

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.06.022

MTHFR 基因多态性与结肠癌患者术后 FOLFOX4 辅助化疗疗效的关系

仇 宇¹, 周春花¹, 杨 农¹, 李坤艳¹, 王 静¹, 刘先领²

Relationship between Polymorphism of MTHFR and Curative Effect of FOLFOX4 Adjuvant Chemotherapy in Postoperative Colon Cancer Patients

QIU Yu¹, ZHOU Chunhua¹, YANG Nong¹, LI Kunyan¹, WANG Jing¹, LIU Xianling²

1. 32 Ward, Hunan Province Tumor Hospital & Affiliated Tumor Hospital of Xiangya Medical School of Central South University, Changsha 410013, China; 2. Department of Oncology, The Second Xiangya Hospital of Central South University

Corresponding Author: LIU Xianling, E-mail: liuxianling3180@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To study the relationship between polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and FOLFOX4 adjuvant chemotherapy in postoperative colon cancer patients. **Methods** A total of 76 postoperative colon cancer patients were enrolled and received six cycles of FOLFOX4 adjuvant chemotherapy. MTHFR C677T gene polymorphism was detected by pyrophosphoric acid sequencing method. **Results** The three allelotypes of the MTHFR-C677T in 76 patients were C/C 47.4% (36/76), T/C 40.8% (31/76), T/T 11.8% (9/76). The relapsed cases were 11 in C/C, 13 in T/C, 9 in T/T. The relapsed rate in T/T was similar to C/C and T/C ($P=0.710$). **Conclusion** There had no relationship between MTHFR C677T mutation and curative effect of FOLFOX4 adjuvant chemotherapy in postoperative colon cancer patients.

Key words: Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR); Polymorphism; Colon cancer; Oxaliplatin; Fluorouracil

摘 要: 目的 研究亚甲基四氢叶酸还原酶基因(MTHFR)C677T 多态性与结肠癌术后患者接受 FOLFOX4 辅助化疗疗效的关系。**方法** 对行结肠癌根治术后接受 FOLFOX4 方案化疗 6 周期的 76 例患者,采用焦磷酸测序法检测 MTHFR C677T 基因多态。**结果** 76 例Ⅱ、Ⅲ期结肠癌患者的 MTHFR-C677T 位点存在 3 种等位基因型,其基因频率分别为:C/C 47.4% (36/76), T/C 40.8% (31/76), T/T 11.8% (9/76)。C/C 基因型 36 例中复发 11 例, T/C 基因型 31 例中复发 13 例, T/T 基因型 9 例中复发 2 例, T/T 基因型复发比率小于 C/C + T/C 基因型 (22.2% vs. 35.8%), 但差异无统计学意义 ($P=0.710$)。 **结论** MTHFR-C677T 基因多态性与结肠癌 FOLFOX4 辅助化疗疗效无关。

关键词: 亚甲基四氢叶酸还原酶; 多态性; 结肠癌; 奥沙利铂; 5-氟尿嘧啶

中图分类号: R735.3⁺5 文献标识码: A

0 引言

5-Fu 是抗代谢类抗肿瘤药物,通过干扰叶酸代谢途径起作用。多种叶酸代谢通路中的酶活性状态均可影响患者对 5-Fu 的敏感度和不良反应^[1]。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylene tetrahydrofolate

reductase, MTHFR)是叶酸代谢过程中的关键酶,通过不可逆催化反应加强叶酸代谢,从而可削弱 5-Fu 的抗肿瘤作用。MTHFR 存在基因多态性,最常见的 SNP 是 C677T 多态性,即在 677 位点发生 C-T 改变,导致 4 号外显子上 222 位丙氨酸突变为缬氨酸,使酶活性显著降低。突变纯合子个体酶活性为野生型的 30%,杂合子个体约为野生型的 60%,突变使细胞内 5,10- MTHFR 水平升高,使得 5-氟-2-脱氧尿苷酸盐、胸苷酸合成酶、与 5, 10-亚甲基四氢叶酸三联复合物更容易形成,此三联复合物的形成阻止了脱氧尿苷酸甲基化为胸苷酸合成酶催化的三磷酸脱氧腺苷,从而增强 5-Fu 的抗瘤作

收稿日期:2013-01-07;修回日期:2013-04-10

作者单位: 1. 410013 长沙,湖南省肿瘤医院暨中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院 32 病区;2. 中南大学湘雅医学院附属第二医院肿瘤科

通信作者: 刘先领, E-mail: liuxianling3180@ yahoo.com.cn

作者简介: 仇宇(1976-),男,硕士,主管药师,主要从事肿瘤药物治疗的相关基因多态性研究

用^[2-3]。本文选择 76 例结肠癌根治术后接受 FOLFOX4 方案化疗的患者为研究对象,分析 MTHFR C677T 多态性与其疗效的关系。

1 资料与方法

1.1 病例选择

收集 2004 年 4 月—2006 年 10 月在湖南省肿瘤医院行结肠癌根治术患者共 243 名,选出接受 FOLFOX4 方案化疗 6 周期且符合研究条件的患者共 76 例,76 例患者中位年龄 57 岁(范围 21~75 岁),按照 NCCN 结肠癌临床指南 2012 版,侵袭性结肠肿瘤的临床表现和主要治疗方法(COL-A)分期标准,Ⅱ期 20 例(26.3%),Ⅲ期 56 例(73.7%)。患者的基本特征见表 1。全部病例的肿瘤组织标本均取自湖南省肿瘤医院暨中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院病理科,且均经病理科确诊,标本为石蜡包埋组织。

表 1 76 例结肠癌根治术患者基本特征

Table 1 76 postoperative colon cancer patient's basic information

Characteristic	Number (%)
Age(years)	
<50	23(30.3)
≥50	53(69.7)
Gender	
Male	48(63.2)
Female	28(36.8)
TNM stage	
I	0(0)
II	20(26.3)
III	56(73.7)
Diseased region	
The proximal colon	34(44.7)
The distal colon	42(54.3)
Depth of bowel wall invasion	
Mucosa	2 (2.6)
Muscularis	18 (23.7)
Serosa	42 (55.3)
Extraserous	14 (18.4)
Lymph node metastasis	
No	20(26.3)
Yes	56(73.7)

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取

去除超过组织的石蜡,切成 5~10 μm 组织块,放入 1.5 ml Ep 管中,加 1 ml 二甲苯,强力振荡 10 s,常温 18 000 r/min 离心 2 min,去除上清液,保留组织块,加 1 ml100%乙醇,振荡混匀,再次常温

18 000 r/min 离心 2min,吸干管内剩余酒精,将 Ep 管开盖至于 37℃孵育 5~10 min,至酒精挥发彻底,加入 180 μl ATL buffer,振荡混匀;再加 20 μl 蛋白酶 K,振荡混匀 56℃孵育 1 h 至组织溶解为清亮溶液,90℃孵育 1 h 1500 转离心 10 s 后,加 200 μl AL buffer,振荡充分混匀,加 200 μl 乙醇(96%~100%),振荡混匀;1500 转离心 10 s,小心将所有溶液转移至 QIAamp MinElute 柱中(柱子放在随试剂盒的 2 mlEp 管中),8 000 r/min 离心 1 min,将柱子放入一个新的 2 ml 离心管中,加 500 μl AW1 buffer,8 000 r/min 离心 1 min 将柱子放入一个新的 2 ml 离心管中,加 500 μl AW2 buffer,8 000 r/min 离心 1 min,将柱子放入一个新的 2 ml 离心管中,14 000 r/min 离心 3 min,将膜全部弄干,放入一个全新的 1.5 mlEp 管中,加入 20~100 μl ATE。加入量<50 μl 时,室温孵育 1 min。14 000 r/min 离心 1 min,获得的 DNA 溶液。

1.2.2 目的基因片段 PCR 扩增

PCR 扩增引物由上海博亚公司合成,引物序列为 MTHFR-C677T-F: Biotin- ACTGTCATC-CCTATTGGCAGGTTA; MTHFR-C677T-R: CG-GTGCATGCCTTCACAA。

1.2.3 目的基因片段 PCR 产物单链模板的纯化

使用 Vertex 涡旋振荡器混匀 Sepharose beads (纯化珠);快速将需要使用的纯化珠总量(每样本 3 μl)转移到一个 Ep 管中;在纯化珠中加入 37 μl 结合缓冲液,使得平均每个样品约有和 PCR 体系一样的体积,将混合物用 Vertex 混匀;快速将以上混合物加入 PCR 产物(40 μl 反应体积)中,每样本 40 μl;PCR 产物常温下混匀 10 min。单链模板纯化:配制 70%乙醇、1×洗涤液;在单链提取装置中,四个样品板中分 A、B、C、D 四组,分别依次加入 180 ml 高纯水、120 ml 70%乙醇、变性缓冲液和洗涤液;打开真空泵,高纯水中清洗真空吸头 30 s;将真空吸头移到 96 孔 PCR 板中,抓取纯化珠;将吸头放入左上中 5 s;然后移到左下中 5 s;再移到右下中清洗 10 s;把吸头放到反应板正上方,关泵;将吸头放入含有测序引物的板中,摇动,释放纯化珠;将放有样品的样品板放在已预热的 ThermoPlate 透明恒温台上加热到 80℃ 2 min,再冷却到室温,完成单链模板纯化。

1.2.4 目的基因 SNP 检测

将上述含有纯化好的单链 PCR 产物采用焦磷酸测序仪(PyroMark ID),在 SNP 检测模式下按仪器操作说明分别检测样品中 MTHFR 基因 SNP 检测。

1.3 随访

随访时间截至 2009 年 10 月 30 日,无病生存期是指根治性手术后至疾病复发或由于病病进展导致死亡的时间。

1.4 统计学方法

采用 SPSS15.0 统计软件进行分析;不同基因型间复发率的比较采用 χ^2 检验进行分析, $P<0.05$ 表明差异有统计学意义;分析决定疗效相关因素使用 Cox 回归模型。

2 结果

2.1 MTHFR-C677T 基因多态性

对 76 例 II、III 期结肠癌患者的 MTHFR-C677T 位点进行了焦磷酸测序,正向引物设计为 ACTGTCATCCCTATTGGCAGGTTA,反向引物设计为 CGGTGCATGCCTTCACAA,测序引物设计为 CGTGATGATGAAATCG。生物素标记在正向引物上,检测 SNP 位点为互补序列:A/GCTC-CCGC 测序结果发现 3 种等位基因型,其基因频率分别为:C/C 47.4%(36/76),T/C 40.8%(31/76),T/T 11.8%(9/76),见图 1。

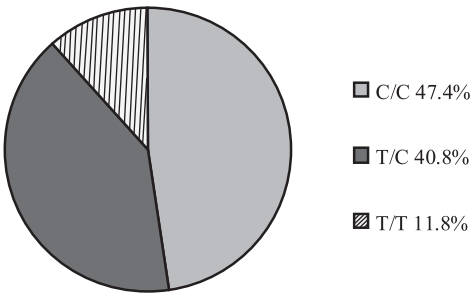


图 1 MTHFR-C677T 基因频率分布图
Figure 1 Frequency distribution of MTHFR-C677T gene

2.2 MTHFR-C677T 突变与结肠癌 FOLFOX4 辅助化疗疗效的关系

MTHFR-C677T 突变,C/C 基因型 36 例中复发 11 例,T/C 基因型 31 例中复发 13 例,T/T 基因型 9 例中复发 2 例,T/T 基因型复发比率小于 C/C + T/C 基因型(22.2% vs. 35.8%),但是差异无统计学意义($P=0.710$),见表 2。

2.3 结肠癌 FOLFOX 4 辅助化疗的疗效相关因素

Cox 模型单因素分析结果显示:TNM 分期、肠壁浸润深度与结肠癌 FOLFOX 4 辅助化疗疗效有关。而性别、年龄、病理部位、MTHFR-C677T 基因多态性与结肠癌 FOLFOX 4 辅助化疗疗效无关,见表 2。

选择单因素分析有统计学意义的变量进行 Cox 模型多因素分析。Cox 模型多因素分析显示,TNM

分期是结肠癌 FOLFOX 4 辅助化疗疗效独立预测因素,而肠壁浸润深度分期不是 FOLFOX 4 辅助化疗的结肠癌疗效独立预测因素,见表 3。

表 2 结肠癌 FOLFOX 4 辅助化疗疗效相关因素 Cox 模型单因素分析结果

Table 2 Single factor analysis results of FOLFOX4 adjuvant treatment by Cox model

Variable	Partial regression coefficient (B)	Standard error (SE)	Value of P (sig.)	Dominance ratio [Exp(B)]
Sexuality	0.189	0.301	0.527	1.209
Age	-0.328	0.257	0.176	0.645
Diseased region	-0.678	0.345	0.059	0.568
TNM stage	0.834	0.231	0.000	2.534
Bowel wall invasion	0.562	0.225	0.013	1.754
MTHFR-C677T	0.236	0.318	0.467	1.253

表 3 结肠癌 FOLFOX4 辅助化疗疗效相关因素 Cox 模型多因素分析结果

Table 3 Multi factor analysis result by of FOLFOX4 adjuvant treatment Cox model

Variable	Partial regression coefficient (B)	Standard error (SE)	Value of P (sig.)	Dominance ratio [Exp(B)]
Bowel wall invasion	-0.213	0.137	0.097	0.745
TNM stage	0.673	0.285	0.026	1.823

3 讨论

不同个体的基因 99.9% 都是相同的,但在序列上有极小(0.1%)的遗传差异,表现为遗传多态性(genetic polymorphism),其中最主要是单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs)。SNPs 存在于整个基因组中,出现的频率为每 100 个碱基对左右就有 1 个^[4]。估计人类基因组中至少有存在 30 万个 SNPs。

结直肠癌目前在国内外大城市发病率和死亡率均居第 3 位^[5],在世界范围内占肿瘤相关死亡因素第 2 位^[6]。随着诊疗水平的进步,近年结肠癌病死率较前下降,其中术后辅助治疗为降低结肠癌病死率作出很大贡献^[7-11]。由 MOSAIC 试验^[4]奠定的 FOLFOX4 方案是高危 II 期与 III 期结肠癌术后辅助化疗的标准方案。本研究亦采用 FOLFOX4 辅助化疗方案进行治疗,此方案包含了 5-氟尿嘧啶、亚叶酸钙和奥沙利铂三种药物。

本研究探讨 MTHFR C677T 多态性和 FOLFOX4 辅助化疗的结肠癌疗效的关系,结果表明 MTHFR C677T 基因频率分别为:C/C 47.4%(36/76),T/C 40.8%(31/76),T/T 11.8%(9/76),而国

内最近黄朝晖等^[12]报道在晚期胃癌中 MTHFR 677 基因型频率分别为 C/C 33.6%(37/110),C/T 47.3%(52/110)和 T/T 19.1%(21/110)。分布频率有一定差异,可能与样本量不同以及地域不同相关。疗效方面,在本研究中含 MTHFR 677 C 等位基因患者 3 年复发率高于不含 MTHFR 677 C 等位基因患者 (C/C + T/C *vs.* T/T, 35.8% *vs.* 22.2%,*P* = 0.710),体现了 T/T 基因型一定的疗效优势,这一点与黄朝晖^[12]等人研究相同,但在本研究中无明显统计学差异,而且 Cox 模型单因素分析 MTHFR-C677T 与 3 年无病生存率无明显相关性,可能与样本量不足相关。为进一步扩大研究提供了理由。

本研究中我们可以看到 MTHFR-C677T 的基因分布频率与国内目前相似研究有一定差异,这可能与现有研究涉及的样本量均较少而很容易发生偏倚有关,再加之分属不同的地域遗传学背景不尽相同,如想得到更为准确的中国人相关基因突变位点的基因分布频率,需要更为大样本、涉及地域更为广泛的研究来证实。与之前的几个晚期肿瘤相关研究相比,MTHFR-C677T 中有疗效上优势的基因型与同类研究结果吻合,均有生存率上的优势倾向,只是差异没有统计学意义。这可能与下面原因有关,本研究与既往的药物基因组学研究不同,进行的是基因多态性与辅助化疗疗效(3 年无病生存率)相关性研究,而可行根治性切除的结肠癌患者 3 年无病生存率较高,复发转移相关事件率低,如想得到统计学差异需进一步扩大样本量和更长时间的生存随访;其二,本研究采用肿瘤组织提取 DNA 而既往研究几乎都采用外周血标本提取 DNA。

另外,Cox 模型单因素分析结果还显示:TNM 分期、肠壁浸润深度与结肠癌 FOLFOX4 辅助化疗的疗效有关。而性别、年龄、病理部位与 FOLFOX4 辅助化疗的结肠癌疗效无关。Cox 模型多因素分析结肠癌的淋巴结转移、Dukes 分期是 FOLFOX4 辅助化疗的结肠癌疗效独立预测因素,而肠壁浸润深度不是复发转移独立预测因素。该分析符合既往研究中疗效相关因素,从而从侧面证明了所得结果的准确性。

研究发现在中国人群中,FOLFOX 4 辅助化疗治疗结肠癌,3 年的生存率接近 70%,由于随访时间限制,目前还不能得到足够的总生存期的数据,因此

MTHFR-C677T 多态性与总生存期的关系需等待后期随访数据的累积来进一步阐明。

参考文献:

[1] Kremer JM. Methotrexate Pharmacogenomics [J]. Ann Rheum Dis, 2006, 65(9):1121-3.

[2] Afzal S, Jensen SA, Vainer B, *et al.* MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer [J]. Ann Oncol, 2009, 20(10):1660-6.

[3] Thomas F, Motsinger-Reif AA, Hoskins JM, *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms and toxicity to 5-FU-based chemoradiation in rectal cancer [J]. Br J Cancer, 2011, 22, 105(11):1654-62.

[4] Giacomini KM, Brett CM, Altman RB, *et al.* The pharmacogenetics research network: from SNP discovery to clinical drug response [J]. Clin Pharmacol Ther, 2007, 81(3):328-45.

[5] Wan DS. Clinical oncology [J]. Two edition. Beijing: Science and Technology Press, 2005: 348-9. [万德森. 临床肿瘤学 [M]. 2 版. 北京: 科技出版社, 2005:348-9.]

[6] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1):10-29.

[7] Lin YL, Liang JT. FOLFOX4 in the adjuvant treatment of colon cancer in Asian patients [J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(114):400-4.

[8] Sugihara K, Ohtsu A, Shimada Y, *et al.* Safety analysis of FOLFOX4 treatment in colorectal cancer patients: a comparison between two Asian studies and four Western studies [J]. Clin Colorectal Cancer, 2012, 11(2):127-37.

[9] Jeon HJ, Woo JH, Lee HY, *et al.* Adjuvant Chemotherapy Using the FOLFOX Regimen in Colon Cancer [J]. J Korean Soc Coloproctol, 2011, 27(3):140-6.

[10] Lu GC, Fang F, Li DC. Efficacy and toxicity analysis of XELOX and FOLFOX4 regimens as adjuvant chemotherapy for stage III colorectal cancer [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2010, 32(2):152-5. [卢国春, 方复, 李德川. 卡培他滨联合奥沙利铂与 5-氟尿嘧啶亚叶酸钙联合奥沙利铂在Ⅲ期结直肠癌辅助化疗中的疗效和安全性比较 [J]. 中华肿瘤杂志, 2010. 32(2):152-5.]

[11] Lombardi L, Gebbia V, Silvestris N, *et al.* Adjuvant therapy in colon cancer [J]. Oncology, 2009, 77 Suppl 1:50-6.

[12] Huang ZH, Hua D, Li LH, *et al.* The prognostic impact of MTHFR C677T polymorphism on gastric cancer patients treated with adjuvant chemotherapy [J]. Lin Chuang Zhong Liu Xue Za Zhi, 2008, 14(4):243-47. [黄朝晖, 华东, 李莉华, 等. MTHFR C677T 基因多态对胃癌辅助化疗预后的影响 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 14(4):243-47.]

[编辑:刘红武;校对:黄国玲]