

# 胱硫醚 $\beta$ -合酶基因 C770T 基因突变与先天性心脏病的相关性研究

卢继芳<sup>1</sup>, 王兆康<sup>1</sup>, 刘振玲<sup>2</sup>, 覃耀明<sup>3</sup> (1. 广西壮族自治区南宁市宾阳县人民医院儿科 530405; 2. 广西壮族自治区人民医院儿科, 南宁 530021; 3. 广西壮族自治区妇幼保健院儿科, 南宁 530003)

**【摘要】** 目的 初步探讨母亲同型半胱氨酸代谢酶胱硫醚  $\beta$ -合酶(CBS)基因 C770T 基因突变与子代先天性心脏病(CHD)发生的关系。方法 运用等位基因扩增技术检测 62 对 CHD 患儿(病例组)及其生物学母亲 C770T 基因型, 并且与 62 对健康儿童(对照组)及其生物学母亲 C770T 基因型对比。结果 CBS C770T 产生 C/C 及 C/T 两种基因型, 病例组母亲的 C/C 及 C/T 基因型频率分别为 45.16% 和 54.84%, C 和 T 等位基因频率分别为 72.58% 和 27.42%; 对照组母亲的 C/C 型、C/T 型、C 及 T 等位基因频率分别为 59.68%、40.32%、79.84% 及 20.16%, 两组母亲的基因型频率及等位基因频率分布比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ); 此外, 病例组 C/C 型、C/T 型和 T 等位基因频率分别为 43.55%、56.45% 和 28.23%, 对照组分别为 58.06%、41.94% 及 29.03%, 两组 C/C 型、C/T 型和 T 等位基因频率分布比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 在广西人群中, 母亲 CBS C770T 基因突变与子代 CHD 无明显相关性, 母亲 C770T 突变可能不足以构成子代 CHD 的独立遗传危险因素。

**【关键词】** 胱硫醚  $\beta$ -合酶; 先天性心脏病; 同型半胱氨酸; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.10.018 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)10-1344-03

**Correlation of cystathionine  $\beta$ -synthase gene mutation and congenital heart defects** LU Ji-fang<sup>1</sup>, WANG Zhao-kang<sup>1</sup>, LIU Zhen-ling<sup>2</sup>, QIN Yao-ming<sup>3</sup> (1. Department of Pediatrics, People's Hospital of Binyang county, Binyang, Guangxi 530405, China; 2. Department of Pediatrics, People's Hospital of Guangxi, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Department of Pediatrics, Guangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanning, Guangxi 530003, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the correlation of maternal cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) gene C770T mutation and occurrence of congenital heart disease (CHD) in offspring. **Methods** A total of 62 CHD children and their mothers were detected for the C770T genotypes by the polymerase chain reaction, and 62 healthy children and their mothers were enrolled as control group. **Results** For the mothers of CHD children, the frequency of C/C was accounted for 45.16%, and C/T for 54.84%. However, the proportion of C/C and C/T were 59.68% and 40.32% respectively among the mothers of healthy children. Meanwhile, the frequency of C/T and T alleles were 56.45% and 28.23% respectively among CHD children, and 41.94% and 29.03% respectively among healthy children. The frequency of genotypes and T alleles were not significantly different between the two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** There might be not significant correlation between C770T mutation in mothers and CHD of offspring. CBS C770T mutation in mothers could not be independent risk factor for CHD of offspring in population of Guangxi.

**【Key words】** cystathionine  $\beta$ -synthase; congenital heart disease; homocysteine; gene

先天性心脏病(CHD)是最常见的出生缺陷之一,其发病与遗传及环境因素有关,其中遗传因素对CHD发病具有重要作用<sup>[1]</sup>。同型半胱氨酸(Hcy)血症是缺血性心血管疾病的独立危险因素<sup>[2-3]</sup>,但近年来研究发现,母亲妊娠期羊水Hcy水平可诱发胎儿出生缺陷及血管疾病,Hcy血症可能是一种新的诱发心血管发育缺陷的独立致畸因子<sup>[4]</sup>。胱硫醚  $\beta$ -合酶(CBS)是调节体内Hcy转硫代途径的关键酶之一,该酶活性降低可导致Hcy血症<sup>[5]</sup>。C770T是CBS基因的常见突变位点之一,该位点突变可引起CBS酶活性的改变,进而导致Hcy血症<sup>[6]</sup>。目前,尚未见母亲C770T突变与子代CHD相关性的研究报道。本研究运用等位基因扩增技术检测62对CHD患儿

母亲C770T基因型,旨在初步探讨母亲C770T突变与子代CHD发病风险的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2011年1月至2012年12月广西壮族自治区人民医院、广西壮族自治区妇幼保健院、南宁市妇幼保健院及柳州市妇幼保健院就诊的62例单纯性CHD患儿(病例组)以及生物学母亲作为研究对象。患儿来自南宁市、柳州市、宾阳县及邕宁县等广西各地市县,均经临床诊断及超声心动图确诊,同时排除心脏血管之外的其他畸形。62例患儿中,男34例,女28例,年龄6个月至8岁,患者类型包括室间隔缺损30例(48.39%)、动脉导管未闭18例(29.03%)、法洛氏四

联症 7 例(11.29%)、房间隔缺损 4 例(6.45%)、其他单纯类型 3 例(4.83%)。按 1:1 匹配原则,在患儿同一医院选取 62 例健康儿童(对照组)及其生物学母亲作对照。两组儿童及其生物学母亲的居住地、年龄、民族、职业、受教育程度、遗传病史、孕龄及流产史等一般资料比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

**1.2 问卷调查及标本采集** 采取访谈式的问卷调查方式了解两组母亲的居住地、年龄、民族、职业、受教育程度、遗传病史、母亲孕龄及流产史等情况。然后抽取两组母亲的外周静脉血 2 mL,2%乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,用苯酚/氯仿法提取白细胞基因组 DNA,琼脂糖电泳及紫外分光光度计分别检测基因组 DNA 的完整性及纯度。此外,以同样方法抽取并处理两组儿童的静脉血 2 mL,得到的 DNA 标本用于检测两组儿童的基因型。

**1.3 检测 C770T 基因型** 采用等位基因扩增技术<sup>[7]</sup>检测 CBS C770T 基因型。聚合酶链反应(PCR)试剂为 Takara 公司产品,PCR 扩增仪及凝胶成像仪均为 BD 公司产品,琼脂糖为 Biowest Agarose。(1)PCR 反应体系:①引物设计参照有关文献<sup>[5]</sup>,由上海捷瑞生物工程公司合成,野生正义引物为(DNA 位置 8219-8238):5'-GGG CTG AGA TTG TGA GGA C-3',突变正义引物为:5'-GGG CTG AGA TTG TGA GGA T-3',反义引物(DNA 位置 8640-8658):5'-AGA TGG ACA GAG GGA CGC-3';②PCR 反应总体积为 50  $\mu$ L,包括以下组分:10 $\times$ PCR Buffer 5  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L 正向及反向引物各 2  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L dNTPs 1  $\mu$ L,Taq 聚合酶 1.25 U,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L,补充 dH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L。(2)PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,以 94 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 59 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 60 s 为 1 个循环,共扩增 35 个循环,最后延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物直接采用 15 g/L 琼脂糖凝胶检测,以 DL2000 为 DNA Marker,电泳条带在紫外凝胶成像仪下观察并且拍照。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,C770T 基因型及等位基因频率分布差异采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,并且应用比值比(OR)和 95%可信区间(CI)评估基因突变对疾病发生的相关风险度。

## 2 结 果

**2.1 检测 C770T 基因型** 目的基因扩增产物片段大小为 439 bp,分别采用野生型引物和突变型引物扩增,扩增产物直接进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳条带。电泳条带显示,两组母亲及儿童 DNA 标本经 PCR 扩增,均产生两种基因型:野生型(C/C)、杂合突变型(C/T),未检测到纯合突变型(T/T),见图 1。

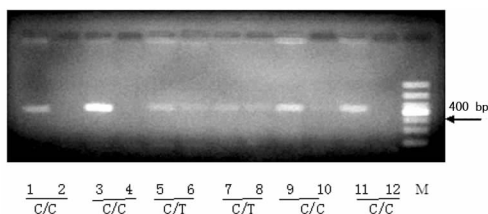


图 1 C770T 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

**2.2 两组母亲的基因突变频率比较** 病例组母亲 C/C、C/T 型及 T 等位基因频率与对照组母亲分别比较,差异均无统计

学意义( $P > 0.05$ ),C/T 型对病例组母亲 OR 为 1.79(95%CI 为 0.88~3.67),提示母亲 C770T 与子代 CHD 的发病无明显相关性,见表 1。

表 1 两组母亲 C770T 基因型及等位基因频率分布比较[n(%)]

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		C/C	C/T	T/T	C	T
病例组	62	28(45.16)	34(54.84)	0	90(72.58)	34(27.42)
对照组	62	37(59.68)	25(40.32)	0	99(79.84)	25(20.16)
$\chi^2$		2.62			1.80	

**2.3 两组儿童的基因突变频率比较** 病例组 C/C、C/T 型及 T 等位基因频率与对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),C/T 型对病例组 OR 为 1.80(95%CI 为 0.88~3.66),提示 C770T 与广西儿童 CHD 无明显相关性,见表 2。

表 2 两组儿童 C770T 基因型及等位基因频率分布比较[n(%)]

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		C/C	C/T	T/T	C	T
病例组	62	27(43.55)	35(56.45)	0	89(71.77)	35(28.23)
对照组	62	36(58.06)	26(41.94)	0	88(70.97)	36(29.03)
$\chi^2$		2.61			1.80	

## 3 讨 论

Hcy 血症是缺血性心血管疾病一个的独立危险因素已得到大量的研究支持<sup>[4-6]</sup>,而近年来的也表明,妊娠期羊水中 Hcy 异常增高与胎儿出生缺陷密切相关,动物实验表明 Hcy 血症能诱发鸡胚或鼠胚早期心血管发育畸形,因而 Hcy 血症可能是一种能损害或干扰早期心血管生长发育的致畸因子<sup>[7]</sup>。

Hcy 是蛋氨酸循环的中间产物,在体内主要有 3 条代谢途径<sup>[8]</sup>,其中转硫代谢是主要代谢途径之一,而 CBS 是调节 Hcy 转硫代谢途径的关键酶,在维生素 B<sub>6</sub> 为辅因子参与下,CBS 催化 Hcy 与丝氨酸发生缩合反应,生成胱硫醚。体内约 53% 的 Hcy 经过此途径被转化为半胱氨酸,因此 CBS 对于维持 Hcy 正常代谢,从而避免 Hcy 血症具有重要意义。人 CBS 基因定位于 21 号染色体靠近端粒位置(21q22.3),全长约 30 $\times$ 10<sup>3</sup> bp,包含 23 个外显子,编码 CBS 多肽 551 个氨基酸残基。CBS 基因具有多态性特点,目前已知该基因至少有 164 个突变点,其中多数为错义突变和缺失突变,不同的突变位点对 CBS 酶活性的影响并不相同。C770T 位点是 CBS 基因的常见突变位点之一,该位点位于 CBS 基因编码区第 7 外显子(EX7),由于 cDNA 的第 770 位 C 被 T 替代,从而导致第 257 位密码原编码的苏氨酸被蛋氨酸替代。C770T 位点突变最早在意大利籍 Hcy 尿症患者中被检出,并发现该位点突变可引起 CBS 酶活性严重下降,进而导致 Hcy 血症。这些研究提示第 257 位密码所编码的苏氨酸对 CBS 蛋白结构的稳定及酶活性的调节具有重要作用<sup>[6]</sup>;研究发现,存在 C770T 位点突变的 Hcy 血症患者对维生素 B<sub>6</sub> 治疗并不敏感,患者血管发生硬化及中枢系统出现病变等<sup>[8]</sup>。目前尚未见关于 C770T 突变与广西人群

CHD 相关性报道。

本研究结果显示,病例组母亲 C/T 型及 T 等位基因频率分别为 54.84% 和 27.42%, 对照组分别为 40.32% 和 20.16%, C/T 型及 T 等位基因频率分布在两组均差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 提示母亲 C770T 突变与子代 CHD 发病无明显相关性; C/T 型 OR 略大于 1.0, 提示在广西人群中, 母亲 C770T 位点可能并不足以构成子代 CHD 发病的独立遗传危险因素。此外, 结果还显示, 病例组 C/T 型及 T 等位基因频率分布与对照组比较差异亦无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 这表明 C770T 突变与广西儿童 CHD 发病无明显相关性, 并进一步证实, 在广西人群中, 母亲 C770T 突变不足以构成子代 CHD 发病的独立遗传危险因素。钟秋安等<sup>[9]</sup>检测 115 对广西 CHD 患儿及对照儿父母 CBS T833C 基因型, 结果也未发现父母 CBS T833C 基因型与子女 CHD 存在明显关联性。据此推测在广西人群中, 子代 CHD 的发病可能与 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶或蛋氨酸合成酶等 Hcy 其他代谢途径的相关酶基因突变有关。由于 CHD 是多基因共同作用而形成的疾病, 仅仅从母亲 CBS 基因某个或某几个位点突变来确定其对子代 CHD 发病的作用, 其意义可能较为有限, 况且, 研究本身受标本例数及基因位点代表性等因素的限制。因此, 要全面阐述母亲 CBS 基因突变与子代 CHD 发病的相关性, 仍需要在增加标本例数的基础上开展多基因、多位点以及多因素的综合研究。

参考文献

[1] Zhu JL, Olsen J, Sørensen HT, et al. Prenatal maternal bereavement and congenital heart defects in offspring; a registry-based study [J]. *Pediatrics*, 2013, 131 (4): e1225-e1230.

[2] Yakub M, Moti N, Parveen S, et al. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in

a Pakistani population [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3): e33222.

[3] 陈亚红, 鲁科峰, 蒋埜. 冠心病、高血压患者血清同型半胱氨酸和超敏 C 反应蛋白的水平变化及临床意义 [J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(21): 2350-2351.

[4] Brouns R, Ursem N, Lindemans J, et al. Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects [J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28(6): 485-493.

[5] Kozich V, Sokolová J, Klatovská V, et al. Cystathionine beta-synthase mutations; effect of mutation topology on folding and activity [J]. *Hum Mutat*, 2010, 31 (7): 809-819.

[6] Sebastio G, Sperandio MP, Panico M, et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 56 (6): 1324-1333.

[7] 李丽帆, 李金平, 顾国龙. 冠心病患者胱硫醚 β-合酶基因 G919A 和 C572T 突变频率 [J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(4): 317-319.

[8] Kim J, Hong SJ, Park JH, et al. Expression of cystathionine beta-synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(6): 1449-1454.

[9] 钟秋安, 仇小强, 曾小云, 等. 父母 MTHFR 基因、CBS 基因与子代先天性心脏病关系的研究 [J]. *广西医学*, 2006, 28(8): 1140-1142.

(收稿日期: 2013-10-15 修回日期: 2013-12-23)

(上接第 1343 页)

剂都不可能避免假阳性和假阴性, 鉴于 HIV 的筛查结果对感染者及其家属在心理和生理方面均会产生很大影响, 可选用高敏感性和特异性的 GICA 试剂和 ELISA 试剂联合使用, 减少假阳与假阴的出现。

参考文献

[1] 邢辉, 梁浩, 洪坤学, 等. 我国 HIV-1 主要流行株外膜蛋白 (env) 基因 V3~V4 区变异及其与生物学特性的关系 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(3): 185-189.

[2] 刘行德, 邓春发. ELISA 法和胶体金快速法检测 HIV 抗体的体会 [J]. *中国医学研究与临床*, 2008, 6(2): 56-57.

[3] 李影林. *中华医学检验全书* [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 379-382.

[4] 符丽芝, 许彬, 张万明. 酶免法检测抗-HIV 假阳性结果的消除 [J]. *临床输血与检验*, 2004, 6(2): 122-123.

[5] 马义才, 贾桂芳, 周琼秀, 等. 五种艾滋病病毒抗体诊断试剂临床质量比较 [J]. *中国性病艾滋病防治*, 2002, 8(4): 224-226.

[6] 黄泓艳, 胡中旺, 王海. HIV 抗体可疑标本实验室检测结果分析 [J]. *安徽预防医学杂志*, 2005(4): 227-228.

[7] 许健, 令狐颖, 周贤位, 等. 2007-2008 年贵州省医疗和采供血机构 HIV 感染者检测确证结果分析 [J]. *贵州医药*, 2009, 33(3): 216-218.

[8] 杨晓莉, 李敬云. HIV 感染确认的现状和发展趋势 [J]. *中国艾滋病性病*, 2007, 13(6): 585-587.

[9] Dock NL, Kleinman SH, Rayfield MA, et al. Human immunodeficiency virus infection and indeterminate western blot patterns. Prospective studies in a low prevalence population [J]. *Arch Intern Med*, 1991, 151(3): 525-530.

[10] Ribeiro-Rodrigues R, Da Silva Pinto Neto LF, Carla CB, et al. Performance characteristics of a rapid new immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(2): 303-307.

(收稿日期: 2013-11-25 修回日期: 2014-01-17)