文章编号: 1001-0580(2009)09-1081-03 中图分类号: R 715.3 文献标志码: A 【论 著】

孕期化学物接触及基因多态性与先天性心脏病

李栋[1], 景学安[1], 王华义[2], 叶文静[1], 范华[1]

摘 要: 目的 探讨 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶 MTHFR基因 C677T多态性和孕期接触化学物与先天性心脏病的关系。方法 采用病例 – 对照研究设计, 选择 144例病例和 168例对照, 采用面访法和聚合酶链反应 – 限制性片段长度多态性分析法(PCR – RFLP)进行检测, 运用多因素 Logistic回归模型分析 MTHFR基因 C677T多态性与孕期化学物接触对先心病的作用强度和交互作用。结果 MTHFR677TT基因型发生先天性心脏病的风险是 MTHFR677CT或 CC基因型的 3.215倍(95% *CI* = 1.958~ 5.280); 孕期化学物接触与子代先天性心脏病关联强度 *OR* 值为 2.150(95% *CI* = 1.041~ 4.442); MTHFR677TT基因型与孕期化学物接触具有正相加交互作用, 交互作用的效应量(RERI)、归因交互效应百分比[AP(AB)]和纯因子间归因交互效应百分比[AP* (AB)]分别为 4.938, 60.23%, 68.59%。结论 MTHFR基因 C677T变异可与孕期接触化学物协同增加子代罹患先心病的危险性。

关键词: 先天性心脏病; 亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR); 基因多态性; 化学物; 交互作用

Correlations between MTHFR gene polymorphism, exposure to chemicals during pregnancy and congenital heart disease

LI Dong, JING Xue-an, WANG Hua-yi, et al. Institute of Epidemiology, Taishan Medical College (Tai'an 271016, China)

Abstract Objective To explore correlations between 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)'s C677T genetic point mutation, exposure to chemicals during pregnancy and congenital heart disease (CHD). **Methods** A total of 144 cases and 168 controls were selected for the case-control study and MTHFR C677T genotype was determined by polymerase chain reaction restricted fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Indicators of quantitative analysis for the intensity of interaction between MTHFR gene C677TT and exposure to chemicals were analyzed with stratified Logistic multiplicative regression. **Results** The risks of CHD for subjects with genotype MTHFR 677TT was 3.215 times (95% CI: 2.042 – 5.784) higher than the subjects with genotype MTHFR 677CT or CC. The OR of CHD for exposure to chemicals during pregnancy was 2.150 (95% CI: 1.958 – 5.280). There was additive interaction effect between genotype MTHFR 677TT and exposure to chemicals during pregnancy. The relative excess risk due to interaction (RERI), the attributable proportion due to interaction [AP(AB)] and the proportion of interaction effect between pure factors [AP* (AB)] were 4.938, 60.23%, 68.59%, respectively. **Conclusion** The interaction of MTHFR C677T genetic point mutation and exposure to chemicals during pregnancy may increase the risks of CHD of offspring in pregnant women.

Key words congenital heart disease; methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR); gene polymorphism; chemical; interaction

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD, 先心病)的病因非常复杂, 至今尚未完全明了, 目前较普遍的观点认为 CHD的发生绝大多数是遗传因素 – 环境因素相互作用的结果[1]。5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶 MTHFR基因为同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢途径关键酶, 由于 MTHFR基因 677C→T改变, 导致该酶活性降低, Hcy再甲基化为甲硫氨酸受阻, 从而引起高 Hcy血症, 具有胚胎毒性, 是一种能损害或干扰早期心血管生长发育的危险因子[2]。为了探讨先天性心脏病与孕期化学物接触、MTHFR基因多态性的关系和交互作用, 本研究于 2006– 2008年选择山东省泰安市和济宁市收治的先心病患儿 144例进行了观察。现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 收集泰安市中心医院、泰山医学院附属医院、泰安市妇幼保健院、济宁医学院附属医院 4所不同层次的综合医院收治, 经临床诊断、彩色多普勒超声心动图诊断确诊为先天性心脏病, 排除心脏血管以外畸形的 144例患儿作为病例组; 选择来自同一医院、经临床、心脏彩色超声检查确定无先心病及其他畸形的住院患儿 168例, 作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 幼儿出生质量及父母孕育史调查 自行设计《幼儿出生质量相关因素调查表》, 内容包括幼儿一般情况、父母在孕期及孕前接触工农业用化学物的种类、接触的方式、接触的频率、接触的时间等方面, 若频率≥1次/周, 连续 4周或接触时间超过 7 d, 结果判定为经常接触。由调查员采用面访法向幼儿的父母调查并填写调查表。

1.2.2 MTHFR基因检测 抽取幼儿外周静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)-Na_2抗凝, 置 – 70 ℃冰箱备用。采用全血 DNA提取试剂盒(大连宝生物公司), 按说明书操作。采用聚合酶链反应 – 限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 MTHFR基因。(1)引物: 上游引物为 5′-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3′, 下游引物为 5′-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3′。(2) PCR反应体系: 总体积 50 μL, 其中, 灭菌双蒸水 29 μL, 10× PCR反应缓冲液 5 μL, $MgCl_2$ 4 μL, dNTP 4 μL, 引物各 1 μL, DNA 5 μL, Taq酶 1 μL。上述液体混匀后, 3000 r/min离心 15 s。(3) PCR反应条件: 95 ℃预变性 5 min; 接 94 ℃变性 30 s, 55 ℃复性 39 s, 72 ℃延伸 30 s, 40个循环; 72 ℃终末延伸 7 min, 最后置于 4 ℃保存。(4)酶切与酶切产物鉴定: 取 10×限制性内切酶反应缓冲液 2.0 μL,

* 基金项目: 山东省自然科学基金项目(Y2006C104); 山东省卫生厅科技计划项目(2005hw142)

作者单位: 1. 泰山医学院流行病学研究所, 山东 泰安 271016; 2. 山东省莱芜市疾病预防控制中心

作者简介: 李栋(1969–), 男, 山东曲阜人, 副教授, 本科, 主要从事流行病与卫生统计学专业。

中国公共卫生 CPH

PCR扩增产物 17 μL, 限制性内切酶 Hinf I 1 μL, 组成 20 μL的酶切反应体系, 37 ℃消化酶切 24 h, 取出酶切产物; 采用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压为 5~ 15 V/cm, 1.5 h)对酶切产物片段进行分离, 溴化乙锭(EB)染色, 紫外透射分析仪检测酶切产物及大小, 进行图片拍摄, 分析基因型。(5)因素及交互作用分析: 参照文献[3], 计算各因素相对危险度(*OR*); 选用相加模型进行交互作用分析, 使用交互作用指数(the synergy index, *S*)进行定性分析, 若 $S > 1$, 说明 A、B两因素之间具有正相加模型交互作用, 两因素同时存在时效应增强, 即协同作用; 若 $S < 1$, 说明 A、B两因素之间具有负相加模型交互作用, 两因素同时存在时效应减低, 即拮抗作用。S绝对值越大, 则说明两因素之间交互作用越强; 使用归因交互效应(RERI)、归因交互效应百分比[AP(AB)]、纯因子间归因交互效应百分比[AP*(AB)]等参数进行定量分析: RERI表示交互作用所引起的相对效应的大小, 绝对值越大, 说明两因素之间交互作用越强; AP(AB)表示因素 A、B联合效应中归因交互效应所占的比重, AP(AB)绝对值越大, 则说明两因素之间的交互作用越强; AP*(AB)表示仅仅因为 AB两因素所引起的效应中(即扣除本底效应)由于交互效应所占的百分比。

1.3 统计分析 应用 SAS 8.2软件进行统计分析, $\alpha = 0.05$。单因素分析采用 *t*检验和 χ^2 检验; 多因素分析及混杂因素调整采用非条件 Logistic回归分析。

2 结 果

2.1 基因型频率均衡性检验 病例组 144例中, 男性 78例, 女性 66例, 平均年龄(2.68±1.46)岁。对照组 168例中, 男性 96例, 女性 72例, 平均年龄(2.79±1.96)岁; 2组性别、年龄构成差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.2784$, $P = 0.5977$; $t = 0.5668$, $P > 0.05$)。对照组 MTHFR基因型频率的观察值与期望值比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 4.385$, $P = 0.112$), 表明 MTHFR基因型频率达到遗传平衡, 具有人群代表性。

2.2 基因型和等位基因频率比较(表 1) 2组间 TT基因型频率差异及 2组间等位基因分布差异均有统计学意义($\chi^2 = 22.326$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 20.515$, $P < 0.0001$), 表明幼儿携带 TT基因型与先天性心脏病的发生有关联; 单因素分析结果显示, MTHFR677TT基因型与先心病的关联强度为 $OR = 3.215$ ($95\%\ CI = 1.958 \sim 5.280$)。

表 1 MTHFRC677T基因多态性与先心病关系

组 别	*n*	基因型						等位基因			
		TT	%	CT	%	CC	%	T	%	C	%
病例组	144	66	45.83	52	36.11	26	18.06	184	63.89	104	36.11
对照组	168	35	20.83	84	50.00	49	29.17	154	45.83	182	54.17
合计	312	101	32.37	136	43.59	75	24.04	338	54.17	286	45.83

2.3 孕期化学物接触与先天性心脏病关系 调查得知, 病例组母亲孕期化学物经常接触率为 15.28%(22/144), 其中职业性接触 7例, 生活性接触 15例, 对照组孕期化学物经常接触率为 7.74%(13/168), 其中职业性接触 4例, 生活性接触 9例, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.433$, $P = 0.0352$), $OR = 2.150$ ($95\%\ CI = 1.041 \sim 4.442$); 调整父母年龄、胎龄混杂因素后, 孕期化学物接触与先心病的 $OR = 2.684$ ($95\%\ CI = 1.334 \sim 4.520$)。

2.4 677TT基因型与孕期化学物接触交互作用(表 2) 以 MTHFR677TT基因型为突变型, 记为"+", CC+CT为未突变基因型, 记为"−", 按照母亲孕期经常接触化学物与否, 分别记为"+"、"−", 进行基因—环境两类因素的交互作用分析。交互作用分析结果显示, 各因素单独作用和联合作用的 *OR* 值差异均有统计学意义, 调整混杂因素前后的交互作用指数(S)分别为 3.184, 3.195, 表明 MTHFR677TT基因型与孕期化学物接触之间在先心病发病中具有正交互作用, 即两因素同时存在时致病效应增强。调整混杂因素前后, RERI分别为 4.938, 6.126; AP(AB)分别为 60.23%, 61.77%; AP*(AB)分别为 68.59%, 68.70%, 可见交互作用的效应量及其在联合作用中所占的比例均较大, 调整后的效应大于调整前。

表 2 MTHFR677TT基因型和孕期化学物接触的交互作用分析

基因型	孕期化学物接触	病例	对照	*OR*	*OR* 95% *CI*	*OR**	95% *CI*
−	−	70	123	1.000	−	1.000	−
−	+	8	10	1.406	0.530~3.726	1.637	1.108~3.251
+	−	52	32	2.855	1.682~4.847	3.154	2.211~5.224
+	+	14	3	8.199	2.277~29.519	9.917	3.289~15.531

注: * 调整混杂因素后结果。

3 讨 论

本研究表明, 携带 TT基因型的个体发生先天性心脏病的风险是 CC或 CT基因型个体的 3.215倍($95\%\ CI = 1.958 \sim 5.280$), 提示 MTHFR677TT基因型可能是儿童 CHD易感性的重要遗传标志。

随着越来越多的化学物质在工农业中的使用, 化学物质对先心病的致畸作用也受到关注。动物实验流行病学调查也证实了化学毒物与先心病的发生存在相关性。一些研究提示, 孕期孕妇接触化学毒物可导致先心病的发生[4-5]。本研究结果表明, 母亲孕期接触工农业用的化学物是先心病的危险因素, 调查所得的化学物主要是农药类和工业有机溶剂类, 调整混杂后, 关联强度差异有统计学意义, 因此, 在优生咨询时应明确孕妇要提高个人的防护意识, 避免有毒物质的接触。

先天性心脏病病因未明, 目前普遍的观点认为先心病是内在遗传易感因素和环境致畸原共同作用所导致[6]。本研究交互作用分析发现, 调整混杂因素后, MTHFR677TT基因型

中国公共卫生 CPH

和孕期接触化学物之间均具有正相加交互作用,交互作用效应量及其在联合效应中所占的比例较大,表明在 MTHFR 677TT基因型的遗传背景下同时暴露于有毒化学物,子代发生先心病的危险性大大增加。建议采取高危人群干预策略,对携带易感基因型的高危个体,积极控制相应的环境因素,可以起到降低疾病发生的目的。

参考文献

〔1〕 高莉洁,赵仲堂,李栋,等.先天性心脏病环境危险因素病例对照研究[J].中国公共卫生,2005,21(2):161-162.

〔2〕 Konrad C, Muller GA, Langer C, et al. Plasma homocysteine, MTHFR C677T, CBS-844 in s68bp, and MTHFD1 G1958A polymorphisms in spontaneous cervical artery dissections[J]. J Neurol, 2004, 251(10): 1242-1248.

〔3〕 赵仲堂.流行病学研究方法与应用[M].2版.北京:科学出版社,2005:523-544.

〔4〕 Loffredo CA, Silbergeld EK, Ferencz C, et al. Association of transposition of the great ateries in infants with maternal exposures to herbicides and rodenticides[J]. Am J Epidemiol, 2001, 153(6): 529-536.

〔5〕 Yauck JS, Malloy ME, Blair K, et al. Proximity of residence to trichloroethylene-emitting sites and increased risk of offspring congenital heart defects among older women[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2004, 70: 808-814.

〔6〕 Jiao K, Kulessa H, Tompkins K, et al. An essential role of Smp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart[J]. Genes Dev, 2003, 17(19): 2362-2367.

收稿日期: 2009-03-11 (孔繁学编辑 宋艳萍校对)

文章编号: 1001-0580(2009)09-1083-01 中图分类号: R 587.1 文献标志码: A

【调查研究与分析】

非依赖型糖尿病患者血压、血流变学指标检测

张宝林,胡泽溪,张丽娟,王义勇,于德香

关键词: 非依赖型糖尿病高血压病; 血流变学; 血脂; 肾功能损害

随着人们生活水平的提高,糖尿病患者有逐年增加趋势。为了解非依赖型糖尿病(NDM)患者的血压血流变和血脂的变化,对 2005-2008年黑龙江省大庆市 206例 NDM患者的血压血脂血液变学指标进行检测,观察 NDM合并高血压患者的血流变学、脂代谢和肾功能指标的改变。现报告如下。

对象与方法 (1)对象:病例选自大庆市第五医院 2005-2008年收治的 NDM患者。糖尿病诊断按 1999年美国糖尿病(ADA)标准[1],高血压诊断按文献标准[2],将符合条件的 206例 NDM患者分成:血压正常的 NDM组(A组)共 101例,其中男 54例,女 47例。合并高血压 NDM组(B组)共 105例,其中男 59例,女 46例。年龄 49~81岁,平均年龄(67.9±18)岁。平均病程 5.9年。选择对象时均排除即往高血压、高血粘、高脂血症和肾功不全者。(2)方法:所有 NDM患者均经详细询问病史、查体、查空腹及餐后 2h血糖、血流变学、血脂和肾功能指标。(3)统计分析:采用 SPSS软件进行 t 检验。

结 果 (1)血压:合并高血压组(B组)的收缩压(145±24)mmHg(kPa=1.333),舒张压(87±16)mmHg。血压正常组(A组)的收缩压(116±13.7)mmHg,舒张压(76.4±10.7)mmHg。B组的收缩压和舒张压均明显高于 A组,2组比较差异有统计学意义(P 均 <0.01)。(2)血流变学:2组比较显示,全血低切粘度 B组(13.5±3.6),A组(11.3±2.9),差异有统计学意义($P<0.01$)。而血浆粘度和纤维蛋白原指标 A组和 B组均高于参考值,显示 NDM对上述结果有直接影响,但 2组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。(3)血脂指标:NDM合并高血压的 B组总胆固醇为(6.04±0.91),低密度脂蛋白胆固醇(3.23±1.12),A组分别为(5.23±1.27)和(2.82±0.87),2组比较差异有统计学意义($P<0.01$),而血甘油三酯和 HDL-C指标 2组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。(4)肾功能指标:B组的血肌酐(70.6±21.3)、尿酸(343±114)均高于 A组的(63.24±21.7)和(287.1±96.2),差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。表明糖尿病合并高血压者累及肾脏的风险度增高。

讨 论 NDM合并高血压为糖尿病常见的并发症之一。本次观察的 NDM病例中并发率为 36%,与糖尿病合并高血压发病率 39%相近[3]。糖尿病合并高血压不同于一般原发性高血压,血压升高特征类似于老年性高血压,以单纯收缩期性高血压为多见。本组病例血脂均增高,有可能有糖尿病合并高血压的发病风险。有文献[4]明确将糖尿病视为影响冠心病发病等危险因素。肾功能指标观察表明,糖尿病合并高血压的 B组血肌酐和尿酸均高于 A组,显示高血压也是糖尿病肾病高影响因素之一。血液流变学异常表明糖尿病患者血液中有形成分和无形成分变化引发血流变学改变。

综上所述,糖尿病合并高血压患者风险性增加,一旦同时出现高脂血症、肾功指标异常和血液流变学的改变,应及早有针对性地治疗。最大限度地减少损害,提高生存率。

参考文献

〔1〕 陈国伟.高血压与糖尿病[J]中国实用内科杂志,2002,22(4):199-200.

〔2〕 张维忠.糖尿病与高血压[C].全国冠心与糖尿病关系研讨会资料,2003,12:28-30.

〔3〕 丰罗菊,于钧,卢明俊,等.糖尿病肾病病变程度影响因素及预测[J].中国公共卫生,2007,23(6):695.

〔4〕 程伟.2型糖尿病血糖控制对血脂影响[J].中国公共卫生,2007,23(10):1276.

收稿日期: 2009-06-01 (刘铁编辑 宋艳萍校对)

作者单位: 黑龙江省大庆第五医院检验科,163711
作者简介: 张宝林(1963-),男,安徽太和人,主管检验师,学士,主要从事临床检验和生化检验工作。

中国公共卫生 CPH