·临床流行病学·

叶酸与宫颈癌关系的病例对照研究

王金桃　马晓晨　程玉英　丁玲　周芩

【摘要】 **目的** 探讨膳食叶酸、血清叶酸与宫颈癌的关系以及叶酸和人乳头瘤病毒(HPV)16 在宫颈癌发生中的相互作用。**方法** 采用以医院为基础的病例对照研究方法,对 111 例经病理学确诊的宫颈鳞癌新发病例和 111 例子宫肌瘤患者进行年龄、籍贯、居住地匹配,在收集宫颈癌相关因素的同时,采用食物频数问卷(FFQ)调查膳食叶酸摄入情况,利用特异 PCR 检测 HPV16 DNA,血清叶酸采用 RIA 定量测定。**结果** 宫颈癌组 HPV16 感染率(61.26%)显著高于对照组(28.83%),调整 *OR* 值4.95(95% *CI*:2.49~9.83);病例组膳食叶酸摄入量(5.00 μg/kcal±0.41 μg/kcal)和血清叶酸水平(1.79 ng/ml±1.42 ng/ml)均低于对照组(5.14 μg/kcal±0.35 μg/kcal,2.59 ng/ml±2.81 ng/ml),差异有统计学意义,特别是随着血清叶酸水平的降低,患宫颈癌的危险性增加($\chi^2=17.37$, $P=0.000$);血清叶酸水平较低同时伴有 HPV16 感染患宫颈癌的危险明显高于两者单独作用之和,交互作用检验有统计学意义($G=5.56$, $P=0.02$)。**结论** 叶酸缺乏可增加宫颈癌发生的危险。

【关键词】 宫颈肿瘤; 叶酸; 人乳头瘤病毒; 病例对照研究

A case-control study on the association between folate and cervical cancer

WANG Jin-tao, MA Xiao-chen, CHENG Yu-ying, DING Ling, ZHOU Qin. *Department of Epidemiology, Public Health College, Shanxi Medical University, Taiyuan* 030001, China

【**Abstract**】 **Objective** To evaluate the possible effects of folate on cervical carcinogenesis and the interaction of folate and human papillomaviruses 16 (HPV16). **Methods** A hospital-based case-control study was conducted. 111 hospitalized cases who were pathologically diagnosed of having cervical cancer and 111 controls identified with hysteromyoma that frequency-matched to cases on age, birth place and residential area. A 60-item food-frequency questionnaire (FFQ) were administered to estimate the consumption of dietary folate. HPV16 DNA in exfoliated cervical cell and serum folate were detected by special PCR and radioimmunoassay respectively. **Results** HPV16 infection rate in cases (61.26%) was significantly higher than that in controls (28.83%), with adjusted *OR* of 4.95 (95% *CI*: 2.49-9.83). The levels of dietary folate in cases (5.00 μg/kcal±0.41 μg/kcal) were significantly lower than that in controls (5.14 μg/kcal±0.35 μg/kcal), but the adjusted *OR* showing no statistical significance. However, serum folate in cases (1.79 ng/ml±1.42 ng/ml) was significantly lower than that in controls (2.59 ng/ml±2.81 ng/ml), and there were significantly increasing trend in the risk of cervical cancer with reducing level of serum folate ($\chi^2_{trend\ test}$ of $P=0.000$). Meanwhile, low-level of serum folate and HPV16-infection showed significant interaction in the development of cervical cancer, with likelihood ratio test of $G=5.56$, $P=0.02$. **Conclusion** Results indicated that low levels of folate might increase the risk of cervical cancer, and potential synergistic action might exist between low level of serum folate and HPV16 in the development of cervical cancer.

【**Key words**】 Cervical neoplasms; Folate; Human papillomaviruses; Case-control study

人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌发生的主要原因[1],但并非惟一因素,寻找其他致癌因子或协同 HPV 致癌因素成为多数学者关注的焦点[2]。作为人们日常生活中暴露频率最高的饮食因素、膳食结构和成分的变化与诸多疾病的发生有关。本研究组前期的研究发现,饮食中叶酸、维生素 A、β-胡萝卜素、维生素 B 等营养素缺乏可增加宫颈癌发生的危险[3],由于叶酸具有参与 DNA 合成和甲基化的生物学功能,与宫颈癌的关系倍受关注[4],然而,目前国内有关叶酸与宫颈癌关系的报道甚少。本研究在考虑高危型 HPV16 感染这一宫颈癌主要危险因素的前提下,采用膳食叶酸为外暴露指标、血清叶酸

基金项目:山西省科技攻关课题资助项目(021080)

作者单位:030001 太原,山西医科大学流行病学教研室(王金桃、丁玲、周芩);北京市疾病预防控制中心(马晓晨);山西省肿瘤医院(程玉英)

为内暴露指标综合衡量人群的叶酸水平，以探讨膳食叶酸、血清叶酸与宫颈癌的关系，以及叶酸与HPV 在宫颈癌发生中的交互作用，以期为宫颈癌的病因研究提供新的理论依据。

对象与方法

1. 研究对象：病例为 2004 年 1－6 月山西省肿瘤医院经病理学确诊的新发宫颈鳞状细胞癌患者 111 例，按照频数匹配的方法选择与病例年龄相差 ±3 岁、同一地区(市)居住、同期在同一医院住院的子宫肌瘤患者 111 例作为对照。所有研究对象均要求为汉族、在当地居住 20 年及以上，同时排除血液系统、消化系统、心脑血管疾病患者、近 3 个月内 B 族维生素使用者和其他肿瘤患者。

2. 资料收集：

(1)宫颈癌相关因素的收集：设计统一的结构式问卷，由培训合格的调查员对研究对象进行面对面询问。调查内容主要包括人口学一般特征、个人生活嗜好、卫生习惯、月经婚育史、既往病史、肿瘤家族史及避孕药使用史等。

(2)膳食叶酸摄入调查：结合当地人群的饮食习惯设计食物频数问卷(FFQ)，收集研究对象发病前 5 年各类食物在不同季节的食用频率和食用量，主要包括粮谷类、豆类、新鲜蔬菜、新鲜水果、肉类、蛋类、奶类及其他共 8 类 60 种食物。

(3)标本采集：收集全部研究对象清晨空腹静脉血5 ml，分离血清和血凝块，置－80℃ 冰箱保存待检。并于入院后、系统治疗前用宫颈刮片 360°旋转两圈收集宫颈脱落细胞，置事先配制的 PBS(pH 值 7.0)液中，12 h内离心、富集细胞，－80℃贮存待检。

3. 实验方法：

(1)HPV16 DNA 扩增：采用异硫氰酸胍-酚氯仿提取法从宫颈脱落细胞中提取 HPV DNA，参照文献[5]建立的方法进行 HPV16 DNA 扩增。

(2)血清叶酸的检测：采用放射免疫法(RIA)定量测定血清叶酸水平，在 FT-646A 微机放免测定仪计数，由软件自动绘出标准曲线，计算待检血清叶酸含量。每批测定均设高、中、低双质控管，操作步骤严格按照说明书进行。

4. 统计学分析：用 Visual FoxPro 6.0编制膳食叶酸日平均摄入量的计算程序，根据《中国食物成分表 2002》将 60 种食物摄入量换算成叶酸的每日平均摄入量。为排除总能量可能的干扰作用，以经总能量调整的每日膳食叶酸平均摄入量(μg/kcal)作为膳食叶酸的评价指标。采用 Stata 7.0和 SPSS 11.0 软件对资料进行 t 检验、Wilcoxon 检验、χ^2 检验、趋势 χ^2 检验及非条件 logistic 回归分析，采用叉生分析和似然比 G 检验进行交互作用分析。

结　果

1. 病例组与对照组的均衡性分析：宫颈癌患者 111 例，年龄30～77 岁(中位数52.53岁 ±9.65岁)；子宫肌瘤患者 111 例，年龄31～74 岁(中位数50.56岁 ±8.74岁)，两组年龄差别无统计学意义(t = 1.59，P = 0.06)。两组在居住地和婚姻状况等方面的差异也无统计学意义(P > 0.05)。

2. 宫颈癌发生的相关因素分析：因素分析结果显示，务农、吸烟、首次性行为年龄小、生育次数多是宫颈癌发生的危险因素，而绝经、文化程度高、家庭收入高是宫颈癌发生的保护因素。未发现被动吸烟、饮酒、饮茶、妇科病史、手术史、自然流产史、宫颈癌家族史等与宫颈癌的相关关系。

对两组人群 HPV16 的检测结果显示，病例组 HPV16 阳性率(61.26%)显著高于对照组(28.83%)，差异有统计学意义(χ^2 = 22.40，P = 0.00)。多元 logistic 回归分析在调整年龄、职业、吸烟、家庭收入、文化程度、月经状况、首次性交年龄、孕次等相关因素后，HPV16 感染的 OR 值为4.95 (95% CI：2.49～9.83)。

3. 膳食叶酸和血清叶酸与宫颈癌关系的分析：经能量调整的膳食叶酸摄入量呈负偏态分布，将其进行对数转化后行 t 检验，对偏态分布的血清叶酸采用 Wilcoxon 检验。结果显示，病例组膳食叶酸摄入量和血清叶酸水平均低于对照组，差异有统计学意义(表 1)。对膳食叶酸与血清叶酸的一致性分析结果显示，在病例组和对照组两者的相关系数(r)分别为0.461(P < 0.001)和0.358(P < 0.001)，两组合并后，r = 0.404(P < 0.001)。

表1 病例组与对照组膳食叶酸(μg/kcal)和血清叶酸(ng/ml)水平比较

组别	膳食叶酸* ($\bar{x} \pm s$)	血清叶酸($M \pm QL$)#
病例组(n = 111)	5.00 ± 0.41	1.79 ± 1.42
对照组(n = 111)	5.14 ± 0.35	2.59 ± 2.81
	t = 2.64，P = 0.01	Z = 4.19，P = 0.00

* 经能量调整的自然对数转化后膳食叶酸摄入量(μg/kcal)；
\# 中位数 ± 四分位间距数

进一步以对照组的膳食叶酸和血清叶酸水平进行四分位数分级分析，结果显示，随着膳食叶酸和血清叶酸水平的降低，患宫颈癌的危险逐渐增加。特别是在调整年龄、职业、吸烟、家庭收入、文化程度、月经状况、首次性交年龄、孕次和 HPV16 后，血清叶酸与宫颈癌发生的风险仍呈剂量反应关系(表 2)。

4. 叶酸和 HPV16 相互作用分析：采用叉生分析对膳食叶酸、血清叶酸和 HPV16 在宫颈癌发生中的相互作用进行了分析，并通过多元 logistic 回归分析对年龄、职业、吸烟、家庭收入、文化程度、月经状况、首次性交年龄、孕次等因素进行了控制。结果显示，膳食叶酸缺乏与 HPV16 感染同时存在时患宫颈癌的危险增加了6.66倍，但交互作用未达统计学显著性水平($G=1.86$, $P>0.25$)；血清叶酸缺乏同时感染 HPV16 患宫颈癌的危险为17.45，交互作用具有统计学意义($G=5.56$, $P=0.02$)，见表 3。

讨　论

叶酸在体内主要参与 DNA 的甲基化和 DNA 的合成过程，有资料报道叶酸缺乏可导致 p53 编码区的低甲基化[6]，而对低甲基化特别敏感的区域恰是人类肿瘤突变最频繁的区域，正是基于这样的生物学基础，叶酸与肿瘤的关系引起了人们的极大兴趣。已有报道叶酸缺乏与结肠癌、乳腺癌、皮肤癌、肺癌等多种肿瘤的发生有关[7]，而有关叶酸与宫颈癌的研究报道甚少，且结果不尽相同。

膳食评价是探讨人群膳食营养状况与疾病关系的基本手段。本研究采用 FFQ 评价膳食叶酸的摄入状况，对 10% 研究对象重复调查的一致性较好(*Kappa* 值为0.54～0.71)。结果显示，病例组膳食叶酸的摄入量明显低于对照组，这与国外多数报道一致[2,8]。Goodman 等[8]的研究发现膳食叶酸与宫颈细胞瘤样变(CIN)的发生有关，随着膳食叶酸摄入增加，患 CIN 的危险降低(趋势检验 $P=0.00$)。山西为宫颈癌高发地区，山区面积大，经济条件差，吃新鲜蔬菜和动物蛋白等富含叶酸食物的时间短、摄入量少，提示饮食中缺乏叶酸可能是导致当地宫颈癌高发的原因之一[3]。当然，本次膳食叶酸的估计是通过 FFQ 这样一种回顾性调查获得，难免受到回忆偏倚和测量偏倚的影响，尽管在对各种食物摄入情况进行调查并加以量化估计时，采取了出示食具给调查对象而尽可能使其回忆准确，在 FFQ 的设计中特别按照季节进行食物成分调查，并在估计膳食叶酸含量时采用了经能量调整的膳食叶酸摄入量以克服测量偏倚，但结果的可靠性还是相对较差。本研究对膳食叶酸与血清叶酸的相关性分析中显示两

表2　膳食叶酸和血清叶酸水平与宫颈癌关系分析

叶酸水平		病例组($n=111$)	对照组($n=111$)	*OR* 值(95% *CI*)	*OR* 值(95% *CI*)*
膳食叶酸(μg/kcal)	>5.35	16	28	1.00	1.00
	5.15～5.35	22	27	1.43(0.62～3.28)	1.62(0.57～4.57)
	4.91～5.15	25	28	1.56(0.69～3.54)	1.80(0.66～4.90)
	≤4.91	48	28	3.00(1.39～6.49)	2.19(0.85～5.62)
	χ^2 趋势检验			$P=0.00$	$P=0.11$
血清叶酸(ng/ml)	≥4.45	5	27	1.00	1.00
	2.59～4.45	26	29	4.84(1.63～14.41)	4.34(1.26～15.02)
	1.62～2.59	36	29	6.70(2.29～19.58)	5.69(1.70～19.04)
	≤1.62	44	26	9.13(3.13～26.64)	13.32(3.88～45.68)
	χ^2 趋势检验			$P=0.00$	$P=0.00$

* *OR* 值调整年龄、职业、吸烟、家庭收入、文化程度、首次性交年龄、月经状况、孕次及 HPV16

表3　膳食叶酸、血清叶酸和 HPV16 相互作用与宫颈癌易感性的关系

叶酸水平		HPV16	病例组例数	对照组人数	*OR* 值(95% *CI*)	*OR* 值(95% *CI*)*
膳食叶酸(μg/kcal)	≥5.15	−	13	42	1.00	1.00
		+	25	13	6.21(2.49～15.05)	9.35(3.10～28.24)
	<5.15	−	30	37	2.62(1.19～5.75)	2.61(1.04～6.59)
		+	43	19	7.31(3.21～16.66)	7.66(2.94～19.93)
			$G=1.86$	$\nu=1$	$P>0.25$	
血清叶酸(ng/ml)	≥2.59	−	14	34	1.00	1.00
		+	17	22	1.88(0.78～4.51)	1.98(0.69～5.73)
	<2.59	−	29	45	1.57(0.72～3.41)	1.62(0.64～4.10)
		+	51	10	12.39(4.93～31.09)	17.45(5.84～52.11)
			$G=5.56$	$\nu=1$	$P=0.02$	

* *OR* 值调整年龄、职业、吸烟、家庭收入、文化程度、首次性交年龄、孕次、月经状况

者的一致性较差，不能排除膳食调查时可能产生的偏倚对结果影响的可能。但另一方面更应引起重视之处在于，叶酸摄入体内后的代谢、运转过程可能受到各种因素的影响，应深入探讨。

与膳食叶酸摄入相比，血清叶酸能比较准确地反应机体的叶酸状况。Kwasniewska 等[9]报道 CIN 患者血清叶酸水平明显低于对照组（$OR = 7.5$，95% CI：1.2～9.7），Weinstein 等[10]在美国 5 个社区中进行的一项多中心的病例对照研究发现，病例组血清叶酸和红细胞叶酸水平均低于对照组，但无统计学意义。Regina 等[11]在调整了宫颈癌已知的危险因素后发现血清叶酸缺乏患宫颈癌的风险增加，但结果未达到统计学显著性水平。本次研究结果显示，病例组血清叶酸明显低于对照组，在调整了宫颈癌的相关因素和 HPV16 后，仍然显示随着叶酸水平的降低患宫颈癌危险性增加的趋势，提示叶酸缺乏可增加患宫颈癌的危险性。

有研究表明叶酸缺乏可导致 DNA 链断裂和染色体脆性增加，其中最常见的一个脆性位点是 FRA3B，而 HPV16 E6 癌基因与宿主 DNA 整合的位点也恰在此处[12]，可见，生物学上支持叶酸缺乏协同 HPV16 致宫颈癌的假设，但在人群中两因素相互作用与宫颈癌关系的研究甚少，且多为描述性研究。有资料显示，血清叶酸充足的妇女重复感染高危型 HPV 的危险性可降低 67%（$OR = 0.33$，95% CI：0.13～0.86）[13]。本次研究发现血清叶酸缺乏且 HPV16 感染同时存在时，患宫颈癌的危险度显著增加，均高于单独暴露于单一因素时患宫颈癌的危险性之和，交互作用检验具有统计学意义（$G = 5.56$，$P = 0.02$），提示低叶酸状态与高危型 HPV16 感染在宫颈癌发生中可能具有协同作用。

山西是宫颈癌的高发区，山西省肿瘤医院是省内收治肿瘤患者的惟一专科医院，集中了全省 80% 的肿瘤患者。本次研究按选择标准收集了一定时期内宫颈癌的全部确诊病例以及同期符合条件的子宫肌瘤患者为研究对象，尽可能使研究对象具有代表性，但受病例对照研究方法的局限，特别是从医院中选择的病例和对照均为术后患者，可能未将重症患者包括在内，此外，住院患者中也可能未包括尚无明显临床症状而未被发现的轻型患者，或由于家庭经济条件等原因未入院者在内，由此而造成的选择偏倚对结果的影响在所难免。因此，需要在社区更广泛的人群中深入进行相关研究或进行前瞻性研究以弥补此缺憾。

参 考 文 献

1 Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med, 2003, 348: 518-527.

2 Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. Virus Res, 2002, 89: 191-199.

3 马晓晨，王金桃，程玉英，等. 膳食因素与宫颈癌关系的病例对照研究. 中国公共卫生杂志，2004，21：191-193.

4 Wolter M, Strohle A, Hahn F, et al. Age-associated changes in the metabolism of vitamin B12 and folic acid: Prevalence, aetiopathogenesis and pathophysiological consequences. Z Gerontol Geriatr, 2004, 37: 109-135.

5 王金桃，高尔生，程玉英，等. 内源性雌孕激素与 HPV 在宫颈癌发生中的协同作用研究. 中华流行病学杂志，2005，26：370-373.

6 Kim YI, Pogribny IP, Salomon RL, et al. Exon-specific DNA hypomethylation of the p53 gene of rat colon induced by dimethylhydrazine, modulation by dietary folate. Am J Pathol, 1997, 149: 1129-1137.

7 Eichholzer M, Luthy J, Moser U, et al. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. Swiss Med Wkly, 2001, 131: 539-549.

8 Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, et al. Case-control study of plasma folate, homocysteine, vitamin B12 and cysteine as markers of cervical dysplasia. Cancer, 2000, 89: 376-382.

9 Kwasniewska A, Tukendorf A, Semczuk M, et al. Folate deficiency and cervical intraepithelial neoplasia. Eur J Gynaecol Oncol, 1997, 18: 526-535.

10 Weinstein SJ, Ziegler RG, Frongillo EA, et al. Low serum and red blood cell folate are moderately, but nonsignificantly associated with increased risk of invasive cervical cancer in U. S. women. J Nutr, 2001, 131: 2040-2046.

11 Regina G, Ziegler, Stephanie J, et al. Nutritional and genetic inefficiencies in one-carbon metabolism and cervical cancer cancer risk. AM Nutritional Sciences, 2002, 211: 1093-1101.

12 Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 3290-3295.

13 Sedjo RL, Inserra P, Abrahamsen M, et al. Human papillomavirus persistence and nutrients involved in the methylation pathway among a cohort of young women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002, 11: 353-359.

（收稿日期：2005-08-25）

（本文编辑：张林东）