

## 대장암의 위치에 따른 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 유전자형 빈도의 차이

포천중문의과대학교 <sup>1</sup>외과, <sup>2</sup>혈액종양내과, <sup>3</sup>임상의학연구소

김종우<sup>1</sup> · 오도연<sup>2,3</sup> · 정소영<sup>2</sup> · 임동진<sup>3</sup> · 김진경<sup>3</sup> · 김남근<sup>3</sup>

### Distributions of MTHFR Gene Polymorphism according to the Location of Colon Cancer

Jong Woo Kim, M.D.<sup>1</sup>, Doyeun Oh, M.D.<sup>2,3</sup>, So Young Chong, M.D.<sup>2</sup>, Dong Jin Yim, M.S.<sup>3</sup>, Jin Kyeong Kim, Ph.D.<sup>3</sup>, Nam Keun Kim, Ph.D.<sup>3</sup>

Departments of <sup>1</sup>Surgery, <sup>2</sup>Oncology, <sup>3</sup>Institute for Clinical Research, College of Medicine, Pochon CHA University, Seongnam, Korea

**Purpose:** Colon carcinogenesis seems to vary according to the original location of tumor, especially the right and the left sides. Two common methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms, 677C → T and 1298A → C, are now known. Especially, the TT type of the 677C → T mutation shows reduced catalytic activity at a rate 30% that of wild type. The aim of this study is to investigate the distributions of MTHFR polymorphisms of 677C → T and 1298A → C according to the location of the colon cancer. **Methods:** Blood samples were collected from 112 patients diagnosed in our hospital, as having colon cancer: 34 proximal and 78 distal cases to the splenic flexure and 448 healthy control subjects. In order to characterize MTHFR polymorphisms, we applied the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results:** The distributions of MTHFR 677C → T polymorphisms as genotypes CC, CT, and TT were 32.4%, 53.1%, and 14.5% in the control group, and 34.8%, 58.0%, and 7.1% in the cancer group (P=0.056). In the 34 proximal cancers, the CC, CT, and TT distributions were 44.1%, 55.9%, and 0% (P<0.05), respectively. In the distal group, they were 30.8%, 59.0%, and 10.3%. The distributions of the MTHFR 1298 A → C polymorphism by genotypes, AA, AC, CC were 69.6%, 28.6%, and 1.8% in the control group, and 58.9%, 38.4%, and 2.7% in the

cancer group. The proximal and the distal groups show genotype distributions of 44.1%, 53.0%, and 2.9% and 65.4%, 32.0%, and 2.6%, respectively, but the differences were not statistically significant. **Conclusions:** There are no definite differences between control subjects and colon-cancer patients in the two polymorphisms 677C → T and 1298 A → C. However, the TT genotype shows a lower frequency in the cancer group than in the control group with a marginal statistical value (P=0.056), which suggest a reduced risk of cancer incidence for this type, compared with a CC or a CT type. **J Korean Soc Coloproctol 2006; 22:69-74**

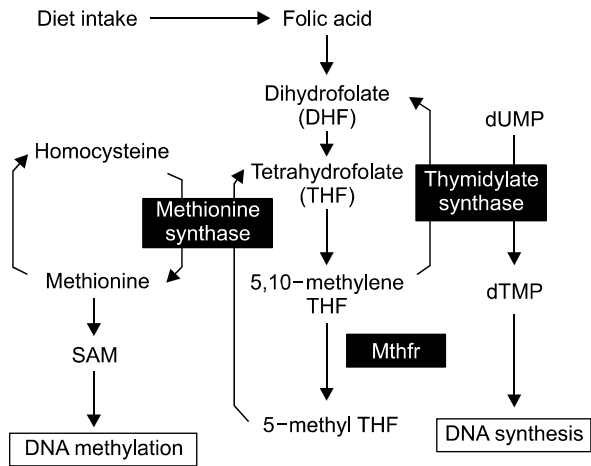
**Key Words:** MTHFR gene polymorphism, Colon cancer, Location  
MTHFR 유전자 다양성, 대장암, 위치

### 서 론

암은 수많은 유전적(genetic) 변이 및 상유전적(epigenetic) 변화들의 최종산물이다.<sup>1</sup> 대부분의 악성 종양에서 유전체의 불안정성(generic instability)이 관찰되는데, 대장암에서는 발암 기전으로 크게 두 가지 형태인 염색체 불안정성(chromosomal instability, CIN pathway)과 미세 부수체 불안정성(microsatellite instability, MIN pathway)이 알려져 있다.<sup>2</sup> 염색체의 변이와 유전자의 홀배수체(aneuploid) 특징을 보이는 CIN은 대부분의 대장암 발암 기전으로 보이며, 반면에 MIN은 일부 대장암의 발암 기전으로 DNA 부정교합 교정에 문

접수: 2005년 4월 20일, 승인: 2006년 3월 30일  
책임저자: 김남근, 463-712, 경기도 성남시 분당구 야탑동 351  
포천중문의과대 분당차병원 생화학교실 및 임상의학  
연구소  
Tel: 031-780-5762, Fax: 031-780-5766  
E-mail: namkkim@naver.com

Received April 20, 2005, Accepted March 30, 2006  
Correspondence to: Nam Keun Kim, Institute for Clinical  
Research, Bundang CHA Hospital, College of Medicine, Pochon  
CHA University, 351 Yatap-dong, Bundang-gu, Seongnam  
463-712, Korea.  
Tel: +82-31-780-5762, Fax: +82-31-780-5766  
E-mail: namkkim@naver.com



**Fig. 1.** Biochemical pathways of folate and methionine metabolism.

제가 있는 것으로 밝혀져 있다.<sup>3-5</sup> MIN 유형의 산재성 대장암에서의 미세 부수체 불안정성 원인은 DNA 부정교합 유전자의 돌연변이보다는 상유전적 변이로서 촉진자(promoter)의 과메틸화(hyper methylation)에 의한 유전자 발현의 소실(silencing)을 초래하는 것으로 알려져 있다.<sup>6,7</sup> 최근에는 이러한 유형의 기전을 CIMP (CpG island methylation phenotype) pathway라 하는데 hMLH1 외에도 p16 등의 종양억제 유전자들의 발현소실에서도 관찰되며 대장암 발생의 약 20~30%는 이 유형과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup>

대장암의 발병위치에 따라 발암 기전에 다소 차이가 있는 것으로 알려져 있는데 과메틸화에 의한 유전자 기능소실은 주로 근위부 암에서 많이 관찰되며, 따라서 MIN 유형의 암이 많이 분포한다. 반면에 원위부 암은 대다수 대장암인 CIN 유형의 암이 주로 분포하며 저메틸화(hypo methylation)와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>8,9</sup>

엽산의 결핍이 발암의 일반적인 위험요소들 중의 하나로 알려져 있는데 DNA 메틸화 과정에도 엽산 대사가 중요하게 관여하는 것으로 밝혀졌다. 엽산 대사의 장애는 메틸화의 이상을 초래해 발암에 기여하게 된다.<sup>10-12</sup> 엽산대사 과정의 효소인 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)는 5,10-methylenetetrahydrofolate를 5-methyltetrahydrofolate로 전환시켜 메티오닌합성에 관여하고, 이어 형성되는 S-adenosyl methionine은 DNA 메틸화의 주된 역할을 하게 된다(Fig. 1). 그런데 이 효소의 돌연변이형은 열에 약하고, 효소로서의 특이성이 감소되므로 결국 DNA 메틸화에 이상을 초래한다.<sup>13-15</sup>

지금까지 알려진 MTHFR의 대표적인 두 가지 변이형의 유전자 다양성으로 677C → T (alanine → valine)과 1298A → C (glutamate → alanine)이 알려져 있는데, 677C → T변이의 TT아형은 효소로서의 기능이 30% 정도로 감소되며, 결국 메티오닌 합성과 DNA메틸화가 크게 감소하게 된다. 그러나 1298A → C변이형의 구체적인 임상적 의미는 아직 밝혀져 있지 않다.<sup>16-19</sup> 따라서 본 연구에서는 MTHFR의 두 가지 변이인 677C → T와 1298A → C의 유전자 다형이 대장암의 발병위치에 따라 차이가 있는지를 살펴보았다.

## 방 법

### 1) 연구대상

본원에서 수술 또는 내시경 조직 검사로서 대장암으로 확진된 환자군 112예(비장만곡을 중심으로 근위부 34예, 원위부 78예)와 대조군으로 정기 건강 검진상 대장암을 비롯한 증상이 발견되지 않았으며, 과거에도 이를 앓은 적이 없으며, 혈전관련 질환이 없는 건강한 448예를 대상으로 하였다. 환자군의 성별 분포는 남자 55예, 여자 57예였으며, 대조군은 각각 177예와 271예였다. 평균연령은 환자군 57.5세(연령대 23~87세), 대조군 48.3세(연령대 25~91세)였다. 본 연구에서 대조군은 암을 포함한 혈전관련 질환을 앓거나, 앓은 적이 없는 건강한인을 대상으로 하였으며, 대장경 검사를 통해 용종여부를 확인하지는 않았다.

### 2) 연구방법

(1) MTHFR 유전자형의 분석: MTHFR의 분석을 위하여 정상 DNA를 대상으로 하였다. 즉 건강 대조군 및 환자군 모두 말초 혈액의 림프구를 채취하여 DNA를 추출하였다. MTHFR 677 유전자형 분류는 GeneAmp PCR machine (Perkin Elmer 2400)을 이용하였다. Human genomic DNA 200 ng을 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 M, deoxynucleotide triphosphate, 1 unit Taq polymerase (TaKaRa, USA)와 함께 전체 용적 100 µl로 하여 시동체(primer) 각각 100 pmol를 넣고 증폭시켰다. 이때 사용한 forward primer는 5'-GCA CTT GAA GAG AAG GTG TC-3', reverse primer 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'이다. PCR의 조건은 denaturation을 94°C에서 5분간 시킨 후, 94°C에서 30초, 51°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초로 정하여 35회 반복 작동시켰다. 말단부위 연장(terminal elongation)은 72°C에서 5분간으로 하였다. 중합효소 연쇄반응(PCR)의 산물은

ethanol로 침전시키고 *Hinf* I으로 digest하여 4% agarose gel에서 전기영동시켰다. 데이터 분석은 Frosst 등<sup>16</sup>의 방법에 따랐다.

변이 대립유전자(variant allele)는 염기서열 677에서 cytosine이 thymine으로 바뀌는데, 동형접합체(homozygote)인 TT형은 173 bp와 30 bp의 두 절편을 보이고, 이형접합체(heterozygote) CT형은 203 bp, 173 bp와 30 bp를 보인다. 정상인 CC형은 203 bp 하나의 band를 보인다.

MTHFR A1298C 유전자 다형은 Skibola 등<sup>19</sup>의 방법을 적용하였다. DNA 증폭에 이용된 시동체(primer)는 forward primer로 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C-3'와 reverse primer로 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3'를 이용하였다. 증폭 및 중합효소연쇄반응의 조건은 MTHFR C677T와 동일하다. 변이 대립유전자는 염기서열 1298에서 adenine이 cytosine으로 치환됨으로써 형성되는데 *Mbo*II 부위를 절제한다. 정상형 AA는 56, 31, 30, 28 및 18 bp의 5개 band를 보인다. 반면에 동형접합성 돌연변이체인 CC형은 84, 31, 30 및 18 bp의 4개 band를 보인다. 결과의 산물은 ethidium bromide를 첨가한 4% agarose gel에서 전기영동으로 분석하였다.

3) 통계분석

대장암의 비교위험도를 측정하기 위해서 저자 등은 odd비값(odds ratio (OR))과 95% 신뢰구간(95 percent confidence intervals, 95% CI)을 사용하였다. MTHFR 효소의 역가에 큰 차이가 없는 CC형과 CT형을 합하여 참고군으로 정하여, TT 변이형군과의 위험도를 분석하기 위해서 logistic regression 모델을 적용하였다. 그리고 여러 연구들<sup>20,22</sup>에서와 같이 본 연구에서도 MTHFR C677T에 대해서는 CC와 CT를 한 그룹으로 TT군과 비

교했고, MTHFR A1298C에서는 AA와 AC를 한 군으로 해서 CC군과 비교했다. 통계 패키지는 SPSS for Windows, version 9.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)을 사용하였다.

결 과

1) MTHFR C677T 유전자형 분석

대조군 448예의 유전자형 분포 결과 CC형 145예(32.4%), CT형 238예(53.1%), TT형 65예(14.5%)로 CT형이 가장 많았다. 전체 환자군의 분포도 CC형 39예(34.8%), CT형 65예(58%), TT형 8예(7.1%)로 분포상 CT형이 많아 대조군과 비슷했으나 TT 돌연변이형의 빈도는 대조군 14.5%에 비해 환자군 7.1%로 다소 낮았다(Table 1). 대립 유전자의 빈도(allele frequencies)는 대조군에서 C와 T 각각 58.9%, 41.1% 환자군에서 63.8%, 36.2%였다.

종양의 위치에 따른 MTHFR 677C → T 유전자형 분포에서 근위부 대장암의 환자군 34예 중에서 TT 변이형은 한 예도 없었고, 반면에 원위부 대장암 환자군 78

Table 1. Distribution of MTHFR\* 677C → T polymorphism, among control & cancer group according to tumor location

	677 MTHFR genotype		
	CC (%)	CT (%)	TT (%)
Control (448) <sup>†</sup>	145 (32.4)	238 (53.1)	65 (14.5)
Cancer (112)	39 (34.8)	65 (58.0)	8 (7.1)
Proximal (34)	15 (44.1)	19 (55.9)	0 (0.0)
Distal (78)	24 (30.8)	46 (59.0)	8 (10.3)

\*MTHFR = methylenetetrahydrofolate reductase; <sup>†</sup> Parenthesis denote the number of cases.

Table 2. Comparison of MTHFR 677TT minor genotype with CC+CT major genotype among control & cancer group

	677 MTHFR genotype		OR (95% CI) <sup>†</sup>	Fischer's exact test P
	CC+CT (%)	TT (%)		
Control (448)*	383 (85.5)	65 (14.5)	1.0	-
Cancer (112)	104 (92.9)	8 (7.1)	0.42 (0.19~0.92)	0.056
Proximal (34)	34 (100)	0 (0.0)	N/A	0.014
Distal (78)	70 (89.7)	8 (10.3)	0.63 (0.29~1.40)	>0.05

\*parenthesis denote the number of cases; <sup>†</sup> odds ratio and corresponding 95% were estimated from logistic regression model; N/A = no assessment.

예 중 8예로 10.3%의 빈도를 보였다(Table 1).

대조군에 비해 환자군에서 TT형의 종양 위험도는 OR 0.42, P-value는 0.056으로 변경값(marginal value)을 보였다. 종양의 위치에 따라, 근위부 대장암에서는 TT형이 한 case도 없었으며 P=0.014의 의미 있는 결과를 보였다. 반면에 원위부에서의 TT형은 각각 OR 0.63, P>0.05로 통계학적인 의의가 없었다(Table 2).

2) MTHFR A1298C 유전자형 분석

대조군 448예의 유전자형 분포 결과 1298 AA형 312예(69.6%), AC형 128예(28.6%), CC형 8예(1.8%)로 AA형이 가장 많았다. 환자군 전체의 분포도 AA형 66예(58.9%), AC형 43예(38.4%), CC형 3예(2.7%)로 대조군과 분포가 비슷했으며 역시 AA형이 가장 많았다. 대립 유전자의 빈도(allele frequencies)는 대조군에서 A와 C 각각 83.9%, 16.1% 환자군에서 78.1%, 21.9%였다. 종양의 위치에 따른 변이 MTHFR 1298CC형의 빈도는 근위부 34예 중 1예(2.9%), 원위부 78예 중 2예(2.6%)로 차이가 없었다(Table 3). 또 MTHFR 677에서처럼 AA와 AC형을 한 그룹으로 변이형인 CC형과 비교했을 때, 전체 환자군에서나 종양의 위치에 따른 근위부, 원위부 각각에서도 OR이나 P-value에 의의가 없었다

Table 3. Distribution of MTHFR A1298C polymorphism, among control and cancer group according to tumor location

	1298 MTHFR genotype		
	AA (%)	AC (%)	CC (%)
Control (448)	312 (69.6)	128 (28.6)	8 (1.8)
Cancer (112)	66 (58.9)	43 (38.4)	3 (2.7)
Proximal (34)	15 (44.1)	18 (52.9)	1 (2.9)
Distal (78)	51 (65.4)	25 (32.0)	2 (2.6)

(Table 4).

본 연구에서 MTHFR C677T와 A1298C의 유전자형 빈도는 Hardy-Weinberg equilibrium에 일치하였다.<sup>23-25</sup>

고 찰

일반적으로 엽산(folic acid)의 결핍이나 엽산대사 장애는 발암 위험인자 중 하나인데 이는 DNA 메틸화의 과정에 엽산 대사가 관여하기 때문으로 알려져 있다. 엽산대사의 장애는 유전자에 전반적인 저메틸화나 촉진자(promoter)에 과메틸화를 일으킬 수 있으며 이러한 현상은 여러 종류의 암에서 공통적으로 관찰된다.<sup>12</sup> 즉 암유발유전자(oncogene) 혹은 종양억제 유전자(tumor suppression gene)의 메틸화 상태는 세포 성장 변형이나 억제에 선택적으로 관여할 수 있다. 그러나 한번의 유전적 사건으로 발암에 이른다고 설명하기에는 불충분하므로 메틸화의 상태변화 등 상유전적(epigenetic) 변화 또한 밀접히 관여하는 것으로 보여진다.<sup>26-28</sup>

MTHFR은 엽산대사에서 중심적인 역할을 하며 DNA 합성과 복구 및 DNA 메틸화에 중요한 역할을 한다. MTHFR은 5,10-methylenetetrahydrofolate (Methylene THF)을 5-methyl-tetrahydrofolate (5-methyl THF)로의 환원에 촉매 작용을 한다. 여기서 만들어진 5-methyl THF는 엽산의 주된 순환 형태로 호모시스테인이 메티오닌으로 재메틸화되는데 탄소원자의 공여자로서의 역할을 한다.<sup>13-15</sup>

MTHFR 유전자는 염색체 1p36.4에 위치하고 있으며 2가지의 대표적인 유전자 다양성이 있는데 염기서열 677 위치의 C가 T (C → T; alanine → valine)로 치환되는 형태와 1298의 A가 C (A → C: glutamate → alanine)로 치환되는 형태가 있다. 변이 유전자의 단백질 발현체는 열에 약하고 효소로서의 특이성이 감소되므로 점차

Table 4. Comparison of MTHFR 1298CC minor genotype with AA+AC major genotype among control and cancer group

	1298 MTHFR Genotype		OR (95% CI) <sup>†</sup>	Fischer's exact test P
	CC+CT (%)	TT (%)		
Control (448)*	440 (98.2)	8 (1.8)	1.0	-
Cancer (112)	109 (97.3)	3 (2.7)	1.51 (0.43 ~ 5.36)	>0.05
Proximal (34)	33 (97.1)	1 (2.9)	1.67 (0.27 ~ 10.70)	>0.05
Distal (78)	76 (97.4)	2 (2.6)	1.45 (0.34 ~ 6.17)	>0.05

\*parenthesis denote the number of cases; <sup>†</sup> odds ratio and corresponding 95% were estimated from logistic regression model.

5,10-methylene THF이 축적되는데 677C → T 다양성이 MTHFR 활동에 영향을 주는 주된 역할을 한다고 생각된다. 최근 677C → T의 변이형은 상승된 호모시스테인 농도를 보이게 되는데 이는 호모시스테인의 재메틸화 감소로 메티오닌합성의 감소에 이르게 되는데, 특히 엽산 섭취가 불충분할 때면 유전체의 DNA 합성 및 DNA 메틸화의 감소를 가져오게 된다. 그러나 아직 MTHFR 1298A → C 변이의 임상적인 의의는 명확히 밝혀져 있지 않다.<sup>15-18</sup>

본 연구에서는 MTHFR 677C → T의 homozygous variant (TT)에 특히 관심을 두었다. 즉 TT 유전자형은 호모시스테인으로부터 메티오닌의 전구 단계인 S-adenosylmethionine (SAM)으로의 메틸화가 많이 감소된다. DNA 메틸화를 위한 메틸기의 공여자로서 SAM은 근위부와 원위부 대장암의 종양형성 과정에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 TT 유전자 변이형의 전반적인 빈도가 대장암 환자군에서 대조군에 비해 낮으며 통계학적으로 변경값(marginal value, P=0.056)을 보이고 있다. 이는 역으로 생각해 보면 CC나 CT 유전자형에 비해 TT형의 유전자를 가진 집단에서 오히려 대장암의 발생률이 낮을 수 있음을 의미한다고 하겠다. 이러한 결과는 다른 보고들에서와 유사하다.<sup>28-30</sup> 특히 Chen 등<sup>28</sup>은 TT 변이형의 odd비값이 0.57로 본 저자들의 결과인 0.42와 유사한 값을 보였다. 이들은 TT 변이형의 유전자군에서 알코올을 과다 섭취는 발암의 강력한 위험요소이나 반대로 알코올의 섭취를 억제하고 메티오닌의 섭취를 높이면 훨씬 발암의 위험도를 감소(OR, 0.11~0.27)시킨다고 보고하였다. 따라서 이러한 유전자형 군에서 식이섭취에 있어서의 메틸기의 공급은 특히 중요하다고 하였다. 즉 고메틸기의 섭취로 TT 변이형에서 발암의 위험도를 줄일 수 있는 것은 5,10-methylene-tetrahydrofolate (MTHF) 농도를 높게 유지시켜 DNA 합성에 있어서의 불균형을 방지하는 데 있을 것이라고 하였다.

대장 내 원발암의 위치에 따른 차이를 살펴보았을 때, Toffoli 등<sup>20</sup>의 보고에서 TT 변이형의 빈도는 대조군 20%, 원위부 대장암군 20%, 근위부 대장암군에서 7%로, 뚜렷하게 근위부 암군에서 677TT형의 빈도 감소를 관찰할 수 있었고 OR 0.36이었는데, 이는 대조군과 비교해서 677TT 상동 변이형의 사람들에서는 근위부 대장암의 발암 위험도가 약 65%나 감소됨을 의미한다고 하였다. 본 연구의 결과에서도 원위부 대장암군에 비해서 확연하게 근위부 대장암군에서 MTHFR 677TT 유전자형의 감소를 관찰할 수 있는 바, OR 값을

얻을 수 없을 정도로 근위부 대장암군에서 이러한 유전자형은 한 예도 없었다. 그러나 두 연구 결과 모두 대조군과 비교해서 원위부 대장암군에서의 677TT형의 빈도 변화나 OR, 즉 발암 위험도의 의의 있는 결과를 보이지는 않았다.

따라서 이러한 결과는 근위부와 원위부 대장암의 발암과정에서 MTHFR 677TT 유전자형에 대한 상이한 역할의 가능성을 강하게 의미하며, 결국 근위부 대장암의 발암 기전에서 과메틸화와의 관련 있음을 뒷받침한다고 하겠다. 즉 근위부 대장암에서의 상대적으로 높은 빈도를 보이는 CC 정상 유전자형과 CT 이형접합성(heterozygous) 유전자형은 그 효소들의 역할에 큰 차이는 없으므로 CpG islands의 과메틸화가 보다 많이 일어난다고 할 수 있을 것이다.

반면에 MTHFR의 다른 유전자 다형으로 알려진 MTHFR 1298A → C은 염기서열 1298 부위의 아데닌이 시토신으로 치환된 경우인데, CC 변이 유전자형을 포함한 각 유전자형의 빈도나 분포에서의 뚜렷한 특징을 환자군에서나 대조군에서 발견할 수 없었다.

## 결 론

본 연구의 결과는 MTHFR의 유전자 다양성에 따라 대장암의 발암 위험도가 다를 수 있음을 보여주고 있다. 특히 근위부 및 원위부 대장암의 MTHFR C677T 유전자형 빈도가 대조군과 차이가 있어서 서로 다른 발암기전이 작용하고 있음을 추정할 수 있다. 따라서 한국인에서도 MTHFR C677T 유전자 다형이 대장암의 발병과 관련이 있을 것으로 생각된다.

## REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70.
2. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancer. Nature 1998;396:643-9.
3. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:2545-50.
4. Heim S, Mitelmann F. Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1994.
5. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. Curr Opin Genet Dev 1999;9:89-96.
6. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical

- outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69-77.
7. Haydon AM, Jass JR. Emerging pathways in colorectal cancer development. *Lancet Oncol* 2002;3:83-8.
  8. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-6.
  9. Lindblom A. Different mechanism in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol* 2001;13:63-9.
  10. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000;130:129-32.
  11. Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, Schweizer P, Aaltonen LA, de la Chapelle A, et al. Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and-unstable colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12661-6.
  12. Oyama K, Kawakami K, Maeda K, Ishiguro K, Watanabe C. The association between methylenedihydrofolate reductase polymorphism and promoter methylation in proximal colon cancer. *Anticancer Res* 2004;24:649-54.
  13. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:195-201.
  14. Shane B, Sokstad ER, Gregory JF. Folic acid metabolism in health and disease. New York: Willey-Liss; 1990.
  15. Goyette P, Summers JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
  16. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
  17. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
  18. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
  19. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12810-5.
  20. Toffoli G, Gafa R, Russo A, Lanza G, Dolcetti R, Sartor F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T polymorphism and risk of proximal colon cancer in north Italy. *Clin Cancer Res* 2003;9:743-8.
  21. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl HD, et al. The Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C → T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000;9:657-63.
  22. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:4862-4.
  23. Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2003;38:821-9.
  24. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997;18:869-82.
  25. Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, Stilgenbauer S, Muller-Hermelink HK, Bentz M, et al. Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 1997;57:4608-14.
  26. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997;95:2032-6.
  27. Markus HS, Ali N, Swaminathan R, Sankaralingam A, Molloly J, Powell J, et al. A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 1997;28:1739-43.
  28. Fujimura H, Kawasaki T, Sakata T, Ariyoshi H, Kato H, Monden M, et al. Common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene increases the risk for deep vein thrombosis in patients with predisposition of thrombophilia. *Thromb Res* 2000;98:1-8.
  29. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1098-102.
  30. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999;8:513-8.