

# 叶酸代谢相关基因 MTHFR、MS 基因多态与胰腺癌风险关联

王丽 林东昕 陆星华 缪小平 李辉

**【摘要】目的** 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)及甲硫氨酸合成酶(MS)基因多态与胰腺癌风险的关系。**方法** 采用以医院为基础的病例对照研究(胰腺癌新发病例 101 例,对照 337 人)方法,进行 MTHFR C677T、A1298C 及 MS A2756G 基因多态与胰腺癌风险关联分析,采用 PCR-RFLP 方法进行两候选基因分型。**结果** 携带 MTHFR-677 CT 及 TT 基因型者发生胰腺癌风险是 CC 基因型个体的 2.17(95% CI:1.26~3.85)及 3.53(95% CI:1.85~6.84)倍,呈明显的等位基因-效应关系;未观察到 MTHFR 1298 多态单独对胰腺癌发生的影响,但发现它与 C677T 有联合作用。MTHFR 677CT 与 TT 基因型与吸烟、饮酒有明显的正向交互,产生交互作用的  $OR_{int}$  值分别为 1.78( $P=0.0010$ )和 2.10( $P=0.0051$ )。未发现 MS A2756G 多态与胰腺癌的发生之间存在统计学的显著关联。**结论** MTHFR C677T 多态与胰腺癌发生风险显著关联,且与吸烟、饮酒存在正向交互作用。

**【关键词】** 胰腺癌;亚甲基四氢叶酸还原酶;甲硫氨酸合成酶;遗传易感性

**Study on the relations between genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase and the risk of pancreatic cancer** WANG Li\*, LIN Dong-xin, LU Xing-hua, MIAO Xiao-ping, LI Hui. \*Department of Epidemiology, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Corresponding author: LI Hui

**【Abstract】Objective** To determine whether genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C), methionine synthase (MS A2756G) were associated with the risks of pancreatic cancer. **Methods** A hospital-based, case-control study consisting of 101 incident pancreatic cancer cases and 337 controls matched on age, sex and race was conducted to investigate the association between polymorphism in MTHFR and MS, and susceptibility to pancreatic cancer. Genotypes of MTHFR C677T, A1298C and MS A2756G were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism methods. **Results** It was found that multivariate-adjusted odds ratio ( $OR_s$ ; 95% confidence interval) for MTHFR-677CT and 677TT compared with 677CC were 2.17(1.26-3.85) and 3.53(1.85-6.84) respectively, which was in a manner of allele-dose relationship. However, no significant association between the A1298C genotype alone and the risk of cancer was observed which seemed that this polymorphism had a combined effect with the C677T polymorphism. A significant gene-environment interaction was observed between C677T polymorphism and cigarette smoking or alcohol intake. Subjects with variant genotypes who smoked >17 pack-years had highest risk for developing the cancer, with the OR of 5.58(2.53-12.30). Similarly, the OR(3.27, 1.51-7.23) for subjects with variant genotypes of alcohol drinker was significantly higher than that for subjects either having the variant genotype or being drinkers. No association was found between MS A2756G polymorphism and risk of pancreatic cancer in the study. **Conclusion** These findings supported the hypothesis that genetic polymorphisms in MTHFR C677T might contribute to the risk of developing pancreatic cancer.

**【Key words】** Pancreatic cancer; Methylenetetrahydrofolate reductase; Methionine synthase; Genetic susceptibility

基金项目:卫生部临床重点学科资助项目(20010102)

作者单位:100005 北京,中国医学科学院基础医学研究所中国协和医科大学基础医学院流行病学教研室(王丽、李辉),肿瘤研究所病因与癌变研究室(林东昕、缪小平),北京协和医院消化内科(陆星华)

通讯作者:李辉

胰腺癌是目前已知恶性度最高的肿瘤之一,5 年生存率仅为 3%<sup>[1]</sup>。我国胰腺癌死亡率呈逐渐上升趋势<sup>[2]</sup>。胰腺癌的病因迄今尚未完全阐明,膳食纤维、维生素 C、水果和蔬菜等可能是胰腺癌的保护因素<sup>[3]</sup>。蔬菜和水果中可能含有大量抗癌物质,叶酸是其中的重要成分之一。来自动物实验和队列研究的结果提示饮食中叶酸的摄入量以及血浆叶酸水平与胰腺癌的发生呈负相关<sup>[4,5]</sup>。叶酸进入体内后要经过一系列代谢活化才能行使其生理功能,叶酸摄入不足和/或叶酸代谢通路上酶活性改变均可导致 DNA 甲基化异常,而肿瘤抑制基因的异常甲基化是肿瘤,包括胰腺癌发生和发展的重要特征。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)和甲硫氨酸合成酶(MS)在叶酸的代谢中起着重要的作用。已发现编码 MTHFR、MS 的基因存在单核苷酸多态, MTHFR 677C→T 和 1298A→C 多态可导致酶活性的下降<sup>[6]</sup>;由于 MS 2756A→G 多态位于与维生素 B12 辅酶因子的甲基化和再活化有关的结构域<sup>[7]</sup>,推测这个多态的存在可能会导致酶活性的改变。目前国内外尚未见 MTHFR 及 MS 基因多态性与胰腺癌显著关联的文献报道。本研究采用病例对照研究方法,探讨了 MTHFR、MS 基因多态性与胰腺癌的关系,及其与吸烟、饮酒之间联合作用对胰腺癌易感性的影响。

## 对象与方法

1. 研究对象:采用频数匹配病例对照研究设计,病例来自 2002 年 6 月至 2004 年 3 月在北京协和医院和中国医学科学院肿瘤医院连续收集的新发胰腺癌病例共 101 例,所有病例经医院专家组确诊为原发性胰腺癌。对照来自医院体检和营养调查的人群,排除肿瘤患者及严重心血管疾病者,并按性别和年龄( $\pm 5$ 岁)与病例进行频数匹配,共 337 人。病例和对照均为北京市及其周边地区的汉族居民。在收集外周血液标本的同时,以问卷的方式调查每个研究对象的人口学以及吸烟、饮酒等资料。“一生中连续或累积吸烟 6 个月或以上者”定义为吸烟者。吸烟量以包年为单位进行计算,即包年数=每日吸烟量 $\div$ 20 支 $\times$ 吸烟年数。“饮酒者”定义为每周饮酒至少 2 次,连续饮酒 1 年及以上者。

2. MTHFR C677T、A1298C 基因多态性分析:每名研究对象抽取 5 ml 静脉血,EDTA 抗凝,采用常规的酚-氯仿法提取血样中 DNA<sup>[8]</sup>。采用聚合酶链反

应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法分析 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 多态<sup>[9]</sup>。前者引物为 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' 和 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3',产物为 198 bp;后者引物为 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C-3' 和 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3',产物为 163 bp。这两个片段在同样的 PCR 条件下分别进行扩增。PCR 混合液(25  $\mu$ l)含 100 ng 模板 DNA、0.4  $\mu$ mol/L 各引物、0.2 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1.0 U Taq 聚合酶及 1 $\times$  反应缓冲液。PCR 在 GeneAmp 2400 热循环仪上进行,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后经 94 $^{\circ}$ C 30 s、61 $^{\circ}$ C 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 30 s 进行 35 个循环的扩增,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。鉴别 677 位点用限制性核酸内切酶 Hinf I (New England BioLabs),TT 产生 175 bp 和 23 bp 两个片段,CT 产生 198、175 和 23 bp 三个片段,CC 无酶切位点只有 198 bp 一个片段。鉴别 1298 位点多态用限制性内切酶 Mbo II (New England BioLabs),1298AA PCR 产生 56、31、30、28 和 18 bp 五个小片段;CC 产生 84、31、30 和 18 bp 四个片段;AC 产生 84、56、31、30、28 和 18 bp 六个片段。

3. MS 基因多态分析:采用 PCR-RFLP 方法分析 MS 基因 A 2756 G 多态<sup>[10]</sup>。所用引物为 5'-TGT TCC AGA CAG TTA GAT GAA AAT C-3' 和 5'-GAT CCA AAG CCT TTT ACA CTC CTC-3',产物为 211 bp。PCR 条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后 94 $^{\circ}$ C 30 s、61 $^{\circ}$ C 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 30 s 进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 HaeIII (New England BioLabs)识别含有 2756G 等位基因的 PCR 产物,GG 基因型产生 131 和 80 bp 二个片段,AG 产生 211、131 和 80 bp 三个片段,AA 为一完整的 211 bp 片段。

4. 统计学分析: $\chi^2$  检验用于分析样本基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,并比较病例组和对照组之间在性别、年龄、吸烟、饮酒状况及各基因型、等位基因分布的差异。基因多态性与胰腺癌风险的关联强度采用比值比(OR)及其 95% 可信区间(CI)进行描述。数据采用非条件 logistic 回归进行分析,采用相乘模型判断基因与环境之间是否存在交互作用。似然比检验用于分析交互是否存在统计学意义,组合分析用于确定基因与基因之间的联合效应。所有数据统计均使用 SAS 软件(Version 8.2)进行分析。使用 EH 及 2LD 软件计算单倍型

频率及连锁不平衡系数。

结 果

1. 一般人口学资料: 两组人群在年龄、性别以及饮酒方面差异无统计学意义(表 1), 吸烟 > 17 包年者发生胰腺癌的风险是吸烟 ≤ 17 包年者的 1.98 倍 (95% CI: 1.11 ~ 3.49, P = 0.0170), 提示吸烟对胰腺癌的风险主要在高剂量吸烟人群中。

表 1 病例组与对照组人口学特征及吸烟和饮酒状况比较

项目	病例组 (n = 101)	对照组 (n = 337)	χ <sup>2</sup> 值	P 值
年龄(岁)				
男性 <45	4(6.2)	16(7.2)	3.300	0.3477
45~	13(20.0)	59(26.7)		
55~	22(33.8)	83(37.6)		
≥65	26(40.0)	63(28.5)		
女性 <45	3(8.3)	13(11.2)	3.640	0.3031
45~	4(11.1)	27(23.3)		
55~	15(41.7)	45(38.8)		
≥65	14(38.9)	31(26.7)		
性别			0.051	0.8209
男	65(64.4)	221(65.6)		
女	36(35.6)	116(34.4)		
吸烟			0.004	0.9516
否	53(52.5)	178(52.8)		
是	48(47.5)	159(47.2)		
吸烟量(包年)			4.312	0.0379
≤17	70(69.3)	267(79.2)		
>17	31(30.7)	70(20.8)		
饮酒			0.681	0.4093
否	72(71.3)	254(75.4)		
是	29(28.7)	83(24.6)		

注: 括号外数据为例数; 括号内数据为构成比(%)

2. MTHFR 基因多态与胰腺癌的关联分析(表 2): 对照组中 MTHFR-677 的 CC、CT 及 TT 三种基因型频率分别为 40.1%、44.2% 和 15.7%, 其分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 (P = 0.2700); 病例组为 22.8%、49.5% 和 27.7%, 病例组中 CT 及 TT 基因型显著高于对照组 (χ<sup>2</sup> = 12.96, P = 0.0015)。多元 logistic 回归分析显示, 调整年龄、性别、吸烟和饮酒等协变量的影响后, 携带 MTHFR-677 CT 及 TT 基因型的个体发生胰腺癌风险是 CC 基因型个体的 2.17(95% CI: 1.26 ~ 3.85) 及 3.53(95% CI: 1.85 ~ 6.84) 倍, 呈等位基因-效应关系。

对照组三种基因型分布频率为 72.1% (AA)、25.5% (AC) 和 2.4% (CC), 分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 (P = 0.9000); 病例组为 75.3%、23.8% 和 1.0%, MTHFR 1298C 等位基因在两组人群分布频率的差异未见统计学意义 (χ<sup>2</sup> = 0.64, P = 0.4300)。

表 2 MTHFR、MS 基因型和等位基因频率在病例组和对照组中的分布及其与胰腺癌风险的关联

基因型	病例 (n = 101)	对照 (n = 337)	aOR 值 (95% CI)*	P 值
MTHFR C677T				
CC	23(22.8)	135(40.1)	1.00	
CT	50(49.5)	149(44.2)	2.17(1.26~3.85)	0.0064
TT	28(27.7)	53(15.7)	3.53(1.85~6.84)	0.0001
C 等位基因	96(47.5)	419(62.2)		
T 等位基因	106(52.5)	255(37.8)		
MTHFR A1298C				
AA	76(75.3)	243(72.1)	1.00	
AC	24(23.8)	86(25.5)	0.92(0.53~1.53)	0.7400
CC	1(0.9)	8(2.4)	0.42(0.02~2.37)	0.4200
A 等位基因	176(87.1)	572(84.9)		
C 等位基因	26(12.9)	102(15.1)		
MS A2756G				
AA	90(89.1)	298(88.4)	1.00	
AG	8(7.9)	38(11.3)	0.76(0.31~1.62)	0.5000
GG	3(3.0)	1(0.3)	8.71(1.07~179.57)	0.0650
A 等位基因	188(93.1)	634(94.1)		
G 等位基因	14(6.9)	40(5.9)		

注: 括号内、外数据同表 1; \* 经年龄、性别、吸烟及饮酒状态调整

组合分析显示, 以携带 MTHFR-677 CC 及 MTHFR-1298 AA 基因型者为参照, 携带 MTHFR-677 CT 和 MTHFR-1298 AA 基因型者发生胰腺癌的风险增加到 2.23 (95% CI: 1.10 ~ 4.82, P = 0.0330) 倍, MTHFR-677 CT 和 MTHFR-1298 AC 携带者增加到 3.55 (95% CI: 1.44 ~ 8.97, P = 0.0063) 倍, 携带 MTHFR-677 TT 和 MTHFR-1298 AA 者风险增加到 3.94 (95% CI: 1.83 ~ 8.93, P = 0.0006) 倍。单倍型分析表明, MTHFR677-1298 单倍型频率在病例组和对照组中的差异有统计学意义 (χ<sup>2</sup> = 14.1, df = 3, P = 0.0028), 病例中 677T-1298A 单倍型频率 52.5% 高于正常对照的 37.8%。以 677C-1298A 单倍型为参照, 携带 677T-1298A 单倍型者发生胰腺癌的风险增加为 1.87 (95% CI: 1.33 ~ 2.64, P = 0.0004) 倍, 677 和 1298 多态存在强连锁不平衡 (D' = 0.99, P = 0.0000), 见表 3。

3. MS A2756G 多态及其与胰腺癌风险的关系: 表 2 显示胰腺癌病例和正常对照的 MS A2756G 基因型及等位基因分布。对照组 AA、AG 及 GG 基因型的分布频率分别为 88.4%、11.3% 和 0.3%, 其分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 (χ<sup>2</sup> = 0.033, P = 0.8600); 而胰腺癌病例中三种基因型频率分别为 89.1%、7.9% 和 3.0%, 两组人群在基因型分布频率的差异有统计学意义 (χ<sup>2</sup> = 6.92, P = 0.0310)。

表3 MTHFR C677T 及 A1298C 组合基因型对胰腺癌风险的影响

MTHFR C677T	MTHFR A1298C	病例 (n = 101)	对照 (n = 337)	aOR 值(95% CI)*	P 值
CC	AA	12(11.9)	74(22.0)	1.00	
CC	AC	10(9.9)	53(15.7)	1.27(0.50~3.20)	0.6100
CC	CC	1(1.0)	8(2.4)	0.90(0.05~5.72)	0.9300
CT	AA	36(35.6)	116(34.4)	2.23(1.10~4.82)	0.0330
CT	AC	14(13.9)	33(9.8)	3.55(1.44~8.97)	0.0063
CT	CC	0(0.0)	0(0.0)	-	
TT	AA	28(27.7)	53(15.7)	3.94(1.83~8.93)	0.0006
TT	AC	0(0.0)	0(0.0)	-	
TT	CC	0(0.0)	0(0.0)	-	

注:同表 2

表4 MTHFR C677T 多态与吸烟、饮酒交互对胰腺癌风险的影响

项目	MTHFR C677T	病例 (n = 101)	对照 (n = 337)	aOR 值 (95% CI)*	似然比检验 (P 值)
吸烟量(包年)					
≤17	CC	16(15.8)	100(29.7)	1.00	
>17	CC	7(6.9)	35(10.4)	1.47(0.54~3.98)	
≤17	CT+TT	54(53.5)	167(49.6)	2.13(1.15~3.95)	
>17	CT+TT	24(23.8)	35(10.4)	5.58(2.53~12.30)	
				OR <sub>int</sub> = 1.78	0.0010
是否饮酒					
否	CC	17(16.8)	91(27.0)	1.00	
是	CC	6(5.9)	44(13.1)	0.75(0.25~2.05)	
否	CT+TT	55(54.5)	158(46.9)	2.08(1.15~3.93)	
是	CT+TT	23(22.8)	44(13.1)	3.27(1.51~7.23)	
				OR <sub>int</sub> = 2.10	0.0051

注:同表 2

经年龄、性别、吸烟及饮酒状况调整后,GG 基因型者发生胰腺癌的风险是 AA 基因型者的 8.71 (1.07~179.57) 倍,处于统计学临界显著性水平 (P=0.0650)。本项研究尚不能证实 GG 基因型与胰腺癌之间存在统计学意义的关联。由于 MS GG 基因型分布频率太低,故没有对这两个基因的基因多态进行联合作用分析。

4. MTHFR C677T 多态与吸烟、饮酒交互作用对胰腺癌发生风险的影响(表 4):以 MTHFR 677CC 基因型及吸烟≤17 包年者为参照组,吸烟>17 包年者或携带 MTHFR 677T 等位基因者发生胰腺癌的风险分别增加到 1.47(95% CI:0.54~3.98) 和 2.13(95% CI:1.15~3.95),而当二者共同存在时,OR 值增加到 5.58(95% CI:2.53~12.30),交互作用产生的 OR<sub>int</sub> 值为 1.78(似然比检验, P=0.0010),提示此基因变异与吸烟之间存在着正向交互作用。MTHFR C677T 多态与饮酒对胰腺癌发生的风险也表现出明显的协同作用。不饮酒者中,携带 CT 或 TT 基因型者发生胰腺癌风险是 CC 基因型者的 2.08(95% CI:1.15~3.93) 倍;而在饮酒者

中,CT 或 TT 基因型者发生胰腺癌的风险增加到 3.27(95% CI:1.51~7.23) 倍。CT 或 TT 基因型与饮酒交互作用产生的 OR<sub>int</sub> 值为 2.10(似然比检验, P=0.0051)。

### 讨 论

本项研究采用以医院为基础的病例对照研究设计,所有病例均为新发病例,避免了因选择现患病例而产生的现患病例-新发病例偏倚。同时正常对照者 MTHFR C677T 基因型频率与文献报道的我国北方汉族人群的频率一致<sup>[9]</sup>,提示对照的选择在遗传学上没有偏倚性。

本项研究探讨了叶酸代谢过程中起重要作用的 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 单核苷酸多态与胰腺癌风险的关系。携带 MTHFR-677 CT 及 TT 基因型者发生胰腺癌的风险分别为 CC 基因型的 2.17 及 3.53 倍。目前虽然还没有 MTHFR 多态与胰腺癌关系的报道,但已报道该基因多态与食管癌、胃癌、结直肠癌和白血病等多种癌症的风险相关<sup>[9-12]</sup>。

MTHFR 基因变异增高胰腺癌风险的机制可能与其引起的 DNA 低甲基化有关。MTHFR 作为叶酸代谢过程中的关键酶,催化 5,10-亚甲基四氢叶酸生成 5-甲基四氢叶酸,后者为细胞内通用甲基供体 S-腺苷甲硫氨酸合成的原料。MTHFR 677C→T 突变使酶活性下降<sup>[13]</sup>,从而导致甲基供体 SAM 的产量下降,最终影响 DNA 的甲基化。有研究显示, MTHFR 677TT 基因型携带者全基因组 DNA 甲基化程度显著低于 MTHFR 677CC 者<sup>[14]</sup>。全基因组低甲基化通常伴随肿瘤抑制基因 CpG 岛区域性的高甲基化<sup>[15]</sup>。目前已发现启动子区 CpG 岛的甲基化与胰腺癌中的一些肿瘤抑制基因及错配修复基因如 p16, ppENK 和 hMLH1 的失活有关<sup>[16,17]</sup>。因此,通用甲基供体不足而导致的肿瘤抑制基因的失活可能在胰腺癌组织的生长调节方面起着非常重要的作用。

本项研究观察到的吸烟、饮酒与 MTHFR 变异基因型的正向交互作用机制,可能与酒精降低细胞

内 SAM 的水平、抑制小肠对叶酸的吸收、增加叶酸的排泄和干扰 MS 的活性有关<sup>[18,19]</sup>,这些作用可能会加重 MTHFR 基因变异导致叶酸代谢障碍所引起的细胞内甲基供体缺乏。而吸烟则可通过降低叶酸和维生素 B6 水平,干扰维生素 B12 的代谢而影响甲基基因形成<sup>[20]</sup>。

虽然我们未观察到 MTHFR A1298C 多态与胰腺癌发病风险显著关联,但对 MTHFR 677 杂合子而言,当其 1298 位点也为杂合子时,其发生胰腺癌的风险要较携带 1298AA 基因型者轻度增加(OR = 1.36),提示 1298C 等位基因的影响有可能存在,但效应不如 677T 明显, Lievers 等<sup>[21]</sup>观察到的 A1298C 和 C677T 组合对于酶活性影响的结果也支持这种推测。

MTHFR 基因多态与癌症风险的关系还可能受叶酸摄入水平的影响<sup>[12,22]</sup>。研究显示在叶酸摄入充足的情况下,TT 基因型者发生肿瘤风险下降。因为在这种情况下,不仅甲基供体的形成得到保障,同时以 5,10-亚甲基四氢叶酸形式存在的叶酸又能为合成 DNA 和 RNA 提供必需的原料。而叶酸摄入水平低的个体,TT 基因型则非常有害。关于叶酸摄入水平与 MTHFR 基因多态之间如何联合作用最终导致癌症易感性增加有待进一步研究。

本项研究未能证实 MS 基因多态与胰腺癌存在关联,原因可能还与大多数人种中 GG 基因型频率均低于 5% 有关<sup>[23]</sup>,此多态对肿瘤发生的影响需要大样本量的研究来证实。

本项研究虽首次报道叶酸代谢基因多态与胰腺癌风险相关,但由于研究的局限性,如病例来源于医院,可能不能代表一般人群,因此尚需重复研究以及前瞻性研究来证实我们结果的病因学意义。

参 考 文 献

- 1 Li D, Xie K, Wolff R, et al. Pancreatic cancer. *Lancet*, 2004, 363: 1049-1057.
- 2 Wang L, Yang GH, Lu XH, et al. Pancreatic cancer mortality in China (1991-2000). *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 1819-1823.
- 3 Howe GR, Burch JD. Nutrition and pancreatic cancer. *Cancer Cause Control*, 1996, 7: 69-82.
- 4 Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Barrett MJ, et al. Dietary and other methyl-group availability factors and pancreatic cancer risk in a cohort of male smokers. *Am J Epidemiol*, 2001, 153: 680-687.
- 5 Stolzenberg-Solomon RZ, Albanes D, Nieto FJ, et al. Pancreatic cancer risk and nutrition-related methyl-group availability indicators in male smokers. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91: 535-541.
- 6 Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for

- vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 1995, 10: 111-113.
- 7 Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002, 99: 3786-3791.
- 8 Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 1976, 3: 2303-2308.
- 9 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.
- 10 Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, et al. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood*, 2001, 97: 3205-3209.
- 11 Miao X, Xing D, Tan W, et al. Susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma and genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase in an at-risk Chinese population. *Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11: 1454-1458.
- 12 Giovannucci E, Chen J, Smith-Warner SA, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase, alcohol dehydrogenase, diet, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12: 970-979.
- 13 Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, 1998, 64: 169-172.
- 14 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.
- 15 Laird PW, Jaenisch R. DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet*, 1994, 3 suppl: 1487-1495.
- 16 Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2000, 60: 1835-1839.
- 17 Ueki T, Toyota M, Skinner H, et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 2001, 61: 8540-8546.
- 18 Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, et al. Metabolic interactions of alcohol and folate. *J Nutr*, 2002, 132: s2367-s2372.
- 19 Kenyon SH, Nicolaou A, Gibbons WA. The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro. *Alcohol*, 1998, 15: 305-309.
- 20 Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, et al. Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12. *Am J Clin Nutr*, 1994, 60: 559-566.
- 21 Lievers KJ, Boers GH, Verhoeef P, et al. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med*, 2001, 79: 522-528.
- 22 Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*, 1996, 56: 4862-4864.
- 23 Goode EL, Potter JD, Bigler J, et al. Methionine synthase D919G polymorphism, folate metabolism, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13: 157-162.

(收稿日期: 2005-04-05)

(本文编辑: 张林东)