基因进行 PCR 扩增后,产生长度为 246 bp 的目的片段。该片段在 677 位点存在多态性,可以被限制性内切酶 Hinf I 酶切,呈三种类型:野生型(C/C)、杂合突变型(C/T)和纯合突变型(T/T)。其中,野生型无 Hinf I 酶切位点,电泳图像仅表现为一条带 246 bp;纯合突变型的两条链均可以被切开,表现为两条带 174 bp 和 72 bp,杂合突变型表现为三条带,246 bp、174 bp 和 72 bp(图 1)。MTHFR 基因 677 位点基因型分布在对照组进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 ( $P > 0.05$ ),符合遗传平衡定律。MTHFR 基因 677 位点基因型和等位基因在病例组和对照组中的分布见表 2 和 3,基因型和等位基因频率在两组间分布差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。



注:1:PCR 扩增产物;2、3、6:纯合突变型;4、7:野生型;5:杂合突变型

**图 1** MTHFR 基因 PCR 扩增产物及酶切电泳图

3. NTDs 可疑影响因素条件 logistic 回归单因素分析结果:用条件 logistic 回归分析方法对可疑影响因素进行单因素筛查,结果见表 4。

**表 2** MTHFR 基因 677 位点基因型在病例组和对照组中的分布

组别	例数	基因型频率		
		CC	CT	TT
病例组	99	14(14.1)	50(50.5)	35(35.4)
对照组	99	34(34.3)	48(48.5)	17(17.2)

注:括号外数据为例数,括号内数据为频率(%); $\chi^2 = 14.605, P = 0.001$

**表3 MTHFR 基因 677 位点等位基因在病例组和对照组中的分布**

组别	等位基因频率			
	C	频率(%)	T	频率(%)
病例组	78	39.4	120	60.6
对照组	116	58.6	82	41.4

注： $\chi^2 = 14.592, P < 0.001$

**表4 NTDs 可疑影响因素条件 logistic 回归单因素分析**

可疑因素	$\beta$	$s_e$	Wald $\chi^2$ 值	P 值	OR 值(95% CI)
文化程度	-0.584	0.250	5.444	0.020 <sup>a</sup>	0.558(0.341~0.911)
孕次	1.304	0.311	17.531	0.000 <sup>b</sup>	3.683(2.001~6.780)
产次	0.493	0.265	3.455	0.063	1.637(0.973~2.752)
生育缺陷儿史	3.954	1.961	4.065	0.044 <sup>a</sup>	52.120(1.117~2434.9)
流产史	1.897	0.619	9.389	0.002 <sup>b</sup>	6.667(1.981~22.435)
妊娠发热	2.639	1.035	6.500	0.011 <sup>a</sup>	14.000(1.841~106.47)
妊娠剧吐	0.718	0.303	5.591	0.018 <sup>a</sup>	2.049(1.131~3.715)
先兆流产	1.099	0.516	4.526	0.033 <sup>a</sup>	3.000(1.090~8.254)
孕期贫血	1.204	0.658	3.345	0.067	3.330(0.917~12.112)
农药	2.197	1.054	4.345	0.037 <sup>a</sup>	9.000(1.140~71.038)
化肥	2.303	1.049	4.820	0.028 <sup>a</sup>	10.000(1.280~78.117)
抗菌药物	1.030	0.521	3.906	0.048 <sup>a</sup>	2.800(1.009~7.774)
叶酸制剂	-0.486	0.449	1.167	0.280	0.615(0.255~1.485)
新鲜蔬菜	-0.394	0.288	1.878	0.171	0.674(0.384~1.185)
新鲜水果	-0.693	0.283	5.083	0.024 <sup>a</sup>	0.528(0.303~0.920)
发芽土豆	1.437	0.357	16.231	0.000 <sup>b</sup>	4.210(2.092~8.472)
丈夫吸烟	0.944	0.315	8.991	0.003 <sup>b</sup>	2.571(1.387~4.767)
MTHFR 基因突变 <sup>c</sup>	0.772	0.225	11.789	0.001 <sup>b</sup>	2.163(1.393~3.361)
孕早期 BMI	0.316	0.087	13.342	0.000 <sup>b</sup>	1.372(1.158~1.625)

注：<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> MTHFR 基因 677 位点等位基因突变个数

从表 4 可以看出,在  $\alpha = 0.05$  水平上,单因素有意义的因素包括:文化程度、孕次、生育缺陷儿史、流产史、妊娠发热( $\geq 38^\circ\text{C}$ )、妊娠剧吐、先兆流产、接触农药化肥、使用抗菌药物、食用新鲜水果、食用发芽土豆、丈夫吸烟、BMI 和 MTHFR 基因 677 位点突变。其中高文化程度和孕期经常摄入新鲜水果是保护因素,其他为危险因素。

4. NTDs 可疑影响因素条件 logistic 回归多因素分析结果:将单因素分析有意义的因素引入条件 logistic 多因素逐步回归模型,分析结果见表 5。

**表5 NTDs 可疑影响因素条件 logistic 回归多因素分析**

可疑因素	$\beta$	$s_e$	Wald $\chi^2$ 值	P 值	OR 值(95% CI)
孕次	1.053	0.413	6.498	0.011 <sup>a</sup>	2.867(1.276~6.444)
化肥	2.784	1.335	4.347	0.037 <sup>a</sup>	16.182(1.182~221.59)
发芽土豆	1.538	0.490	9.843	0.002 <sup>b</sup>	4.656(1.781~12.171)
MTHFR 基因突变	0.756	0.347	4.745	0.029 <sup>a</sup>	2.130(1.079~4.205)

注:同表 4

从表 5 可以看出,在 15 个单因素分析有意义的因素中,最终进入多因素分析有意义的因素有 4 个,分别是孕次、化肥、发芽土豆和 MTHFR 基因 677 位点突变。

### 讨 论

NTDs 是在胚胎发育的第 24-28 天,神经管的关闭受阻所致。多年的研究认为,NTDs 是多因素

疾病,是由多对微效基因共同作用,并受环境因素影响而引起的疾病。本次调查中,所有调查员经统一培训,在医院同时收集病例和对照,同一对病例、对照由同一个调查员登记填写,尽量避免调查对象提供的信息偏倚。所选病例和对照孕妇孕周相近,回忆偏倚相差不大。通过对山西省 NTDs 的影响因素分析发现,孕次、接触化肥、食用发芽土豆和 MTHFR 基因 677 位点突变是山西省 NTDs 患儿发生的主要环境和遗传危险因素。

1. 孕次与 NTDs 的关系:随着孕次的增加和孕妇年龄的增大,生殖细胞发育不良,进而导致受精卵的发育、分裂和分化不良;同时,随孕次的增加,子宫内膜不断受累,致使受孕期间蜕膜发育不良,胚胎的营养供给不足,容易引发胚胎畸形。多因素条件 logistic 回归分析发现孕次是 NTDs 的危险因素。提示:孕次增加可能是生育 NTDs 患儿的危险因素之一。

2. 接触化肥与 NTDs 的关系:山西省地处山区,经济和信息发展相对落后,绝大多数妇女为农村人口,并以农业为生,有些孕妇在孕早期难免接触农药、化肥。化肥的成分主要以磷酸盐、硫酸盐、硝酸盐和亚硝酸盐等为主,其中硝酸盐和亚硝酸盐类具有致畸作用,并在一些动物试验中造成了神经系统发育异常<sup>[4]</sup>。本研究孕妇孕早期接触化肥与 NTDs 的发生有一定的关系,单因素分析后引入多因素模型  $OR = 16.182$ 。在本研究中,孕妇接触“化肥”的暴露率很低,特别是在对照组,仅一例,偶然性造成的 P 值有统计学意义的可能性很大,同时考虑到病例对照研究难以避免的回忆偏倚,因此对该结果还需要进一步增加样本量来做解释。但是,由于化肥的一些成分已经证明对动物有毒性作用,因此妇女在妊娠期特别是妊娠早期应避免接触农药、化肥。

3. 食用发芽土豆与 NTDs 的关系:在冬春季,山西省农民以食用储藏白菜和土豆为主,饮食单调,不仅导致各种维生素和某些微量元素的缺乏,而且长期储藏的土豆,特别是发芽土豆,含有大量生物碱。土豆类生物碱对小鼠胚胎的生长发育及分化具有明显的损害作用<sup>[5]</sup>。它具有极强的胚胎毒性,人类对生物碱的敏感度比动物高 100~450 倍,孕妇如长期大量食用含生物碱较高的土豆,蓄积体内会产生致畸效应。而且,土豆中的生物碱并不能因常规的水浸、蒸、煮等烹调而减少。在我国东北长春地区也发现无脑儿、脊柱裂的形成与食用发芽的土豆有关<sup>[6]</sup>,从而更加证实了发芽土豆是导致 NTDs 患儿发生的

一个危险因素。因此,妇女在妊娠早期最好不吃发芽土豆。

4. 叶酸与 NTDs 的关系:从 20 世纪 80 年代起,世界各国学者针对 70 年代动物试验、临床和流行病学的提示,进行了环境因素对 NTDs 发生影响的研究,证实妇女体内叶酸缺乏是 NTDs 发生的主要病因<sup>[7]</sup>,妇女在妊娠前后服用叶酸可降低胎儿发生 NTDs 的危险性,使其发病率降低 50%~70%。

在本次 NTDs 影响因素的单因素分析中,并没有得出叶酸是 NTDs 的保护性因素这一结论。进一步的分析可以看出,在我们的调查对象中不论是病例组还是对照组妇女,叶酸的利用率都非常的低,病例组的利用率仅为 11.1%,对照组 16.2% ( $\chi^2 = 1.027, P > 0.1$ )。说明山西省育龄期妇女对叶酸预防 NTDs 的知识了解甚少,对叶酸的重视程度不够。相同的情况也在国内外其他地区存在。调查表明,美国、英国和挪威的妇女并没有很好的按推荐量来服用叶酸<sup>[8,9]</sup>。1997 年的一项调查显示美国仅有 32.2% 的育龄妇女(25 岁以下的妇女仅占 19%)服用叶酸增补剂,到 1997 年底,美国和英国虽然已经推荐叶酸增补剂七八年,但是 NTDs 的发病率似乎并没有下降<sup>[10-12]</sup>。

张乐等<sup>[13]</sup>通过对出生缺陷高发区与低发区孕早期妇女叶酸知行现状调查比较显示:山西省不论是城市还是农村地区,妇女对叶酸知识的知晓率和利用率都低于 NTDs 低发的江苏省,城市和农村分别仅有 31.1% 和 8.5% 人服用叶酸,并且,大多数妇女是在怀孕后才开始服用,错过了叶酸的最佳服用期。这一原因可能是山西省 NTDs 高发的重要因素。

5. MTHFR 基因 677 位点多态性与 NTDs 的关系:同型半胱氨酸(Hcy)是一种有潜在毒性的代谢产物,孕妇孕早期体内蓄积较多时,就可诱发 NTDs。到目前为止,国内外学者大多数认为 MTHFR 基因 677 位点突变可导致酶活性降低、Hcy 水平升高,是 NTDs 的危险因素。但也有学者研究认为,MTHFR 基因 677 位点突变在病例组和对照组分布无差异,不足以构成 NTDs 的危险因素。

本次研究中 MTHFR 基因 677 位点有 3 种基因型,即 CC、CT 和 TT。在对照组其基因型分布符合 Hardy-weinberg 遗传平衡定律,说明 MTHFR 基因的检测结果具有代表性。基因型频率(CC、CT、TT)在病例组的分布分别为 14.1%、50.5% 和 35.4%,在对照组的分布分别为 34.3%、48.5% 和 17.2%,T 易

感等位基因频率在病例组和对照组分别为 60.6%、41.4%,基因型和等位基因频率在两组间分布差异有统计学意义( $P < 0.01$ );在控制了混杂因素后发现 MTHFR 基因 677 位点突变增加了 NTDs 的危险性。说明母亲 MTHFR 基因 677 位点突变可能是山西省 NTDs 患儿发生的重要遗传因素,证明母亲 MTHFR 基因与后代发生 NTDs 之间存在病因学关联,与上述部分研究报道相一致,国内的研究也已证实该结论<sup>[14]</sup>。

Herrmann 等<sup>[15]</sup>国外学者发现 MTHFR677 位点 TT 基因型个体在维生素 B12 缺乏时容易得高 Hcy 血症。Harmon 等<sup>[16]</sup>报道 MTHFR677 位点 TT 基因型个体在叶酸缺乏时容易得高 Hcy 血症。这就提示我们 MTHFR 基因 TT 基因型作用的发挥在很大程度上取决于体内许多已知或未知营养素(包括叶酸、维生素、微量元素等)水平。因此,携带 TT 和 CC、CT 基因型个体相比,需要摄入更多的营养素。

#### 参 考 文 献

- [1] 曲梅,李竹. 神经管畸形相关基因研究进展. 遗传, 2002, 24(6): 695-698.
- [2] 全国妇幼卫生监测办公室. 全国妇幼卫生监测年会会议资料. 成都: 华西医科大学, 2000; 11.
- [3] 许海燕, 陈在嘉, 汤健, 等. 冠心病患者同型半胱氨酸代谢相关酶基因多态性的研究. 中华医学杂志, 1999, 79(6): 414-416.
- [4] Croen LA, Todoroff K, Shaw GM. Maternal exposure to nitrate from drinking water and diet and risk for neural tube defects. Am J Epidemiol, 2001, 153(4): 325-331.
- [5] 王学工, 李守柔. 土豆类生物碱的提取及其对小鼠胚胎致畸作用的研究. 中华妇产科杂志, 1993, 28(2): 73-75.
- [6] 武钢, 伦正兰. 中国优生学. 北京: 科学技术文献出版社, 2000.
- [7] 陈新, 李竹, 孙尚拱, 等. 妇女增补叶酸预防神经管畸形成果推广的成本-效果分析. 中华医学科研管理杂志, 2001, 14(2): 90-92.
- [8] Earl Ford. Serum and red blood cell folate concentrations, race, and education: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Clin Nutr, 1999, 69: 476-479.
- [9] Staff AC, Loken EB, Holven K, et al. Effects of public initiatives aimed at reducing neural tube defects with folic acid supplement. Tidsskr Nor Laegeforen, 2005, 125(4): 435-437.
- [10] Abramsky L, Botting B, Chapple T, et al. Has advice on periconceptional folate supplementation reduced neural-tube defects? Lancet, 1999, 354(9183): 998-999.
- [11] Kadir RA, Sabin C, Whitlow B, et al. Neural tube defect and periconceptional folic acid in England and Wales: retrospective study. BMJ, 1999, 319: 92-95.
- [12] CDC. Neural tube defect surveillance and folic acid intervention Texas-Mexico Border, 1993-1998. MMWR, 2000, 49(1): 1-3.
- [13] 张乐, 任爱国, 李智文, 等. 出生缺陷高发区与低发区孕早期妇女叶酸知行现状比较. 遗传与优生, 2004, 25(5): 293-298.
- [14] 朱慧萍, 李竹, 刀京晶, 等. 父母 MTHFR 基因型对后代发生神经管畸形的影响. 遗传, 2000, (5): 285-287.
- [15] Herrmann W, Obeid R, Schorr H, et al. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the B-Vitamins: A Facet of Nature-Nurture Interplay. Clin Chem Lab Med, 2003, 41(4): 547-553.
- [16] Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, et al. The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. Q J Med, 1996, 89(8): 571-577.

(收稿日期: 2008-01-15)

(本文编辑: 尹廉)