

· 现场调查 ·

亚甲基四氢叶酸还原酶 677 基因多态性与胃癌危险度关系病例对照研究

穆丽娜 丁保国 陈传炜 卫国荣 周学富 王如鸿 蔡琳 张作风 姜庆五 俞顺章

【摘要】 目的 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)677 基因多态性与胃癌危险度的关系。方法 采用以人群为基础的病例对照研究方法,聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法用于检测 MTHFR677 的基因型。结果 胃癌病例组中 MTHFR677 C/C、C/T、T/T 三种基因型的频率分别为 25.8%、54.6%、19.6%。对照组中三种基因型频率分别为 34.5%、50.9%、14.6%。以 C/C 基因型作为参照基因型 C/T 或 T/T 两种基因型的 OR 值为 1.52(95% CI: 1.04~2.23)。胃癌病例组中 C 和 T 两种等位基因型频率分别为 53.3% 和 46.7%, 对照组中分别为 60.0% 和 40.0%。以 C 等位基因为参照, T 等位基因的 OR 为 1.31(95% CI: 1.02~1.69)。此外研究还显示 MTHFR677 AnyT 基因型可能与吸烟、霉变粮食、大麦粥摄入、盐的过量摄入以及幽门螺杆菌 CagA 的感染发生交互作用而增加个体患胃癌的危险度。而该基因型与饮酒和饮茶未见明显的交互作用。结论 当个体携带 C/T 或 T/T 基因型时,患胃癌的危险度上升,携带 AnyT 基因型还可与其他环境危险因素发生交互作用,增加个体患胃癌的危险度。

【关键词】 胃肿瘤;亚甲基四氢叶酸还原酶;基因多态性;病例对照研究

A case-control study on the relationship between methyl-tetra-hydrofolic acid reductase 677 gene polymorphism and the risk of stomach cancer MU Li-na*, DING Bao-guo, CHEN Chuan-wei, WEI Guo-rong, ZHOU Xue-fu, WANG Ru-hong, CAI Lin, ZHANG Zuo-feng, JIANG Qing-wu, YU Shun-zhang. *School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between methyl-tetra-hydrofolic acid(MTHFR) 677 gene polymorphism and the risk of stomach cancer. **Methods** A population based case-control study was conducted and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to detect its genotypes. **Results** Among cases with stomach cancer, the frequency of C/C, C/T, T/T genotype were 25.8%, 54.6%, 19.6%, compared with controls as 34.5%, 50.9%, 14.6% respectively. Using C/C genotype as reference, the OR of C/T or T/T genotype was 1.52(95% CI: 1.04-2.23). 53.3% C and 46.7% T allele were distributed in stomach cancer cases, while 60.0% C and 40.0% T in controls. The OR for T allele in relation to C allele was 1.31(1.02-1.69) when C allele was used as reference. In addition, the present study showed that MTHFR677 AnyT genotype might interact with smoking, moldy food intake, wheat porridge intake, eating salty food and Hp CagA infection to increase the risk of stomach cancer. No interaction was observed between MTHFR677 AnyT genotype and alcohol drinking or green tea intake. **Conclusion** MTHFR677 AnyT genotype, might increase the risk of stomach cancer development and the genotype might also interact with other environmental risk factors to increase the risk of stomach cancer.

【Key words】 Stomach neoplasms; Methyl-tetra-hydrofolic acid reductase; Genetic polymorphism; Case-control study

DNA 的甲基化和合成修复在癌症的发展过程中至关重要,大量的研究表明 DNA 甲基化受到提

供甲基基团的叶酸水平调控,而叶酸在细胞内需经亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)677 代谢转化而发挥作用。该基因的编码区有两个常见的单核苷酸,即 C677T 和 A1298C。近来的研究显示该两个位点均呈现多态性,且 C677T 的多态性更加普遍, MTHFR677 的 C→T 缬氨酸代替丙氨酸,使酶活性

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院(穆丽娜、陈传炜、卫国荣、姜庆五、俞顺章);江苏省泰兴市疾病预防控制中心(丁保国、周学富、王如鸿);福建医科大学(蔡琳);University of California, Los Angeles School of Public Health(张作风)

降低, DNA 甲基化出现异常, 这种甲基化的异常可能导致致癌基因和抑癌基因的表达改变, 影响对细胞生长和功能的调控, 促进癌症的发生^[1]。而对于胃癌与 MTHFR677 多态性的关系在国内报道较少, 因此我们与江苏省泰兴市疾病预防控制中心合作进行了该项以人群为基础的病例对照研究, 探索在胃癌高发人群中 MTHFR677 的多态性与胃癌危险度的关系。

材料与方 法

1. 研究对象: 206 例胃癌为 2000 年泰兴市各大医院经组织病理学确诊的胃癌新发病例。因本研究对肝癌、胃癌、食管癌三种癌症同时进行, 因此对照为根据三种癌症病例的总体年龄、性别分布随机选取共用的健康人群, 共 415 例, 并要求是曾在本地居住 10 年以上、同意参加者。

2. 调查内容: 应用统一的调查表调查研究对象的基本人口资料、饮水饮食、吸烟、饮酒、饮茶、疾病及家族史等。

3. DNA 抽提: 从血块中采用酚-氯仿法抽提 DNA。因有些研究对象未采集到血样或血液, 样本量太少, 393 名对照和 196 例胃癌病例抽提到 DNA。

4. 基因型检测: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测基因型, 试剂购自 Promega 公司。引物序列为^[2]: Primer1: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA-3'; Primer2: 5'-AGGACGGTGC GG TGAGAGTG-3'。PCR 反应体系为: 10×PCR 缓冲液 2 μl, 20 μmol/L 的 dNTP 1.4 μl, 0.2 μmol/L 引物各 1 μl, T 酶 0.3 μl, 加双蒸水到反应体积至 20 μl。反应条件为: 95℃ 5 min 预变性, 94℃ 30 s, 62℃ 45 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。然后取 PCR 反应产物 7 μl 以 Hinf I 内切酶消化, 4% 的琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段。MTHFR677 经 Hinf I 内切酶消化后分为三种基因型: 纯合子 C/C, 杂合子 C/T, 纯合子 T/T。纯合子 C/C 为 198 bp 的一个扩增条带, 杂合子 C/T 为 198 bp、175 bp 和 23 bp 三个扩增条带, 纯合子 T/T 为 175 bp 和 23 bp 的两个条带。391 名对照和 194 例胃癌病例检测到 MTHFR677 的基因型。

5. 统计学分析: 应用 Epi Info 软件输入数据, SAS 软件进行统计处理。用非条件 logistic 回归计算 OR 及 95% CI, 以进行危险度评价。相乘及相加

交互作用判断: 相加交互: $OR_{11} > OR_{10} + OR_{01} - 1$; 相乘交互: $OR_{11} > OR_{10} \times OR_{01}$, 其中 OR_{11} 代表暴露于两种因素时的 OR, OR_{10} 和 OR_{01} 代表暴露于其中一种因素时的 OR。

结 果

1. 胃癌病例和对照组中 MTHFR677 各基因型、等位基因的分布情况: 如表 1 所示, 胃癌病例组中 MTHFR677 C/C、C/T、T/T 三种基因型的频率分别为 25.8%、54.6%、19.6%。对照组中三种基因型频率分别为 34.5%、50.9%、14.6%。两组比较显示, 对照组中 C/C 基因型的比例较高, 而病例组中以 C/T、T/T 的比例较高。以 C/C 基因型作为参照基因型, C/T 和 T/T 两种基因型的 OR 分别为 1.44(95% CI 0.96~2.15) 和 1.80(95% CI 1.07~3.04)。进一步合并两基因型与参照基因型进行比较, OR 为 1.52(95% CI 1.04~2.23)。胃癌病例组中 C 和 T 两种等位基因分别为 53.3% 和 46.7%, 对照组中分别为 60.0% 和 40.0%。以 C 等位基因为参照, T 等位基因的 OR 为 1.31(1.02~1.69)。

表1 MTHFR677 基因型及等位基因在胃癌病例和对照组中的分布

基因	病例组		对照组		OR 值(95% CI)
	例数	百分率 (%)	人数	百分率 (%)	
基因型					
C/C	50	25.8	135	34.5	
C/T	106	54.6	199	50.9	1.44(0.96~2.15)
T/T	38	19.6	57	14.6	1.80(1.07~3.04)
C/T 或 T/T	144	74.2	256	65.5	1.52(1.04~2.23)
等位基因					
C	208	53.3	469	60.0	
T	182	46.7	313	40.0	1.31(1.02~1.69)

注 $\chi^2 = 7.087, P = 0.008$

2. 遗传平衡检验: 将对照组的 MTHFR677 各基因频率代入 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律, 进行吻合度检测, 结果显示 MTHFR677 各基因型频率与期望值基本吻合, 符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡。

3. MTHFR677 基因与胃癌环境危险因素的交互作用: 由表 2 可见, 霉变粮食与 MTHFR677 的交互作用分析显示, 以个体携带 C/C 基因性, 不暴露于霉变粮食为参照, 携带 AnyT 基因型并暴露于霉变粮食的个体患胃癌的调整 OR 值为 2.94(95% CI: 1.57~5.52), 是只携带 MTHFR677 AnyT 基因性个体危险度的 2 倍, 交互作用判断为相乘交互作用, 暴

露于吸烟和携带 MTHFR677AnyT 基因型也显示为相乘的交互作用,同时暴露于两因素时调整的 OR 值为 2.83(95% CI :1.39~5.74),而只暴露于吸烟和携带 AnyT 基因型的个体患胃癌的调整的 OR 值分别为 1.56(95% CI :0.85~2.87)和 1.47(95% CI :0.67~3.20)。而携带 MTHFR677AnyT 基因型的个体同时暴露于饮酒或者饮茶未显示与该基因型的交互作用。携带 AnyT 基因型同时摄入大麦粥时,患胃癌的调整危险度为 2.49(95% CI :1.41~4.40),两因素呈相乘的交互作用。此外饮食嗜咸在该研究中也显示可能与 MTHFR677 的 AnyT 基因型呈相乘交互作用,而 Hp CagA 与该暴露基因型在该研究中呈现较弱的相乘交互作用,同时暴露于两者时个体患胃癌的调整危险度为 2.20(1.20~3.95)。

讨 论

叶酸是所有细胞内转甲基作用的甲基供体,给各种底物提供甲基和甲酰基,5,10-MTHFR677 不可逆地将 5,10-亚甲基四氢叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸。这种转变对控制细胞内的高半胱氨酸和足够的 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)水平非常关键。而 SAM 是所有蛋白、脂质和 DNA 甲基化反应最重要的甲基供体^[3]。MTHFR677 位点上的胞嘧啶被胸腺嘧啶取代(C-T),导致缬氨酸替代丙氨酸,使该基因呈多态性^[4]。有研究报道 MTHFR 纯合 T/T 基因型约有 30% 野生型(C/C)的活性,杂合型 T/C 有 65% 野生型的活性^[5],当具有 T/T 或 T/C 的基因型时,5-甲基四氢叶酸的水平降低,影响 DNA 的甲基化。已有研究证实 T/T 比 C/C 具有更高的甲基接受能力^[2],

表2 MTHFR677 与环境交互作用

危险因素	基因型	病例组		对照组		粗 OR 值(95% CI)	调整 OR 值(95% CI)
		例数	构成比(%)	人数	构成比(%)		
霉变粮食							
无	C/C	42	22.2	109	28.6		
无	AnyT	108	57.1	209	54.9	1.34(0.88~2.05)	1.52(0.97~2.38)
有	C/C	6	3.2	23	6.0	0.68(0.26~1.78)	0.79(0.29~2.18)
有	AnyT	33	17.5	40	10.5	2.14(1.20~3.83)	2.94(1.57~5.52)
吸烟							
不吸	C/C	21	11.1	66	16.9		
不吸	AnyT	64	33.9	136	34.9	1.48(0.83~2.63)	1.56(0.85~2.87)
吸	C/C	28	14.8	69	17.7	1.28(0.66~2.46)	1.47(0.67~3.20)
吸	AnyT	76	10.2	119	30.5	2.01(1.14~3.55)	2.83(1.39~5.74)
饮酒							
否	C/C	35	18.5	91	23.5		
否	AnyT	14	7.4	44	11.3	0.83(0.40~1.69)	1.08(0.50~2.36)
是	C/C	98	51.9	171	44.1	1.49(0.94~2.37)	1.76(1.08~2.87)
是	AnyT	42	22.2	82	21.1	1.33(0.78~2.28)	1.75(0.96~3.20)
饮茶							
是	C/C	13	7.14	56	15.0		
是	AnyT	33	18.1	72	19.3	1.97(0.95~4.10)	1.21(0.55~2.67)
否	C/C	47	25.8	113	30.2	1.79(0.90~3.58)	1.80(0.88~3.68)
否	AnyT	89	48.9	133	35.6	2.88(1.49~5.58)	2.00(0.98~4.10)
大麦粥							
不常吃	C/C	24	12.4	73	18.7		
不常吃	AnyT	59	30.4	134	34.3	1.34(0.77~2.33)	1.52(0.85~2.73)
常吃	C/C	26	13.4	62	15.9	1.28(0.67~2.44)	1.34(0.68~3.65)
常吃	AnyT	85	43.8	122	31.2	3.12(1.24~3.63)	2.49(1.41~4.40)
嗜咸							
否	C/C	37	19.4	102	36.6		
否	AnyT	11	5.8	31	8.1	0.98(0.48~2.14)	0.75(0.37~1.71)
是	C/C	103	53.9	203	52.9	1.40(0.90~2.18)	1.50(0.93~2.40)
是	AnyT	40	20.9	48	12.5	2.30(1.31~4.04)	2.49(1.36~4.54)
Hp CagA							
-	C/C	32	16.7	81	23.3		
-	AnyT	16	8.3	36	10.4	1.13(0.55~2.30)	1.17(0.55~2.49)
+	C/C	94	49.0	159	45.8	1.50(0.92~2.42)	1.70(1.02~2.84)
+	AnyT	50	26.0	71	20.5	1.78(1.03~3.08)	2.20(1.20~3.95)

因此说明在T/T中甲基化不足。

本次研究的结果提示 C/C 基因型在对照中所占比例为34.5% ,C/T基因型为50.9% ,T/T基因型为14.6% ,该结果与 Song 等^[6]在北京研究报道的三种基因型的构成比非常相似。病例组基因型构成与对照组比较发现 ,胃癌病例组与对照组的基因型构成差异有统计学意义 ,C/T和T/T基因型显示为危险基因型 ,而携带危险基因型的个体由于 MTHFR 酶活性的降低而导致甲基化异常与胃癌危险度的上升直接有关。该结果与沈红兵等对胃癌与 MTHFR677 关系的研究结果相似^[7,8]。

癌症的发生是基因和环境共同作用的结果 ,两者在癌症的发展过程中均发挥着不可或缺的作用。因此我们试图将胃癌的环境危险因素和 MTHFR677 的多态性结合进行交互作用的分析 ,以更入地了解胃癌的病因学。结果显示 MTHFR677AnyT 基因型可能与吸烟、霉变粮食、大麦粥摄入、盐的过量摄入以及 Hp CagA 的感染发生交互作用而增加个体患胃癌的危险度。MTHFR677 的C/T和T/T基因型表现为该酶活性的下降 ,因此该两种基因型的携带者 DNA 甲基化水平的降低可能导致抑癌基因失活而癌基因被激活、DNA 的修复功能被破坏。当个体暴露于环境有害物质 ,如重度吸烟、霉变粮食、大麦粥等时 ,前致癌物在体内先经过代谢酶转化为终致癌物 ,与 DNA 结合而造成化学损伤 ;或者个体暴露于盐的过量摄入、Hp CagA 感染而造成对胃的损伤时 ,在癌变进行的过程中 ,如果暴露个体因同时携带C/T或T/T 基因型而伴有癌基因和抑癌基因的表达异常 ,即阻止癌症发展的屏障发生异常 ,促进了正常细胞转化为启动细胞 ,启动了癌症的进程。此外 ,低甲基化可能导致癌基因的激活 ,与环境致癌物造成的基因损伤发生协同作用 ,使个体患癌症的危险性增强。

此外 ,值得重视的是 ,据国外一些研究报道 : MTHFR 多态性与胃癌危险度的关系还受到叶酸摄入量影响^[9] ,该假设提出 :当叶酸摄入充足时 ,携带 MTHFR 变异基因型者由于既有足够的甲基供体保证正常甲基化 ,又由于 MTHFR677 活性降低而抑制了5-甲基四氢叶酸形成的通路 ,从而增进了

DNA 合成并减少了 DNA 损伤 ,所以患癌危险度降低 ,而当叶酸摄入不足时 ,携带 MTHFR 变异基因型者 DNA 甲基化和 DNA 合成/修复异常使个体患癌的危险度明显上升。本次研究主要在经济水平较低的农村地区进行 ,整体人群叶酸水平处于较低状态 ,结论与以上假设基本相一致。然而在今后进一步的研究中我们还需将 MTHFR677 多态性与叶酸水平相结合以证实以上假设 ,并全面评价 MTHFR677 与胃癌危险度的关系。

参 考 文 献

- 1 Goyette P, Sumner JS, Milos R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase : isolation of cDNA , mapping and mutation identification. *Nat Genet* ,1994 ,7:195-200.
- 2 Stern LL, Mason JB, Selhub J, et al. Genomic DNA hypomethylation , a characteristic of most cancers , is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* ,2000 ,9:849-853.
- 3 Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia : interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* ,1991 ,55:131-138.
- 4 Goyette P, Sumner JS, Milos R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase : isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nat Genet* ,1994 ,7:55.
- 5 Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease : a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* ,1995 ,10:111-113.
- 6 Song C, Xing D, Tan W, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* ,2001 ,61:3272-3275.
- 7 Shen H, Xu Y, Zheng Y, et al. Polymorphisms of 5 ,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population : a case-control study. *Int J Cancer* ,2001 ,95:332-336.
- 8 高长明 ,吴建中 ,丁建华 ,等. 亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 多态性与胃癌易感性的关系. *中华流行病学杂志* ,2002 ,23:289-292.
- 9 Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* ,1996 ,56:4862-4864.

(收稿日期 2003-05-08)

(本文编辑 :尹廉)