DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.028
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1201-04

论著

胃癌亚甲基四氢叶酸还原酶基因1298AC多态性与 *H. pylori* 感染的关系

司佩任,房殿春,张 浩,杨柳芹,罗元辉,廖化禹 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨重庆地区胃癌人群亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因1298AC多态性及与 *H. pylori* 感染的关系。方法 采用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,检测122例胃癌和101例正常对照的MTHFR基因1298AC多态性;采用PCR和Warthin-Starry银染色法检测幽门螺杆菌(*H. pylori*)。结果 胃癌组1298AA、1298AC和1298CC 3种基因型频率分别为59.8%、36.1%和4.1%,与对照组中3种基因型频率57.4%、37.6%和5.0%相比无显著差异($P>0.05$)。以1298AA基因型的OR为1.00,胃窦癌AC基因型的OR为0.87(95%CI,0.42~1.82),CC基因型的OR为0.41(95%CI,0.05~3.72)。胃癌MTHFR 1298AC 3种基因型中 *H. pylori* 的检出率无明显差别($P>0.05$)。结论 重庆地区人群中MTHFR 1298AC多态性可能是胃窦癌的保护因素,MTHFR 1298AC多态性与 *H. pylori* 感染无关。

关键词:亚甲基四氢叶酸还原酶;多态性;*H. pylori*;胃癌
中图法分类号:R377;R394.2;R735.2 文献标识码:A

Relationship between polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene 1298AC and *H. pylori* infection in gastric cancer

SI Pei-ren, FANG Dian-chun, ZHANG Hao, YANG Liu-qin, LUO Yuan-hui, MIAO Hua-yu (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between the polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene 1298AC and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in patients with gastric cancer from Chongqing. **Methods** The polymorphisms in MTHFR gene A1298C were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and *H. pylori* was detected by PCR and Warthin-Starry silver stain methods. **Results** The polymorphisms in MTHFR 1298AC in 122 cases of gastric cancer and 101 cases of normal controls were analyzed. The genotypic frequencies of MTHFR 1298AA, 1298AC, and 1298CC were 59.8%, 36.1%, and 4.1% in gastric cancer, but 57.4%, 7.6%, and 5.0% in the controls, respectively. There was no significant difference in distribution of MTHFR 1298 A C genotype between gastric cancer and controls ($P>0.05$). The individuals with 1298CC genotype had a 0.41-fold (95%CI, 0.05—3.72) reduced risk of developing gastric cancer antrum as compared with those who had 1298AA genotype. The polymorphisms in MTHFR 1298AC were not correlated with H. pylori infection in gastric cancer ($P>0.05$). **Conclusion** The polymorphisms in MTHFR 1298AC may be associated with the reduced risk of developing gastric cancer of antrum, but may not be associated with *H. pylori* infection.

Key words: methylenetetrahydrofolate reductase; polymorphism; *H. pylori*; gastric cancer

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染是引起胃癌发生的主要危险因素,被WHO列为第一类致癌原。发达国家有30%的胃癌由 *H. pylori* 感染引起,而发展中国家由 *H. pylori* 感染引起的胃癌高达50%[1]。流行病学研究表明,*H. pylori* 感染的个体胃癌危险性有9倍的增加[2]。动物实验显示,*H. pylori* 感染不仅可增强甲基硝基亚硝基胍的诱癌作用,长期 *H. pylori* 感染本身即可诱发出胃窦腺癌[3]。长期随访

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070043);全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z075)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070043) and the "Tenth Five-year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (01Z075)
作者简介:司佩任(1968—),男,山东省定陶县人,硕士,主治医师,主要从事胃粘膜癌变机制与防治方面的研究,现在山东烟台107医院消化科工作。电话:(0537)3439672
通信作者:房殿春,电话:(023)68754124
收稿日期:2003-06-13;修回日期:2003-12-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

研究亦证明,胃癌只发生在有 *H. pylori* 感染胃粘膜,而不发生于无 *H. pylori* 感染胃粘膜[4]。尽管研究表明 *H. pylori* 感染与胃癌有关,但 *H. pylori* 感染引起胃癌的分子机制仍不清楚。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahyclrofolate reductase, MTHFR)是叶酸代谢的关键酶,能催化 5,10-亚甲基四氢叶酸不可逆地转变成 5-甲基四氢叶酸。5,10-亚甲基四氢叶酸参与嘌呤和胸苷酸的重新合成,并在 DNA 复制时发挥重要作用。MTHFR 活性下降通过减少 SadoMet 合成,进而影响 DNA 甲基化水平。*H. pylor* 感染与 MTHFR 多态性的关系尚少见报道,为此我们探讨了 *H. pylor* 感染与 MTHFR 基因 1298AC 多态性的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

122 例胃癌组织取自我院 2001 年 1 月至 2003 年 5 月收治的胃癌病人,均经组织病理学确诊,取癌及手术切缘正常组织立即置于-70 ℃冰箱冻存备用。101 例对照组为同期在我院查体并行胃镜检查的健康人,胃镜下排除明显的慢性胃炎、肠化、增生、溃疡及癌变后,取正常胃窦粘膜活检标本 2 块立即置于-70 ℃冰箱冻存备用。胃癌组男性 90 例,女性 32 例,年龄 30~84 岁,平均 55.2 岁;对照组男性 74 例,女性 27 例,年龄 29~79 岁,平均 54.6 岁。两组均无肿瘤家族史,吸烟和饮酒率无显著差异。采用常规酚:氯仿:异戊醇抽取法提取 DNA。

1.2 MTHFR 基因的多态性检测

MTHFR 1298AC 多态性引物序列为 5′-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3′(上游引物),5′-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3′(下游引物)[5]。PCR 反应体系总体积 20 μl,包括 10×buffer 2 μl,4× dNTP 各 200 μmol/L,引物各 50 ng,*Taq* DNA 聚合酶 1.25 U,DNA 模板 100 ng。PCR 扩增条件:92 ℃预变性 4 min 后,92 ℃,1 min;51 ℃,1 min;74 ℃,40 s,共 35 个循环;最后 74 ℃延伸 5 min。PCR 扩增反应完成后,取 5 μl PCR 扩增产物,2%琼脂糖凝胶电泳观察扩增情况。若出现 163 bp 的清晰条带,则进行 Mbo II 内切酶酶切分析。酶切产物在 20%非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,电压 120 V,时间 3.5 h,溴化乙锭(EB)染色,紫外灯下观察并照相。

1.3 幽门螺杆菌的检测

1.3.1 尿素酶基因的检测 采用 PCR 方法。参照文献[6]合成引物,上游引物引物序列为 GCCAATGGTAAATTAGTT,下游引物序列为 CTCCTTAATTGTTTTTAC。反应体系 20 μl,包括 10×Buffer 2 μl,模板 DNA 100 ng,上下游引物各 50 ng,dNTP 200 μmol/L,*Taq* 酶 1.5 U,$MgCl_2$ 2.0 mmol/L。反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃,1 min;45 ℃,1 min;72 ℃,1 min;共 40 个循环,然后 72 ℃延伸 7 min。取 5 μl PCR 扩增产物,用 2%琼脂糖凝胶,电压 60 V,电泳 40 min。阳性者可见 411 bp 的清晰条带,即判断为幽门螺杆菌感染(+)。

1.3.2 Warthin-Starry 银染色 细胞核和 *H. pylori* 均着棕黑色,细胞浆和粘液呈浅黄色。

PCR 扩增和 Warthin-Starry 银染色均阳性者判断为幽门螺杆菌感染。

1.4 统计学分析

胃癌病例组和对照组的 MTHFR 基因型频率差异用 χ^2 检验。胃癌与 MTHFR 基因多态性相关性的评价用 ORs(Odds Ratios)和 95% CIs(Confidence Intervals)表示。统计学分析均使用 SPSS 统计软件处理。

2 结果

2.1 胃癌 MTHFR A1298C 基因多态性

经 PCR 扩增,野生型 MTHFR 可见 163 bp 电泳条带(图 1)。经限制性酶切可分为 3 个基因型,1298 AA 可见 56,31,30,28 和 18 bp 5 个片段;杂合型 1298AC 产生 84,56,31,30,28 和 18 bp 6 个片段;而纯合型 1298CC 则产生 84,31,30,和 18 bp 4 个片段,其中 18bp 的片段泳出胶外(图 2)。

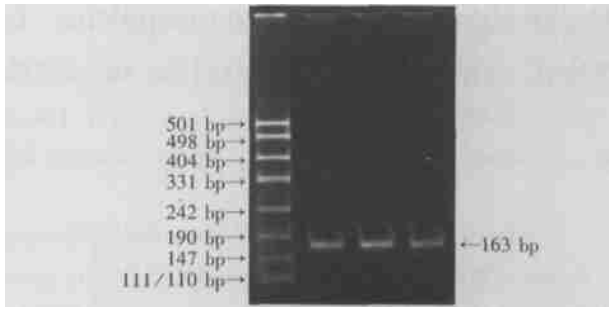
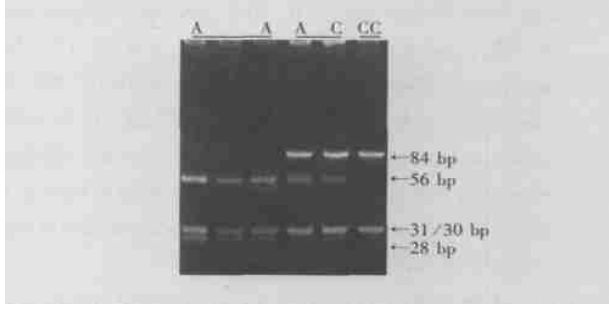


图 1 **MTHFR 1298AC 位点 PCR 扩增产物为 163 bp 长度的片段**

Fig 1 PCR amplification product of 163 bp in MTHFR 1298AC locus



1298AA showed 56, 31, 30, 28, and 18 bp fragments; 1298AC showed 84, 56, 31, 30, 28, and 18 bp fragments; 1298CC showed 84, 31, 30, and 18 bp fragments

图 2 **MTHFR 1298 AC 多态性酶切结果**

Fig 2 Polymorphism analysis by enzyme digestion in MTHFR 1298AC locus

101 例对照组 MTHFR 1298AC 基因型频率分别为 AA 57.4%、AC 37.6%、CC 5.0%,符合 Hardy-Weinberg 平衡规律。122 例胃癌组 MTHFR 1298AC 基因型频率分别为 AA 59.8%、AC 36.1%、CC 4.1%。健康对照的 MTHFR 1298A 和 1298C 等位基因型频率分别为 76.2%和 23.8%,胃癌组的 MTHFR 1298A 和

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1298C 等位基因频率分别为 77.9% 和 22.1%, 差异无显著性意义(P= 0.683)。

我们以 1298AA 基因型的 OR 为 1.00, AC 基因型的 OR 为 0.92, 95%CI(0.53~1.60), CC 基因型的 OR 为 0.81, 95%CI 为 (0.22~2.88), AC+CC 基因型的 OR 为 0.91, 95%CI(0.53~1.55), 经统计学分析差异无显著性意义(P 值分别为 0.768、0.726 和 0.716)。说明就整体而言, MTHFR 1298AC 多态性与胃癌发生的危险性无显著性差异。

我们把胃癌按癌发部位分为胃贲门癌、胃体癌和胃窦癌, 与对照组进行比较, 结果见表 1。以贲门癌 AA 基因型的 OR 为 1.00, AC 基因型的 OR 为 1.22, 95%CI(0.52~2.89), 经统计学分析差异无显著性意义(P= 0.650); CC 基因型 OR 为 1.55, 95%CI 为(0.27~8.77), 差异无显著性意义(P= 0.620); AC+CC 基因型的 OR 为 1.26, 95%CI(0.55~2.88), 统计学分析差异无显著性意义(P= 0.585)。CC、AC 和 AC+CC 基因型的 OR 均无显著升高, 提示 MTHFR 1298AC 多态性不是胃贲门癌的一个影响因素。

表 1　**MTHFR 1298AC** 基因型分布和胃贲门癌、胃体癌及胃窦癌危险性的关系

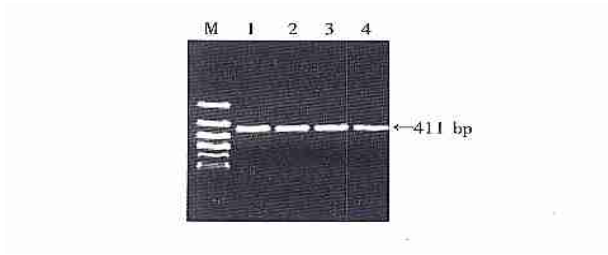
Tab 1　Relationship of the distribution of MTHFR 1298AC polymorphic genotypes with cancers in gastric cardia, corpus, and antrum

	AA(%)	AC(%)	CC(%)	AC+CC(%)
Cardia	15(51.7)	12(41.4)	2(6.9)	14(48.3)
Corpus	30(62.5)	16(33.3)	2(4.2)	18(37.5)
Antrum	28(62.2)	16(35.6)	1(2.2)	17(37.8)
Control	58(57.4)	38(37.6)	5(5.0)	43(42.6)

以胃体癌 AA 基因型 OR 为 1.00, AC 基因型 OR 为 0.81, 95%CI(0.39~1.69), 1298CC 基因型 OR 为 0.77, 95%CI(0.14~4.23), 1298AC+CC 基因型 OR 为 0.81, 95%CI(0.40~1.64), 结果提示 MTHFR1298 变异基因型胃癌危险性有下降的趋势, 但经统计学分析差异无显著性意义(P 值分别为 0.581、0.766 和 0.556)。MTHFR 1298AC 多态性与胃体癌无明显相关。以胃窦癌 AA 基因型的 OR 为 1.00, AC 基因型 OR 为 0.87, 95%CI(0.42~1.82), CC 基因型 OR 为 0.41, 95%CI(0.05~3.72), AC+CC 基因型 OR 为 0.82, 95%CI(0.40~1.68), 随着变异等位基因的增加, OR 明显下降, 特别是 CC 基因型与 AA 基因型比较胃癌危险性有 59%的下降, 提示 MTHFR 1298AC 多态性可能是胃窦癌的保护因素, 但统计学差异不显著(P 值分别为 0.716、0.418 和 0.586), 可能是标本数量较少所致。

2.2　*H. Pylori* 感染与 MTHFR 基因 1298AC 多态性的关系

经 PCR 扩增(图 3)和 Warthin-Starry 染色(图 4), 122 例胃癌 *H. Pylori*+ 者 76 病例, 占 62.3%, *H. pylori*- 者 46 例, 占 37.7%。*H. Pylori* 感染与 MTHFR 1298AC 多态性的关系见表 2。由表 2 可知, MTHFR 1298AC 3 种基因型中, AA 基因型的 *H. pylori* 检出率为 60.3%, AC 和 CC 基因型的阳性率分别为 63.6%和 80.0%, 3 型之间的 *H. pylori* 阳性率经统计学分析无显著性差异(P= 0.661), 提示 MTHFR 1298AC 多态性与 *H. pylori* 感染无关。



M: Marker; 1—4: *H. pylori* positive

图 3　***H. pylori* UreA** 基因 **PCR** 扩增产物为 **411 bp** 长度的片段

Fig 3　PCR amplification product of 411 bp in *H. pylori* UreA gene

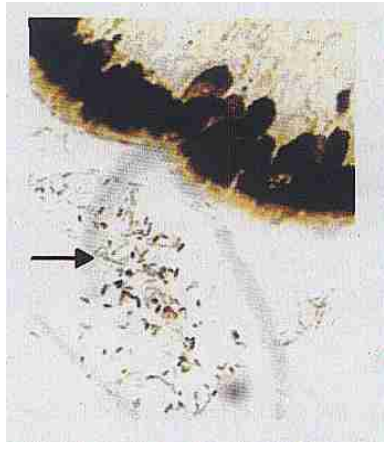


图 4　**Warthin-Starry** 银染色检测 ***H. pylori*** 结果　(→: *H. pylori*)

Fig 4　Results of *H. pylori* by Warthin-Starry silver staining (→: *H. pylori*)

表 2　胃癌组 ***H. pylori*** 感染与 **MTHFR 1298AC** 多态性的关系

Tab 2　Relationship of *H. pylori* infection with MTHFR 1298AC polymorphic genotypes in gastric cancer

Group	n	MTHFR 1298AC			P
		AA(%)	AC(%)	CC(%)	
H. Pylori+	38	44(60.3)	28(63.6)	4(80.0)	0.661
H. Pylori−	28	29(39.7)	16(36.4)	1(20.0)	

3　讨论

MTHFR 在调节叶酸代谢、甲基供体生成和核苷酸重新合成过程中发挥关键作用。MTHFR 1298AC 基因型变异将导致 MTHFR 活性下降, 使 DNA 甲基化、DNA 合成和修复过程发生障碍[7]。已有研究表明, MTHFR 基因多态性与多种肿瘤的危险性增加有关。本研究分析了 MTHFR 基因多态性对胃癌危险性的影响, 发现重庆地区胃癌病人和健康人群 MTHFR 1298 A C 基因频率分布并无显著差异。但将不同部位胃癌的 MTHFR 基因多态性进行分析显示, 1298CC 纯合子胃窦癌的危

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

险性有近60%的下降，提示该基因型对重庆地区人群胃窦癌的发生可能起保护作用。

流行病学和临床随访资料均证明 *H. pylori* 感染与胃癌的发生有关，但 *H. pylori* 感染引起胃癌的机制仍不完全清楚。我们过去的研究显示，胃粘膜 *H. pylori* 感染可导致线粒体微卫星 DNA 不稳定性和核基因组的整合[8~11]。最近研究表明，*H. pylori* 毒素可以导致胃粘膜细胞错配修复基因表达的下调[12]。但胃粘膜 *H. pylori* 感染是否与 MTHFR 基因的多态性有关，国内外尚少见文献报道。本研究分析了胃癌粘膜 *H. pylori* 感染与 MTHFR 基因 1298AC 多态性的关系，122 例胃癌中 *H. pylori*＋者 76 例，占 62.3%，*H. pylori*－者 46 例，占 37.7%，未能证实胃粘膜 *H. pylori* 感染与 MTHFR 基因 A1298C 多态性之间有显著的相关性，提示 *H. pylori* 感染与 MTHFR 基因 1298AC 多态性之间无直接的关系。但本研究检测的均为胃癌组织，众所周知，胃癌粘膜因胃环境的改变，不利于 *H. pylori* 的生存，可能不能反映既往 *H. pylori* 感染的情况，因此 *H. pylori* 感染与 MTHFR 基因多态性之间的关系仍需进一步研究。

参考文献：

[1] Forman D. *Helicobacter pylori* and gastric cancer[J]. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996, 220: 23－26.

[2] Huang J Q, Sridhar S, Chen Y, *et al*. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer[J]. Gastroenterology, 1998, 114(6): 1169－1179.

[3] Shimizu N, Inada K, Nakanishi H, *et al*. *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(4): 669－676.

[4] Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, *et al*. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer[J]. N Engl J Med, 2001, 345(11): 784－789.

[5] van der Put N M, Gabreels F, Stevens E M, *et al*. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects[J]? Am J Hum Genet, 1998, 62(5): 1044－1051.

[6] Clayton C L, Kleanthous H, Coates P J, *et al*. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(1): 192－200.

[7] Choi S W, Mason J B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme[J]. J Nutr, 2000, 130(2): 129－132.

[8] 凌贤龙，房殿春，周晓东，等. 胃粘膜线粒体 DNA 不稳定及核内整合与幽门螺杆菌感染有关[J]. 中华消化杂志，2003，23(2)：80－83.

[9] 凌贤龙，房殿春，汪荣泉，等. 胃粘膜线粒体 DNA 不稳定与白细胞介素 8 活性的关系[J]. 中华病理学杂志，2003，32(1)：35－37.

[10] 凌贤龙，房殿春，周晓东，等. 胃粘膜幽门螺杆菌感染与线粒体 DNA 微卫星不稳的关系[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1024－1026.

[11] 凌贤龙，房殿春，周晓东，等. 幽门螺杆菌感染与胃粘膜炎症反应和 IL-8 活性的关系[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1046－1048.

[12] Kim J J, Tao H, Carloni E, *et al*. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells[J]. Gastroenterology, 2002, 123(2): 542－553.

（编辑 陈聪连）

（上接 1200 页）

喃西林液清洗口腔。②严格无菌操作：每日更换气管垫 2 次，敷料被污染应及时更换，吸痰用具定期消毒，吸痰管 1 次 1 换。③呼吸机各种管道在使用前应严格消毒，避免交叉感染，长期应用呼吸机时，应定期消毒呼吸机的螺纹管和湿化瓶。④连续使用呼吸机 3 d 以上的病人应做痰培养和药敏试验，合理选用抗生素。⑤避免冷凝液的吸入。文献[2]报道机械通气环路中的冷凝液有细菌繁殖的可能。因而，应及时倒掉集液瓶中的液体，避免肺部细菌感染。⑥保持室内空气流通，定时进行空气消毒。

1.2.6 加强呼吸肌锻炼，制定撤机时间表，尽早撤机 患者病情稳定后，就应采用辅助通气模式，指导患者深呼吸，腹式呼吸，鼓励病人咳嗽，并逐渐延长锻炼时间，为撤机做准备。短期应用机械通气的病人，自主呼吸显著增强，可直接脱机。对机械通气超过 1 周以上的病人，可采取间断脱机。停机后，病人如呼吸、血压平稳，心率无明显加快，尿量满意，额头无汗，则说明病人对停机的耐受性好，可继续撤机过程。少数对呼吸机有依赖者，白天可间断停机，夜间睡眠时可接上呼吸机，逐渐延长脱机时间，直至完全脱机。

2 讨论

开胸术后患者呼吸功能都有不同程度的下降，术后适当运用机械通气，可防止肺通气功能不全、肺不张等并发症。人工通气建立后，呼吸道处于非生理状态，管理不当，反而给治疗带来困难，因此密切监测呼吸，保持呼吸道通畅，防止气道阻塞，注意气道湿化，预防感染，可减少并发症的发生。同时，从机械通气开始就应对撤机有所计划和安排，积极为撤机创造条件，一旦时机成熟，应及时撤机。

关键词：开胸手术；机械通气；呼吸道管理

中图法分类号：R655；R473.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 景 华. 实用外科重症监护与治疗[M]. 上海：第二军医大学出版社，1999. 195－213.

[2] 廖春碧. 呼吸机相关肺炎的诊治及护理进展[J]. 国外医学护理分册，1998，17(5)：203.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net