

叶酸水平、MTHFR 基因 C677T 多态性与宫颈癌的相关性研究*

薛雄燕, 朱嫦琳, 潘练华, 黄少珍, 黄燕婷, 马婉珍, 李炜焯[△]

(佛山市第一人民医院检验科, 广东佛山 528000)

摘要:目的 探讨血清叶酸及 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 多态性与宫颈癌易感性的相关作用。方法 收集 82 例宫颈癌患者和 82 例对照者,均为 HPV-16 阳性,应用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法检测 MTHFR 基因 C677T 多态性,同时采用电化学发光法检测血清叶酸水平,对二者与宫颈癌易感性的相关性进行分析。结果 病例组血清叶酸水平(8.63 ± 5.63) $\mu\text{g/L}$ 低于对照组(10.84 ± 5.99) $\mu\text{g/L}$, 差异有统计学意义($t=2.43, P=0.016$); 两组人群的 MTHFR 基因 C677T 均为杂合型(CT)频率最高,病例组人群纯合型(TT)高于野生型(CC),与对照组不一致($\chi^2=7.529, P=0.023$); 病例组 T 等位基因频率高于 C 等位基因,与对照组不一致($\chi^2=5.903, P=0.015$)。与野生型(CC)人群相比,纯合型(TT)人群患宫颈癌的危险性显著增高($OR=3.485, 95\%CI:1.331 \sim 9.122$),而杂合型(CT)人群未发现显著影响($OR=1.752, 95\%CI:0.810 \sim 3.789$); 在叶酸充足人群中, MTHFR 基因型为纯合型(TT)的人群患宫颈癌的危险为野生型(CC)人群的 2.057 倍($95\%CI:0.455 \sim 9.304$),而叶酸不充足且 MTHFR 基因型为纯合型(TT)的人群患宫颈癌的危险则上升为 4.354 倍($95\%CI:1.195 \sim 15.865$)。结论 MTHFR 基因 C677T 多态性是宫颈癌发生的易感因素,纯合型(TT)可增加宫颈癌发生的危险,尤其在低叶酸水平人群中发生风险最高。

关键词: 宫颈癌; 叶酸; 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.06.018

中图法分类号:R737.33

文章编号:1673-4130(2019)06-0710-04

文献标识码:A

The relationship between folate, MTHFR gene C677T polymorphism and cervical cancer*

XUE Xiongyan, ZHU Changlin, PAN Lianhua, HUANG Shaozhen,

HUANG Yanting, MA Wanzhen, LI Weixuan[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between serum folate, 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and cervical cancer. **Methods** The study included 82 women with cervical cancer and 82 healthy controls. Genotyping for the MTHFR C677T polymorphism was analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. Serum folate was measured by electrochemiluminescence method. Relationships of serum folate, MTHFR gene C677T polymorphism and cervical cancer were analyzed. **Results** The levels of serum folate in patient group [$(8.63 \pm 5.63) \mu\text{g/L}$] were significantly higher than in control group [$(10.84 \pm 5.99) \mu\text{g/L}$], the difference was statistically significant ($t=2.43, P=0.016$). The highest genotype frequency of MTHFR was CT type in both patient group and control group. The TT type in patient group was higher than CC type, which was significantly different in control group ($\chi^2=7.529, P=0.023$). The allele frequency of C was higher than T in patient group, which was significantly different in control group ($\chi^2=5.903, P=0.015$). Comparing with CC type, the risk of cervical cancer was significantly increased in patient with MTHFR gene of TT type ($OR=3.485, 95\%CI:1.331-9.122$). But there was no significantly increased risk in patients with CT type ($OR=1.752, 95\%CI:0.810-3.789$). Without folate deficiency, the odd ratios of cervical cancer in patients with MTHFR gene of TT was 2.057 times higher than that in those with wild type (CC, $95\%CI:0.455-9.304$).

* 基金项目:佛山市自筹经费类科技计划项目(2016AB001811)。

作者简介:薛雄燕,女,主任技师,主要从事生物化学及分子生物学研究。△ 通信作者, E-mail:lxwuan@fsyy.com。

本文引用格式:薛雄燕,朱嫦琳,潘练华,等.叶酸水平、MTHFR 基因 C677T 多态性与宫颈癌的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(6):710-713.

With folate deficiency, the odd ratios of cervical cancer in patients with MTHFR gene of TT increased to 4.354 times than that in those with wild type (CC, 95% CI: 1.195–15.865). **Conclusion** MTHFR gene C677T polymorphism is a susceptible factor for cervical cancer, and the TT type of this gene can increase the risk of cervical cancer. The risk of cervical cancer is the highest among people with folate deficiency and MTHFR gene of TT type.

Key words: cervical cancer; folate; 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase; gene polymorphism

宫颈癌是妇女常见的恶性肿瘤之一,发病率高,严重影响广大妇女的身心健康。宫颈癌的发生是多阶段、多步骤,有多重因素参与,其中已有研究指出叶酸缺乏与宫颈癌的发生发展密切相关^[1-3],但目前得到的结论并不一致。叶酸生物学作用的发挥受到体内一些酶的影响,其中,5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是叶酸代谢过程中的关键酶,在叶酸参与DNA甲基化反应的过程中起重要作用。MTHFR基因具有单核苷酸多态性,多态性位点的突变可引起其编码的酶活性下降,推测可能与叶酸水平变化相关。因此,本研究通过检测宫颈癌患者及正常对照者血清叶酸水平及分析MTHFR基因C677T多态性,明确其与宫颈癌易感性的关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组选自2015年3月至2018年2月佛山市第一人民医院妇科及肿瘤内科住院的确诊为宫颈癌患者82例作为病例组,均为女性,年龄36~51岁,平均(44.39±3.74)岁。病例组宫颈癌分期为二期38例,三期44例。组织学分型为腺癌6例,鳞癌76例。对照组选取同期与病例无血缘关系的体检者共82例,均为女性,年龄35~52岁,平均(45.12±3.89)岁。所有研究对象均为人类乳头瘤病毒(HPV)-16阳性,两组年龄和性别比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究方案经医院伦理委员会审核通过,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 纳入标准及排除标准 病例组患者均经病理确诊为宫颈癌。所有纳入研究的人群均排除合并严重心、肝、肾、肺疾病者、妊娠期及哺乳期妇女、合并其他恶性肿瘤者,所有研究对象无血缘关系。

1.3 MTHFR 基因 C677T 多态性检测原理 采用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法,扩增产物由识别多态性位点的特异性核酸内切酶进行酶切,酶切片段经电泳分析,根据电泳条带区分基因型。

1.4 仪器与试剂 采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管采集研究对象外周静脉血2 mL,用于MTHFR基因C677T多态性检测,采用黄色促凝真空采血管采集周静脉血3 mL,3 500 r/min离心10 min后,上层血清用于叶酸检测。亚甲基四氢叶酸还原酶基因677C/T检测试剂盒(PCR-RFLP)购自深圳

市奥萨制药有限公司,检测仪器为ABI公司7500荧光实时定量PCR仪。叶酸检测采用Roche公司E601全自动电化学发光分析仪及配套试剂。所有操作严格按照说明书。

1.5 检测方法

1.5.1 DNA 提取 在1.5 mL离心管中加入300 μL充分摇匀的变性液及55 μL抗凝全血,室温放置5 min后,12 000 r/min离心3 s,弃去上清,在管底红褐色沉淀中加分次加入洗涤液A、洗涤液B和无水乙醇洗涤后离心弃去上清,沉淀置于65℃金属浴中干燥约20 min后,加入55 μL溶解液混匀,12 000 r/min离心3 s,吸取上清备用。

1.5.2 PCR 扩增反应 在PCR反应管中加入试剂盒中的PCR扩增混合液21.8 μL, Taq DNA聚合酶0.2 μL及待检DNA样品3 μL,置于PCR扩增仪按以下扩增程序进行:94℃变性30 s、65℃退火45 s、72℃延伸45 s,共35个循环。

1.5.3 酶切反应 每管加入酶切缓冲液4.7 μL、限制性内切酶0.3 μL和10 μL PCR产物,37℃温育1 h。

1.5.4 电泳检测及结果分析 采用1×TBE配制2%琼脂糖凝胶,酶切反应管中加入电泳上样缓冲液5 μL,取10 μL加入琼脂糖凝胶加样孔中,5 v/cm电压下电泳45 min,根据电泳带型模式图判断基因型。

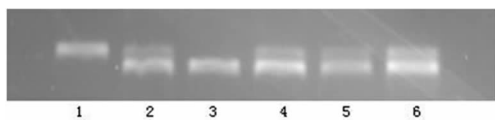
1.6 统计学处理 采用统计学软件SPSS19.0进行数据处理。等位基因频率用基因频率计数法进行计算,Hardy-Weinberg($H-w$)平衡采用拟合优度 χ^2 检验,组间的基因型及基因频率比较采用 χ^2 检验,应用OR值及其95%的可信区间(CI)来估计其相对危险度; $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清叶酸水平与宫颈癌的关系 病例组血清叶酸水平(8.63±5.63) μg/L低于对照组(10.84±5.99) μg/L,差异具有统计学意义($t=2.43, P=0.016$)。

2.2 不同组别 MTHFR 基因 C677T 基因型分布情况 对病例组和对照组的MTHFR基因C677T位点各基因分布进行Hardy-weinberg平衡检验,分布符合遗传平衡法则($P>0.05$),说明样本具有代表性,各种基因型电泳图见图1。表1显示了MTHFR基因

C677T 各基因型的分布情况。其中,病例组和对照组均为杂合型(CT)频率最高,病例组纯合型(TT)高于野生型(CC),而对照组则相反。两组间各基因型频率不一致,差异具有统计学意义($\chi^2 = 7.529, P = 0.023$)。两组人群 MTHFR 基因 C677T 等位基因频率比较结果显示,病例组 T 等位基因频率高于 C 等位基因,与对照组的基因分布不一致,差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.903, P = 0.015$)。



注:1 纯合型(TT);2 杂合型(CT);3 野生型(CC);4 杂合型(CT);5 杂合型(CT);6 阳性质控

图 1 各种基因型电泳图

表 1 MTHFR 基因 C677T 位点的基因频率分布[n(%)]

组别	n	C677T 基因型频率			C677T 等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
病例组	82	15(18.3)	42(51.2)	25(30.5)	72(43.9)	92(56.1)
对照组	82	23(28.1)	48(58.5)	11(13.4)	94(57.3)	70(42.7)

2.3 MTHFR 基因 C677T 多态性与宫颈癌易感性

分析 与野生型(CC)人群相比,纯合型(TT)人群患宫颈癌的危险性显著增高($OR = 3.485, 95\% CI: 1.331 \sim 9.122$),而杂合型(CT)人群对宫颈癌患病的危险性未发现显著影响($OR = 1.752, 95\% CI: 0.810 \sim 3.789$)。见表 2。

表 2 MTHFR 基因 C677T 多态性与宫颈癌易感性的关系

基因型/等位基因	病例组(n)	对照组(n)	OR(95%CI)	χ^2	P
CC	15	23	1.000		
CT	42	48	1.752(0.810~3.789)	2.053	0.152
TT	25	11	3.485(1.331~9.122)	6.686	0.010

2.4 血清叶酸和 MTHFR 基因多态性相互作用与宫颈癌易感性分析 结合考虑人群血清叶酸水平和 MTHFR 基因 C677T 多态性相互作用,与宫颈癌易感性的相关性进行分析,结果显示,在叶酸充足人群中,MTHFR 基因型为纯合型(TT)的人群患宫颈癌的危险为 2.057 倍($95\% CI: 0.455 \sim 9.304$),而叶酸不充足且 MTHFR 基因型为纯合型(TT)的人群患宫颈癌的危险则上升为 4.354 倍($95\% CI: 1.195 \sim 15.865$)。见表 3。

表 3 血清叶酸和 MTHFR 基因多态性相互作用与宫颈癌易感性的关系

血清叶酸	MTHFR 基因型	病例组(n)	对照组(n)	OR(95%CI)	χ^2	P
$\geq 10.84 \mu\text{g/L}$	CC	7	12	1.000		
	CT	17	25	1.166(0.381~3.563)	0.072	0.788
	TT	6	5	2.057(0.455~9.304)	0.889	0.346
$< 10.84 \mu\text{g/L}$	CC	8	11	1.000		
	CT	25	23	1.495(0.511~4.368)	0.542	0.462
	TT	19	6	4.354(1.195~15.865)	5.231	0.022

3 讨论

宫颈癌是仅次于乳腺癌的第二大女性致死癌症,每年全世界约有 50 万新发病例,死亡人数超过 27 万。国家癌症中心发布的研究数据表明,我国在 2014 年宫颈癌患病率居全世界第二。宫颈癌的病因尚未完全明确,叶酸属于 B 族维生素,可参与 DNA 的合成和甲基化。叶酸缺乏则导致 DNA 甲基化异常和 DNA 修复障碍,从而增加肿瘤发生的风险。最近有研究指出,叶酸缺乏可能与宫颈癌发生密切相关,但尚未得出一致的结论。本研究分别检测宫颈癌患者及对照者血清叶酸水平,发现宫颈癌患者血清叶酸水平显著低于对照组,与之前报道一致^[4-5],提示叶酸缺乏可能增加宫颈癌发生的危险。

MTHFR 是叶酸代谢过程中的关键酶,能不可逆催化 N5,N10-亚甲基四氢叶酸转化为 N5-甲基四氢

叶酸,为甲基循环提供供体,维持机体 DNA 正常甲基化反应,参与 DNA 合成。MTHFR 基因具有单核苷酸多态性,常见的多态性位点为 C677T,其野生型(CC)可发生一个位点突变,为杂合型(CT),或两个位点突变,为纯合型(TT)。C677T 位点的突变可导致 MTHFR 发生酶活性改变,其中杂合型(CT)酶活性只有野生型(CC)的 65%,而纯合型(TT)的酶活性则只有 30%左右。MTHFR 酶活性的降低,可导致血清叶酸水平下降,引起 DNA 甲基化异常和 DNA 合成障碍,可能参与肿瘤的发生发展过程。国内外已有研究指出 C677T 多态性与乳腺癌、大肠癌、白血病等发生密切相关^[6-8]。本研究对宫颈癌患者及对照组 MTHFR 基因 C677T 多态性进行检测,结果显示,研究所选的样本等位基因分布符合 $H-w$ 平衡,具有群体代表性,在宫颈癌患者中,纯合型(TT)所占比例为

30.5%,显著高于对照组(13.4%),对等位基因频率比较的结果也显示,病例组 T 等位基因频率高于 C 等位基因,与对照组相反,提示 MTHFR 基因的纯合型(TT)是宫颈癌的易感基因,其患宫颈癌的风险较野生型(CC)人群显著增加($OR = 3.485, 95\% CI: 1.331 \sim 9.122$),与之前的研究报道基本一致^[9-11]。

有研究认为,MTHFR 基因 C677T 多态性与肿瘤发生风险的关系,受血清叶酸水平的影响,存在一定的交互关系。MTHFR 是叶酸代谢过程的关键酶,MTHFR 基因发生突变可导致酶活性下降,从而改变个体对肿瘤的遗传易感性,同时也引起体内叶酸水平的改变。然而,叶酸水平可以通过膳食进行补充,在一定程度上降低由于 MTHFR 基因突变人群的肿瘤易感风险。因此在考虑 MTHFR 基因多态性对肿瘤的影响时,必须同时考虑体内实际叶酸水平,才能正确评估个体的遗传易感性。对 MTHFR 基因 C677T 多态性与结直肠癌发生风险的研究结果指出,纯合型(TT)的个体发生结肠癌的风险低于杂合型(CT)和野生型(CC)个体,然而,当叶酸水平不足时,纯合型(TT)的保护作用减弱,甚至可能转变为结肠癌发生风险增加^[7]。同样的,对 MTHFR 基因 C677T 多态性与乳腺癌发生风险的研究也认为,纯合型(TT)携带者与乳腺癌发生风险呈正相关的现象仅存在于叶酸不足的妇女当中^[6]。因此,本研究对血清叶酸和 MTHFR 基因多态性相互作用与宫颈癌易感性进行了综合分析。结果显示,在叶酸充足人群中,MTHFR 基因型为纯合型(TT)的人群患宫颈癌的危险性较对照组并无显著增加,而在叶酸不充足且 MTHFR 基因型为纯合型(TT)的人群中,患宫颈癌的危险则显著上升为野生型(CC)的 4.354 倍($95\% CI: 1.195 \sim 15.865$),提示在存在 MTHFR 基因突变的个体中,补充充足的叶酸也有利于降低宫颈癌的发生风险,与 BADIGA 等^[12]研究结论基本一致。

4 结 论

研究结果表明,MTHFR 基因 C677T 多态性是宫颈癌发生的易感因素,该基因的纯合型(TT)可增加宫颈癌发生的危险,在低叶酸水平的纯合型(TT)人群中,发生宫颈癌风险最高。由于本研究所纳入的研究对象均已证实为 HPV-16 阳性,可排除 HPV-16 感染对统计结果的影响。然而,由于条件所限,本研究的样本量较小,在后期试验中应加大样本量,并纳入 HPV-16 阴性人群进行分析研究,进一步明确叶酸、MTHFR 基因多态性及 HPV-16 与宫颈癌的相互关系。

参考文献

[1] LI Q L, DING L, JING N, et al. Folate deficiency and ab-

errant DNA methylation and expression of FHIT gene were associated with cervical pathogenesis [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2):1963-1972.

- [2] CAI L M, YU R F, HAO X, et al. Folate receptor-targeted bioflavonoid genistein-loaded chitosan nanoparticles for enhanced anticancer effect in cervical cancers [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2017, 12(1):509.
- [3] 聂小凤, 许榕仙, 李健. 叶酸与相关因素的交互作用对宫颈癌的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(1):106-109.
- [4] WANG Z L, WANG J T, FAN J R, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Chinese women: large study in Jiexiu, Shanxi Province, China [J]. *J Cancer*, 2017, 8(6):924-932.
- [5] 何芳, 杨慧娟. 生活方式、膳食习惯、血清叶酸水平与宫颈癌的相关性调查 [J]. *中国现代医生*, 2014, 52(12):142-144.
- [6] HARDI H, MELKI R, BOUGHALEB Z, et al. Significant association between ERCC2 and MTHFR polymorphisms and breast cancer susceptibility in Moroccan population: genotype and haplotype analysis in a case-control study [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):292.
- [7] KIM K R, YOON J H, SHIM H J, et al. Role of depth of response and MTHFR genotype as predictors of fluorouracil rechallenge therapy for refractory metastatic colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2):2491-2498.
- [8] HUANG L L, DENG D H, PENG Z G, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) are associated with susceptibility to adult acute myeloid leukemia in a Chinese population [J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 39(3):328-333.
- [9] CHEN H, ZHU J. C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase May contribute to cervical cancer risk in complete over-dominant model [J]. *Med Hypotheses*, 2013, 80(5):679-683.
- [10] HAJIESMAEIL M, TAFVIZI F, SARMADI S. The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on susceptibility to human papilloma virus infection and cervical cancer [J]. *Infec Gene Evol*, 2016, 46(1):1-6.
- [11] 张小莉, 金平. MTHFR 和 XRCC3 基因多态性与宫颈鳞癌发生的相关性研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2013, 48(7):545-547.
- [12] BADIGA S, JOHANNING G L, MACALUSO M, et al. A lower degree of PBMC L1 methylation in women with lower folate status May explain the MTHFR C677T polymorphism associated higher risk of CIN in the US post folic acid fortification era [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e110093.

(收稿日期:2018-09-11 修回日期:2018-12-21)