

## 亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 位点多态性与结直肠癌的相关性分析

洪文光, 陈森明, 蔡泽华, 李泓, 陈健松, 刘万珍\*

潮州市人民医院 胃肠外科, 广东 潮州 521011

**【摘要】** 目的 探索亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 基因 C677T 位点的多态性与结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患病风险之间的关系。方法 选取 2022 年 1 月至 2023 年 12 月在潮州市人民医院确诊的 101 例 CRC 患者为研究组, 另选取同期 98 例健康人员为对照组。采用聚合酶链反应和 Sanger 测序, 检测受试者 MTHFR 基因 C677T 位点多态性。对两组受试者的年龄、性别、体重指数、吸烟史、饮酒史、家族史、基因型等进行比较。基于多因素 Logistic 回归模型计算调整优势比 (adjusted odds ratio, AOR) 和 95% CI, 分析 CRC 患病的风险因素。结果 研究组和对照组 MTHFR C677T 位点基因型和等位基因分布差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。多因素 Logistic 回归模型分析结果显示, CC、CT 基因型的 CRC 患病风险较 TT 基因型高 ( $AOR=4.068$ , 95% CI 1.672~9.896,  $P < 0.05$ ;  $AOR=2.866$ , 95% CI 1.481~5.546,  $P < 0.05$ ), C 等位基因纯合子 (CC) 携带者的 CRC 患病风险较 T 等位基因 (CT+TT) 携带者高 ( $AOR=3.176$ , 95% CI 1.718~5.870,  $P < 0.05$ )。结论 MTHFR 基因 C677T 位点 CC 基因型和 C 等位基因会增加 CRC 患病风险。

**【关键词】** 结直肠癌; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性

## Analysis of association between C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene and colorectal cancer

Hong Wenguang, Chen Senming, Cai Zehua, Li Hong, Chen Jiansong, Liu Wanzhen\*

Department of Gastrointestinal Surgery, Chaozhou People's Hospital, Chaozhou 521011, Guangdong, China

\*Corresponding author: Liu Wanzhen, E-mail: 940923836@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the association between the C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and the risk of colorectal cancer (CRC). **Method** From January 2022 to December 2023, 101 cases of CRC patients diagnosed in Chaozhou People's Hospital were selected as the study group, and 98 healthy persons were included as the control group. The MTHFR C677T polymorphism of the subjects was detected by polymerase chain reaction and Sanger sequencing. The differences of the data between the two groups, such as age, gender, body mass index, smoking history, drinking history, family history and genotype were compared. Multifactorial Logistic regression model was used to calculate the adjusted odds ratio (AOR) and 95% CI, and to evaluate the risk factors for CRC. **Result** The differences in genotype and allele distribution of the MTHFR C677T locus between the study group and control group were statistically significant (both  $P < 0.05$ ). The results of multifactorial Logistic regression model analysis showed that the risk of CRC incidence was higher in CC and CT genotypes than that in TT genotypes ( $AOR=4.068$ , 95% CI 1.672~9.896,  $P < 0.05$ ;  $AOR=2.866$ , 95% CI 1.481~5.546,  $P < 0.05$ ), and the risk of CRC incidence in people with C allele homozygote (CC) was higher than that with T allele (CT+TT) ( $AOR=3.176$ , 95% CI 1.718~5.870,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The CC genotype and C allele of the C677T locus of MTHFR gene may increase the risk of CRC incidence.

**【Key words】** Colorectal cancer; Methylenetetrahydrofolate reductase; Genetic polymorphism

基金项目: 广东省医学科研项目 (B2023497); 潮州市卫生健康局科研项目 (潮卫科研 2022016); 潮州市科技计划项目 (202201GY04)

\* 通信作者: 刘万珍, E-mail: 940923836@qq.com

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一,全球每年有185万新发病例和88万死亡病例<sup>[1]</sup>。近年来,随着医疗技术水平的不断提高,尤其是CRC筛查与早期诊断技术的普及,CRC的发病率有所下降,但全球范围内的CRC病例数仍在持续上升<sup>[2-3]</sup>。此外,由于复发和耐药的发生,晚期CRC患者的5年生存率仍不尽如人意<sup>[4-5]</sup>。

亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)在细胞内的稳态、叶酸代谢以及DNA的合成过程中起到了不可或缺的作用。它具有将5,10-亚甲基四氢叶酸(5,10-methylenetetrahydrofolate, 5,10-MTHF)还原成5-甲基四氢叶酸(5-methyltetrahydrofolate, 5-MTHF)的能力,这是血液中叶酸的重要循环形式,并提供甲基将同型半胱氨酸转化为蛋氨酸。MTHFR基因突变造成甲基化反应失衡,致使基因组DNA低甲基化,并影响叶酸代谢<sup>[6]</sup>。

MTHFR C677T是单核苷酸多态性最常见的突变位点之一,与酶活性不足有关<sup>[7]</sup>。MTHFR C677T是位于677位置的点突变,其中丙氨酸被缬氨酸取代<sup>[8]</sup>。MTHFR C677T多态性降低了MTHFR的活性,导致血液中的同型半胱氨酸水平上升,这可能是癌症的一个风险因素<sup>[8]</sup>。

MTHFR基因C677T位点多态性的流行病学研究结果表明,充足的叶酸摄入可保护人们免受CRC的侵袭<sup>[10]</sup>。然而,该位点的多态性具有地域性,而且研究结果存在差异<sup>[9]</sup>。本研究选取潮州市人民医院的CRC患者样本,运用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和Sanger测序技术,对MTHFR基因C677T位点的多态性和CRC易感性进行病例对照研究探讨,以期对CRC高风险人群建立早期防治措施,并为其预后评估等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取2022年1月至2023年12月在潮州市人民医院确诊为CRC的患者样本为研究组,共纳入101例。研究组纳入标准:①经由本院的病理科确诊,患有原发性CRC;②通过身份证上的详细资料和对患者及其亲属的询问,确定了其是三代以上均为潮汕籍贯的居民。研究组排除标准:①患者或家属不愿意参加者;②曾经接受过放射治疗或

化学疗法等相关医疗手段的患者;③已被诊断出有其他种类恶性肿瘤的患者。

同一时间段内,招募了与研究组年龄相匹配的健康人员作为对照组,共纳入98例。对照组纳入标准:①没有疾病或残疾,并且具有良好的生理和心理健康状态;②通过身份证上的详细资料和对本人及其亲属的询问,确定了其是三代以上均为潮汕籍贯的居民。对照组排除标准:①与组内成员存在血缘关系者;②过去患有肿瘤者;③曾经接受过放射性治疗或化学疗法等相关医疗手段者。

本研究已得到潮州市人民医院伦理委员会的正式批准(伦理批准号CZSRMYY-20220329013)。在获得受试者监护人和受试者对相关检查的知情同意,并签署了知情同意书之后,收集受试者的基本信息,包括年龄、性别、体重指数(body mass index, BMI)、吸烟史、饮酒史以及家族史等。

### 1.2 提取基因组中的DNA

通过使用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝真空管,于早晨7~9点从研究组患者的外周血液中采集了2 ml的样本。对照组样本为我院体检中心样本。按照全基因组DNA提取试剂盒(DP348,天根生化科技有限公司,北京)的操作标准,从样本中提取了全基因组DNA。使用全波长酶标仪Multiskan GO(赛默飞世尔科技,德国)测量样本中的DNA浓度,并将这些DNA储存在-80℃的冰箱中备用。

### 1.3 引物的设计及反应体系

参照孙全昌等<sup>[10]</sup>的研究,合成MTHFR基因C677T位点多态性引物,上游引物序列为5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3',下游引物序列为5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'。苏州金唯智生物科技有限公司主要承担合成本课题所需的相关引物工作。PCR总反应体系为50 μl, 2×Taq混合物的添加量为25 μl(北京艾德莱生物技术有限公司),无核酸酶水为10.5 μl,上游和下游的引物均为1 μl(10 μmol/L),DNA模板为2 μl。PCR的反应条件包括:程序段1,95℃的预变性时间为3 min;程序段2,95℃的变性时间为20 s,59℃的退火时间为20 s,69℃的延伸时间为30 s,总共进行了40个循环;程序段3,69℃的延伸时间为5 min。在扩增过程完成后,使用浓度为2%的琼脂糖(Biowest公司,西班牙)进行凝胶电泳,并利用凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)对产物进行分析,同时保留成像的结果。取扩增后的PCR产物

30  $\mu$ l 送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

#### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 22.0 对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。计数资料以频数或率或构成比(%)表示,采用  $\chi^2$  检验进行组间比较。采用多因素 Logistic 回归模型计算调整优势比(adjusted odds ratio, AOR)和 95%CI,以评估 CRC 患病的风险因素。样本代表性采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究组和对照组临床资料比较

研究组共纳入 CRC 患者 101 例,其中男性 69 例(68.3%),女性 32 例(31.7%),平均年龄(64.4 $\pm$ 12.3)岁。对照组纳入健康人员 98 例,其中男性 67 例(68.4%),女性 31 例(31.6%),平均年龄(63.5 $\pm$ 13.5)岁。两组受试者的详细资料见表 1。经比较,研究组和对照组的年龄、BMI、性别、吸烟史、饮酒史和家族史差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 结直肠癌患者和健康人员的临床资料比较

项目	研究组 (n=101)	对照组 (n=98)	$\chi^2$ 值	P 值
年龄( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	64.4 $\pm$ 12.3	64.4 $\pm$ 13.2	0.010	0.992
BMI( $\bar{x} \pm s$ , kg/m <sup>2</sup> )	26.0 $\pm$ 2.3	25.3 $\pm$ 2.7	1.859	0.065
性别[例(%)]			0.040	0.842
男	69 (68.3)	67 (68.4)		
女	32 (31.7)	31 (31.6)		
吸烟史[例(%)]			0.661	0.416
有	31 (30.7)	25 (25.5)		
无	70 (69.3)	73 (74.5)		
饮酒史[例(%)]			1.712	0.191
有	24 (23.8)	16 (16.3)		
无	77 (76.2)	82 (83.7)		
家族史[例(%)]			1.116	0.291
有	13 (12.9)	8 (8.2)		
无	88 (87.1)	90 (91.8)		
基因型[频数(%)]			11.466	0.003
CC	53 (52.5)	32 (32.6)		
CT	39 (38.6)	43 (43.9)		
TT	9 (8.9)	23 (23.5)		
等位基因[频数(%)]			12.656	<0.001
C	145 (71.8)	107 (54.6)		
T	57 (28.2)	89 (45.4)		

注: BMI, 体重指数。

### 2.2 MTHFR 基因 PCR 产物及测序分析

采用 PCR 对测序目标片段进行扩增,扩增完成后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,产物长度为 198 bp(图 1A)。在 MTHFR 基因第 4 号外显子 677 密码子中,核苷酸的位置显示了从胞嘧啶(C)到胸腺嘧啶(T)的多态性,导致丙氨酸变成缬氨酸,基因型涵盖 CC 型(图 1B)、CT 型(图 1C)和 TT 型(图 1D)。

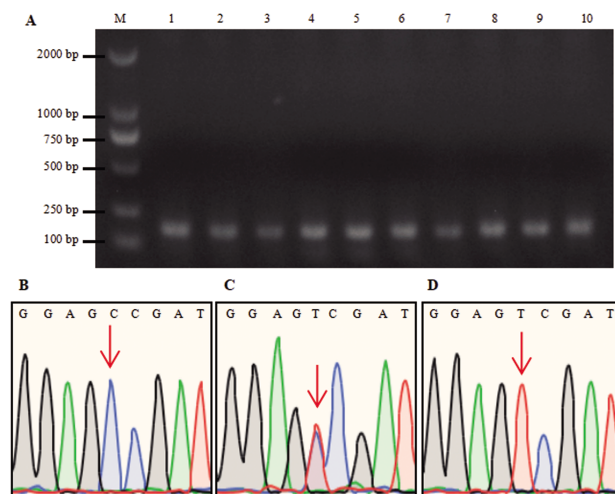


图 1 MTHFR 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图和测序结果

注: A, MTHFR 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图(M, DNA 分子量标准;数字 1~10, PCR 扩增产物,以 10 例样本为例); B, 单峰 C 碱基为 CC 基因型; C, 双峰 C 和 T 碱基为 CT 基因型; D, 单峰 T 碱基为 TT 基因型。

### 2.3 基因分布特征

研究组和对照组 MTHFR 基因 C677T 位点的基因分布特征见表 1。研究组 CC、CT 和 TT 基因型频率分别为 52.5%、38.6%、8.9%, 对照组 CC、CT 和 TT 基因型频率分别为 32.6%、43.9%、23.5%, 两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。研究组 C 等位基因频率 71.8% 高于对照组 54.6%, 研究组 T 等位基因频率 28.2% 低于对照组 45.4%, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.4 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

研究组和对照组的 MTHFR 基因 C677T 位点基因型分布特征如表 2 所示, 两组多态性均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡( $P > 0.05$ ), 表明本研究样本人群具有较好的群体代表性。

### 2.5 MTHFR C677T 基因型多态性与 CRC 之间的关联

以是否患有 CRC 为因变量(是=1, 否=0), 纳

入年龄、性别、BMI、家族史、吸烟史、饮酒史和基因型频率进行多因素 Logistic 回归分析。在调整了年龄、性别、BMI、家族史等因素后,分析结果提示,与 TT 型相比,CC 型 ( $AOR=4.068, 95\% CI 1.672\sim 9.896, P<0.05$ ) 和 CT 型 ( $AOR=2.866, 95\% CI 1.481\sim 5.546, P<0.05$ ) 患 CRC 的风险更高(表 3)。另外,纳入相同的影响因素和等位基因进行多因素 Logistic 回归分析,结果发现,与 T 等位基因 (CT+TT) 携带者相比, C 等位基因纯合子(CC) 携带

者患 CRC 的风险更高 ( $AOR=3.176, 95\% CI 1.718\sim 5.870, P<0.05$ )。

### 3 讨论

CRC 是一种发病率和死亡率都很高的常见恶性肿瘤<sup>[2]</sup>。该疾病病情进展迅速而临床表现延迟,给患者的治疗带来了许多挑战。CRC 的发病机制复杂,包括遗传不稳定性及表观遗传学变化在内的许多风险因素与 CRC 密切相关<sup>[10-11]</sup>,因此,探

表 2 MTHFR 基因 C677T 位点的基因分布进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡的详细分析

项目	研究组				对照组			
	实际频数	理论频数	$\chi^2$ 值	P 值	实际频数	理论频数	$\chi^2$ 值	P 值
基因型			0.118	0.943			1.295	0.454
CC	53	52.04			32	29.20		
CT	39	40.92			43	48.58		
TT	9	8.04			23	20.21		

表 3 结直肠癌患病风险因素的多因素 Logistic 回归分析[例(%)]

因素	赋值	研究组(n=101)	对照组(n=98)	AOR (95% CI)	P 值
性别					
男	1	69 (68.3)	67 (68.4)	参考值	
女	2	32 (31.7)	31 (31.6)	1.071 (0.610~1.880)	0.812
年龄					
<60 岁	1	40 (39.6)	38 (38.8)	参考值	
≥60 岁	2	61 (60.4)	60 (61.2)	1.314 (0.756~2.286)	0.333
BMI					
正常	1	9 (8.9)	21 (21.4)	参考值	
超重	2	69 (68.3)	59 (60.2)	0.465 (0.190~1.134)	0.092
肥胖	3	23 (22.8)	18 (18.4)	0.478 (0.176~1.301)	0.148
吸烟史					
无	1	70 (69.3)	73 (74.5)	参考值	
有	2	31 (30.7)	25 (25.5)	0.895 (0.460~1.743)	0.744
饮酒史					
无	1	77 (76.2)	82 (83.7)	参考值	
有	2	24 (23.8)	16 (16.3)	0.825 (0.431~1.579)	0.561
家族史					
无	1	88 (87.1)	90 (91.8)	参考值	
有	2	13 (12.9)	8 (8.2)	0.470 (0.196~1.142)	0.096
基因型					
TT	1	9 (8.9)	23 (23.5)	参考值	
CT	2	39 (38.6)	43 (43.9)	2.866 (1.481~5.546)	0.002
CC	3	53 (52.5)	32 (32.6)	4.068 (1.672~9.896)	0.002
等位基因					
TT+CT	1	48 (47.5)	66 (67.3)	参考值	
CC	2	53 (52.5)	32 (32.7)	3.176 (1.718~5.870)	<0.001

注: AOR, 调整优势比; BMI, 体重指数, 正常 BMI 为 18.5~<24.0 kg/m<sup>2</sup>, 超重 BMI 为 24.0~<28.0 kg/m<sup>2</sup>, 肥胖 BMI 为 ≥28.0 kg/m<sup>2</sup>。

索与CRC发病风险相关的基因是目前研究热点之一。蒋露等<sup>[12]</sup>报道CRC患者石蜡样本中的*UGT1A1\*28*以及*UGT1A1\*6*基因多态性与CRC的发病风险增加相关。景丽萍等<sup>[13]</sup>报道CRC患者白介素-10基因多态性会引起CRC根治术后肺部感染风险升高。曲珍等<sup>[14]</sup>报道CRC患者谷胱甘肽S-转移酶P1(glutathione S-transferase P1, *GSTP1*)基因多态性与CRC患者对奥沙利铂化疗方案的敏感性有关,且*GSTP1*基因多态性可能成为接受奥沙利铂化疗的CRC患者发生周围神经毒性的一个预测指标。本研究中所提及的*MTHFR*基因被认为是目前已知的与CRC易感性有关的关键基因之一,而在此之前,已有众多学者对其与CRC易感性的关系进行了研究。Wik等<sup>[15]</sup>探讨了*MTHFR*基因C677T位点多态性与林奇综合征患者发生CRC风险之间的关系,研究表明,*MTHFR*基因型与潜在的种系DNA错配修复基因一起,可能有助于预测林奇综合征患者患CRC的风险。Ghorbani等<sup>[16]</sup>调查了*MTHFR*基因C677T位点多态性的临床意义及其与伊朗CRC患者血清叶酸和维生素B<sub>12</sub>的相关性,结果表明,携带677TT和677CT基因型的人群与CRC患病风险的关联性更高,提示*MTHFR*基因C677T位点多态性可能在CRC的发生发展中发挥着关键的作用。本研究通过分析我院CRC患者*MTHFR*基因C677T位点的多态性,以期对相关研究提供更多的参考资料和证据。

本课题探索*MTHFR*基因C677T位点的多态性与CRC关系的结果表明,C等位基因可能是CRC的高风险基因,CC和CT基因型为CRC的高风险基因型,*MTHFR*基因C677T位点的多态性与CRC存在关联性,与众多研究者的研究结果一致<sup>[8,10]</sup>。然而,此项研究仍有其局限性。研究只针对*MTHFR*基因中的C677T位点进行了分析,并且研究范围仅限于潮汕地区的居民。而且本课题收集的样本量不多,可能会影响研究结果的代表性。因此,关于CRC与*MTHFR*基因多态性的深入研究,有必要通过扩大研究范围、增加研究位点和扩大样本量来进行更全面的分析,这将有助于更深入了解*MTHFR*基因多态性与CRC疾病风险之间的相互关系,并为CRC的发病机制提供更多有价值的数据和更权威的理论支持。此外,本课题没有对血液中的叶酸含量进行测量,若能完善该数据,将为本课题的最终结论提供更有力的依据。综上所述,

CRC是一种多因素疾病,涉及遗传、表观遗传和环境风险因素,本项研究通过观察*MTHFR*基因C677T位点的多态性,揭示其与CRC疾病易感性存在一定关系,为从分子层面深入研究CRC的发病机制提供了科学依据。

## 参考文献

- [1] BAGHAD I, ERREGUIBI D, BOUFETTAL R, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism and the risk of sporadic colorectal cancer[J]. Pan Afr Med J, 2021,38: 287.
- [2] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013,63(1):11-30.
- [3] 国家卫生健康委员会医政司,中华医学会肿瘤学分会.中国结直肠癌诊疗规范(2023版)[J/CD].消化肿瘤杂志(电子版),2023,15(3):177-206.
- [4] ASTERIA CR, PUCCIARELLI S, GERARD L, et al. The impact of colorectal screening program on the detection of right-sided colorectal cancer. A 5-year cohort study in the Mantua District [J]. Int J Colorectal Dis, 2015,30(12): 1627-1637.
- [5] 中国医师协会外科医师分会,中华医学会外科学分会胃肠外科学组,中华医学会外科学分会结直肠外科学组,等.中国结直肠癌肝转移诊断和综合治疗指南(2023版)[J/CD].消化肿瘤杂志(电子版),2023,15(2): 86-99.
- [6] JEON Y, KIM J, PARK H, et al. Genetic variants in 3'-UTRs of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) predict colorectal cancer susceptibility in Koreans [J]. Sci Rep, 2015,5: 11006.
- [7] LIEW SC, GUPTA ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases [J]. Eur J Med Genet, 2015,58(1): 1-10.
- [8] YE H C, LAI C, CHANG S, et al. Polymorphisms of *MTHFR* C677T and A1298C associated with survival in patients with colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy[J]. Int J Clin Oncol, 2017,22(3): 484-493.
- [9] FAVORITI P, CARBONE G, GRECO M, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review [J]. Updates Surg, 2016,68(1): 7-11.
- [10] 孙全昌. *MTHFR*基因多态性与大肠癌易感性的关系[D].河北:承德医学院,2013.
- [11] GRADY WM, CARETHERS JM. Genomic and

- epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008,135(4): 1079-1099.
- [12] 蒋露, 丁颖, 季盼, 等. 老年结直肠癌病人 UGT1A1\*28 及 \*6 基因多态性分析[J]. *实用老年医学*, 2023,37(10): 1004-1008.
- [13] 景丽萍, 王棣, 殷艳, 等. IL-10 基因多态性与结直肠癌根治术后肺部感染程度的关联[J]. *中华医院感染学杂志*, 2023,33(19): 2949-2952.
- [14] 曲珍, 徐圣秋, 王轩. GSTP1 基因多态性与结直肠癌患者奥沙利铂化疗敏感性及相关神经毒性的关系 [J]. *肿瘤药学*, 2023,13(4): 449-454.
- [15] WIJK MU, NEGLINE M, BEISVÅG V, et al. MTHFR C677T and A1298C polymorphism's effect on risk of colorectal cancer in Lynch syndrome [J]. *Sci Rep*, 2023,13(1): 18783.
- [16] GHORBANI M, AZGHANDI M, KHAYAMI R, et al. Association of MTHFR C677T variant genotype with serum folate and Vit B12 in Iranian patients with colorectal cancer or adenomatous polyps [J]. *BMC Med Genomics*, 2021,14(1): 246.

收稿日期: 2024-04-08