

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2203002

论著·临床研究

## 母亲 *MTHFD1* 及 *MTHFD2* 基因多态性与子代先天性心脏病的关联

陈倩<sup>1</sup> 黄鹏<sup>2</sup> 宋欣俐<sup>1</sup> 刘亦萍<sup>1</sup> 孙梦婷<sup>1</sup> 王婷婷<sup>1</sup> 张森茂<sup>1</sup> 秦家碧<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅公共卫生学院流行病学与卫生统计系, 湖南长沙 410078;

2. 湖南省儿童医院心胸外科, 湖南长沙 410007)

**[摘要]** **目的** 探讨母亲亚甲基四氢叶酸脱氢酶 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, *MTHFD*) 1、2 (*MTHFD1*、*MTHFD2*) 基因多态性与子代先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 的关联。**方法** 采用以医院为基础的病例对照研究, 选取2017年11月至2020年3月在湖南省儿童医院就诊的683例单纯CHD患儿的母亲作为病例组, 选取同时时间段内就诊于同一家医院并排除任何先天畸形的740例儿童的母亲作为对照组。通过问卷调查, 收集研究对象的相关暴露信息。完成调查问卷后, 采集母亲5 mL静脉血, 用于*MTHFD1*、*MTHFD2*基因多态性的检测。采用多因素logistic回归模型分析*MTHFD1*、*MTHFD2*基因多态性与CHD的关联; 采用Haploview 4.2软件的四配子检验法构建单倍型, 评估单倍型与CHD的关联; 并采用广义多因子降维法和logistic回归法分析基因-基因交互作用与CHD的关联。**结果** 多因素logistic回归分析显示, 母亲*MTHFD1*基因rs11849530位点 (GA vs AA: OR=1.49; GG vs AA: OR=2.04) 和rs1256142位点 (GA vs GG: OR=2.34; AA vs GG: OR=3.25) 显著增加子代CHD的发生风险 ( $P<0.05$ ), 而母亲*MTHFD1*基因rs1950902位点 (AA vs GG: OR=0.57) 和*MTHFD2*基因rs1095966位点 (CA vs CC: OR=0.68) 显著降低子代CHD的发生风险 ( $P<0.05$ )。母亲携带单倍型G-G-G (OR=1.86)、G-A-G (OR=1.35) 显著增加子代CHD的发生风险 ( $P<0.05$ )。交互作用分析显示, 母亲*MTHFD*基因2个位点 (*MTHFD1* rs1950902、*MTHFD1* rs2236222) 的一阶交互作用及3个位点 (*MTHFD1* rs1950902、*MTHFD1* rs1256142、*MTHFD2* rs1095966) 的二阶交互作用可能与CHD的发生风险存在关联 ( $P<0.05$ )。**结论** 母亲*MTHFD1*、*MTHFD2*基因多态性及其单倍型, 以及2个位点 (*MTHFD1* rs1950902、*MTHFD1* rs2236222) 和3个位点 (*MTHFD1* rs1950902、*MTHFD1* rs1256142、*MTHFD2* rs1095966) 的交互作用与子代CHD的发生相关。

[中国当代儿科杂志, 2022, 24 (7): 797-805]

**[关键词]** 先天性心脏病; 亚甲基四氢叶酸脱氢酶; 病例对照研究; 单倍型; 基因-基因交互作用; 子代

### Association of maternal *MTHFD1* and *MTHFD2* gene polymorphisms with congenital heart disease in offspring

CHEN Qian, HUANG Peng, SONG Xin-Li, LIU Yi-Ping, SUN Meng-Ting, WANG Ting-Ting, ZHANG Sen-Mao, QIN Jia-Bi. Department of Epidemiology and Health Statistics, Xiangya School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China (Qin J-B, Email: qinjiabi@csu.edu.cn)

**Abstract: Objective** To study the association of maternal methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (*MTHFD1*) and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (*MTHFD2*) gene polymorphisms with congenital heart disease (CHD) in offspring. **Methods** A hospital-based case-control study was conducted. The mothers of 683 children with CHD alone who attended Hunan Children's Hospital, from November 2017 to March 2020 were enrolled as the case group, and the

[收稿日期] 2022-03-02; [接受日期] 2022-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81803313、82073653); 湖南省重点研发计划项目 (2018SK2063); 湖南省科技人才托举工程项目 (2020TJ-N07); 国家卫生健康委员会出生缺陷研究与预防重点实验室 (湖南省妇幼保健院) 开放课题 (KF2020006); 湖南省自然科学基金项目 (2018JJ2551)。

[作者简介] 陈倩, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 秦家碧, 男, 教授。Email: qinjiabi@csu.edu.cn。

mothers of 740 healthy children who attended the same hospital during the same period and did not have any deformity were enrolled as the control group. A questionnaire survey was performed to collect related exposure data, and then venous blood samples (5 mL) were collected from the mothers to detect *MTHFD1* and *MTHFD2* gene polymorphisms. A multivariate logistic regression analysis was used to evaluate the association of *MTHFD1* and *MTHFD2* gene polymorphisms with CHD. The four-gamete test in Haploview 4.2 software was used to construct haplotypes and evaluate the association between haplotypes and CHD. The generalized multifactor dimensionality reduction method and logistic regression analysis were used to examine gene-gene interaction and its association with CHD. **Results** The multivariate logistic regression analysis showed that maternal *MTHFD1* gene polymorphisms at rs11849530 (GA vs AA:  $OR=1.49$ ; GG vs AA:  $OR=2.04$ ) and at rs1256142 (GA vs GG:  $OR=2.34$ ; AA vs GG:  $OR=3.25$ ) significantly increased the risk of CHD in offspring ( $P<0.05$ ), while maternal *MTHFD1* gene polymorphisms at rs1950902 (AA vs GG:  $OR=0.57$ ) and *MTHFD2* gene polymorphisms at rs1095966 (CA vs CC:  $OR=0.68$ ) significantly reduced the risk of CHD in offspring ( $P<0.05$ ). The haplotypes of G-G-G ( $OR=1.86$ ) and G-A-G ( $OR=1.35$ ) in mothers significantly increased the risk of CHD in offspring ( $P<0.05$ ). The gene-gene interaction analyses showed that the first-order interaction between *MTHFD1* rs1950902 and *MTHFD1* rs2236222 and the second-order interaction involving *MTHFD1* rs1950902, *MTHFD1* rs1256142, and *MTHFD2* rs1095966 might be associated with risk of CHD ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Maternal *MTHFD1* and *MTHFD2* gene polymorphisms and their haplotypes, as well as the interaction between *MTHFD1* rs1950902 and *MTHFD1* rs2236222 and between *MTHFD1* rs1950902, *MTHFD1* rs1256142, and *MTHFD2* rs1095966, are associated with the risk of CHD in offspring. [Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2022, 24(7): 797-805]

**Key words:** Congenital heart disease; Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase; Case-control study; Haplotype; Gene-gene interaction; Offspring

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 是新生儿中最常见的出生缺陷类型<sup>[1]</sup>, 也是导致婴儿死亡率升高的主要原因<sup>[2]</sup>。全球CHD发病率约为0.9%, 意味着全球每年至少有135万CHD患儿出生<sup>[3]</sup>。目前许多学者认为CHD是由于遗传、环境等因素单独或综合作用的结果<sup>[4-5]</sup>。流行病学调查显示, 孕期叶酸的摄入可降低40%~60%子代CHD的发生<sup>[6]</sup>。叶酸缺乏可导致高同型半胱氨酸血症, 国内外有研究表明母亲同型半胱氨酸水平升高与子代CHD发生相关<sup>[7-8]</sup>。亚甲基四氢叶酸脱氢酶1 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1, *MTHFD1*) 基因位于染色体14q24, 编码的单一蛋白具有3种酶的活性。*MTHFD1*基因编码的C1四氢叶酸 (tetrahydrofolic acid, THF) 合成酶, 通过其甲酰-THF合成酶活性催化甲酸和THF向10-甲酰-THF的转化, 是一碳单位进入叶酸代谢的切入点<sup>[9]</sup>。亚甲基四氢叶酸脱氢酶2 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2, *MTHFD2*) 是由第2染色体上基因所编码的线粒体酶, 该酶于1960年首次在埃及希腹水肿瘤细胞中发现<sup>[10-11]</sup>。*MTHFD2*具有亚甲基四氢叶酸脱氢酶及环化水解酶的双重活性, 在叶酸代谢途径中催化2个连续的反应, *MTHFD1*、*MTHFD2*是体内叶酸代谢产物相互转化反应中的关键酶<sup>[12]</sup>。母亲*MTHFD1*基因、*MTHFD2*基因缺陷可能会影响酶的活性, 使叶酸代谢障碍及同型半胱氨酸再甲基化途径受阻, 从而引起同型半胱氨酸蓄积造成高同

型半胱氨酸血症。因此, 母亲*MTHFD1*基因、*MTHFD2*基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 可能通过影响叶酸与同型半胱氨酸代谢改变后代对CHD的易感性。目前, 关于母亲*MTHFD1*基因、*MTHFD2*基因与子代CHD关联的研究较少, 既往研究只关注*MTHFD1*基因的个别位点 (rs2236225、rs1950902、rs1076991、rs8010584)<sup>[13-20]</sup>, 事实上, *MTHFD1*基因、*MTHFD2*基因还有许多其他位点有待研究。本研究是基于医院开展的病例对照研究, 旨在评估母亲*MTHFD1*基因、*MTHFD2*基因多态性及基因之间的交互作用与子代CHD的关联, 为叶酸-同型半胱氨酸代谢通路上相关基因对CHD的易感性提供流行病学依据, 也为揭示叶酸预防出生缺陷的潜在作用机制提供线索。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

本研究采用以医院为基础的病例对照研究, 选取2017年11月至2020年3月在湖南省儿童医院心胸外科就诊的683例CHD患儿的母亲作为病例组, 选取同时间段内就诊于同一家医院并排除任何先天畸形的740例儿童的母亲作为对照组。本研究已获中南大学湘雅公共卫生学院伦理委员会审批 (审批号: XYGW-2018-07), 并进行了临床试验注册 (注册号: ChiCTR1800016635)。

## 1.2 纳入和排除标准

病例组纳入标准：(1) 经彩色多普勒超声和/或手术确诊患单纯性CHD（除心脏畸形外未合并其他系统畸形）患儿的母亲；(2) 患儿母亲彼此间无亲缘关系；(3) 自愿参加本研究并签署知情同意书。病例组排除标准：(1) 患儿合并其他先天性疾病；(2) 双胎或多胎妊娠；(3) 非自然受孕；(4) 民族为少数民族；(5) 因患精神疾病、情绪极度不稳定而无法配合调查或对孕前、孕期暴露情况记忆不清；(6) 与患儿无血缘关系；(7) 无法提供血液样本；(8) 无法完成问卷调查。

对照组纳入标准：(1) 经病史询问及临床诊断排除了CHD和/或CHD以外的其他先天性疾病的患儿母亲；(2) 与病例无亲缘关系，且对照彼此之间无亲缘关系；(3) 经项目告知后，自愿加入研究并签署知情同意书。对照组排除标准：(1) 双胎或多胎妊娠；(2) 非自然受孕；(3) 民族为少数民族；(4) 因患精神疾病、情绪极度不稳定而无法配合调查或对孕前、孕期暴露情况记忆不清；(5) 与患儿无血缘关系；(6) 无法提供血液样本；(7) 未完成问卷调查。

## 1.3 问卷调查

采用问卷调查以下内容：孕母的社会人口学特征（孕龄、文化程度、过去1年的家庭收入、民族和居住地）、家族史（近亲婚姻、先天畸形）、既往不良妊娠史（自然流产、死胎、死产、早产、低出生体重、妊娠高血压和妊娠糖尿病）、围孕期感冒和发热史、围孕期生活行为史（主动吸烟、被动吸烟、饮酒史等）、围孕期饮茶习惯、围孕期环境污染接触史、围孕期叶酸服用情况、孕母染发或烫发和饲养或亲密接触宠物等。

## 1.4 DNA的提取和基因多态性检测

在研究对象入组后24 h内，由所在科室的护士采用乙二胺四乙酸抗凝管采集研究对象5 mL外周静脉血。血液采集后立即于4℃冰箱内保存并在12 h内低温运送回实验室，3 500 r/min下离心15 min，分离血浆及血细胞并进行分装，标记研究对象分组及编号后保存于-80℃低温冰箱。参考已发表的文献所介绍的方法<sup>[21]</sup>筛选基因的待检位点。具体为：检索NCBI数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，查询并核实MTHFD1、MTHFD2基因的主要SNP位点，并结合HapMap数据库核实SNP位点信息，要求选择tanSNP时 $r^2$ 所设的阈值不小于0.8且要求各位点最小等位基因频率（minor

allele frequency, MAF)  $\geq 10\%$ 。最终选择了13个基因位点（rs1950902、rs2236225、rs2236222、rs11849530、rs1256146、rs2236224、rs1256142、rs34616731、rs7571842、rs702466、rs828858、rs828903、rs1095966）作为本研究的待检基因位点。利用MassARRAY飞行时间质谱（Agena iPLEX assay, San Diego, CA, USA）对MTHFD1、MTHFD2基因的13个SNP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。

## 1.5 统计学分析

计数资料采用频数和百分率或构成比(%)表示，2组间计数资料的比较采用卡方检验或Fisher确切概率法，等级资料的比较采用Wilcoxon秩和检验。涉及多重比较时，采用错误发现率(false discovery rate, FDR)校正的方法调整P值以控制假阳性率，得到校正P值( $Q_{FDR}$ )，并以 $Q_{FDR} \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。在描述比较基因多态性位点基因型分布频率之前，对照组人群进行Hardy-Weinberg平衡检验， $P \geq 0.05$ 则说明各基因频率达到遗传平衡。采用单因素和多因素logistic回归分析，分别计算未调整和调整的相对危险比(odds ratio, OR)及95%可信区间(confidence interval, CI)，并控制潜在的混杂因素，以检验母亲MTHFD1、MTHFD2基因多态性与CHD的关联强度。利用Haploview 4.2软件计算不同SNP位点之间的 $r^2$ 值， $r^2 < 0.8$ 表明SNP位点之间不存在连锁不平衡；同时，利用四配子检验法构建单倍型，并分析各单倍型在病例组和对照组之间的分布。采用广义多因子降维法(generalized multifactor dimensionality reduction, GMDR)和logistic回归法分析基因-基因交互作用，在模型有统计学意义的情况下，测试样本的准确度越大、交叉验证一致性越接近10，其模型越好。

## 2 结果

### 2.1 2组基线资料的比较

病例组和对照组的基线数据汇总见表1。结果显示，孕母居住地、文化程度、家庭年收入、家族成员有先天畸形史、近亲婚配史、既往不良妊娠史（死胎或死产、妊娠糖尿病、妊娠高血压）及围孕期感冒或发热史、叶酸补充、不良生活习惯（主动或被动吸烟、饮酒）、围孕期环境污染接触史、围孕期孕母染发或烫发和饲养或亲密接

触宠物等指标在 2 组间的比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在后续多因素分析中, 这些因素将作为混杂因素进行控制。

表 1 病例组和对照组的基线资料比较 [n (%)]

变量	对照组 (n=740)	病例组 (n=683)	$\chi^2/Z$ 值	P值
孕母怀孕时年龄(岁)				
<35	635(85.8)	595(87.1)	0.516	0.473
≥35	105(14.2)	88(12.9)		
居住地			59.121	<0.001
城镇	338(45.7)	178(26.1)		
农村	402(54.3)	505(73.9)		
孕母文化程度			15.471	<0.001 <sup>b</sup>
小学或以下	9(1.2)	98(14.3)		
初中	144(19.5)	282(41.3)		
高中或中专	246(33.2)	196(28.7)		
大学或本科及以上	341(46.1)	107(15.7)		
家庭年收入(万)			19.060	<0.001 <sup>b</sup>
≤5	211(28.5)	544(79.6)		
6~10	319(43.1)	100(14.6)		
11~15	69(9.3)	17(2.5)		
≥16	141(19.1)	22(3.2)		
家族成员有先天畸形史	7(0.9)	44(6.4)	31.050	<0.001
孕母有出生缺陷	3(0.4)	7(1.0)	-	0.210 <sup>a</sup>
近亲婚配史	3(0.4)	25(3.7)	19.508	<0.001
自然流产史	68(9.2)	79(11.6)	2.167	0.141
死胎或死产史	3(0.4)	23(3.4)	17.373	<0.001
子代早产史	6(0.8)	10(1.5)	1.364	0.243
子代低出生体重史	2(0.3)	6(0.9)	-	0.164 <sup>a</sup>
妊娠糖尿病史	23(3.1)	67(9.8)	26.924	<0.001
妊娠高血压史	17(2.3)	46(6.7)	16.531	<0.001
围孕期感冒史	74(10.0)	140(20.5)	30.635	<0.001
围孕期发热史	13(1.8)	59(8.6)	35.015	<0.001
围孕期叶酸服用	687(92.8)	577(84.5)	24.996	<0.001
围孕期主动吸烟	16(2.2)	50(7.3)	21.369	<0.001
围孕期被动吸烟	265(35.8)	357(52.3)	39.104	<0.001
围孕期饮酒	54(7.3)	88(12.9)	12.342	<0.001
围孕期饮茶	49(6.6)	37(5.4)	0.907	0.341
围孕期环境污染物接触	53(7.2)	135(19.8)	49.206	<0.001
围孕期染发烫发	45(6.1)	86(12.6)	18.011	<0.001
围孕期饲养或亲密接触宠物	51(6.9)	90(13.2)	15.718	<0.001

注: a 示采用 Fisher 确切概率法; b 示采用 Wilcoxon 秩和检验。

## 2.2 对照组 MTHFD1 和 MTHFD2 基因位点 Hardy-Weinberg 平衡检验

对照组 MTHFD1 和 MTHFD2 基因型 Hardy-Weinberg 平衡检验结果如表 2~3 所示, 对照人群 MTHFD1 和 MTHFD2 基因的 13 个位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 (均  $P > 0.05$ ), 表明对照组的样本人群具有良好的群体代表性。

表 2 母亲 MTHFD1 基因型分布频率及对照组 Hardy-Weinberg 平衡检验

基因位点	对照组(例)	病例组(例)	P值
rs1950902(GG/GA/AA)	274/363/103	315/306/62	0.322
rs2236225(GG/GA/AA)	495/219/26	420/238/25	0.770
rs2236222(AA/GA/GG)	458/247/35	375/248/60	0.818
rs11849530(AA/GA/GG)	346/297/97	308/269/106	0.100
rs1256146(GG/GA/AA)	571/158/11	549/123/11	0.985
rs2236224(GG/GA/AA)	393/297/50	342/296/45	0.543
rs1256142(GG/GA/AA)	215/361/164	111/385/187	0.593
rs34616731(TT/AT/AA)	547/180/13	530/139/14	0.682

表 3 母亲 MTHFD2 基因型分布频率及对照组 Hardy-Weinberg 平衡检验

基因位点	对照组(例)	病例组(例)	P值
rs7571842(GG/GA/AA)	337/323/80	305/333/45	0.843
rs702466(CC/GC/GG)	472/237/31	414/229/40	0.856
rs828858(TT/TA/AA)	580/152/8	537/137/9	0.575
rs828903(AA/AG/GG)	470/233/37	433/207/43	0.249
rs1095966(CC/CA/AA)	259/368/113	270/325/88	0.343

## 2.3 母亲 MTHFD1 和 MTHFD2 基因多态性与子代 CHD 的关联分析

母亲 MTHFD1 和 MTHFD2 基因上 13 个位点的 SNP 与子代 CHD 的关联分析结果如表 4~5 所示。在调整表 1 基线资料比较中差异有统计学意义的混杂因素后, 母亲 MTHFD1 基因 rs1950902、rs11849530 和 rs1256142 位点及 MTHFD2 基因 rs1095966 位点的多态性与子代 CHD 存在关联。

在位点 rs1950902 上, 携带 AA 基因型的母亲与携带 GG 基因型相比, 子代 CHD 的风险显著降低 ( $OR=0.57$ ,  $Q_{FDR}=0.040$ )。该位点的隐性模型 ( $OR=0.62$ ,  $Q_{FDR}=0.048$ ) 和加性模型 ( $OR=0.78$ ,  $Q_{FDR}=0.040$ ) 可降低子代 CHD 的风险。

在位点 rs11849530 上, 携带 GA ( $OR=1.49$ ,  $Q_{FDR}=0.011$ ) 或 GG ( $OR=2.04$ ,  $Q_{FDR}=0.002$ ) 基因型的母亲与携带 AA 基因型相比, 子代 CHD 的风险显

著增加。该位点的显性模型 ( $OR=1.62$ ,  $Q_{FDR}=0.002$ )、隐性模型 ( $OR=1.71$ ,  $Q_{FDR}=0.009$ ) 和加性模型 ( $OR=1.44$ ,  $Q_{FDR}=0.001$ ) 与子代 CHD 风险存在关联。

在位点 rs1256142 上, 携带 GA ( $OR=2.34$ ,  $Q_{FDR}<0.001$ ) 或 AA ( $OR=3.25$ ,  $Q_{FDR}<0.001$ ) 基因型的母亲与携带 GG 基因型相比, 子代 CHD 的风险显著增加。该位点的显性模型 ( $OR=2.59$ ,  $Q_{FDR}<0.001$ )、隐性模型 ( $OR=1.77$ ,  $Q_{FDR}=0.001$ ) 和加性模型 ( $OR=1.78$ ,  $Q_{FDR}<0.001$ ) 与子代 CHD 风险存在关联。

在位点 rs1095966 上, 携带 CA ( $OR=0.68$ ,  $Q_{FDR}=0.032$ ) 基因型的母亲与携带 CC 基因型相比, 子代 CHD 的风险显著降低。该位点的显性模型 ( $OR=0.68$ ,  $Q_{FDR}=0.040$ ) 和加性模型 ( $OR=0.78$ ,  $Q_{FDR}=0.032$ ) 可降低子代 CHD 的风险。

表 4 母亲 MTHFD1 基因多态性与子代 CHD 的关联

基因位点	单因素 logistic 回归分析		多因素 logistic 回归分析		
	未调整 OR (95%CI)	P 值	调整的 OR (95%CI) *	P 值	$Q_{FDR}$ **
rs1950902					
基因型					
GG	1		1		
GA	0.73(0.59~0.92)	0.006	0.84(0.63~1.12)	0.235	0.235
AA	0.52(0.37~0.75)	<0.001	0.57(0.36~0.89)	0.014	0.040
基因模型					
显性模型	0.69(0.56~0.85)	<0.001	0.77(0.59~1.02)	0.065	0.081
隐性模型	0.62(0.44~0.86)	0.005	0.62(0.40~0.95)	0.029	0.048
加性模型	0.73(0.62~0.85)	<0.001	0.78(0.64~0.96)	0.016	0.040
rs2236225					
基因型					
GG	1		1		
GA	1.28(1.02~1.60)	0.031	1.27(0.94~1.70)	0.119	0.595
AA	1.13(0.65~1.99)	0.664	1.06(0.52~2.15)	0.871	0.940
基因模型					
显性模型	1.27(1.02~1.57)	0.034	1.24(0.93~1.65)	0.137	0.343
隐性模型	1.04(0.60~1.83)	0.882	0.97(0.48~1.96)	0.940	0.940
加性模型	1.20(0.99~1.44)	0.061	1.17(0.91~1.49)	0.215	0.358
rs2236222					
基因型					
AA	1		1		
GA	1.23(0.98~1.53)	0.073	1.03(0.77~1.38)	0.828	0.828
GG	2.09(1.35~3.25)	0.001	1.53(0.85~2.72)	0.154	0.770
基因模型					
显性模型	1.33(1.08~1.65)	0.008	1.10(0.83~1.44)	0.515	0.644
隐性模型	1.94(1.26~2.98)	0.003	1.51(0.85~2.69)	0.158	0.395
加性模型	1.34(1.13~1.58)	0.001	1.13(0.91~1.41)	0.280	0.467

表 4 (续)

基因位点	单因素 logistic 回归分析		多因素 logistic 回归分析		
	未调整 OR (95%CI)	P 值	调整的 OR (95%CI) *	P 值	$Q_{FDR}$ **
rs11849530					
基因型					
AA	1		1		
GA	1.02(0.81~1.27)	0.880	1.49(1.10~2.02)	0.011	0.011
GG	1.23(0.90~1.68)	0.202	2.04(1.35~3.10)	0.001	0.002
基因模型					
显性模型	1.07(0.87~1.32)	0.530	1.62(1.23~2.15)	0.001	0.002
隐性模型	1.22(0.90~1.64)	0.194	1.71(1.16~2.53)	0.007	0.009
加性模型	1.09(0.94~1.26)	0.279	1.44(1.19~1.75)	<0.001	0.001
rs1256146					
基因型					
GG	1		1		
GA	0.81(0.62~1.05)	0.116	0.82(0.58~1.16)	0.263	0.263
AA	1.04(0.45~2.42)	0.927	0.52(0.19~1.40)	0.198	0.330
基因模型					
显性模型	0.83(0.64~1.06)	0.139	0.79(0.56~1.10)	0.155	0.388
隐性模型	1.09(0.47~2.52)	0.850	0.54(0.20~1.45)	0.219	0.274
加性模型	0.86(0.68~1.08)	0.201	0.79(0.59~1.05)	0.108	0.540
rs2236224					
基因型					
GG	1		1		
GA	1.15(0.92~1.42)	0.220	0.82(0.62~1.10)	0.187	0.935
AA	1.03(0.67~1.59)	0.878	0.92(0.53~1.61)	0.767	0.959
基因模型					
显性模型	1.13(0.92~1.39)	0.252	0.84(0.63~1.10)	0.206	0.515
隐性模型	0.97(0.64~1.48)	0.899	1.00(0.58~1.73)	0.988	0.988
加性模型	1.08(0.91~1.28)	0.382	0.89(0.71~1.11)	0.310	0.517
rs1256142					
基因型					
GG	1		1		
GA	2.07(1.58~2.71)	<0.001	2.34(1.63~3.36)	<0.001	<0.001
AA	2.21(1.62~3.01)	<0.001	3.25(2.14~4.94)	<0.001	<0.001
基因模型					
显性模型	2.11(1.63~2.73)	<0.001	2.59(1.83~3.67)	<0.001	<0.001
隐性模型	1.32(1.04~1.69)	0.023	1.77(1.28~2.43)	<0.001	0.001
加性模型	1.47(1.26~1.71)	<0.001	1.78(1.45~2.19)	<0.001	<0.001
rs34616731					
基因型					
TT	1		1		
AT	0.80(0.62~1.03)	0.077	0.78(0.56~1.09)	0.150	0.250
AA	1.11(0.52~2.39)	0.786	0.62(0.25~1.54)	0.305	0.381
基因模型					
显性模型	0.82(0.64~1.04)	0.106	0.77(0.56~1.05)	0.100	0.250
隐性模型	1.17(0.55~2.51)	0.686	0.65(0.26~1.61)	0.351	0.351
加性模型	0.89(0.70~1.07)	0.185	0.79(0.60~1.04)	0.086	0.430

注: \*调整表 1 基线资料比较中差异有统计学意义的混杂因素; \*\*采用错误发现率校正的方法调整 P 值得到的校正 P 值。显性模型: 纯合突变型+杂合型 vs 野生型; 隐性模型: 纯合突变型 vs 野生型+杂合型; 加性模型: 纯合突变型 vs 杂合型 vs 野生型。

表 5 母亲 *MTHFD2* 基因多态性与子代 CHD 的关联

基因位点	单因素 logistic 回归分析		多因素 logistic 回归分析		
	未调整 OR (95% CI)	P 值	调整的 OR (95% CI)*	P 值	Q <sub>FDR</sub> **
<b>rs7571842</b>					
基因型					
GG	1		1		
GA	1.14(0.92~1.42)	0.241	1.12(0.84~1.49)	0.445	0.556
AA	0.62(0.42~0.92)	0.019	0.55(0.33~0.91)	0.020	0.050
基因模型					
显性模型	1.04(0.84~1.28)	0.738	0.99(0.76~1.31)	0.963	0.963
隐性模型	0.58(0.40~0.85)	0.005	0.52(0.32~0.86)	0.008	0.040
加性模型	0.92(0.78~1.09)	0.324	0.88(0.71~1.08)	0.223	0.372
<b>rs702466</b>					
基因型					
CC	1		1		
GC	1.10(0.88~1.38)	0.398	1.14(0.85~1.52)	0.384	0.384
GG	1.47(0.90~2.40)	0.120	1.81(0.94~3.48)	0.075	0.375
基因模型					
显性模型	1.14(0.92~1.42)	0.218	1.20(0.91~1.59)	0.195	0.244
隐性模型	1.42(0.88~2.30)	0.151	1.73(0.91~3.29)	0.096	0.160
加性模型	1.15(0.96~1.37)	0.121	1.22(0.97~1.55)	0.091	0.227
<b>rs828858</b>					
基因型					
TT	1		1		
TA	0.97(0.75~1.26)	0.839	1.00(0.71~1.41)	0.996	0.996
AA	1.22(0.47~3.17)	0.691	2.08(0.63~6.84)	0.229	0.573
基因模型					
显性模型	0.99(0.77~1.27)	0.910	1.05(0.75~1.46)	0.791	0.989
隐性模型	1.22(0.47~3.19)	0.682	2.08(0.63~6.83)	0.228	0.573
加性模型	1.00(0.79~1.26)	0.997	1.09(0.80~1.48)	0.585	0.975
<b>rs828903</b>					
基因型					
AA	1		1		
AG	0.96(0.77~1.21)	0.755	1.09(0.81~1.46)	0.577	0.577
GG	1.26(0.80~2.00)	0.321	1.48(0.79~2.78)	0.219	0.420
基因模型					
显性模型	1.01(0.81~1.25)	0.964	1.13(0.86~1.50)	0.385	0.481
隐性模型	1.28(0.81~2.01)	0.290	1.44(0.78~2.67)	0.249	0.420
加性模型	1.04(0.87~1.24)	0.656	1.15(0.91~1.44)	0.252	0.420
<b>rs1095966</b>					
基因型					
CC	1		1		
CA	0.85(0.68~1.06)	0.151	0.68(0.51~0.92)	0.013	0.032
AA	0.75(0.54~1.04)	0.080	0.67(0.44~1.03)	0.068	0.085
基因模型					
显性模型	0.82(0.66~1.02)	0.077	0.68(0.51~0.91)	0.008	0.040
隐性模型	0.82(0.61~1.11)	0.197	0.83(0.56~1.23)	0.356	0.356
加性模型	0.86(0.74~1.00)	0.055	0.78(0.64~0.96)	0.019	0.032

注：\*调整表 1 基线资料比较中差异有统计学意义的混杂因素；\*\*采用错误发现率校正的方法调整 P 值后得到的校正 P 值。显性模型：纯合突变型+杂合型 vs 野生型；隐性模型：纯合突变型 vs 野生型+杂合型；加性模型：纯合突变型 vs 杂合型 vs 野生型。

## 2.4 连锁不平衡及单倍型分析

连锁不平衡分析显示，母亲 *MTHFD1* 和 *MTHFD2* 基因位点间不存在连锁不平衡 ( $r^2 < 0.8$ )。13 个 SNP 位点共形成了 3 个单倍型块 (Block) (图 1)。SNP 位点形成的单倍型在 2 组间的分布情况如表 6 所示，Block1 内包含 3 个位点：rs2236225、rs2236224 和 rs1256142，构成 4 种单倍型：G-G-A、G-G-G、A-A-G 和 G-A-G，其中 G-G-G ( $OR=1.86$ ,  $95\%CI: 1.53\sim 2.26$ )、G-A-G ( $OR=1.35$ ,  $95\%CI: 1.03\sim 1.78$ ) 单倍型显著增加子代 CHD 的风险 ( $Q_{FDR} \leq 0.05$ )；Block2 内包含 2 个位点：rs1256146 和 rs34616731，构成 3 种单倍型：G-T、A-A、G-A；Block3 内包含 3 个位点 rs828858、rs828903 和 rs7571842，构成 4 种单倍型：T-A-G、T-A-A、A-G-G、T-G-G。

## 2.5 基因-基因交互作用分析

运用 GMDR 分析母亲 *MTHFD1* 和 *MTHFD2* 基因 13 个 SNP 位点间的交互作用，结果如表 7 所示：2 个位点 (rs1950902、rs2236222) 的一阶交互作用、3 个位点 (rs1950902、rs1256142、rs1095966) 的二阶交互作用可能与 CHD 的发生风险存在关联 ( $P < 0.05$ )。采用 logistic 回归法分析上述 3 个位点的二阶交互作用，显示母亲 rs1950902 位点携带基因型 GA+AA、rs1256142 位点携带基因型 GG、rs1095966 位点携带基因型 CC ( $OR=0.02$ ,  $95\%CI: 0.01\sim 0.12$ )，以及 rs1950902 位点携带基因型 GA+AA、rs1256142 位点携带基因型 GG、rs1095966 位点携带基因型 CC+CA ( $OR=0.32$ ,  $95\%CI: 0.14\sim 0.72$ ) 可能降低子代 CHD 的风险 ( $Q_{FDR} < 0.05$ )，见表 8。

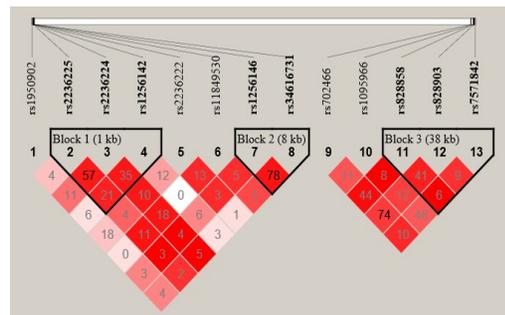


图 1 *MTHFD1* 和 *MTHFD2* 基因各位点连锁不平衡图 图中红色方框代表位点连锁不平衡的程度，颜色越深表示位点之间连锁不平衡强度越强。框中数值为连锁不平衡指标的具体值，接近于 100，提示两位点之间连锁不平衡强度越强；接近于 0，则提示两位点连锁不平衡强度越弱，即趋向于遗传平衡。框上方数字 1~13 分别对应数字上方的位点 rs 号。

表 6 SNP 位点形成的单倍型在病例组 and 对照组中的分布情况

单倍型块	单倍型	对照组 (%)	病例组 (%)	$\chi^2$	OR(95%CI)	P	Q <sub>FDR</sub>
Block1	G-G-A	45.9	54.2	19.521	1		
	G-G-G	26.4	16.8	38.777	1.86(1.53~2.26)	<0.001	0.003
	A-A-G	17.3	19.6	2.560	1.04(0.85~1.27)	0.697	0.697
	G-A-G	8.9	7.8	1.160	1.35(1.03~1.78)	0.033	0.050
Block2	G-T	85.8	87.1	0.990	1		
	A-A	12.0	9.9	2.999	1.22(0.97~1.55)	0.097	0.194
	G-A	2.0	2.3	0.312	0.88(0.53~1.47)	0.621	0.621
Block3	T-A-G	46.9	47.6	0.145	1		
	T-A-A	31.9	30.2	0.933	1.07(0.90~1.27)	0.426	0.702
	A-G-G	10.9	10.5	0.093	1.05(0.82~1.35)	0.702	0.702
	T-G-G	9.1	10.1	0.723	0.92(0.71~1.19)	0.533	0.702

表 7 MTHFD1 和 MTHFD2 基因位点间交互作用分析

位点数	模型	训练样本的准确度	测试样本的准确度	P <sup>*</sup>	交叉检验的一致性
1	rs1256142	0.5629	0.5616	0.0107	10/10
2	rs1950902_rs2236222	0.5918	0.5800	0.0010	10/10
3	rs1950902_rs1256142_rs1095966	0.6200	0.5588	0.0107	6/10

注: \*调整表 1 基线资料比较中差异有统计学意义的混杂因素。

表 8 MTHFD1 和 MTHFD2 基因位点间交互作用的 logistic 回归分析

位点 1	位点 2	位点 3	OR(95%CI) <sup>*</sup>	P	Q <sub>FDR</sub> <sup>**</sup>			
rs1950902	rs2236222	GG	AA	1				
		GA+AA	AA	0.69(0.48~1.00)	0.049	0.147		
		GG	GA+GG	0.88(0.52~1.49)	0.629	0.944		
		GA+AA	GA+GG	1.06(0.76~1.48)	0.735	0.735		
rs1950902	rs1256142	rs1095966	GG	GG	CC	1		
			GA+AA	GG	CC	0.02(0.01~0.12)	<0.001	<0.001
			GG	GG	CC+CA	0.42(0.19~0.94)	0.034	0.079
			GA+AA	GG	CC+CA	0.32(0.14~0.72)	0.006	0.021
			GG	GA+AA	CC	1.09(0.52~2.28)	0.818	0.818
			GA+AA	GA+AA	CC	1.58(0.81~3.05)	0.178	0.311
			GG	GA+AA	CC+CA	1.26(0.65~2.43)	0.492	0.574
			GA+AA	GA+AA	CC+CA	0.70(0.37~1.32)	0.270	0.378

注: \*调整表 1 基线资料比较中差异有统计学意义的混杂因素; \*\*采用错误发现率校正的方法调整 P 值后得到的校正 P 值。

### 3 讨论

CHD 是影响儿童健康水平和人口素质的重大公共卫生问题<sup>[22]</sup>。研究母亲叶酸代谢过程关键酶(如 MTHFD1、MTHFD2) 基因多态性与子代 CHD 的关联, 可为判断亲代是否为高风险个体提供科学依据。但目前相关研究多倾向于关注患儿

MTHFD1 基因多态性与 CHD 发生风险的关联<sup>[13-19]</sup>, 涉及母亲 MTHFD1 基因多态性与子代 CHD 风险的关联的流行病学证据还十分有限。Cheng 等<sup>[20]</sup> 发现母亲 MTHFD1 基因 rs2236225 位点多态性与子代 CHD 存在有统计学意义的关联, 并且指出, CHD 患儿的母亲具有较低的叶酸水平及较高的血清同型半胱氨酸浓度, 这从流行病学的角度部分解释

了母亲 rs2236225 位点基因多态性和子代 CHD 发生的生物学合理性。然而, 本研究未发现母亲 *MTHFD1* 基因 rs2236225 位点多态性与子代 CHD 发生风险的关联, 与 Song 等<sup>[9]</sup> 和 Christensen 等<sup>[15]</sup> 研究结果一致。此外, 本研究发现母亲 *MTHFD1* 基因 rs1950902、rs11849530 和 rs1256142 位点多态性与子代 CHD 存在有统计学意义的关联, 与 Song 等<sup>[9]</sup> 研究结果一致。有研究者报道了 *MTHFD2* 基因多态性与癌症的关联<sup>[23]</sup>, 但目前尚无关于 *MTHFD2* 基因多态性与 CHD 关联的研究。

本研究分析了母亲 *MTHFD1* 和 *MTHFD2* 基因 13 个位点 (rs1950902、rs2236225、rs2236222、rs11849530、rs1256146、rs2236224、rs1256142、rs34616731、rs7571842、rs702466、rs828858、rs828903、rs1095966) 的 SNP 与子代 CHD 的关联, 结果表明, 母亲 *MTHFD1* 基因 rs1950902、rs11849530、rs1256142 位点及 *MTHFD2* 基因 rs1095966 位点的多态性与子代 CHD 存在关联, 没有观察到 *MTHFD1* 基因 rs2236225 位点与子代 CHD 风险之间的显著相关性, 可能是由于不同人群之间的遗传差异造成的, 也可能是叶酸-同型半胱氨酸失衡对 CHD 各亚型的易感性不同<sup>[24]</sup>。由于本研究中 CHD 各亚型病例的样本量有限, 我们没有分析特定 CHD 亚型与母亲 *MTHFD1*、*MTHFD2* 基因多态性之间的关联。总的来说, 本研究中涉及的一些多态性之前还没有得到证实, 而且关于母亲 *MTHFD1*、*MTHFD2* 基因多态性与子代 CHD 关联性的文献仍然有限, 需要更进一步、更明确的证据来明确其机制。

本研究在基因与疾病的关联分析中, 13 个位点共形成了 3 个单倍型块, Block1 中的单倍型 G-G-G 和 G-A-G 显著增加了子代 CHD 的风险。多数学者认为 CHD 具有多基因遗传疾病的特征, 疾病的发生往往是由于多个基因共同作用的结果。不同基因之间或同一基因不同位点间可能通过相互作用影响疾病的发生发展, 若研究忽略了基因-基因之间的交互作用, 遗传变异的真实效应则将无法被准确地描述出来<sup>[25]</sup>。目前关于母亲基因-基因交互作用对子代 CHD 影响的研究较少, 且不同的研究所关注的基因及位点存在差异。本研究运用了 GMDR 和 logistic 回归法分析基因-基因的交互作用, 结果显示, 2 个位点 (*MTHFD1* rs1950902、*MTHFD1* rs2236222) 的一阶交互作用、3 个位点 (*MTHFD1* rs1950902、*MTHFD1* rs1256142、

*MTHFD2* rs1095966) 的二阶交互作用可能与 CHD 的发生存在关联。

本研究存在以下局限性: 第一, 本研究是以医院为基础的病例对照研究, 通过问卷访谈的方式回顾性收集研究对象及其配偶围孕期的相关暴露因素信息, 可能存在回忆偏倚; 第二, 由于 CHD 儿童是一个相对特殊的人群, 不可能通过随机抽样来选择研究对象, 且本次研究只选择了一家医院, 结果的代表性有待进一步研究; 第三, 由于样本量的限制, 本研究未对 *MTHFD1*、*MTHFD2* 基因多态性与不同 CHD 亚型的关联进行评估。

综上所述, 本研究显示, 母亲 *MTHFD1* 基因 rs1950902、rs11849530、rs1256142 位点和 *MTHFD2* 基因 rs1095966 位点的多态性与子代 CHD 存在关联, *MTHFD1*、*MTHFD2* 基因位点构成的单倍型 (G-G-G 和 G-A-G) 也与子代 CHD 的发生有关。*MTHFD1*、*MTHFD2* 基因 2 个位点 (*MTHFD1* rs1950902、*MTHFD1* rs2236222) 的一阶交互作用、3 个位点 (*MTHFD1* rs1950902、*MTHFD1* rs1256142、*MTHFD2* rs1095966) 的二阶交互作用可能与子代 CHD 的发生风险存在关联。然而, *MTHFD1*、*MTHFD2* 基因的遗传变异影响 CHD 发生的作用机制仍不明确, 未来还需要开展更多研究。

利益冲突声明: 所有作者声明无任何利益冲突。

#### [参 考 文 献]

- [1] Rossano JW. Congenital heart disease: a global public health concern[J]. *Lancet Child Adolesc Health*, 2020, 4(3): 168-169. PMID: 31978370. DOI: 10.1016/S2352-4642(19)30429-8.
- [2] Parnell AS, Correa A. Analyses of trends in prevalence of congenital heart defects and folic acid supplementation[J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(3): 495-500. PMID: 28449454. PMCID: PMC5393985. DOI: 10.21037/jtd.2017.03.16.
- [3] Liu Y, Chen S, Zühlke L, et al. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies[J]. *Int J Epidemiol*, 2019, 48(2): 455-463. PMID: 30783674. PMCID: PMC6469300. DOI: 10.1093/ije/dyz009.
- [4] 王蕾, 王海丽, 常明秀, 等. 孕前及孕早期母体因素与子代复杂先天性心脏病的相关性研究[J]. *现代预防医学*, 2020, 47(4): 739-742.
- [5] Moreau JLM, Kesteven S, Martin EMMA, et al. Gene-environment interaction impacts on heart development and embryo survival[J]. *Development*, 2019, 146(4): dev172957.

- PMID: 30787001. DOI: 10.1242/dev.172957.
- [6] Stanhewicz AE, Kenney WL. Role of folic acid in nitric oxide bioavailability and vascular endothelial function[J]. *Nutr Rev*, 2017, 75(1): 61-70. PMID: 27974600. PMCID: PMC5155615. DOI: 10.1093/nutrit/nuw053.
- [7] 赵刘碧琦, 徐子力, 刘宗谕, 等. 叶酸代谢通路相关酶基因多态性与先天性心脏病的关系研究[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(14): 3371-3374. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2019.14.70.
- [8] Qu Y, Lin S, Zhuang J, et al. First-trimester maternal folic acid supplementation reduced risks of severe and most congenital heart diseases in offspring: a large case-control study[J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(13): e015652. PMID: 32613868. PMCID: PMC7670504. DOI: 10.1161/JAHA.119.015652.
- [9] Song X, Li Q, Diao J, et al. Association of *MTHFD1* gene polymorphisms and maternal smoking with risk of congenital heart disease: a hospital-based case-control study[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2022, 22(1): 88. PMID: 35100977. PMCID: PMC8805321. DOI: 10.1186/s12884-022-04419-2.
- [10] 何焕. *MTHFD2*在食管鳞癌中的表达及其临床预后意义[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020.
- [11] Tedeschi PM, Scotto KW, Kerrigan J, et al. *MTHFD2*—a new twist?[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7): 7368-7369. PMID: 26848977. PMCID: PMC4884922. DOI: 10.18632/oncotarget.7147.
- [12] Christensen KE, Mackenzie RE. Mitochondrial methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, and formyltetrahydrofolate synthetases[J]. *Vitam Horm*, 2008, 79: 393-410. PMID: 18804703. DOI: 10.1016/S0083-6729(08)00414-7.
- [13] Khatami M, Ratki FM, Tajfar S, et al. Relationship of the *MTHFD1* (rs2236225), *eNOS* (rs1799983), *CBS* (rs2850144) and *ACE* (rs4343) gene polymorphisms in a population of Iranian pediatric patients with congenital heart defects[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2017, 33(9): 442-448. PMID: 28865601. DOI: 10.1016/j.kjms.2017.05.016.
- [14] Wang B, Liu M, Yan W, et al. Association of SNPs in genes involved in folate metabolism with the risk of congenital heart disease[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013, 26(18): 1768-1777. PMID: 23701284. DOI: 10.3109/14767058.2013.799648.
- [15] Christensen KE, Rohlicek CV, Andelfinger GU, et al. The *MTHFD1* p. Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(2): 212-220. PMID: 18767138. DOI: 10.1002/humu.20830.
- [16] Huang J, Mei J, Jiang L, et al. *MTHFR* rs1801133 C>T polymorphism is associated with an increased risk of tetralogy of Fallot[J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(2): 172-176. PMID: 24649091. PMCID: PMC3917760. DOI: 10.3892/br.2014.222.
- [17] Jiang YC, Kuang LL, Sun SN, et al. Association of genetic polymorphisms of *de novo* nucleotide biosynthesis with increased CHD susceptibility in the northern Chinese population[J]. *Clin Genet*, 2017, 91(5): 748-755. PMID: 27659940. DOI: 10.1111/cge.12874.
- [18] 许晶. 基因区域多态性与先天性心脏病发病关系研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2010.
- [19] Xu J, Xu X, Xue L, et al. *MTHFR* c.1793G>A polymorphism is associated with congenital cardiac disease in a Chinese population[J]. *Cardiol Young*, 2010, 20(3): 318-326. PMID: 20374669. DOI: 10.1017/S1047951110000247.
- [20] Cheng J, Zhu WL, Dao JJ, et al. Relationship between polymorphism of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and congenital heart defect[J]. *Biomed Environ Sci*, 2005, 18(1): 58-64. PMID: 15861780.
- [21] 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.
- [22] 张若, 马慧, 闫慧, 等. 围孕期妇女4种生活因素与新生儿先天性心脏病关系的广义线性模型分析[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2017, 38(3): 332-336. DOI: 10.7652/jdyxb201703003.
- [23] Zhu Z, Leung GKK. More than a metabolic enzyme: *MTHFD2* as a novel target for anticancer therapy?[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 658. PMID: 32411609. PMCID: PMC7199629. DOI: 10.3389/fonc.2020.00658.
- [24] Rosenquist TH. Folate, homocysteine and the cardiac neural crest[J]. *Dev Dyn*, 2013, 242(3): 201-218. PMID: 23335187. DOI: 10.1002/dvdy.23922.
- [25] 王婷婷. 先天性心脏病的影响因素及预测模型研究[D]. 长沙: 中南大学, 2020.

(本文编辑: 邓芳明)