

新疆哈萨克族食管癌与叶酸摄入水平、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态关系的研究

秦江梅 王秀梅 陈波 杨磊 李锋 何玲 廖佩花

【摘要】 目的 探讨新疆哈萨克族人群食管癌与叶酸摄入水平及与叶酸代谢相关基因亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态的关系。**方法** 采用1:2配比的病例对照研究方法,收集120例哈萨克族食管癌患者,按同性别、同民族、年龄相差≤5岁、同一个居住地区等选取对照240例;选用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 MTHFR C677T 基因型,采用条件 logistic 回归进行统计分析。**结果** 叶酸摄入量与哈萨克族食管癌有关($\chi^2 = 7.868, \nu = 1, P < 0.01$),其 OR 值为0.519(95% CI:0.329~0.821),叶酸摄入水平高是保护因素;病例组和对对照组 MTHFR C677T 基因型分布,经统计学检验,差异有统计学意义($\chi^2 = 15.823, \nu = 1, P < 0.01$);MTHFR 677CT、TT 基因型个体发生食管癌的危险性是 CC 基因型个体的2.613倍(95% CI:1.628~4.194);交互作用提示:叶酸摄入充足,可降低携带 MTHFR 677CT、TT 基因型个体发生食管癌的危险性。多因素条件 logistic 回归分析显示:饮用河水或渠水、饮食不规律、辛辣饮食、暴饮暴食、粮食存放超过1年、有食管或胃病变史、MTHFR 677 位点发生C→T改变等是哈萨克族食管癌的危险因素,叶酸摄入水平高是保护因素。**结论** 叶酸摄入缺乏是新疆哈萨克族食管癌的主要危险因素;MTHFR C677T 多态是哈萨克族食管癌的易感因素。

【关键词】 食管肿瘤;叶酸;亚甲基四氢叶酸还原酶 677T 基因;哈萨克族;病例对照研究

Study on the ingestion of folate and polymorphism of MTHFR C677T with esophageal cancer in Xinjiang Kazakh QIN Jiang-mei, WANG Xiu-mei, CHEN Bo, YANG Lei, LI Feng, HE Ling, LIAO Pei-hua. Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Disease, Medical of College, Shihezi University, Shihezi 832002, China

【Abstract】 Objective To study the relationship between esophageal cancer (EC) and the ingestion of folate, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphisms in Kazakh area, Xinjiang. **Methods** A 1:2 matched case-control study was adopted. 120 cases diagnosed as esophageal cancer were collected with 240 population-based and hospital-based controls were selected by the same sex, same nationality and each pair's ages were permitted to differ within 5 years. MTHFR genotypes were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and the conditional logistic regression model was performed in this study. **Results** Data showed that the ingestion of folate was related to EC in Kazakh ($\chi^2 = 7.868, \nu = 1, P < 0.01$) with OR:0.519 (95% CI:0.329-0.821) while more folate intake appeared to be the protective factor of EC in Kazakh. The MTHFR C677T genotype frequencies of EC group was different from the control group ($\chi^2 = 15.823, \nu = 1, P < 0.01$). The individuals with 677CT, TT genotype had a 2.613-fold (95% CI:1.628-4.194) increased risk of developing EC, compared to those who had 677CC genotype. Data from Interaction Analysis showed that more folate intake could reduce the incidence of esophageal cancer to the individuals who carried the MTHFR 677CT or TT genotypes. Results from multivariate conditional logistic regression analysis showed that: unsanitary drinking water, irregular eating, prefer eating peppery food, engorgement, crusted rice or wheat, having history of stomach or esophagus illness, carrying MTHFR 677CT or TT genotypes were risk factors of esophageal cancer while taking in more folate was the protective factor of EC. **Conclusion** Lacking of folate intake were mainly risk factor and the polymorphisms of MTHFR C677T gene were susceptibility factor of esophageal cancer in Kazakh in Xinjiang.

【Key words】 Esophageal neoplasms; Folate; Methylenetetrahydrofolate reductase C677T; Kazakh; Case control study

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30660161);重大基础研究前期研究专项基金资助项目(2005CCA03700);2006年教育部科学技术研究重点资助项目(206167)

作者单位:832002 石河子大学医学院新疆地方与民族高发病省部共建教育部重点实验室

哈萨克族是食管癌高发民族,1990-1992 年全国第二次死因回顾调查资料显示哈萨克族食管癌的调整死亡率为 68.88/10 万,高于我国一般地区发病水平。有研究表明叶酸缺乏与多种癌症相关^[1],其缺乏可能通过扰乱正常 DNA 甲基化、合成和修复而致癌^[2]。叶酸需要代谢转化才能发挥其生物学作用,亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是叶酸生物转化形成甲基供体的关键酶,具有多态性,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,导致 DNA 甲基化水平降低^[3]。本研究综合分析了新疆地区哈萨克族食管癌与叶酸摄入量、MTHFR 基因多态性关系。

对象与方法

1. 调查对象:病例组来自 2005 年 3 月至 2007 年 5 月在新疆北部哈萨克族聚集地区的 6 所医院收集哈萨克族新发食管癌病例,共 120 例;对照组按照同性别、同民族、年龄相差≤5 岁、同一个居住地 1:2 匹配,其中一部分对照来源于同一所医院的非肿瘤、非消化道疾病的就诊或住院的病例,另一部分对照来源于同一乡镇或市区的正常人群,共计 240 人。

2. 调查内容:病例和对照组均采用统一的调查表,由培训合格的各医院调查员进行问卷调查。调查内容为一般情况,包括性别、实际年龄、文化程度、婚姻、职业等;日常生活行为习惯,包括吸烟、饮酒和喝茶等嗜好;饮食习惯包括蔬菜、水果摄入情况、三餐是否定时、进食速度、是否喜食烫食、辣食、硬食和月食盐量等;是否有食管、胃疾病史及食管癌家族史等。蔬菜和水果摄入量是等级资料,分为:不吃或及少吃、每月吃数次、1-3 d/周、4-6 d/周及每天都吃五组。蔬菜摄入种类分为以土豆、胡萝卜和洋葱为主的根茎类蔬菜和以时令绿色蔬菜为主两类。

3. 实验室检测:收集研究对象的静脉血标本,EDTA-K₂ 抗凝,分装,-70℃ 低温保存。基因组 DNA 提取用上海生物工程基因组小量抽提试剂盒 II, MTHFR 基因的检测参照文献^[4]聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测,所用引物为 5'-TTT GAG GCT GAC CTG AAC ACT TGA AGG AG-3' 和 5'-GAG TGG TAG CCC TGG ATG GGA AAG ATC CCG-3'^[4]。PCR 反应总体积 25 μl,基因组 DNA 溶液 2 μl,含引物(20 pmol/μl)各 0.5 μl,2.5 mmol/L 的 4× dNTP 0.5 μl,5 U/μl Taq 酶 0.1 μl, MgCl₂ 2.0 mmol/L,

10×PCR buffer 2.5 μl。PCR 扩增条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,60.5℃ 1 min,72℃ 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min;PCR 产物用 *Hinf*I 内切酶在 37℃ 消化 13 h,用 2% 琼脂糖凝胶电泳确定 MTHFR 基因型。基因型分为野生型纯合型(C/C)、杂合型(C/T)、变异纯合型(T/T)。

4. 统计学分析:使用 Epi Data 软件建立数据库,对所有调查项目进行整理和赋值,叶酸摄入水平根据食用蔬菜的量、种类和食用水果的量化划分为常年叶酸摄入水平低和摄入水平高两类,以绿色蔬菜摄入为主的摄入量达到每周 1-3 d 及以上摄入者或以土豆等根茎类蔬菜摄入量达到每周 4-6 d 及以上者或水果摄入达到每周 1-3 d 及以上者为叶酸摄入量多,不足上述标准者被定为叶酸摄入少,并按 0,1 赋值(0=叶酸摄入量少,1=叶酸摄入量多),采用 SPSS 13.0 软件进行条件 logistic 回归分析,计算回归系数估计值(β)、标准误(s_{β})、P 值、OR 值及 95% 可信区间(CI)。1:2 匹配的病例对照涉及到的公式有:

$$n_2 \text{ 的期望值: } E(n_2) = \frac{1}{3}(n_2 + n_4)$$

$$n_2 \text{ 的方差: } Var(n_2) = \frac{2}{9}(n_2 + n_4)$$

$$n_1 \text{ 的期望值: } E(n_1) = \frac{2}{3}(n_1 + n_3)$$

$$n_1 \text{ 的方差: } Var(n_1) = \frac{2}{9}(n_1 + n_3)$$

$$\chi^2 = \frac{[n_2 - E(n_2) + n_1 - E(n_1)]^2}{Var(n_2) + Var(n_1)}$$

$$OR = \frac{(n_1 + 2n_2)}{(2n_3 + n_4)} \quad (n_1, n_2, n_3, n_4 \text{ 的解释见表 1 标示})$$

结 果

1. 一般状况及遗传平衡检验:120 例食管癌患者年龄为 38.3~79.0 岁,平均 59.0 岁±10.0 岁,其中男性 81 例,女性 39 例;对照 240 人,年龄 35.2~80.4 岁,平均 58.4 岁±10.1 岁,其中男性 162 人,女性 78 人。病例组与对照组年龄差异无统计学意义($t = 0.586$, $v = 358$, $P = 0.558$)。为检验人群 MTHFR C677T 基因型频率是否达到 Hardy-Weinberg 遗传平衡,将对照组 MTHFR 基因型频率观察值与期望值进行比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 3.34$, $v = 2$, $P > 0.05$),说明 MTHFR 基因型频率已达到遗传平衡,具有人群代表性。

2. 叶酸摄入水平与哈萨克族食管癌的关系:以

叶酸摄入量大为暴露以“+”表示,叶酸摄入小以“-”表示,1:2配对,每个对子有3人,1例病例,2名对照,三者的暴露情况出现六种可能组合:+++、++-、+-、--、-+-、-+-及---。经1:2配对资料的 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=7.868$, $P<0.01$),叶酸摄入量多少与哈萨克族食管癌有关,其OR值为0.519(95%CI:0.329~0.821),叶酸摄入量多是保护因素(表1)。

表1 叶酸摄入水平与哈萨克族食管癌关系

病例组 叶酸摄入水平	对照组叶酸摄入水平			合计
	++	+-	--	
+	15(n_1)	30(n_2)	5(n_3)	50
-	25(n_4)	27(n_5)	18(n_6)	70
合计	40	57	23	120

注: $\chi^2=7.868, \nu=1, P<0.01$

3. MTHFR C677T 基因多态与食管癌的关系:以 MTHFR C677T 的突变杂合型 CT 和突变纯合型 TT 型为暴露以“+”表示。食管癌病例组和对照组 MTHFR C677T 基因分布,差异有统计学意义($\chi^2=15.823, \nu=1, P<0.01$),OR 值为2.613(95%CI:1.628~4.194),MTHFR 677 位点发生C→T改变是哈萨克族食管癌的危险因素。见表2。

表2 MTHFR C677T 基因多态与哈萨克族食管癌关系

病例组 基因多态	对照组基因多态			合计
	++	+-	--	
+	7	25	28	60
-	5	21	34	60
合计	12	46	62	120

注: $\chi^2=15.823, \nu=1, P<0.01$

4. 叶酸摄入水平与 MTHFR C677T 基因多态

的交互作用:以叶酸摄入量少、MTHFR C677T 基因型为 CC 发生食管癌的危险性为基数 1,则叶酸摄入多而 MTHFR C677T 基因型为 CC 者发生食管癌的危险性为对照的0.468倍,叶酸摄入量少而 MTHFR C677T 基因型为 CT+TT 者发生食管癌的危险性对照的2.170倍。叶酸摄入多而 MTHFR C677T 基因型为 CT+TT 者发生食管癌与对照比差异无统计学意义。可见当叶酸摄入量充足时,会使携带 MTHFR 677CT 和 677TT 基因型者发生食管癌的危险性降低。见表3。

表3 叶酸摄入水平、MTHFR C677T 基因多态与哈萨克族食管癌交互作用分析

叶酸摄入	基因多态	病例	对照	χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
少	CC	37	73	-	-	1.000
多	CC	23	97	6.232	0.013	0.468(0.256~0.855)
少	CT+TT	33	30	5.842	0.016	2.170(1.152~4.088)
多	CT+TT	27	40	0.801	0.371	1.332(0.710~2.496)

5. 多因素条件 logistic 回归分析:为控制混杂因素,同时将叶酸摄入水平、MTHFR C677T 基因多态结果以及其他单因素条件 logistic 回归分析有意义的指标:饮水类型、饮用生水、冰箱的使用、吸烟、饮酒、进食速度、饮食规律性、辛辣饮食、暴饮暴食、粮食存放时间、霉存放时间、熏制肉摄入量、食管或胃疾病史、食管癌家族史等引入多因素条件 logistic 回归模型,结果显示:多因素模型中除饮用河水或渠水、饮食不规律、辛辣饮食、暴饮暴食、粮食存放时间超过1年是危险因素外,叶酸摄入水平高是保护因素,MTHFR 677 位点发生C→T改变等是哈萨克族食管癌的危险因素。见表4。

表4 新疆哈萨克族食管癌多因素条件 logistic 回归分析

因素	β	s_e	χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
饮水类型(对照=自来水)					
手压机井水	0.289	0.674	0.183	0.668	1.335(0.356~5.001)
河水或渠水	2.334	0.611	14.575	0.000	10.322(3.114~34.215)
不规律饮食(对照=规律)					
偶尔	-1.074	0.554	3.762	0.052	0.342(0.115~1.011)
经常	2.291	0.993	5.326	0.021	9.889(1.412~69.239)
辛辣饮食(对照=无)					
偶尔	2.665	0.633	17.740	0.001	14.371(4.158~49.673)
经常	2.767	0.844	10.757	0.000	15.907(3.045~83.107)
暴饮暴食(对照=无)					
偶尔	-1.089	0.588	3.426	0.064	0.337(0.106~1.066)
经常	3.170	1.022	9.625	0.002	23.812(3.214~176.446)
粮食存放(对照=当年)	3.404	1.242	7.511	0.006	30.073(2.636~343.019)
上消化道病史(对照=无)	2.265	0.685	10.940	0.001	9.634(2.517~36.876)
叶酸摄入(对照=少)	-1.381	0.548	6.341	0.012	0.251(0.086~0.736)
MTHFR 677(对照=基因型 CC)	2.486	0.646	14.806	0.000	12.019(3.387~42.651)

讨 论

叶酸摄入缺乏是新疆哈萨克族食管癌的主要危险因素。我国哈萨克族主要聚集在新疆北部的伊犁、塔城和阿勒泰地区,该民族以游牧为主,随季节变迁辗转夏季和冬季牧场,饮食结构单一,以奶茶、馕和抓饭为主,吃蔬菜、水果较少,哈萨克族偏爱土豆、胡萝卜等根茎类蔬菜。新鲜蔬菜、水果是叶酸的主要来源,在蔬菜种类中根茎类蔬菜叶酸含量较低。本课题组测定的哈萨克族正常人群血清叶酸水平(3.960 ± 2.05) ng/ml 远低于国家正常人群参考值(5.21 ng/ml)。我们认为哈萨克族食管癌高发与该民族整体叶酸摄入水平低有关。本次哈萨克族食管癌与叶酸摄入量关系的研究进一步证实,哈萨克族中叶酸摄入少者发生食管癌风险高于叶酸摄入多者。

MTHFR C677T 多态是新疆哈萨克族食管癌的易感因素。MTHFR 是一种调节叶酸的限速酶,当 MTHFR C677T 多态位点存在时,碱基置换导致读码框改变,翻译的氨基酸产物亦改变,此变化影响到蛋白功能,MTHFR 活性随之下降。677TT 编码的 MTHFR 活性下降导致 5-methylTHF 的合成不足,无法有效启动蛋氨酸的再循环,从而不能保证机体基因组正常的甲基化状态。由于不能提供足够的甲基供体,基因组 DNA 将随之出现低甲基化^[3]。基因组的去甲基化以及某些特定基因的低甲基化状态,是促进肿瘤发生发展的危险因素。本研究证实,携带 CT 或 TT 基因型的哈萨克族个体发生食管癌的危险性是 CC 基因型个体的 2.613 倍(95% CI: 1.628~4.194);MTHFR C677T 多态是新疆哈萨克族食管癌的易感因素。

叶酸的水平和 MTHFR 可能共同参与哈萨克族食管癌的发生。叶酸缺乏和/或叶酸代谢障碍可能通过破坏 DNA 的正常甲基化和基因组的完整性而致癌^[5]。本研究的“基因-叶酸”交互作用结果显示:在叶酸摄入量少时,MTHFR 677CT 基因型或 TT 基因型者发生食管癌的风险是 CC 基因型的 2.170 倍;当叶酸摄入充足能够降低携带 MTHFR 677CT 基因型或 TT 基因型个体发生食管癌的风险。可能的解释为:MTHFR 是叶酸代谢中的一个关键酶,催化 5,10-亚甲基四氢叶酸(5,10-methyleneTHF)不可逆地转化为 5-甲基四氢叶酸

(5-methylTHF)。MTHFR 活性下降会造成 5-methylTHF 的合成不足,然而在叶酸供应充足的情况下,有足够的原料可以提供,从而弥补了酶活性下降所带来的对基因组甲基化状态负面影响;与此同时,MTHFR 活性下降导致的 5,10-methyleneTHF 累积在叶酸充分供应的情况下得到加强,5,10-methyleneTHF 是胸苷合成酶的甲基供体,在胸苷合成酶的催化下使脱氧尿嘧啶(dUMP)转化为脱氧胸腺嘧啶(dTMP),后者是正常 DNA 合成的基本构成成分之一,高浓度的 5,10-methyleneTHF 充分保证了 dUMP 到 dTMP 的转变,使 DNA 合成充分进行,并且 dUMP 减少使尿嘧啶异常掺入基因组 DNA 的概率减少^[6],从而保证了正常的 DNA 合成和低频率的 DNA 损伤,这种此消彼长共同保证了 MTHFR 677 基因多态的保护性作用。故在叶酸摄入量高的人群中,此多态位点是作为一种保护性因素,降低机体患癌的危险性。与此理论相应,当叶酸摄入不足时,MTHFR 活性下降造成 5-methylTHF 合成下降会进一步恶化,从而加重 DNA 甲基化程度的不足^[3]。同时,低叶酸供应不能提供必需量 5,10-methyleneTHF,而 MTHFR 功能下降所致 5,10-methyleneTHF 累积亦不足以弥补,其在 DNA 合成方面的保护性作用则不能有效发挥。

基于本次研究结果提示,应加强对哈萨克族的健康教育,改变不良饮食习惯,多吃叶酸含量丰富的蔬菜及水果,减少食管癌发病的风险。

参 考 文 献

- [1] 林东昕,谭文,陆士新,等. 中国食管癌分子流行病学研究. 中华流行病学杂志,2003,24(10):939-943.
- [2] Takezaki T, Shinod M, Hatooka S, et al. Subsite specific factor for hypopharyngeal and esophageal cancer. Cancer Causes and Control,2000,11:597-608.
- [3] Friso S, Choi SW, Girelli D, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(8):5606-5611.
- [4] Xing DY, Tan W, Lin DX. Genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer among Chinese population. Oncology Reports,2003,10:1615-1623.
- [5] Kimio Y, Tomoyuki H, Shumpei O, et al. Allele frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 40 candidate genes for gene-environment studies on cancer: data from population-based Japanese random samples. J Hum Genet,2003,48(12):654-658.
- [6] Suomala T, Gamse G, Fowler B. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) assay in the forward direction: residual activity in MTHFR deficiency. Clin Chem,2002,48(6):835-843.

(收稿日期:2007-08-17)

(本文编辑:尹廉)