DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.011
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
1710 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1710-04

重庆地区人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与结直肠癌易感性关系研究

黄 萍[1],周紫垣[1],马恒太[1],刘晋[illegible],周燕虹[1],曹 佳[1],葛海燕[2],余佩武[3],Toshiro Takezaki[4] (第三军医大学:[1]军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038;[2]附属新桥医院普通外科,重庆 400037;[3]附属西南医院普通外科,重庆 400038,[4]Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan)

提 要:目的 探讨重庆人群亚甲基四氢叶酸还原酶(Methylenetetrahdrofolate reducatase, MTHFR)基因多态性与结直肠癌的关系,研究叶酸、MTHFR基因多态性以及结直肠癌发生的交互作用。方法 ①用聚合酶链反应限制性片段多态性(PCR-RFLP)技术,检测82例结直肠癌患者和82例正常对照的MTHFR基因多态性。②使用放免方法检测病例及对照血浆中的叶酸含量。结果 ①病例组叶酸水平显著低于对照组。②结直肠癌患者与对照MTHFR突变基因型率分别为56.1%和51.3%,无统计学差异。结论 叶酸水平与结直肠癌的发生显著相关,是结直肠癌发病的保护因素。在重庆人群中MTHFR基因多态性可能不是结直肠癌发生的危险因素。

关键词:结直肠癌;亚甲基四氢叶酸还原酶;叶酸;限制性片段长度多态性
中图法分类号:R181.3;R735.3;Q5 文献标识码:A

MTHFR polymorphisms and colorectal cancer susceptibility in Chongqing people

HUANG Ping, ZHOU Zi-yuan, MA Heng-tai, LIU Jin-yi, ZHOU Yan-hong, CAO Jia, GE Hai-yan, YU Pei-wu, Toshiro Takezaki (Department of Hygiene Toxicology, College of Military Prerentive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and colorectal cancer susceptibility and to observe the interaction of MTHFR polymorphism, folate concentration and colorectal susceptibility. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to analyze the genotype of MTHFR in 82 cases of colorectal cancer and 82 controls. Folate levels in sera of the cases and controls were measured by radioimmunoassay (RIA). **Results** The folate level in the case group was significantly lower than that in the control. No significant difference in the frequency of MTHFR variant genotype was found between the cases and the controls (56.1% *vs* 51.3%). Subjects with low folate level were at a significantly higher risk of developing colorectal cancer. **Conclusion** Folate level is significantly associated with colorectal susceptibility. Folate is a colorectal cancer protective factor. In this study, MTHFR gene polymorphism might not be related with colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; folate; methylenetetrahydrofolate reductase; restriction fragment length polymorphism

结直肠癌在我国恶性肿瘤发病中居第四位[1],是常见恶性肿瘤之一。有研究报道叶酸含量与乳腺癌[2]、神经管畸形[3],急性白血病[4]等恶性肿瘤的发生有关。但与结直肠癌的相关性,国外研究结果不一致[5,6],国内未见报道。亚甲基四氢叶酸还原酶(Methylenetetrahdrofolate reducatase, MTHFR)是一种黄素蛋白,是叶酸代谢过程中一种重要的酶,其功能是将体内5,10-亚甲基四氢叶酸还原成体内叶酸的主要活性形式—5-甲基四氢叶酸。5-甲基四氢叶酸是一种甲基供体,是甲基合成的主要的叶酸循环形式,参与多种重要的生物过程(如嘌呤、嘧啶的合成)。MTHFR 677C→T的突变会降低酶的活性,导致5-甲基四氢叶酸的水平降低[7]。国内外已有报道显示MTHFR 677C→T的突变与一些肿瘤的发生相关[8]。为了进一步探讨结直肠癌的分子机制,以便对结直肠癌的发生做到早期监测与预防,我室目前正在参加有关结直肠癌危险因子与保护因子的中、日、韩国际合作研究项目。本研究使用三方一致的流行病学病例-对照研究方法,采用了分子流行病学方法对MTHFR基因多态性、叶酸与结直肠癌易感性三者之间的交互关系作一初步研究。

基金项目:日本文部省优先资助领域C科研基金资助项目(12218242)
作者简介:黄 萍(1975—),女,江苏省南京市人,硕士研究生,助教,主要从事肿瘤遗传学方面的研究,电话:(023)68752295。作者原单位:第四军医大学秦都口腔医学院检验科,西安 710032
通信作者:曹 佳,电话:(023)68752271;E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-08-22

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

1　材料与方法

1.1　研究对象

病例和对照均来自 2001-03—2002-10 第三军医大学附属西南医院和新桥医院的住院病人。病例组与对照按 1∶1 配对, 各 82 例。病例组与对照组男性分别为 48 例, 女性分别为 34 例。病例与对照男性平均年龄分别为 51.1 岁和 51.7 岁, 女性平均年龄分别为 53.0 岁和 51.8 岁。男性、女性年龄无差异性。病人的年龄范围从 25～74 岁, 对照的年龄范围从 29～76 岁。研究使用中、日、韩国际合作小组统一设计的半定量食物频数调查表(Semi-quantitative food frequency questionnaire, SQFFQ), 对纳入研究的病例与对照组进行问卷调查, 问卷采用面访形式。调查表内容包括年龄、性别、当前和既往职业史, 个人生活习惯、吸烟与酒精摄入情况、详细饮食摄入情况、肿瘤遗传史等, 建立流行病学档案。

1.2　纳入标准

1.2.1　病例选择标准如下　①全部为新发 6 个月内入院由病理学诊断确诊的结直肠癌患者; ② 按照 Amsterdam 标准排除遗传性非息肉腺瘤(Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC); ③排除家族性腺瘤息肉(Familial adenomatous polyposis, FAP); ④纳入研究时均未经化疗、放疗治疗。

1.2.2　对照选择标准如下　①非肿瘤患者; ②与所选择病例性别相同; ③年龄相差小于 5 岁; ④无慢性疾病和营养代谢性疾病; ⑤与病例组来自同一居住地(本研究控制在同一地区); ⑥与病例组无血缘关系。

1.3　MTHFR 基因型分析

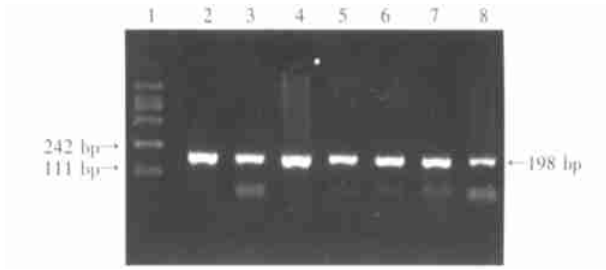
1.3.1　标本采集　所有病例和对照术前平稳采集 10 ml 静脉血。分离血样并分别保存血清、血浆和有核细胞。血凝块于 −20 ℃冰箱中保存, 血清、血浆、有核细胞于 −80 ℃低温冰箱保存。血浆用于检测叶酸, 血凝块提取 DNA 后用于 MTHFR 基因多态性检测。

1.3.2　DNA 的提取　从血凝块中提取 DNA, 具体方法参见文献[9]。用 DU-600 型 Beckman 紫外分光光度计测定所提取的 DNA 的纯度并定量。DNA 保存于 −20 ℃冰箱中备用。

1.3.3　试剂　MTHFR 基因扩增反应引物全部由上海 Sangon 公司合成。*Taq* 酶、dNTPs 及 PCR 反应体系为华美生物工程公司产品。

1.3.4　PCR 扩增所需片段　25 μl 扩增体系 100～200 ng 基因组 DNA, GSTM1、GSTT1 引物各 25 pmol, 2 mmol/L $MgCl_2$, 4× dNTP 0.2 mmol/L, 2.5 U *Taq* 酶。引物序列[10]: 5′-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3′和 5′-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3′。PCR 反应条件为: 95 ℃ 5 min 预变性; 35 个循环: 95 ℃ 30 s, 62 ℃ 45 s, 72 ℃ 50 s; 72 ℃延伸 5 min。PCR 反应在 Eppendorf Gradient PCR 仪上进行。反应完成后, 取 5 μl PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳(5 V/cm, EB: 250 ng/ml), 在紫外灯下观察条带位置, 若在相应位置有清晰扩增条带(DNA 样品经 PCR 扩增后产生 198 bp 片段), 则进行酶切反应。电泳图谱见图 1。

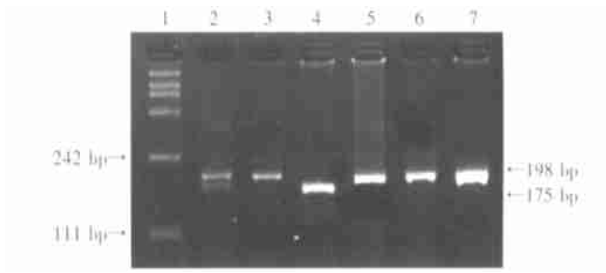
1.3.5　*Hinf* Ⅰ限制性内切酶消化扩增片段　在 10 μl 酶切体系中加入 10× 缓冲液 1 μl, *Hinf* Ⅰ 10 U, PCR 扩增产物 5 μl, 用蒸馏水补足酶切反应体积。37 ℃消化过夜。消化产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳, 170 V 30 min, 于紫外透射仪观察结果。MTHFR 基因 677 位核苷酸表现多态性, 有三种类型。仅有 198 bp 片段者为纯合未突变型(C/C); 仅有 175 bp 片段者为纯合突变型(T/T); 而酶切后产生 198 bp, 175 bp, 23 bp 片段者(23 bp 片段太小, 电泳时已泳动至胶外, 紫外灯下观察不到)为杂合子型(C/T)。酶切结果见图 2。



1: Marker; 2～8: MTHFR gene amplification products

图 1　PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig 1　Agarose gel electrophoresis of PCR amplification product



1: Marker; 3, 5, 6 and 7: C/C(Wild type); 2: C/T(Heterozygotes mutant); 4: T/T(Homozygote mutant)

图 2　MTHFR 基因限制性长度多态性分析

Fig 2　Analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) of MTHFR

1.4　叶酸含量测定

叶酸测定: 叶酸放免试剂盒购自海军总医院, 按说明书操作进行测定, 灵敏度为 0.5 ng/每管, 批内变异系数 *CV* 7.2%。使用中国科学技术大学中佳公司 GC-911γ 计数仪进行检测。叶酸测定在本校附属西南医院核医学科完成。

1.5　统计学处理

1.5.1　计算各组 MTHFR 基因型和等位基因频率, 基因型和等位基因频率比较用 SPSS 10.0 软件包进行 χ^2 检验。

1.5.2　使用 SPSS 软件包分别计算病例与对照组 MTHFR 各基因型叶酸含量的均值与标准差, 并做 Wilcoxon 秩和检验。

2　结果

表 1 显示病例组与对照组的三种不同基因型分布情况。其中 C/T 型与 T/T 基因型在病例与对照中分布均无差异性($P>0.05$)。突变等位基因 T 的频率, 病例组为 31.7%(48.8%÷2+7.3%), 对照组为 31.1%(40.2%÷2+11.0%), 病例组与对照组突变等位基因频率无统计学差异($P>0.05$)。

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

表1 结直肠癌病人与对照组 MTHFR 基因型比较

Tab 1 Comparison of MTHFR genotype between colorectal cancer patients and the controls

MTHFR genotype	Colorectal cancer		Control		OR(95%CI)	P
	n	%	n	%		
C/C	36	43.9	40	48.8	1.000	
C/T	40	48.8	33	40.2	1.347(0.707~2.568)	>0.05
T/T	6	7.3	9	11.0	0.741(0.240~2.286)	>0.05

表2显示了 MTHFR 基因多态性与叶酸水平的交互关系。可以看到病例组与对照组叶酸含量差异非常显著($P<0.01$)。病例组叶酸含量显著低于对照组。其中病例与对照组 MTHFR C/C(纯合未突变型)和 C/T(杂合突变型)两种基因型的个体叶酸含量均有显著性差异。病例组与对照组组内 MTHFR 各基因型之间均无差异性。

表2 结直肠癌病人与对照组叶酸含量与 MTHFR 基因的交互关系

Tab 2 Relationship between folate levels and MTHFR genotype in colorectal cancer patients and the controls

Genotype	Mean of cases ng/ml(n)	Mean of controls ng/ml(n)	Wilcoxon test
Total	8.93±4.83(82)	10.18±2.33(82)	<0.01
C/C	8.01±2.41(36)	10.77±2.68(40)	<0.01
C/T	8.00±2.29(40)	10.73±2.14(33)	<0.01
T/T	9.16±4.52(6)	10.51±2.91(9)	>0.05
P	>0.05 *	>0.05 #	

*: The difference of folate value between different MTHFR genotype of colorectal group is not significant; #: The difference of folate value between different MTHFR genotype of control group is not significant

3 讨论

MTHFR 基因位于1号染色体 1p36.1, 677C→T 突变使其产生一个 *Hinf* Ⅰ限制性酶切位点,这种突变的等位基因频率在不同种族之间差异很大(11%~38%)[11],被认为是常染色体隐性遗传。这种不耐热 MTHFR 突变基因型会表现出不同程度的酶活性和耐热性降低。纯合突变型基因(677TT)会导致 MTHFR 酶活性明显下降至正常值的50%。

基因的突变频率在不同种族的人群可能不同,而且由于地理条件和环境因素的原因,相同的基因突变在不同的人群中所起的作用可能也不一样。本研究 MTHFR 的纯合突变率与日本的一项研究接近,但高于欧洲一些国家[11],低于在中国其他一些地区进行的研究[12,13],这提示即使是同一种族的人群 MTHFR 基因677位的突变频率也可能因地区的不同而有差异。

MTHFR 基因多态性与结直肠癌相关性研究在国内尚未见报道。本研究提示,在重庆人群中,MTHFR 基因的杂合突变和纯合突变是比较普遍的。在对照组中,MTHFR 3种基因型的频率分别为 C/C:48.8%, C/T:40.2%, T/T:11.0%,突变等位基因频率为31.1%。与吴建中等[12]报道的 C/C:31.5%, C/T:49.5%, T/T:19.0%有差异。但与 Marugame 等[14]报道的220例健康体检的日本人的相应基因型频率 40.5%, 47.7%, 11.8%,突变等位基因频率为35.6%的结果接近。

病例组与对照组 MTHFR677C→T 的突变比较无差异。初步提示 MTHFR 677C→T 的多态性与结直肠癌的发生无相关性,可能不是结直肠癌发病的危险因子。

病例组与对照组叶酸含量有显著性差异,病例组叶酸水平显著低于对照组,说明叶酸缺乏与结直肠癌发病有一定相关性。从表2可以看到病例组与对照组 MTHFR C/C(纯合未突变型)和 C/T(杂合突变型)两种基因型的个体叶酸含量均有显著性差异,而病例组与对照组 MTHFR T/T 型(纯合突变型)的个体叶酸含量无差异。我们认为这可能是病例组与对照组的例数太少(分别为6例和9例)所致,今后应进一步增大样本量进行研究。病例与对照组组内 MTHFR 各基因型之间叶酸含量均无差异性($P>0.05$),表明 MTHFR 677 位点是否具有多态性与叶酸水平不相关,即 MTHFR 677C→T 的突变并不是导致机体叶酸水平降低的因素。

Ma 等[15]对202例结直肠癌患者和326例对照进行的病例研究报道:MTHFR 677C→T 多态性可以通过提高合成 DNA 的5,10-甲基四氢叶酸的水平来降低结直肠癌发病的危险性,但对于低叶酸摄入和高酒精摄入者该基因型不具有保护作用。我们的研究结果显示叶酸含量的降低是结直肠癌发病的危险因素。MTHFR 677C→T 的突变不能导致叶酸含量的降低,MTHFR 677C→T 的突变与结直肠癌的发病也未提示相关性。下一步我们还将进行更大样本的分析工作,以进一步阐明重庆地区人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与结直肠癌易感性的相关性。

(致谢:本研究得到第三军医大学附属西南医院和新桥医院普通外科、骨科等部门的大力协助,并得到参与本次研究受试者的热情支持,特表示衷心感谢!)

参考文献:

[1] 李连弟,饶克勤,张思维,等. 中国12市县1993—1997年肿瘤发病和死亡登记资料统计分析[J]. 中国肿瘤, 2002, 11(9): 497—507.

[2] Zhang S M, Willett W C, Selhub J, *et al*. Plasma folate, vitamin B_6, vitamin B_{12}, homocysteine, and risk of breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(5): 373—380.

[3] Fodinger M, Horl W H, Sunder Plassmann G. Molecular biology of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase[J]. J Nephrol, 2000, 13(1): 20—33.

[4] Skibola C F, Smith M T, Kane E, *et al*. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(22): 12810—12815.

[5] La Vecchia C, Negri E, Pelucchi C, *et al*. Dietary folate and colorectal

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

cancer[J]. Int J Cancer 2002, 102(5): 545—547.
[6] Eichholzer M, Luthy J, Moser U, *et al*. Folate and the risk of colorectal, breast and cervical cancer: the epidemiological evidence[J]. Swiss Med Wkly, 2001, 131(37-38): 539—549.
[7] 张敬民. 叶酸与肿瘤发生[J]. 国外医学外科学分册, 2002, 2(29): 75—78.
[8] Giovannucci Edward. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review[J]. J Nutr, 2002, 132(8 Suppl): 2350S—2355S.
[9] 钮菊英, 沈洪兵. 从血凝块中提取染色体 DNA 的方法及其应用[J]. 南京医科大学学报, 2000, 20(5): 389—390.
[10] Powers R W, Minich L A, Lykins D L, *et al*. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate, and susceptibility to preeclampsia[J]. J Soc Gynecol Investig, 1999, 6(2): 74—79.
[11] 于佳梅, 王新春, 陈白滨, 等. 中国 5 个民族亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的研究[J]. 人类学学报, 1998, 17(3): 242—246.
[12] 吴建中, 高长明, 丁建华, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与食管癌易感性的关系[J]. 肿瘤, 2002, 22(4): 268—270.
[13] 杨本海, 刘永忠. 皖南地区汉人亚甲基四氢叶酸还原酶基因型的检测[J]. 皖南医学院学报, 2001, 20(4): 308—309.
[14] Marugame T, Tsuji E, Inoue H, *et al*. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of colorectal adenomas[J]. Cancer Lett, 2000, 151(2): 181—186.
[15] Ma J, Stampfer M J, Giovannucci E, *et al*. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1997, 57(6): 1098—1102.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2003)19-1713-01

个案与短篇

度冷丁致阿托品样副作用 1 例

A case report of atropine-like side effects caused by dolantin

刘 利[1], 苏 东[2] (第三军医大学: [1] 校直卫生处; [2] 附属西南医院麻醉科, 重庆 400038)

度冷丁(哌替啶)作为一种麻醉性镇痛剂, 在临床上用于各种剧烈疼痛(如创伤性疼痛、手术后疼痛、内脏绞痛、晚期癌痛及分娩痛等)的治疗。治疗剂量的度冷丁可引起多种不良反应, 包括眩晕、出汗、口干、恶心、呕吐、心动过速等。国外有文献报道尚可引起阿托品样症状, 如瞳孔扩大、心悸、兴奋、谵妄、甚至惊厥[1]。国内尚未见类似报道。我校附属西南医院 2000 年 2 月收治 1 例剖宫产患者, 术中、术后先后两次给予度冷丁镇痛, 均出现类阿托品样症状, 排除其他用药所致。现报告如下。

1 临床资料

孕妇, 28 岁, 孕 39^{+} 周, 既往体健, 术前检查心肺无异常发现。于 2000 年 2 月 24 日 5:00 在持续硬膜外麻醉下行剖宫产术。术中生命体征基本平稳, 6:16 产出一活男婴。6:30 因静脉滴注度冷丁 25 mg、氟哌啶 2.5 mg, 患者随即出现心率增快, 达 150 次/min, 并出现兴奋、谵妄。经予吸氧等处理后, 患者心率逐渐降至 90～96 次/min, 上述症状缓解。术中出血约 250 ml, 术后生命体征平稳, 予抗炎、止血、促进子宫回复等处理, 患者无不适。术后 12 h 患者因伤口处疼痛而予度冷丁 50 mg 肌注。30 min 后患者再次出现心悸、兴奋、谵妄, 查体显示: 心率 130 次/min, 血压基本平稳, 患者双侧瞳孔扩大, 双肺呼吸音清晰, 心音有力, 各瓣膜听诊区均未闻及病理性杂音。即予吸氧等处理后, 上述症状持续约 20 min 后渐转平稳。

2 讨论

度冷丁(哌替啶)是吗啡类合成代用品, 药理作用与吗啡相似, 为阿片受体激动剂。在临床上用于各种剧烈疼痛的控制, 但较之吗啡其成瘾性较弱。度冷丁通过在突触前膜水平减少神经递质释放和后膜引起的超极化而发挥镇痛作用[2], 长期使用亦可成瘾。该药起效快, 持续时间短, 治疗剂量可出现轻度的不良反应, 如眩晕、出汗、口干、恶心、呕吐、心动过速及体位性低血压等。剂量过大可抑制呼吸, 偶可致震颤、肌肉挛缩、反射亢进以及惊厥等中枢兴奋症状。但能引起兴奋、谵妄、心悸、瞳孔扩大、心动过速等阿托品样症状, 目前国内尚无文献报道。本病例患者在先后两次使用度冷丁后均出现上述阿托品样症状, 在排除其它用药所致的可能性后, 可明确为使用度冷丁所致。

在对度冷丁的药理作用研究中, 发现其对离体平滑肌有微弱的阿托品样作用。临床病例观察亦进一步证实了上述作用的存在。因此, 在国外度冷丁的用药指南上明确指出对青光眼患者慎用。然而度冷丁何以引起阿托品样症状的机制目前仍不明晰。本研究在国内首次报道度冷丁的这种阿托品样副作用, 对进一步提高度冷丁的药用安全性提供临床依据。

关键词: 度冷丁; 阿托品样副作用
中图法分类号: R971.2 文献标识码: B

参考文献:

[1] McQuay H. Opioids in pain management[J]. Lancet, 1999, 353(9 171): 2229—2232.
[2] 王寿勇, 蒋昭祥. 术后硬膜外阿片类镇痛药的选择[J]. 国外医学麻醉学与复苏分册, 1998, 19(4): 243.

(编辑 薛国文)

作者简介: 刘 利(1972—), 女, 重庆市人, 主管护师, 主要从事围手术期护理方面的研究。电话: (023)68752155

收稿日期: 2003-05-12; 修回日期: 2003-07-19

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