

亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与胃癌易感性的关系

高长明 吴建中 丁建华 刘燕婷 臧宇 李苏平 苏平 胡旭 徐天亮

Takezaki Toshiro Tajima Kazuo

【摘要】 目的 研究亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 多态性及其和烟酒嗜好相互作用与胃癌易感性的关系。方法 在上消化道癌高发区江苏省淮安市进行病例对照研究(胃癌患者 107 例,对照人群 200 名),调查研究对象的生活习惯,采用 PCR-RFLP 技术检测研究对象的 MTHFR 基因型。结果 ①胃癌组中 MTHFR 变异基因型拥有者的比例为 79.4%,显著高于对照组的 68.5% ($\chi^2 = 4.15, P = 0.0416$)。MTHFR 变异基因型拥有者发生胃癌的危险性显著升高($OR = 1.78, 95\% CI : 0.99 \sim 3.22$)。性别和年龄调整 $OR = 1.89, 95\% CI : 1.08 \sim 3.32$)。②在 MTHFR 变异基因型拥有者中,伴有吸烟习惯者发生胃癌的 OR 为 7.72($95\% CI : 2.23 \sim 26.79$),伴有经常饮酒习惯者发生胃癌的 OR 为 3.08($95\% CI : 1.30 \sim 7.23$)。与不吸烟、不经常饮酒的野生型纯合子 MTHFR 基因型拥有者相比,伴有吸烟和经常饮酒习惯的 MTHFR 变异基因型拥有者发生胃癌的 OR 为 13.96($95\% CI : 2.76 \sim 70.46$)。结论 MTHFR C677T 变异基因型与胃癌的易感性有关;吸烟和饮酒与 MTHFR 变异基因型在胃癌发生中有明显的协同作用。

【关键词】 亚甲基四氢叶酸还原酶;基因 C677T;吸烟;饮酒;胃肿瘤

Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and the risk of stomach cancer GAO Changming*, WU Jianzhong, DING Jianhua, LIU Yanting, ZANG Yu, LI Suping, SU Ping, HU Xu, XU Tianliang, Takezaki Toshiro, Tajima Kazuo. *Department of Epidemiology, Jiangsu Province Institute of Cancer Research, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Objective In order to study the relation between polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase C677T (MTHFR) and susceptibility of stomach cancer (SC). **Methods** We conducted a case-control study with 107 cases of SC and 200 population-based controls in Huaian city of Jiangsu province, China. The epidemiological data were collected, and DNA of peripheral blood leukocytes was obtained from all of the subjects. MTHFR genotypes were detected by PCR-RFLP method. **Results** (1) The frequency of MTHFR variant genotypes (C/T + T/T) among the cases (79.4%) was significantly higher than the controls (68.5%) ($P = 0.0416$); the crude OR for SC was 1.78 (95% $CI : 0.99 \sim 3.22$). After adjustment for sex and age, the OR for SC was 1.89 (95% $CI : 1.08 \sim 3.32$). (2) Subjects who had MTHFR variant genotypes and having smoking habit were at a significantly higher risk of developing SC ($OR = 7.72, 95\% CI : 2.23 \sim 26.79$) compared with those who had wild-type homozygotes (C/C) genotype and no smoking habit. Individuals who had variant genotypes and who had habit of frequent alcohol drinking were at an increased risk of developing SC ($OR = 3.08, 95\% CI : 1.30 \sim 7.23$) compared with those with C/C genotype and low consumption of alcohol. As compared with subjects with C/C genotype and low consumption of alcohol and no smoking habit, individuals who had variant genotypes and who had habits of frequent alcohol drinking and smoking had 12.96 (95% $CI : 2.76 \sim 70.46$) folds risk developing SC. **Conclusions** These results in the present study suggested that the polymorphisms of MTHFR C677T was associated with risk of developing SC, and there was a coordinated effect between MTHFR genotypes and habits of smoking and alcohol drinking in the development of SC.

【Key words】 Methylenetetrahydrofolate reductase; Genotypes C677T; Smoking; Alcohol drinking; Stomach neoplasms

基金项目:日本文部省国际学术研究癌症特别研究经费资助项目(08042015)

作者单位 210009 南京,江苏省肿瘤防治研究所流行病学研究室(高长明、吴建中、丁建华、刘燕婷、臧宇、李苏平、苏平);淮安市卫生防疫站(胡旭、徐天亮);日本爱知县がんセンター研究所疫学、予防部(Takezaki Toshiro, Tajima Kazuo)

亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 是调节叶酸和蛋氨酸代谢的限速酶^[1]。叶酸和蛋氨酸代谢循环与 DNA 甲基化、DNA 合成和修复有关。MTHFR 基因定位于染色体 1p 36.3, 研究发现 MTHFR 基因是多态的, 其中最常见的是 C677T 多态, 即在 677 位点发生 C→T 改变, 使酶活性显著降低。由于基因组 DNA 中的某些基因的甲基化, 特别是癌基因或抑癌基因的甲基化可直接影响癌的发生, 所以 MTHFR 基因的多态性有可能通过影响 DNA 甲基化水平或影响 DNA 合成, 改变不同基因型个体的癌症易感性。有些研究报道了 MTHFR 基因多态性与结直肠癌、急性淋巴细胞白血病、子宫内膜癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌等癌症的关系^[1-8]。但关于 MTHFR 基因多态性与胃癌易感性的关系, 国内外鲜见报道。我国胃癌的死亡率居恶性肿瘤死亡的第一位, 为了进一步探讨胃癌的病因, 有效地开展胃癌预防工作, 我们在上消化道癌高发地区江苏省淮安市进行环境因素调查研究的同时, 采用分子流行病学方法对 MTHFR 基因多态性与胃癌易感性的关系进行了研究, 现将结果报道如下。

材料与方法

1. 对象和标本: 1999 年 8 月至 2000 年 9 月间, 在淮安市人民医院随机收集经组织病理学确诊的胃癌 107 例, 同时在当地收集相同年龄组无癌症病史的一般对照人群 200 名。调查每个对象的吸烟、饮酒以及饮食习惯, 同时抽静脉血, 置乙二胺四乙酸钠抗凝管, 分离白细胞层。用 QIAamp DNA 提取试剂盒提取白细胞 DNA, DNA 置 -30℃ 低温冰箱保存备用。

2. 基因型分析: 参照文献^[1]的方法, 用 PCR-RFLP 技术检测研究对象的 MTHFR 基因型, 所用引物为 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA-3' 和 5'-AGGACGCTGCGGTGAGAGTG-3'。反应总体积 25 μ l, 含引物 (25 pmol/ μ l) 各 0.5 μ l, 4 \times dNTP 2.5 μ l, Taq 酶 1 U, 基因组 DNA 溶液 1 μ l, 10 \times Buffer (含 MgCl₂) 2.5 μ l。反应条件为 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环; 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物用 Hinf I 内切酶在 37℃ 消化 3 h, 用 3% 琼脂糖凝胶、电压 120 V 电泳 3 h。溴化乙锭染色确定 MTHFR 基因型。基因型分为野生型纯合子 (C/C)、杂合子 (C/T)、变异型纯合子 (T/T) 3 种类型。

3. 统计学分析: 采用 SAS 软件和 Epi Info 软件, 以比值比 (OR) 及 95% 可信限 (95% CI) 表示相对危险度, 以多元非条件 logistic 回归模型计算调整 OR 及 95% CI。采用叉生分析观察 MTHFR 基因型与吸烟、饮酒习惯的交互作用, OR 及 95% CI 的计算调整了性别、年龄、吸烟、饮酒、饮茶及生蔬菜、水果、肉和豆制品摄取, 用文献^[9]介绍的方法计算交互作用系数 r , 以观察交互作用的影响强度。用 Mantel-Haenszel χ^2 检验基因型频度、吸烟和饮酒状况分布差异。

结果

胃癌组男、女性分别为 84 例和 23 例, 平均年龄标准差 ($\bar{x} \pm s$) 分别为 (61.35 \pm 7.75) 岁和 (60.17 \pm 9.89) 岁; 对照组男、女性分别为 132 名和 68 名, 平均年龄分别为 (60.76 \pm 8.46) 岁和 (58.72 \pm 9.54) 岁。胃癌组与对照组之间的性别、年龄分布差异无显著性。胃癌组中吸烟者和经常饮酒者分别占 76.4% 和 36.9%, 显著高于对照组的 56.6% 和 24.6%。

胃癌组与对照组 MTHFR 基因型分布频度见表 1。对胃癌组和对照组的 MTHFR 基因型频率进行了遗传平衡检验, 两组的 MTHFR 基因型频率观察值与期望值之间差异无显著性 (χ^2 分别为 2.13 和 0.007, P 值均 $>$ 0.05), 表明胃癌组和对照组的 MTHFR 基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 比例, 样本具有群体代表性。胃癌组拥有 MTHFR 变异基因型 (C/T + T/T) 者占 79.4%, 显著高于对照组的 68.5% ($\chi^2 = 4.15, P = 0.0416$)。与 MTHFR C/C 基因型者相比, 变异基因型者发生胃癌的危险性 (OR) 为 1.78 (95% CI 1.09 ~ 3.22), 性别和年龄调整 OR 为 1.89 (95% CI 1.08 ~ 3.32)。

MTHFR 基因型和吸烟或饮酒习惯相互作用与胃癌易感性的关系见表 2。MTHFR 变异基因型与吸烟或饮酒有明显的协同作用。与拥有 MTHFR C/C 基因型、无吸烟习惯者相比, 变异基因型并伴有吸烟习惯者发生胃癌的危险性升高 6.72 倍 (95% CI: 2.23 ~ 26.79)。与拥有 MTHFR C/C 基因型、不饮酒或较少饮酒者相比, 变异基因型并伴有经常饮酒习惯者发生胃癌的危险性升高 2.08 倍 (95% CI: 1.30 ~ 7.23)。变异基因型对吸烟和经常饮酒在胃癌发生中的效应有放大作用, 其交互作用系数 r 分别为 1.46 和 1.66。

表1 MTHFR677 基因型分布及其与胃癌易感性的关系

MTHFR	胃癌组		对照组		粗 OR (95% CI)	性别、年龄调整 OR (95% CI)
	例数	构成比(%)	例数	构成比(%)		
C/C*	22	20.6	63	31.5	1.00	1.00
C/T*	61	57.0	99	49.5	1.76(0.95~3.29)	1.94(1.07~3.52)
T/T*	24	22.4	38	19.0	1.81(0.84~3.89)	1.38(0.96~1.97)
C/T+T/T**	85	79.4	137	68.5	1.78(0.99~3.22)	1.89(1.08~3.32)

* $\chi^2_{M-H} = 4.17, P = 0.124$; ** $\chi^2_{M-H} = 4.15, P = 0.042$

表2 MTHFR677 基因型和烟酒习惯相互作用与胃癌的关系

烟酒习惯	MTHFR	胃癌组	对照组	调整 OR(95% CI)
吸烟状况*				
不吸	C/C	3	29	1.00
不吸	C/T+T/T	22	56	4.04(1.08~15.08)
吸或吸过	C/C	19	33	6.13(1.55~24.17)
吸或吸过	C/T+T/T	62	78	7.73(2.23~26.79)
饮酒频率**				
<1次/周	C/C	13	47	1.00
<1次/周	C/T+T/T	52	103	1.97(0.97~4.01)
≥1次/周	C/C	9	16	1.56(0.52~4.70)
≥1次/周	C/T+T/T	29	33	3.08(1.30~7.23)

* $\chi^2_{M-H} = 16.16, P = 0.001$; $r = 2.04/1.40 = 1.46$

** $\chi^2_{M-H} = 8.62, P = 0.035$; $r = 1.13/0.68 = 1.66$

表3为MTHFR基因型、吸烟和饮酒以及它们的相互作用与胃癌易感性关系的进一步分析结果。吸烟作为独立的危险因素在拥有MTHFR C/C基因型者和变异基因型者中都有显著增加胃癌发生危险性的作用。饮酒作为独立因素的作用不明显,但经常饮酒与吸烟习惯有协同作用,在拥有MTHFR C/C基因型者中,有经常饮酒和吸烟习惯者发生胃癌的危险性升高8.32倍(95% CI: 1.51~57.55)。同时具有MTHFR变异基因型、吸烟和经常饮酒3种因素者,其发生胃癌的危险性最高,与不吸烟、不经常饮酒的MTHFR C/C基因型者相比,有吸烟和经常饮酒习惯的变异基因型者胃癌发生的危险性升高12.96倍(95% CI 2.76~70.46)。

表3 MTHFR677 基因型、吸烟和饮酒相互作用与胃癌的关系

MTHFR	吸烟	饮酒	病例组例数	对照组例数	调整 OR(95% CI)	χ^2 值	P 值
C/C	不吸	<1次/周	3	26	1.00		
C/C	不吸	≥1次/周	0	3	-	0.00	0.970
C/T+T/T	不吸	<1次/周	18	50	3.27(0.84~12.73)	2.92	0.088
C/T+T/T	不吸	≥1次/周	2	6	6.44(0.48~86.30)	1.98	0.160
C/C	吸或吸过	<1次/周	10	21	6.34(1.34~29.96)	5.44	0.020
C/C	吸或吸过	≥1次/周	9	12	9.33(1.51~57.55)	5.78	0.016
C/T+T/T	吸或吸过	<1次/周	34	50	5.88(1.64~21.04)	7.40	0.007
C/T+T/T	吸或吸过	≥1次/周	27	27	13.96(2.76~70.46)	10.18	0.001

讨 论

MTHFR 杂合子及变异型纯合子基因拥有者在美国白人男性中占55.3%^[1],在我国东北地区正常妇女中占64%~79%^[10]。本项研究中正常对照MTHFR变异基因型拥有者占68.5%,说明MTHFR变异基因型在人群中具有较高的频率,而且中国人MTHFR变异基因型拥有者的比例较西方人群更高。研究表明MTHFR变异型纯合子与血浆中同型半胱氨酸水平的升高和5-甲基四氢叶酸水平的降低有关^[11]。体外实验也证实MTHFR变异型纯合子的DNA接受甲基的能力显著高于野生型纯合子^[12]。说明MTHFR基因变异导致了作为甲基供体的蛋氨酸合成障碍,进而导致了DNA的低甲基化。细胞基因组DNA的去甲基化可能与细胞的过度增殖有关,研究证明细胞DNA的甲基化水平,特别是有关基因表达控制点的甲基化水平对基因表达起调节作用,甲基化水平降低,相关基因的转录水平就增高^[13]。有人发现在结直肠良性腺瘤和结直肠癌中总体DNA的甲基化水平分别较正常黏膜低8%和10%,特定原癌基因如c-Ha-ras及c-ki-ras基因也呈低甲基化状态^[12]。提示MTHFR基因多态性可能与癌症的发生有关。

本研究在国内外首次发现胃癌组中MTHFR变异基因型者的比例显著高于对照组,变异基因型

增加了发生胃癌的危险性。这一结果不仅表明 MTHFR 基因多态性与胃癌的发生有关,而且表明个体的叶酸和蛋氨酸代谢平衡与胃癌的发生有直接的关系。同时也提示胃癌的发生可能与 DNA 的低甲基化有关。MTHFR 基因多态性与肿瘤易患性的关系受环境因素影响较大。Ma 等^[14]在结直肠癌的研究中发现:在低乙醇摄取或在血浆中叶酸水平较高时,MTHFR T/T 基因型是结直肠癌发生的保护性因素。而在其后的研究中,Ulrich 等^[15]则发现:在低叶酸摄取条件下,MTHFR T/T 基因型是结直肠癌腺瘤发生的危险因素。Lathrop 等^[16]也发现,MTHFR T/T 基因型者的白细胞 DNA 在体外试验中接受甲基的能力与红细胞中叶酸浓度呈负相关。由于叶酸可从饮食中供给,因此进一步研究饮食成分特别是叶酸摄取和 MTHFR 基因多态性相互作用与胃癌的关系,对于在我国经济有效地开展胃癌预防具有重要的意义。

吸烟和饮酒与胃癌发生的关系已经有很多报道,但其结果尚不一致。本研究发现吸烟和饮酒习惯与 MTHFR 变异基因型在胃癌发生中有明显的协同作用,这可能与吸烟使血液中的叶酸水平降低、多量饮酒可导致叶酸缺乏及乙醇可竞争性抑制甲基基团的代谢有关。

参 考 文 献

- 1 Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, et al. A methylenetetra-hydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*, 1996, 56:4862-4864.
- 2 Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, et al. Methylenetetra-hydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999, 8:513-518.
- 3 Skibola CF, Smith MT, Kane E, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:12810-12815.
- 4 Park KS, Mok JW, Kim JC. The 677C-T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer risk. *Genet Test*, 1999, 3:233-236.

- 5 Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, et al. Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 1997, 18:2307-2311.
- 6 Gershoni-Baruch R, Dagan E, Israeli D, et al. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur J Cancer*, 2000, 36:2313-2316.
- 7 Kimura F, Franke KH, Steinhoff C, et al. Methyl group metabolism gene polymorphisms and susceptibility to prostatic carcinoma. *Prostate*, 2000, 45:225-231.
- 8 Piyathilake CJ, Macaluso M, Johanning GL, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res*, 2000, 20:1751-1757.
- 9 沈靖,王润田,徐希平.代谢酶基因多态性与环境暴露交互作用的分析方法及其应用. *中华流行病学杂志*, 2001, 22:61-64.
- 10 李克深,郑东梅,薛雅丽,等. MTHFR 基因 C677T 多态与神经管缺陷及先兆子痫关系的研究. *中华医学遗传学杂志*, 2000, 17:76-78.
- 11 Frosst P, Blom HJ, Milos P, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methyl-ene-tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 1995, 10:111-113.
- 12 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 Biomark Prev*, 2000, 9:849-853.
- 13 张天泽,徐光炜,主编. *肿瘤学.中册*.天津:科学技术出版社, 1996.1629.
- 14 Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al. Methylenetetra-hydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res*, 1997, 57:1098-1102.
- 15 Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, et al. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 1999, 8:659-668.
- 16 Lathrop SL, 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 Biomark Prev*, 2000, 9:849-853.

(收稿日期:2001-08-10)

(本文编辑:尹廉)

· 更正 ·

作者对“广州市正常人群流行性脑脊髓膜炎抗体水平调查”的更正

本刊 2002 年第 2 期第 93 页“广州市正常人群流行性脑脊髓膜炎抗体水平调查”一文中第 5、12、16 行“流脑 A 群杀菌抗体”的“杀菌”二字应删去,改为“流脑 A 群抗体”。特此更正。