

叶酸缺乏与 MTHFR C677T 多态性对乳腺癌患者淋巴细胞遗传损伤的影响

吴暇玉¹,倪娟¹,邹天宁²,梁子卿¹,汪旭¹

Role of Folate Deficiency and MTHFR C677T Polymorphisms on Genetic Damage in Human Lymphocytes from Breast Cancer Case

WU Xia-yu¹, NI Juan¹, ZOU Tian-ning², LIANG Zi-Qing¹, WANG Xu¹

1. School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China; 2. Thirdary Affiliated Hospital of Kunming Medical College

Corresponding Author: WANG Xu, E-mail: wangxu@fudan.edu.cn

Abstract :Objective To investigate the role of folate deficiency and MTHFR C677T polymorphism on genetic damage in human lymphocytes from breast cancer cases and controls. **Methods** Lymphocytes with different MTHFR C677T genotypes from the donors were cultured for 9 days in media with different concentrations of folic acid (FA) and the frequencies of micronucleated binucleated cell (MNBN) was evaluated by cytokinesis-block micronucleus cyto assay (CBMN cyt). **Results** The frequencies of micronucleated binucleated cell (MNBN) in 30 nmol/L FA were significantly higher than those in 60, 120, 240, 2 260 nmol/L FA ($P < 0.001 \sim 0.05$), but no significant differences were observed either between those in 60 and 120 nmol/L FA, or between those in 120, 240 and 2 260 nmol/L FA within either groups when the genotype was the same. Within either of cancer case and control groups, the frequencies of MNBN of mutant homozygotes (TT) was significantly higher than that of wild isozygotes (CC) ($P < 0.01 \sim 0.05$) in any FA concentration group. After the genetic damage background of sample was reduced, there was no significantly difference in MNBN frequency between lymphocytes with the same genotype from case and control at the same FA concentration. **Conclusion** FA concentration below 120 nmol/L increased genetic damage in human lymphocytes in vitro. Individuals with MTHFR 677TT genotype may be more sensitive to folic acid deficiency regardless the cancer statues than those with MTHFR 677CC and 677 CT genotypes.

Key words :MTHFR;C677T;Folic acid;Breast cancer

摘 要:目的 探讨叶酸缺乏与 MTHFR C677T 基因型多态性对乳腺癌患者淋巴细胞遗传损伤的影响及其与对照的差异。方法 采用 9 天淋巴细胞长期培养辅以胞质阻断微核细胞组分析 (CBMN cyt), 分析不同浓度的叶酸对三种 MTHFR C677T 基因型乳腺癌人群和健康人群双核细胞微核率的影响与差异。结果 MTHFR C677T 三种基因型 (CC, CT, TT) 的乳腺癌个体与对照组淋巴细胞在叶酸浓度为 30 nmol/L 时双核细胞微核率 (MNBN) 均显著高于 60、120、240 和 2 260 nmol/L 测试组 ($P < 0.001 \sim 0.05$), 60 和 120 nmol/L 两个测试组之间以及 120、240 和 2 260 nmol/L 三个测试组之间都未发现显著性差异。乳腺癌个体和对照组淋巴细胞中, MTHFR 677TT 在任何培养条件下, MNBN 频率均显著高于相应样本组同类培养的野生纯合型 (CC) ($P < 0.01 \sim 0.05$); 消减样本自身遗传损伤背景后, 相同基因型的乳腺癌个体和正常个体淋巴细胞在 MNBN 频率上无显著性差异。结论 在离体情况下, 低于 120 nmol/L 的叶酸浓度可增加人类淋巴细胞遗传损伤, 无论是健康人群还是癌症患者, MTHFR 677TT 型纯合个体, 对叶酸缺乏都更加敏感。

关键词:亚甲基四氢叶酸还原酶; C677T 多态性; 叶酸; 乳腺癌

中图分类号: R737.9; Q355 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2008)12-0854-04

收稿日期: 2008-01-22; **修回日期:** 2008-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30760098, 30560061); 云南省自然科学基金资助项目 (2005C0028M); 云南省教育厅科研基金资助项目 (06 Y119B)

作者单位: 1. 650092 昆明, 云南师范大学生命科学学院; 2. 昆明医学院第三附属医院

通信作者: 汪旭, E-mail: wangxu@fudan.edu.cn

作者简介: 吴暇玉 (1980-), 女, 硕士, 讲师, 从事遗传毒理学研究

0 引言

叶酸是人体正常发育的重要营养物质。它一方面通过提供甲基完成尿嘧啶脱氧核苷酸 (dUMP) 到

胸腺嘧啶脱氧核苷酸(dTMP)的合成,另一方面通过同型半胱氨酸(Hcy)合成甲硫氨酸(Met)、S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的生化过程影响DNA甲基化^[1-4],因此叶酸在保持基因组稳定性中起着重要的作用。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是控制叶酸到dTMP合成以及胞嘧啶-磷酸化-鸟嘌呤核苷酸(CpG)甲基化的关键酶,在叶酸缺乏情况下,MTHFR酶活性的下降有可能提高5,10-亚甲基四氢叶酸的浓度,降低5-甲基四氢叶酸的浓度^[5]。这种情况下,dTMP的合成过程可能强于SAM合成过,进而降低dUMP错配到DNA中引发的染色体断裂,并可能削弱甲基供体的合成。因此MTHFR对DNA合成和甲基化发挥着关键作用。MTHFR活性可能受MTHFR基因序列变异、Met或SAM浓度、黄素腺嘌呤二核苷酸和核黄素浓度等因素的影响^[5-6]。

鉴于叶酸缺乏和MTHFR基因多态性都涉及到叶酸代谢途径的运行状态和DNA的各种代谢活动,而DNA的结构与功能影响染色体的稳定性又与肿瘤的发生、发展密切相关,本研究拟通过cytCBMN^[7]探索不同叶酸浓度和MTHFR C677T多态性对乳腺癌患者及其对照淋巴细胞遗传损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

在知情同意情况下,从昆明医学院第三附属医院19位治疗前女性乳腺癌患者(35~52岁)取样,同时从昆明血液中心征集相同年龄段20个健康个体,各抽取外周血5 ml,分离淋巴细胞进行离体培养。

1.2 试剂

叶酸、无叶酸RPMI1640培养基、L-谷氨酰胺、细胞松弛素B等购自Sigma公司;青霉素和链霉素购自哈药集团制药总厂;常规RPMI1640购自Gibco公司;新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;透析小牛血清购自Hyclone公司(SH30079.02);淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司;白介素-2购自深圳新吉尔制药厂,肝素(12 500 u)购自上海生物化学试剂厂;Hinf I、Mbo I购自华美公司。

1.3 PCR-RFLP分析MTHFR C677T基因型

以500 μl外周血提取基因组DNA,PCR扩增获取MTHFR基因片段,扩增产物分别用Hinf I、Mbo I消化,琼脂糖凝胶电泳识别677CC、677CT、677TT基因型,详见文献^[6]。

1.4 细胞培养

根据人血浆叶酸生理浓度(20~40 nmol/L)^[2-3],实验将叶酸浓度设为30、60、120、240、2 260 nmol/L(常规RPMI1640培养基),培养基的其他成分及浓度与RPMI1640培养基一致。利用淋巴细胞分离液从受试个体外周血中分离淋巴细胞,以细胞浓度为 0.5×10^6 /ml培养于1 ml含5%透析小牛血清、100单位双抗、2 mmol/L L-谷氨酰胺、10 μl/ml PHA, pH 7.0的不同浓度叶酸培养基中。细胞于37°C、5%CO₂培养箱中培养,每3天更换一次相应培养基,培养8天后,加入细胞松弛素B(终浓度为4.5 μg/ml),继续培养28 h,第9天1 000 r/min离心弃上清,加入约20 μl含6%DMSO的小牛血清,温和混匀,室温静置8 min,涂片,空气干燥1 h,甲醇冰醋酸(3:1)固定10 min,空气干燥,5%Giemsa(pH 7.0)染色5 min,空气干燥,封片,CBMN分析双核细胞微核率(MNed BN/1 000 BN cells, MNBN)^[7-8],每张片分析1 000个双核细胞,每浓度组分析5 000个以上双核细胞。

1.5 统计学方法

以SPSS 12.0 one-way ANOVA分析不同浓度叶酸、C677T基因多态性对乳腺癌个体及正常个体淋巴细胞遗传毒性效应,以Independent Samples Test比较乳腺癌患者与正常个体相同基因型对叶酸缺乏引发的遗传毒性敏感性差异,并以Difference of difference消减各组样本内背景差异后,进一步解析乳腺癌患者与正常个体对叶酸缺乏的敏感性差异^[9],Sigma plot 10.0作图。

2 结果

乳腺癌患者或对照MNBN频率在30 nmol/L测试组均显著高于60、120、240和2 260 nmol/L四个测试组($P < 0.001 \sim 0.05$),而60 nmol/L和120 nmol/L两个浓度间差异无统计学意义,120、240、2 260 nmol/L三个测试组间差异也无统计学意义,在此基础上,我们统计了叶酸浓度分别为30、120和240 nmol/L时,不同基因型(野生型纯合子CC型、杂合子CT型、突变纯合子TT型)的人体淋巴细胞微核率,见表2,图1、2。结果显示,无论是病例或对照淋巴细胞,TT基因型在三个浓度组中,MNBN均显著高于同类培养的野生纯合子CC型($P < 0.01 \sim 0.05$);去除乳腺癌个体与对照组背景值后,当叶酸浓度相同时,同样基因型的乳腺癌个体与正常个体之间MNBN频率差异均无统计学意义。

表 1 不同叶酸浓度下乳腺癌患者和对照组个体胞质阻断淋巴细胞微核频率

Tab 1 Frequency of cytokinesis-blocked MNed BNs lymphocytes cell in different concentration of folic acid

Group (n)	MNed BNs n/1 000 BNC(±s)				
	folic acid in medium (nmol/L)				
	30	60	120	240	2 260 *
Breast cancer (19)	19.96 ±1.16 ^a	11.90 ±0.46 ^{bc}	9.99 ±0.85	9.66 ±0.34	9.69 ±0.40
Control (20)	16.58 ±0.47 ^a	9.31 ±0.38 ^{bc}	8.04 ±0.39	7.66 ±0.32	7.60 ±0.29

* :常规 RPMF1640 培养基 one way-ANOVA , ^a : P < 0.05 vs 120 nmol/L , ^b : P < 0.05 vs 240 nmol/L , ^c : P < 0.05 vs 2 260 nmol/L

表 2 叶酸缺乏诱发 MTHFR C677T 多态性
个体胞质阻断淋巴细胞微核率

Tab 2 Folic acid deficiency induce cytokinesis-blocked
MNed BNs lymphocytes cell of MTHFR C677T

Group	MNed BNs n/1 000BNC(±s)		
	folic acid in medium (nmol/L)		
	30	120	240
MTHFR C677T genotype(n)			
Breast cancer case			
CC(9)	17.19 ±0.66 ^{ab}	10.36 ±0.77	9.66 ±0.37
CT(8)	21.28 ±2.06 ^{ab}	8.20 ±1.44	9.55 ±0.73
TT(2)	27.13 ±1.78 ^{ab}	15.47 ±0.63	14.16 ±0.34
All(19)	19.96 ±1.16 ^{ab}	9.99 ±0.85	9.66 ±0.34
Control			
CC(11)	15.82 ±0.62 ^{ab}	6.99 ±0.29	7.59 ±0.51
CT(5)	16.68 ±0.61 ^{ab}	7.88 ±0.79	7.68 ±0.37
TT(4)	18.53 ±1.11 ^{ab}	9.66 ±0.58	9.02 ±0.83
All(20)	16.58 ±0.47 ^{ab}	8.04 ±0.39	7.66 ±0.32

one way-ANOVA , ^a : P < 0.05 vs 120nmol/L , ^b : P < 0.05 vs240 nmol/L

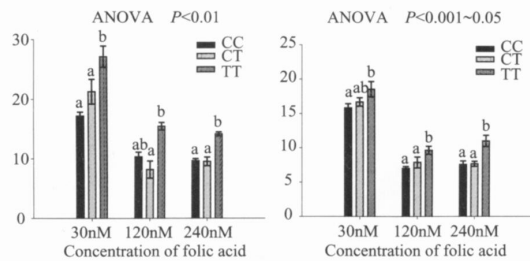


图 1 相同叶酸浓度下乳腺癌、对照组 MTHFR C677T
不同基因型双核细胞微核频率比较

Fig 1 Comparison of MNBN frequency between different C677T
MTHFR genotype under same concentration of folic acid medium

3 讨论

MTHFR 是叶酸代谢中关键性酶,主要催化 5, 10-亚甲基四氢叶酸到 5-甲基四氢叶酸的转化,对于平衡 DNA 合成与 DNA 甲基化是一个非常重要的酶。MTHFR 酶活影响血浆 5,10-亚甲基四氢叶酸浓度,而 5,10-亚甲基四氢叶酸浓度对 dUMP 到 dTMP 转化起关键性作用,影响着 DNA 的合成与修复。细胞内高浓度的 5,10-亚甲基四氢叶酸有益

于 dTMP 的合成,从而增强了 DNA 的稳定性^[10-11]。MTHFR 基因 677 位点发生 C → T 置换^[12],677TT 基因型与许多癌症的发病危险度有不同的关联:TT 纯合体结肠癌的发病危险度可能降低,而胃癌、宫颈癌发病风险有增加倾向^[13]。研究表明,677TT 型突变纯合体个体血浆同型半胱氨酸显著高于 677CC 野生型纯合体个体,而红细胞叶酸浓度则显著低于 677CC 野生型个体^[10],相关报道也显示 677TT 个体相对于 677CT 和 677CC 个体,可能存在较高乳腺癌(或其他相关疾病)发病风险^[10,12]。而当叶酸的摄入不足时,同样会增加 dUMP 错配到 DNA 中的机会。本研究发现,相同叶酸浓度下,677TT 病例与对照的淋巴细胞微核率均分别显著高于各样本组 677CC 型个体,提示该基因型个体对叶酸缺乏更加敏感,然而 MTHFR 基因多态型如何影响 DNA 稳定性以及恶性肿瘤的转变当前还没有准确的报道。MTHFR 不可逆转的催化 5,10-亚甲基四氢叶酸到 5-甲基四氢叶酸的转化,5-甲基四氢叶酸最终提供甲基完成 SAM 的合成,这一生化反应对 DNA 甲基化和基因表达至关重要^[14],提示 MTHFR 酶活性的下降可能会减低 5-甲基四氢叶酸的浓度、DNA 甲基化程度。本试验结果没有得到 MTHFR 677 位点基因突变纯合子增加乳腺癌的遗传不稳定性的预期假设。随着叶酸浓度的升高,乳腺癌患者基因组遗传损伤显著性降低,表明叶酸的摄入可能会降低乳腺癌的发病风险。本项研究中,我们通过五个浓度组比较发现,当叶酸浓度在 30、60 和 120 nmol/L 时,微核率随着叶酸浓度升高而降低,而在叶酸浓度为 120、240 和 2 260 nmol/L 时,微核率则不再随叶酸浓度升高而明显改变,因此我们认为,离体情况下,低于 120 nmol/L 的叶酸浓度增加人类淋巴细胞遗传损伤,这与我们过去的研究结果相吻合^[15-18]。鉴于正常人体血浆叶酸生理浓度为 20 ~ 40 nmol/L,低于我们所得到的维持遗传稳定性的最适叶酸浓度,提示额外补充叶酸可能有助于降低人体遗传损伤和相关疾病风险。

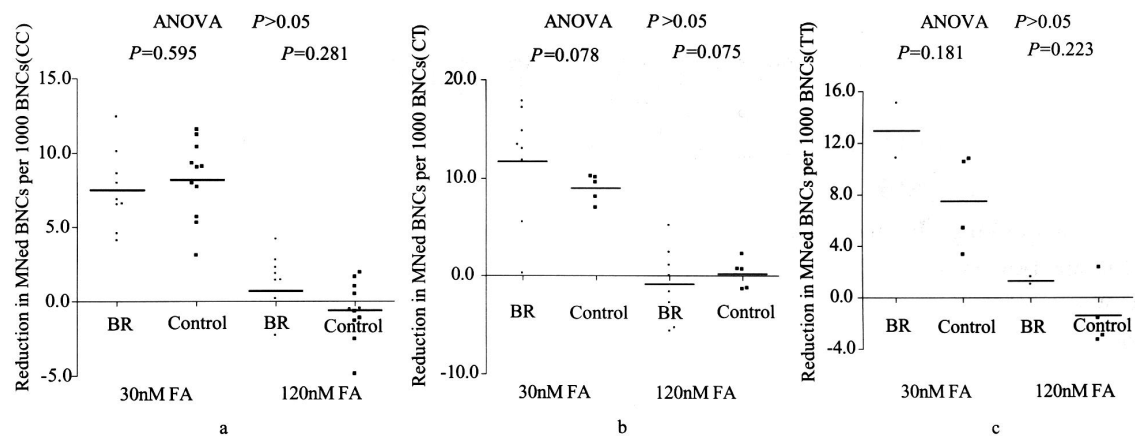


图 2 消减各组样本内遗传损伤背景值后,乳腺癌与对照组 MTHFR C677T 相同基因型间双核细胞微核频率比较(BR:乳腺癌)

Fig 2 Comparison of reduction in MNBN frequency in C677T MTHFR genotype between patients and controls with difference of difference analysis (BR:Breast cancer)

参考文献:

[1] Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review [J]. Am J Epidemiology, 2004, 159(5): 423-443.

[2] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folic acid deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage [J]. PNAS, 1997, 94(7): 3290-3295.

[3] Fenech M. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells [J]. Mutat Res, 2001, 475(1-2): 56-67.

[4] Wang X, Fenech M. A comparison of folic acid and 5-methyl tetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes in vitro [J]. Mutagenesis, 2003, 18(1): 81-86.

[5] Cicek MS, Nock NL, Li L, et al. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotypes and haplotypes and prostate cancer risk and aggressiveness [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(8): 1331-1336.

[6] Ping Yi, Igor P, Pogribny S, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of 677C →T and 1298A →C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk [J]. Cancer letter, 2002, 181(2): 209-213.

[7] Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death [J]. Mutat Res, 2006, 600(1-2): 58-66.

[8] Fenech M. The in vitro micronucleus technique [J]. Mutat Res, 2000, 455(1): 81-95.

[9] Andrew JV, Douglas GA. Analysing controlled trials with baseline and follow up measurements [J]. British Medical Journal, 2001, 23(7321): 1123-1124.

[10] Narayanan S, McConnell J, Little J, et al. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status in human lymphocytes in vivo [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(9): 1436-1443.

[11] Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation [J]. J Nutr, 2002, 132(8): 2382-2387.

[12] Friso S, Choi SW, Girelli D, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status [J]. PNAS, 2002, 99(8): 5606-5611.

[13] Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, et al. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutation in MTHFR [J]. Am J Hum Genet, 1996, 59(6): 1268-1275.

[14] Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, et al. Metabolic interactions of alcohol and folate [J]. J Nutr, 2002, 132(8): 2367-2372.

[15] Wang X, Wu XY, Liang ZQ, et al. A comparison of genomic instability under folic acid deficiency between breast patients and normal norecancer controls from a Chinese population in Yunan [J]. Mutagenesis, 2006, 21(1): 41-47.

[16] 吴暇玉, 邹天宁, 汪旭, 等. 叶酸、核黄素缺乏及 MTHFR A1298C 多态性对人类遗传稳定性的影响 [J]. 癌变、畸变、突变, 2007, 19(4): 259-262.

[17] 朱静, 吴暇玉, 汪旭, 等. 核黄素缺乏对成人淋巴细胞株遗传稳定性及细胞毒性影响初探 [J]. 营养学报, 2006, 28(6): 531-533.

[18] 阚祥绪, 邹天宁, 汪旭, 等. 云南人亚甲基四氢叶酸还原酶基因型多态性与乳腺癌易感性的关联 [J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(9): 716-718.

[编辑:贺文;校对:刘红武]