

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2403067

论著·临床研究

母亲 *MTR* 基因多态性及其与围孕期叶酸补充的交互作用与子代室间隔缺损的关联研究

阮霄睿 孙梦婷 魏剑晖 罗曼君 刘涵君 唐嘉鹏 李柳莹 秦家碧

(中南大学湘雅公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 湖南长沙 410013)

[摘要] **目的** 探讨母亲 *MTR* 基因多态性及其与围孕期叶酸补充的交互作用与子代室间隔缺损 (ventricular septal defect, VSD) 的关联。**方法** 采用病例对照研究, 招募426例1岁以内VSD患儿母亲和740例同年龄健康婴儿母亲。通过问卷调查收集母亲相关暴露信息, 并采集其血液标本进行基因多态性检测。采用多因素logistic回归和逆概率加权法处理后logistic回归分析位点与VSD的关联。使用叉生分析和logistic回归分析探讨位点与叶酸补充间的相加和相乘交互作用。**结果** 母亲 *MTR* 基因 rs6668344 位点 CT 和 TT 型增加了子代对 VSD 的易感性 ($P<0.05$)。rs3768139 位点 GC 和 CC 型、rs1050993 位点 AG 和 GG 型、rs4659743 位点 AT 和 TT 型、rs3768142 位点 GG 型、rs3820571 位点 GT 和 TT 型与 VSD 发生风险降低有关 ($P<0.05$)。rs6668344 位点变异与叶酸补充对 VSD 存在拮抗相乘交互作用 ($P<0.05$)。**结论** 母亲 *MTR* 基因多态性与子代 VSD 发生显著相关。rs6668344 位点变异者围孕期叶酸补充可降低其子代 VSD 易感性, 提示遗传高风险人群更应补充叶酸以预防子代 VSD 的发生。

[中国当代儿科杂志, 2024, 26 (9): 899-906]

[关键词] 室间隔缺损; *MTR* 基因; 单核苷酸多态性; 逆概率处理加权; 交互作用; 子代

Maternal *MTR* gene polymorphisms and their interactions with periconceptional folic acid supplementation in relation to offspring ventricular septal defects

RUAN Xiao-Rui, SUN Meng-Ting, WEI Jian-Hui, LUO Man-Jun, LIU Han-Jun, TANG Jia-Peng, LI Liu-Xuan, QIN Jia-Bi. Department of Epidemiology and Health Statistics, Xiangya School of Public Health, Central South University, Changsha 410013, China (Qin J-B, Email: qinjiabi123@163.com)

Abstract: Objective To investigate how maternal *MTR* gene polymorphisms and their interactions with periconceptional folic acid supplementation are associated with the incidence of ventricular septal defects (VSD) in offspring. **Methods** A case-control study was conducted, recruiting 426 mothers of infants with VSD under one year old and 740 mothers of age-matched healthy infants. A questionnaire survey collected data on maternal exposures, and blood samples were analyzed for genetic polymorphisms. Multivariable logistic regression analysis and inverse probability of treatment weighting were used to analyze the associations between genetic loci and VSD. Crossover analysis and logistic regression were utilized to examine the additive and multiplicative interactions between the loci and folic acid intake. **Results** The CT and TT genotypes of the maternal *MTR* gene at rs6668344 increased the susceptibility of offspring to VSD ($P<0.05$). The GC and CC genotypes at rs3768139, AG and GG at rs1050993, AT and TT at rs4659743, GG at rs3768142, and GT and TT at rs3820571 were associated with a decreased risk of VSD ($P<0.05$). The variations at rs6668344 demonstrated an antagonistic multiplicative interaction with folic acid supplementation in relation to VSD ($P<0.05$). **Conclusions** Maternal *MTR* gene polymorphisms significantly correlate with the incidence of VSD in offspring. Mothers with variations at rs6668344 can decrease the susceptibility to VSD in their offspring by supplementing with folic acid during the periconceptional period, suggesting the importance of periconceptional folic acid supplementation in genetically at-risk populations to prevent VSD in offspring.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2024, 26(9): 899-906]

[收稿日期] 2024-03-19; [接受日期] 2024-06-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82073653、81803313); 湖南省杰出青年基金项目 (2022JJ10087)。

[作者简介] 阮霄睿, 女, 博士研究生。

[通信作者] 秦家碧, 男, 教授。Email: qinjiabi123@163.com。

Key words: Ventricular septal defect; *MTR* gene; Single nucleotide polymorphism; Inverse probability of treatment weighting; Interaction; Offspring

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 约占全部出生缺陷的 1/3, 为婴幼儿死亡原因顺位第 7 的疾病^[1-2]。室间隔缺损 (ventricular septal defect, VSD) 指心室间隔存在洞或孔道的先天性心脏畸形, 为最常见的 CHD 亚型 (约占 40%)^[3], 我国 VSD 出生患病率为 1.41/1 000 新生儿^[4]。轻型 CHD (包括 VSD) 患儿的检查、住院和手术治疗总费用均数达 54 702 元, 疾病负担沉重^[5]。VSD 病因复杂, 涉及遗传和环境因素及其交互作用。规范服用叶酸的产妇其子代 VSD 发生风险为未服叶酸的 0.61 倍^[6-7]。然而, 两项分别开展于丹麦和加拿大的出生队列研究否认了补充叶酸的保护作用^[8-9], 可能原因是个体对叶酸代谢能力有差异, 即母亲补充叶酸对子代的效应受到叶酸代谢途径相关酶基因的影响。甲硫氨酸合酶 (methionine synthase, *MTR*) 是叶酸-同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 代谢过程的关键酶。叶酸体内代谢产物 5-甲基四氢叶酸作为底物, 在维生素 B₁₂ 辅因子作用下将毒性代谢产物 Hcy 重新转化为前体甲硫氨酸, 该过程由 *MTR* 催化^[10]。*MTR* 基因变异引起酶活性下降, 造成体内 Hcy 蓄积。鸡胚和小鼠实验表明胚胎发育早期暴露于高浓度 Hcy 提高了 VSD 发生率^[11-12], 人群研究亦发现 VSD 患儿母亲血浆 Hcy 浓度高于健康对照^[13]。当前研究聚焦于 *MTR* 基因 rs1805087 位点单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与 CHD 的关联^[14-17], 结果存在异质性^[18], 少数研究涉及其他位点^[19-20]。既往研究较少关注该基因多态性与 VSD 亚型的关联, 且仅局限于少数 SNP; 尚无研究探索围孕期补充叶酸和 *MTR* 基因交互作用对子代的影响。本研究以医院为基础, 采用病例对照研究设计, 并使用倾向性评分逆概率处理加权法 (inverse probability of treatment weighting, IPTW) 控制混杂因素, 探讨母亲 *MTR* 基因多态性及其与围孕期叶酸补充的交互作用与子代 VSD 的关联, 为筛选遗传高风险孕产妇、实现精准预防提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究为以医院为基础的病例对照研究。招募 2021 年 12 月—2022 年 12 月在湖南省儿童医院心

胸外科就诊的 1 岁以内 VSD 患儿母亲为病例组, 同一时期在该医院体检科体检的 1 岁以内健康婴儿母亲为对照组。

病例组纳入标准: (1) 按照国际疾病分类第 11 版标准 (<https://icd.who.int/browse/2024-01/mms/en#668140715>), 经彩色多普勒超声心动图和手术共同诊断为 VSD 患儿的母亲; (2) 汉族; (3) 单胎受孕; (4) 产后 1 年内的母亲; (5) 签署知情同意书、完成调查问卷并愿意提供外周血标本用于 SNP 检测。排除标准: (1) 非生物学母亲; (2) 伴随染色体或其他系统畸形患儿的母亲; (3) 与其他母亲有亲缘关系; (4) 辅助生殖技术受孕的母亲或患有精神障碍性疾病不能配合完成调查的母亲。

对照组为经体检初筛及心脏彩超证实心脏结构、功能均正常的儿童的母亲, 其他纳入和排除标准同病例组。

本研究通过了中南大学湘雅公共卫生学院伦理委员会审批 (审批号: XYGW-2021-01)。

1.2 问卷调查

由经过统一培训的调查员开展面对面问卷调查, 具体内容包括: 母亲一般人口学特征 (怀孕时年龄、孕前体重指数、受教育程度、居住地、家庭年收入)、个人史 (妊娠并发症史、家族三代近亲婚配史、家族成员出生缺陷史、本人出生缺陷史)、孕前生活习惯 (孕前吸烟、孕前饮酒); 患儿基本特征 (性别、出生方式、早产史)。叶酸补充的定义为孕前 3 个月或孕早期 (孕 1~3 个月) 开始每周连续 5 d 及以上每天服用至少 400 μg 叶酸。为减少回忆偏倚, 本研究仅纳入产后 1 年内的母亲, 并查阅医院病例系统和孕产妇保健手册进行信息核查。

1.3 SNP 检测

检索美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 的 SNP 数据库 (<https://ncbi.nlm.nih.gov/>) 中 *MTR* 基因的主要 SNP 位点, 并按照连锁不平衡程度 $r^2 \geq 0.8$ 和次等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) > 0.5 的条件进行筛选。

问卷调查结束后, 由所在科室的护士取 5 mL 外周静脉血, 并置于乙二胺四乙酸抗凝管中, 3 500 r/min 离心 15 min 以分离血浆和血细胞, 并保存于 -80°C 冰箱。所有样本的分装操作均在生物安

全柜内完成。使用QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 按照标准流程提取血细胞的基因组DNA。利用Massarray飞行时间质谱 (Agena iPLEX assay, San Diego, CA, USA) 对MTR基因位点进行检测, 具体检测工作由博森生物科技(北京)有限公司完成。

1.4 统计学分析

采用Epidata 3.1软件建立数据库, 双人录入问卷结果。采用R 4.3.0软件进行统计学分析。计数资料采用例数和率或构成比(%)进行统计描述。卡方检验及Mann-Whitney U检验用于病例组和对照组基线特征的比较。对于差异有统计学意义($P<0.05$)的协变量, 计算其倾向性评分, 并采用IPTW法对病例组和对照组加权、构建虚拟样本, 以平衡两组间混杂因素分布^[21]。使用标准化均数差 (standardized mean difference, SMD) 评估加权前后组间协变量均衡程度, SMD <0.1 表明均衡性好。利用拟合优度卡方检验判断对照组人群各SNP位点是否符合哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium), $P\geq 0.05$ 认为达到遗传平衡。

采用多因素logistic回归和经IPTW后的logistic回归计算各SNP及其在显性模型(野生型vs突变杂合子+突变纯合子)下的相对危险比(odds ratio, OR)及95%置信区间(confidence interval, CI), 两种方法相互比较、印证。利用叉生分析和logistic回归分析探讨MTR基因各位点与补充叶酸之间的相加和相乘交互作用, 并计算超额相对危险度(relative excess risk due to interaction, RERI)、交互作用归因比(attributable proportion due to interaction, AP)和协同指数(synergy index, S), 以及交互作用项的OR值及其95%CI。由于多重比较增大了假阳性错误的概率, 采用Benjamini-Hochberg法对P值进行错误发现率(false discovery rate, FDR)校正, FDR <0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

按纳入和排除标准最终招募1 166例研究对象, 其中病例组426例, 对照组740例。两组在教育程度($U=86\,954$, $P<0.001$)、居住地($\chi^2=41.801$, $P<0.001$)、家庭年收入($\chi^2=71.574$, $P<0.001$)、妊娠并发症史($\chi^2=77.624$, $P<0.001$)、

家族三代近亲婚配史($\chi^2=13.989$, $P<0.001$)、家族成员出生缺陷史($\chi^2=19.837$, $P<0.001$)、孕前吸烟($\chi^2=19.602$, $P<0.001$)、孕前饮酒($\chi^2=7.884$, $P<0.001$)和子代性别($\chi^2=10.390$, $P<0.001$)方面的比较差异有统计学意义。

2.2 IPTW处理后病例组与对照组基线特征比较

以上述9个协变量作为调整变量进行IPTW处理。处理后组间均衡性提升(SMD <0.1), 各协变量的组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$), 见表1。

2.3 遗传平衡检验

对照组人群MTR基因18个SNP位点进行拟合优度检验, 如表2所示, 除rs2229276、rs1805087、rs2275565、rs10925252外其他14个位点均符合遗传平衡定律($P\geq 0.05$), 后续对这14个SNP位点进行分析。

2.4 母亲MTR基因多态性与子代VSD的关联分析

单因素logistic回归分析显示, rs3768139、rs6676866、rs1050993、rs4659743、rs3768142、rs4659724、rs6668344、rs3754255、rs3820571位点多态性与VSD的关联有统计学意义(均FDR <0.05)。多因素logistic回归和IPTW处理后的logistic回归分析以上位点多态性与子代VSD的关联, 结果见表3。

多因素logistic回归分析表明, 母亲MTR基因rs6668344位点CT和TT型增加了子代对VSD的易感性, rs3768139位点GC和CC型、rs1050993位点AG和GG型、rs4659743位点AT和TT型、rs3768142位点GG型及rs3820571位点GT和TT型与VSD的发生风险降低有关, 以上位点在显性模型下与VSD的关联均有统计学意义(均FDR <0.05)。IPTW处理后的logistic回归分析结果与多因素logistic回归分析的结果一致。

2.5 SNP位点与叶酸补充交互作用分析

经IPTW均衡混杂因素后, 母亲围孕期补充叶酸对子代VSD具有保护效应(OR=0.73, 95%CI: 0.56~0.96, $P=0.025$)。分析补充叶酸与以上logistic回归有统计学意义的位点之间的相加和相乘交互作用, 结果表明rs6668344位点变异与围孕期叶酸补充对子代VSD发生存在拮抗相乘交互作用(OR=0.43, 95%CI: 0.26~0.69, FDR <0.05), 见表4。

表 1 IPTW 处理前后病例组与对照组基线特征的比较 [n (%)]

因素	处理前				处理后			
	对照组 (n=740)	病例组 (n=426)	SMD	P值	对照组 (n=1 134)	病例组 (n=1 182)	SMD	P值
受教育程度								
小学及以下	9(1.22)	43(10.09)	0.895	<0.001	41(3.62)	53(4.48)	0.058	0.892
初中	144(19.46)	195(45.77)			311(27.43)	343(29.02)		
高中或中专	246(33.24)	123(28.87)			374(32.98)	374(31.64)		
大专或本科及以上	341(46.08)	65(15.26)			408(35.98)	412(34.86)		
居住地								
农村	402(54.32)	313(73.47)	0.407	<0.001	676(59.61)	673(56.94)	0.052	0.515
城镇	338(45.68)	113(26.53)			458(40.39)	509(43.06)		
家庭年收入 (万元)								
≤10	530(71.62)	394(92.49)	0.565	<0.001	890(78.48)	935(79.10)	0.016	0.878
>10	210(28.38)	32(7.51)			24(2.12)	247(20.90)		
妊娠并发症史								
否	675(91.22)	305(71.60)	0.521	<0.001	991(87.39)	999(84.52)	0.084	0.200
是	65(8.78)	121(28.40)			143(12.61)	183(15.48)		
家族三代近亲婚配史								
否	737(99.59)	413(96.95)	0.204	<0.001	1 125(99.21)	1 166(98.65)	0.024	0.750
是	3(0.41)	13(3.05)			9(0.79)	16(1.35)		
家族成员出生缺陷史								
否	733(99.05)	404(94.84)	0.247	<0.001	1 106(97.53)	1 149(97.21)	0.024	0.750
是	7(0.95)	22(5.16)			28(2.47)	33(2.79)		
孕前吸烟								
否	724(97.84)	394(92.49)	0.251	<0.001	1 096(96.65)	1 120(94.75)	0.091	0.210
是	16(2.16)	32(7.51)			38(3.35)	62(5.25)		
孕前饮酒								
否	686(92.70)	374(87.79)	0.166	0.005	1 043(91.98)	1 088(92.05)	0.003	0.955
是	54(7.30)	52(12.21)			91(8.02)	94(7.95)		
性别								
男	473(63.92)	231(54.23)	0.198	0.001	691(60.93)	761(64.38)	0.071	0.329
女	267(36.08)	195(45.77)			443(39.07)	421(35.62)		

注：[IPTW] 逆概率处理加权法；[SMD] 标准化均数差。

表 2 对照组 MTR 基因 SNP 位点哈迪-温伯格平衡检验

基因位点	等位基因	MAF	实际基因型频数			理论基因型频数			χ^2 值	P值
			AA	AB	BB	AA	AB	BB		
rs955516	T/A	0.375	263	342	135	255	359	127	1.646	0.199
rs1266164	C/T	0.338	507	218	15	513	206	21	2.319	0.128
rs3768139	G/C	0.317	507	218	15	513	206	21	2.319	0.128
rs6676866	G/T	0.475	226	356	158	221	367	153	0.650	0.420
rs1050993	A/G	0.368	549	176	15	548	177	14	0.041	0.839
rs2229276	A/G	0.391	275	311	154	250	360	129	13.761	<0.001
rs4659743	A/T	0.317	531	194	15	533	190	17	0.312	0.577
rs1806505	C/T	0.368	260	352	128	257	358	125	0.224	0.636
rs3768142	T/G	0.378	277	346	117	274	353	114	0.267	0.605
rs4659724	G/A	0.362	273	338	129	264	356	120	1.890	0.169
rs6668344	C/T	0.395	299	330	111	291	346	103	1.605	0.205

续表 2

基因位点	等位基因	MAF	实际基因型频数			理论基因型频数			χ^2 值	P值
			AA	AB	BB	AA	AB	BB		
rs1805087	A/G	0.191	597	127	16	590	142	9	8.177	0.004
rs4077829	G/T	0.295	258	354	128	256	359	126	0.121	0.718
rs2275565	G/T	0.226	517	193	30	509	210	22	4.719	0.030
rs3754255	C/T	0.313	203	349	188	193	370	178	2.351	0.125
rs3820571	G/T	0.376	552	173	15	551	175	14	0.112	0.738
rs10925252	T/C	0.377	295	311	134	274	352	113	10.250	0.001
rs12060570	G/C	0.377	262	350	128	258	358	124	0.358	0.550

注：[MAF] 次等位基因频率；[SNP] 单核苷酸多态性。AA、AB、BB 分别指野生型、突变杂合子和突变纯合子。

表 3 母亲 MTR 基因 SNP 位点与子代 VSD 的关联

SNP 位点 /基因型 /遗传模型	多因素 logistic 回归			IPTW 后 logistic 回归		
	OR(95%CI)*	P	FDR_P	OR(95%CI)*	P	FDR_P
rs3768139						
GG	1.00			1.00		
GC	0.27(0.13~0.54)	<0.001	<0.001	0.22(0.13~0.35)	<0.001	<0.001
CC	0.22(0.11~0.43)	<0.001	<0.001	0.21(0.13~0.33)	<0.001	<0.001
显性模型	0.23(0.12~0.45)	<0.001	<0.001	0.21(0.13~0.33)	<0.001	<0.001
rs6676866						
GG	1.00			1.00		
GT	1.16(0.85~1.60)	0.355	0.355	1.00(0.83~1.21)	0.993	0.993
TT	0.76(0.49~1.16)	0.204	0.230	0.80(0.63~1.01)	0.062	0.070
显性模型	1.05(0.77~1.42)	0.772	0.772	0.94(0.78~1.12)	0.464	0.474
rs1050993						
AA	1.00			1.00		
AG	0.30(0.14~0.62)	0.001	0.002	0.23(0.14~0.38)	<0.001	<0.001
GG	0.26(0.13~0.51)	<0.001	<0.001	0.24(0.15~0.38)	<0.001	<0.001
显性模型	0.27(0.13~0.53)	<0.001	<0.001	0.24(0.14~0.38)	<0.001	<0.001
rs4659743						
AA	1.00			1.00		
AT	0.24(0.12~0.50)	<0.001	<0.001	0.19(0.11~0.31)	<0.001	<0.001
TT	0.25(0.12~0.50)	<0.001	<0.001	0.24(0.14~0.38)	<0.001	<0.001
显性模型	0.25(0.12~0.49)	<0.001	<0.001	0.23(0.14~0.36)	<0.001	<0.001
rs3768142						
TT	1.00			1.00		
GT	0.75(0.55~1.02)	0.066	0.085	0.84(0.69~1.01)	0.055	0.081
GG	0.57(0.36~0.87)	0.011	0.017	0.56(0.43~0.72)	<0.001	<0.001
显性模型	0.70(0.52~0.94)	0.018	0.027	0.76(0.64~0.90)	0.002	0.003
rs4659724						
GG	1.00			1.00		
GA	1.16(0.85~1.60)	0.354	0.355	0.96(0.80~1.17)	0.696	0.783
AA	1.51(0.91~2.30)	0.057	0.073	1.30(0.93~1.72)	0.056	0.070
显性模型	1.26(0.93~1.70)	0.135	0.152	1.07(0.89~1.28)	0.474	0.474
rs6668344						
CC	1.00			1.00		
CT	1.57(1.14~2.16)	0.006	0.011	1.45(1.21~1.76)	<0.001	<0.001
TT	2.05(1.36~3.10)	<0.001	<0.001	1.67(1.30~2.14)	<0.001	<0.001
显性模型	1.68(1.25~2.29)	<0.001	<0.001	1.51(1.26~1.80)	<0.001	<0.001

续表 3

SNP 位点 /基因型 /遗传模型	多因素 logistic 回归			IPTW 后 logistic 回归		
	OR(95%CI)*	P	FDR_P	OR(95%CI)*	P	FDR_P
rs3754255						
CC	1.00			1.00		
TC	1.40(0.98~2.01)	0.063	0.085	1.22(0.99~1.50)	0.063	0.081
TT	1.28(0.85~1.94)	0.243	0.243	1.00(0.78~1.27)	0.981	0.981
显性模型	1.36(0.97~1.93)	0.074	0.095	1.14(0.94~1.39)	0.187	0.240
rs3820571						
GG	1.00			1.00		
GT	0.26(0.13~0.54)	<0.001	<0.001	0.20(0.12~0.32)	<0.001	<0.001
TT	0.22(0.11~0.42)	<0.001	<0.001	0.20(0.12~0.32)	<0.001	<0.001
显性模型	0.23(0.11~0.44)	<0.001	<0.001	0.20(0.12~0.31)	<0.001	<0.001

注：*调整的因素包括受教育程度、居住地、家庭年收入、妊娠并发症史、家族三代近亲婚配史、家族成员出生缺陷史、孕前吸烟、孕前饮酒和子代性别。[SNP] 单核苷酸多态性；[VSD] 室间隔缺损；[IPTW] 逆概率处理加权法。

表 4 母亲 *MTR* 基因位点多态性与叶酸补充对子代 VSD 发生的相加和相乘交互作用

<i>MTR</i> 基因位点	相加交互作用*			相乘交互作用*		
	<i>RERI</i> (95%CI)	<i>AP</i> (95%CI)	<i>S</i> (95%CI)	<i>OR</i> (95%CI)	<i>P</i>	<i>FDR_P</i>
rs3768139	0.18(−0.10~0.46)	0.38(−0.81~1.57)	0.74(0.63~0.88)	1.07(0.67~1.72)	0.777	0.987
rs1050993	0.15(−0.05~0.34)	0.22(−0.40~0.83)	0.68(0.25~1.86)	0.98(0.60~1.62)	0.941	0.987
rs4659743	0.14(−0.02~0.30)	0.20(−0.31~0.72)	0.68(0.23~2.07)	1.00(0.62~1.64)	0.987	0.987
rs3768142	0.28(0.06~0.50)	0.95(−0.88~2.78)	0.71(0.64~0.80)	1.32(0.88~2.00)	0.177	0.531
rs6668344	5.24(−4.47~14.95)	0.51(0.24~0.78)	2.32(1.40~3.84)	0.43(0.26~0.69)	<0.001	<0.001
rs3820571	0.13(−0.06~0.33)	0.13(−0.14~0.39)	−0.47(Na) [#]	0.86(0.53~1.41)	0.546	0.987

注：统计参数中 *RERI* 指超额相对危险度，*AP* 指交互作用归因比，*S* 指协同指数，*FDR_P* 指错误发现率校正后的 *P* 值。*调整的因素包括受教育程度、居住地、家庭年收入、妊娠并发症史、家族三代近亲婚配史、家族成员出生缺陷史、孕前吸烟、孕前饮酒和子代性别。[#]由于该组样本量较小，软件无法计算得出参数估计结果，因此，只有点估计值，没有 95%CI。

3 讨论

MTR 基因定位于染色体 1q43，含有 33 个外显子，编码由 1 265 个氨基酸组成的蛋白质。SNP 是最常见的基因多态性，具有遗传稳定性且在各群体中普遍存在，因此常用于疾病易感基因定位的研究。当前 *MTR* 基因多态性研究热门 SNP 为 rs1805087 (A2756G)，其第 919 位密码子发生突变，使得位于辅因子结合处螺旋的天冬氨酸置换为甘氨酸^[22]，该错义突变降低酶活性。Liu 等^[17]发现该位点纯合突变使得非综合征型 CHD 的风险提高了 5.85 倍，而多项研究表明该位点多态性与 CHD 之间的关联无统计学意义^[14-15, 18]，且 Su 等^[23]发现该位点变异与 VSD 的关联无统计学意义，尚无研究关注 *MTR* 基因其他位点多态性与 VSD 的关联。本研究多因素 logistic 回归分析显示，母亲 *MTR* 基因 rs6668344 位点变异与子代 VSD 发病增加

显著相关，rs3768139、rs1050993、rs4659743、rs3768142 和 rs3820571 位点变异降低了子代 VSD 易感性。为减少混杂因素，采用倾向性评分 IPTW 处理后 logistic 回归分析探索 *MTR* 基因多个 SNP 与 VSD 的关联，与多因素 logistic 回归分析结果一致。

本研究发现位点 rs1050993 突变纯合子 GG 型子代 VSD 风险是 AA 型的 0.26 倍。Deng 等^[19]发现婴儿该位点 A/G 突变与其 CHD 发病概率降低有关，本研究结果提供了母体该位点变异对 VSD 畸形具有保护作用的证据。李依寰等^[24]分析了母亲 *MTR* 基因位点多态性与子代 CHD 的关联，发现 rs3768139、rs3820571、rs1050993 位点变异降低子代 CHD 发病风险，显性模型下 rs6668344 位点变异使子代发病风险增加 55%。本研究从这些变异位点与 VSD 亚型关联的角度进一步支持了这些结论。本研究还观察到母亲围孕期增补叶酸与 rs6668344 位点变异之间存在拮抗交互作用，这表明对在该位点

携带CT型和TT型的母亲，补充叶酸可以降低其子代VSD发生的风险，为识别高危人群并针对性制定预防措施（孕前3个月开始补充叶酸至妊娠满3个月）提供依据。然而，本研究仅识别了统计学交互作用，具体生物学机制有待深入研究。与本研究结果不同的是，美国一项病例对照研究分析了子代118个叶酸代谢通路相关酶基因SNP与心脏圆锥动脉干畸形的关联，结果均无统计学意义^[25]。一项关注子代MTR基因多态性的研究报道了rs2275565位点变异使CHD发病风险增加了3.93倍^[17]，本研究未发现该位点与VSD之间存在统计学关联。

对小鼠MTR基因进行杂合敲除后酶活性减少了50%~60%，而纯合敲除具有胚胎致死性，且对孕鼠补充叶酸仍无法减少MTR^{-/-}胚胎的死亡^[26]。作为叶酸-Hcy代谢通路中的关键酶，MTR基因突变造成酶活性减弱时，具有细胞毒性和致畸作用的Hcy在体内蓄积^[27]。刘虹等^[28]对孕鼠给予Hcy，观察到胚胎心肌细胞出现凋亡和坏死，且损伤程度与剂量相关，这表明母体高浓度Hcy可能造成胎儿CHD。其机制包括抑制心脏神经嵴细胞表面N-甲基-D-天冬氨酸受体活性、干扰三磷酸肌醇介导的信号转导通路^[29]等，造成神经嵴上皮迁移过程异常。心脏神经嵴细胞表达大量叶酸受体，在胚胎发育过程中转运叶酸进入细胞，为核酸合成提供底物，其参与胚胎心脏流出道和动脉圆锥等重要部位的形成，神经嵴上皮迁移异常可能造成VSD、动脉圆锥畸形等CHD^[30]。

本研究存在一些局限性：首先，回顾性研究可能存在回忆偏倚和报告偏倚，尽管已采取一系列质量控制措施，包括限定调查对象为产后1年内的母亲、查阅医院病例系统和孕产妇保健手册，仍不能完全避免；其次，仅通过问卷调查收集母亲围孕期叶酸补充情况，未检测母亲血浆或细胞内叶酸浓度，若能收集相关样本进行分析，将提供更有力的证据；最后，受地域限制，调查人群主要来自湖南省，且均为汉族，南北方人群、汉族和少数民族人群的遗传背景差异对结果的外推可能有一定的影响。

综上所述，本研究发现母亲MTR基因rs3768139、rs1050993、rs4659743、rs3768142和rs3820571位点多态性与子代VSD发生风险降低相关；rs6668344位点变异可增加子代VSD发生风险，而围孕期补充叶酸可降低子代VSD易感性，提示遗传高风险人群更应补充叶酸以预防子代VSD的

发生。未来仍需进一步验证MTR基因位点多态性与VSD的关联，并应构建多基因风险评估评估母亲MTR基因与其他叶酸代谢通路相关酶基因的联合作用对子代VSD易感性的影响。

作者贡献声明：阮霄睿负责采集数据、统计分析、解释数据、初稿写作；孙梦婷、魏剑晖、罗曼君、刘涵君、唐嘉鹏、李柳莹负责采集数据、统计分析、审核与写作；秦家碧负责研究设计、论文构思、审核与写作、获取研究经费。

利益冲突声明：所有作者声明无利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Triedman JK, Newburger JW. Trends in congenital heart disease: the next decade[J]. Circulation, 2016, 133(25): 2716-2733. PMID: 27324366. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023544.
- [2] GBD 2017 Congenital Heart Disease Collaborators. Global, regional, and national burden of congenital heart disease, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017[J]. Lancet Child Adolesc Health, 2020, 4(3): 185-200. PMID: 31978374. PMCID: PMC7645774. DOI: 10.1016/S2352-4642(19)30402-X.
- [3] Lopez L, Houyel L, Colan SD, et al. Classification of ventricular septal defects for the Eleventh Iteration of the International Classification of Diseases—striving for consensus: a report from the International Society for Nomenclature of Paediatric and Congenital Heart Disease[J]. Ann Thorac Surg, 2018, 106(5): 1578-1589. PMID: 30031844. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2018.06.020.
- [4] Zhao L, Chen L, Yang T, et al. Birth prevalence of congenital heart disease in China, 1980-2019: a systematic review and meta-analysis of 617 studies[J]. Eur J Epidemiol, 2020, 35(7): 631-642. PMID: 32519018. PMCID: PMC7387380. DOI: 10.1007/s10654-020-00653-0.
- [5] He Q, Dou Z, Su Z, et al. Inpatient costs of congenital heart surgery in China: results from the National Centre for Cardiovascular Diseases[J]. Lancet Reg Health West Pac, 2023, 31: 100623. PMID: 36879787. PMCID: PMC9985056. DOI: 10.1016/j.lanwpc.2022.100623.
- [6] Li X, Li S, Mu D, et al. The association between periconceptional folic acid supplementation and congenital heart defects: a case-control study in China[J]. Prev Med (Baltim), 2013, 56(6): 385-389. PMID: 23480969. DOI: 10.1016/j.ypmed.2013.02.019.
- [7] Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use[J]. Am J Epidemiol, 2000, 151(9): 878-884. PMID: 10791560. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a010291.

- [8] Leirgul E, Gildestad T, Nilsen RM, et al. Periconceptional folic acid supplementation and infant risk of congenital heart defects in Norway 1999-2009[J]. Paediatr Perinat Epidemiol, 2015, 29(5): 391-400. PMID: 26212116. DOI: 10.1111/ppe.12212.
- [9] Bedard T, Lowry RB, Sibbald B, et al. Folic acid fortification and the birth prevalence of congenital heart defect cases in Alberta, Canada[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2013, 97(8): 564-570. PMID: 23913528. DOI: 10.1002/bdra.23162.
- [10] Bailey LB, Gregory JF. Folate metabolism and requirements[J]. J Nutr, 1999, 129(4): 779-782. PMID: 10203550. DOI: 10.1093/jn/129.4.779.
- [11] 卢艳, 王海琴, 王新. 高同型半胱氨酸血症孕妇与其子发生先天性心脏病的关系[J]. 中南大学学报(医学版), 2011, 36(1): 68-73. PMID: 21311142. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.01.011.
- [12] Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(26): 15227-15232. PMID: 8986792. PMCID: PMC26385. DOI: 10.1073/pnas.93.26.15227.
- [13] Xu X, Ye B, Li M, et al. The UA doppler index, plasma HCY, and Cys C in pregnancies complicated by congenital heart disease of the fetus[J]. J Clin Med, 2022, 11(19): 5962. PMID: 36233829. PMCID: PMC9573527. DOI: 10.3390/jcm11195962.
- [14] 宫婷, 李芬, Huang H, 等. *MTR*、*MTRR* 基因多态性与先天性心脏病的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 127-130. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2010.02.022.
- [15] Raina JK, Panjalya RK, Dogra V, et al. "Association of *MTHFR* and *MS/MTR* gene polymorphisms with congenital heart defects in North Indian population (Jammu and Kashmir): a case-control study encompassing meta-analysis and trial sequential analysis" [J]. BMC Pediatr, 2022, 22(1): 223. PMID: 35468734. PMCID: PMC9036697. DOI: 10.1186/s12887-022-03227-z.
- [16] Li WX, Dai SX, Zheng JJ, et al. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G and *MTRR* A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency[J]. Nutrients, 2015, 7(8): 6670-6687. PMID: 26266420. PMCID: PMC4555142. DOI: 10.3390/nu7085303.
- [17] Liu Y, Zhong T, Song X, et al. Association of *MTR* gene polymorphisms with the occurrence of non-syndromic congenital heart disease: a case-control study[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 9424. PMID: 37296303. PMCID: PMC10256807. DOI: 10.1038/s41598-023-36330-x.
- [18] Liu W, Wang J, Chen LJ. Association between *MTR* A2756G polymorphism and susceptibility to congenital heart disease: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2022, 17(7): e0270828. PMID: 35802641. PMCID: PMC9269412. DOI: 10.1371/journal.pone.0270828.
- [19] Deng C, Deng Y, Xie L, et al. Genetic polymorphisms in *MTR* are associated with non-syndromic congenital heart disease from a family-based case-control study in the Chinese population[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5065. PMID: 30911047. PMCID: PMC6433945. DOI: 10.1038/s41598-019-41641-z.
- [20] Zhao JY, Qiao B, Duan WY, et al. Genetic variants reducing *MTR* gene expression increase the risk of congenital heart disease in Han Chinese populations[J]. Eur Heart J, 2014, 35(11): 733-742. PMID: 23798577. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu221.
- [21] 涂博祥, 秦婴逸, 吴骋, 等. 倾向性评分加权方法介绍及 R 软件实现[J]. 中国循证医学杂志, 2022, 22(3): 365-372. DOI: 10.7507/1672-2531.202111101.
- [22] Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations[J]. Genet Epidemiol, 1999, 17(4): 298-309. PMID: 10520212. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2272(199911)17:4<298::AID-GEPI5>3.0.CO;2-V.
- [23] Su J, Li Z. Analysis of *MTR* and *MTRR* gene polymorphisms in Chinese patients with ventricular septal defect[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2018, 26(10): 769-774. PMID: 29293099. PMCID: PMC6250295. DOI: 10.1097/PAL.0000000000000512.
- [24] 李依寰, 黄鹏, 王婷婷, 等. 母亲 *MTR* 基因多态性与先天性心脏病易感性关联[J]. 中国公共卫生, 2022, 38(2): 161-166. DOI: 10.11847/zgggws1134330.
- [25] Shaw GM, Lu W, Zhu H, et al. 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects[J]. BMC Med Genet, 2009, 10: 49. PMID: 19493349. PMCID: PMC2700092. DOI: 10.1186/1471-2350-10-49.
- [26] Swanson DA, Liu ML, Baker PJ, et al. Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(4): 1058-1065. PMID: 11158293. PMCID: PMC99560. DOI: 10.1128/MCB.21.4.1058-1065.2001.
- [27] Menezo Y, Elder K, Clement A, et al. Folic acid, folinic acid, 5 methyl tetrahydrofolate supplementation for mutations that affect epigenesis through the folate and one-carbon cycles[J]. Biomolecules, 2022, 12(2): 197. PMID: 35204698. PMCID: PMC8961567. DOI: 10.3390/biom12020197.
- [28] 刘虹, 李勇, 叶鸿瑁, 等. 同型半胱氨酸体内诱导鼠胚胎心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国生育健康杂志, 2002, 13(4): 173-176. DOI: 10.3969/j.issn.1671-878X.2002.04.016.
- [29] Lie OV, Bennett GD, Rosenquist TH. The N-methyl-D-aspartate receptor in heart development: a gene knockdown model using siRNA[J]. Reprod Toxicol, 2010, 29(1): 32-41. PMID: 19737608. PMCID: PMC2818120. DOI: 10.1016/j.reprotox.2009.08.005.
- [30] Yamagishi H. Cardiac neural crest[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2021, 13(1): a036715. PMID: 32071091. PMCID: PMC7778148. DOI: 10.1101/cshperspect.a036715.

(本文编辑: 邓芳明)

(版权所有©2024中国当代儿科杂志)