

性激素结合蛋白基因多态性与肝细胞癌患者术后复发关系研究

刘 顺, 曾小云, 柏 桦, 许 杨, 张艳艳, 潘冬香, 毛良勤, 黄秋兰, 仇小强

基金项目: 广西科学研究与技术开发资助项目(编号:桂科攻 0993003D-4); 广西研究生教育创新计划资助项目(编号: 2011105981004M171)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室(刘 顺, 曾小云, 柏 桦, 许 杨, 张艳艳, 潘冬香, 毛良勤, 黄秋兰, 仇小强); 541004 广西, 桂林医学院公共卫生学院(仇小强)

作者简介: 刘 顺(1984-), 男, 在读研究生, 研究方向: 肿瘤分子流行病学。E-mail: leeshun2010@163.com

通讯作者: 仇小强(1957-), 男, 教授, 医学硕士, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤分子流行病学。E-mail: xqqiu9999@sina.com

[摘要] **目的** 探讨性激素结合蛋白(SHBG)基因 Asp327Asn 位点单核苷酸多态性与肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)根治术后早期复发的关系。**方法** 收集 131 例实施根治性切除术的原发性 HCC 患者临床病理、血液 DNA 及预后生存资料, 以单因素分析、多因素 Cox 风险回归分析临床病理及 Asp327Asn 位点多态性与 HCC 术后复发关系, 用 Kaplan-Meier 生存曲线描述各基因型的无复发生存时间, 并对不同基因型无复发生存曲线进行 Log-Rank 检验比较。**结果** 全组病例 1、2 年生存率分别为 87%、76%, 累积复发率分别为 17%、19%。单因素及多因素分析均显示结节数可能与术后复发有关, 而 Asp327Asn 位点多态性可能与术后复发无关。生存分析显示, 在单一结节数的 HCC 患者中, 虽然 Asp/Asn + Asn/Asn、Asp/Asp 基因型无复发生存时间比较差异无统计学意义($P=0.21$), 但生存曲线后半段明显分离。**结论** SHBG 基因 Asp327Asn 位点多态性可能与 HCC 术后复发无关, 但是对于肝脏基本状况较好的 HCC 患者, 该位点多态性可能对其术后远期预后有一定的影响。

[关键词] 肝细胞癌; 性激素结合蛋白; 单核苷酸多态性; 生存分析

[中图分类号] R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)05-0381-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.05.01

Association between SHBG-SNP Asp327Asn and recurrence of primary hepatocellular carcinoma after radical resection LIU Shun, ZENG Xiao-yu, BAI Hua, et al. Department of Epidemiology and Statistics, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the association between SHBG-SNP Asp327Asn and recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) after radical resection. **Methods** Materials of clinical pathology, blood DNA and prognosis survival of 131 HCC patients were collected. Univariate analysis and multivariate Cox regression analysis were used to detect the factors of recurrence of primary HCC after radical resection. The recurrence-free survival curves of genotypes of Asp327Asn were described by Kaplan-Meier analysis and the survival times were compared by Log-Rank test. **Results** The overall survival rate and cumulative recurrence rate for 1, 2 years were 87%, 76% and 17%, 19% respectively. Both univariate analysis and multivariate analysis showed only number of nodules but not the polymorphism of Asp327Asn was related to the recurrence of HCC after radical resection. Survival analysis showed that, among HCC patients with a single nodule, although the recurrence-free survival time of Asp/Asn + Asn/Asn and Asp/Asp genotypes had no statistical difference ($P=0.21$), the later part of the survival curves separated obviously. **Conclusion** Polymorphism of SHBG-SNP Asp327Asn may be not associated with recurrence of HCC after radical resection. However, polymorphism of the locus may have a certain influence on the long-term prognosis to those with a good liver basic condition.

[Key words] Hepatocellular carcinoma; Sex hormone-binding globulin; Single nucleotide polymorphisms; Survival analysis

肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma,HCC)的患者以男性为主。研究表明,性激素可能在HCC的发生和发展中起着重要的作用。研究发现血清睾酮水平升高可以影响男性HCC患者根治术后复发风险和远期生存率^[1],提示性激素相关因子亦可用于HCC术后复发风险评估。然而,血清性激素水平受多种因素影响,肝损害本身对激素水平也造成影响^[2]。因此,遗传标志物可能更客观地描述其水平的差异。性激素结合蛋白(Sex hormone-binding globulin,SHBG)又称睾酮-雌二醇结合球蛋白,是重要的性激素转运蛋白,SHBG基因单核苷酸多态性(SNP)可以影响血清中SHBG浓度。本研究旨在初步探讨SHBG基因Asp327Asn位点多态性与HCC根治术后早期复发的关系,为客观评估HCC复发风险及远期预后提供参考,现将研究结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 为2009-01~2010-12在广西医科大学附属第一医院、附属肿瘤医院收治符合根治性肝切除指征而行根治性肝切除术,术前未进行其他治疗,术后经病理诊断为HCC的患者共131例。其中男性110例,女性21例;年龄27~78(48.92±10.44)岁,HBV表面抗原(HBsAg)阳性109例,阴性22例。

1.2 研究方法

1.2.1 现场调查 采用统一的流行病学调查问卷,经患者知情同意后,由专门培训的调查员于术前对研究对象进行面对面调查,并查阅病历资料,内容包括基本情况、家族史、吸烟史、饮酒史、HBV标志物检测结果、影像学资料等。调查完成后采集研究对象外周血2 ml,采用常规酚-氯仿法提取全基因组DNA,-20℃保存备用。

1.2.2 基因分型 基因分型应用TaqMan MGB荧光实时定量PCR技术,PCR反应体系总体积为25 μl,包括2×TaqMan Universal PCR Mix 12.50 μl、20×SNP Genotyping Assay Mix 1.25 μl、模板DNA 1.00 μl、ddH₂O 10.25 μl。PCR反应条件为95℃×10 min→(92℃×15 sec→60℃×1 min)×40个循环。基因

分型试剂、7500 Fast 实时定量PCR仪、基因分型分析软件均购于美国应用生物系统(ABI)公司。为进行质量控制,每次检测设置2个空白对照及2个重复样本作为阳性对照;随机抽取5%的样本进行盲法复测,检测结果一致率为100%。

1.2.3 随访情况 观察起始点为肝癌根治性肝切除术后,随访采用门诊复查、电话随访相结合的方式进行,随访时间最短为2个月,最长为30个月,末次随访时间为2011-07-31。

1.3 统计学方法 数据录入与分析分别采用Epi-Data 3.0和SPSS13.0软件,计数资料比较采用χ²检验。应用Kaplan-Meier生存曲线描述各基因型的无复发生存时间,并对不同基因型无复发生存曲线进行Log-Rank检验,以Cox回归风险模型筛选复发影响因素并分析各基因型的复发风险。所有的统计学检验均为双侧概率检验,检验水准为α=0.05。

2 结果

2.1 术后复发生存状况 本组131例术后的随访率为90.8%(119/131),随访时间最长30个月,最短为2个月,中位随访时间为12个月。其中复发22例(20.1%,22/131),因HCC死亡22例(20.1%,22/131)。术后1年和2年生存率分别为87%和76%,累积复发率分别为17%和19%。

2.2 HCC根治术后复发相关因素分析 对HCC根治术后复发可能影响因素进行单因素分析,结果显示结节数可能与术后复发有关(χ²=6.00,P=0.01),Cox风险回归分析发现与单一结节个体相比,结节个数≥2个复发风险显著增高(OR=3.54,95%CI:1.22~10.32);SHBG基因Asp327Asn位点各基因型分布见表1。结果显示该位点多态性可能与术后复发无关(χ²=0.56,P=0.76);将携带有突变型等位基因Asn的基因型合并,亦未见该位点多态性与术后复发有关(χ²=0.04,P=0.85);Cox风险回归分析亦未见其与复发风险有关。其他因素,如性别、年龄、民族、吸烟史、饮酒史、乙肝表面抗原状态、肿瘤最大直径、有无癌栓等亦未见与术后复发有关。

表1 HCC根治术后复发影响多因素Cox风险回归分析

因 素	复发(例)	无复发(例)	b	χ ²	P	OR	OR 95%CI
结节个数	1	84	12			1	-
	≥2	16	8	1.27	5.38	0.02	3.54 1.22~10.32*
SHBG 基因型	Asp/Asp	96	18			1	-
	Asp/Asn	12	3	-10.31	≤0.01	0.80	0.29~4.93 ^Δ
	Asn/Asn	2	0	0.18	0.06	0.99	-
	Asp/Asn + Asn/Asn	14	3	-0.16	0.05	0.83	0.21~3.53 ^Δ

注: * Cox 风险回归,调整因素包括性别、年龄、民族、吸烟史、饮酒史、乙肝表面抗原状态、肿瘤最大直径、有无癌栓; ^Δ Cox 风险回归,调整因素除以上各项外加结节数

2.3 SHBG 基因 Asp327Asn 位点 SNP 与 HCC 根治术后无复发生存时间关系 将携带突变等位基因 Asn 基因型合并 (Asp/Asn + Asn/Asn), 与携带 Asp/Asp 基因型个体比较, 其无复发生存时间差异无统计学意义 ($P = 0.82$) (见图 1)。本组病例中, 因结节个数可能与术后复发有关, 故对其进行分层分析, 结果发现在单一结节数的 HCC 患者中, 上述基因型无复发生存时间比较差异无统计学意义 ($P = 0.21$), 但生存曲线后半段明显分离 (见图 2); 多因素 Cox 风险回归分析未见其复发风险有差异 ($OR = 3.24, 95\% CI: 0.57 \sim 18.33$, 调整因素包括性别、年龄、民族、吸烟史、饮酒史、乙肝表面抗原状态、肿瘤最大直径、有无癌栓); 在结节个数 ≥ 2 的 HCC 患者中, 上述基因型无复发生存时间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

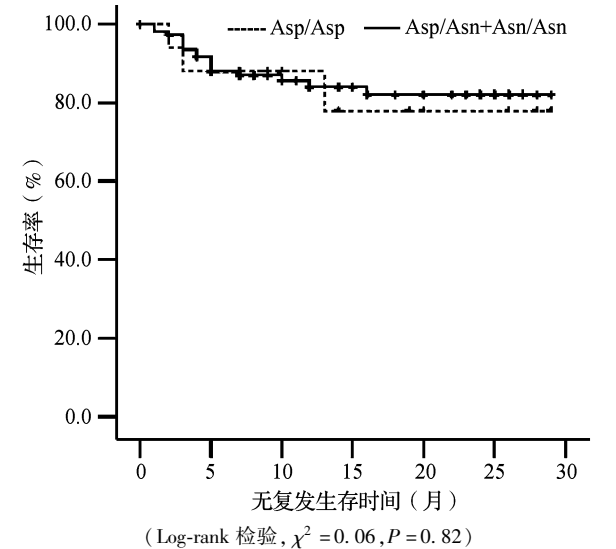


图1 HCC 患者不同基因型携带者术后无复发生存时间的比较

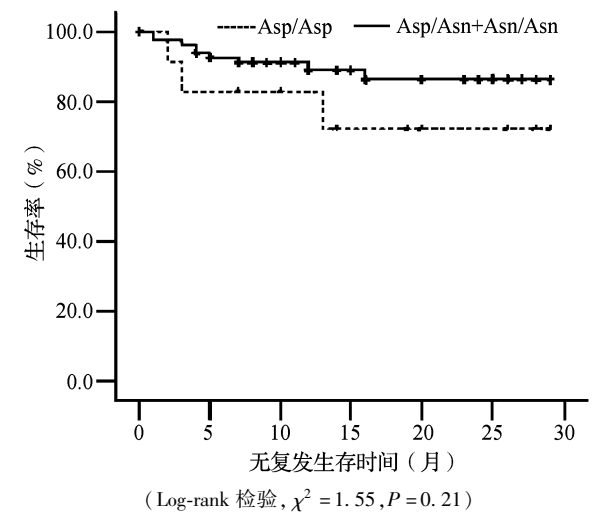


图2 单一结节 HCC 患者不同基因型携带者术后无复发生存时间比较

3 讨论

3.1 对于具有手术适应证的 HCC 早期患者, 手术切除可以获得 70% 的 5 年生存率, 而粗略估计又有 70% 的患者在 5 年内复发^[3], 其中, 术后复发有两个高峰, 一个是术后 2 年内, 称为早期复发, 多因肿瘤肝内转移蔓延; 另一个是术后 2 年以上, 称为晚期复发, 多因肿瘤在肝硬化区域重新生成^[3]。蔡荣耀等^[4]研究发现, 早期复发患者的 1、3、5 年总体生存率明显低于晚期复发患者。所以, 预防早期复发对于提高早期 HCC 患者肝切除术后远期生存率意义重大, 而寻找预后预测因素显得至关重要。近年来, 分子流行病学方面的预测因素越来越被研究者重视, 单核苷酸多态性 (SNP) 作为最常见的分子遗传标志, 自然地应用于肝癌发生风险评估及预后风险预测。

3.2 在外周血中 SHBG 转运雄激素和雌激素, 并调节性激素进入靶器官及其生物利用率。研究表明, SHBG 基因第 8 外显子 Asp327Asn 位点 SNP 与机体血浆中 SHBG 水平有关^[5,6], 可能影响机体内睾酮 (T) 与雌二醇 (E_2) 比率^[5], 因此该位点被用于多种激素相关性肿瘤易感性研究中。以往研究发现, 该位点多态性与前列腺癌、子宫内膜癌、乳腺癌^[7] 胃癌^[8] 及胆道癌^[9] 等发生风险有关。我们前期研究也发现该位点多态性与 HCC 发生及发病年龄提早有关, 提示该位点突变所导致的生物学效应在众多激素相关性肿瘤的发生和发展中起着重要的作用, 其是否可作为预后复发风险预测标志物, 值得探讨。我们的研究结果显示, 结节个数可能是 HCC 术后早期复发的独立预测因素, 但 SHBG 基因 Asp327Asn 位点多态性可能与术后复发无关; 然而, 在单一结节的患者中, Asp/Asp 与 Asp/Asn + Asn/Asn 基因型个体随着生存时间的增长, 无复发生存时间曲线明显分开, 提示对于肝脏基本状况较好的 HCC 患者, 该位点多态性可能对其术后远期预后有一定的影响; 基因多态性联合临床病理指标, 可能具有较好的预测能力。Villanueva 等^[3] 联合临床、病理、基因表达谱等数据构建预测模型能较好预测单一结节 HCC 患者术后复发, 提示综合预测模型可能具有更高的预测能力。性激素在肝癌的发生和发展中起到重要的作用, 综合性激素相关因子及临床病理指标构建的预后预测模型可能具有一定的临床研究价值, 值得进一步探讨。

综上所述, 本研究虽然未发现 SHBG 基因 Asp-327Asn 位点 SNP 与 HCC 术后复发有关, 但是发现

该位点多态性与临床病理指标联合应用于预后风险评估,可能具有一定的预测能力。因此,我们的研究有可能为综合预测模型的制定提供有意义的参考。目前,肝癌发生、发展有关的许多环境或遗传危险因子已阐明,但 HCC 转移和复发分子机制仍不清楚,高通量技术的应用加深了对肝癌细胞特性的认识^[10]。随着后基因时代的进展,基因组学、蛋白组学和表观基因组学等方面的新技术不断成熟。基于性激素相关因子及临床病理指标构建的 HCC 术后预后模型的适用性,可以结合基因组学、蛋白组学和表观基因组学方面的新技术进行探索。

参考文献

1 Lin MC, Wu CC, Cheng SB, et al. The influence of high serum testosterone levels on the long-term prognosis in male patients undergoing hepatectomy for early stage hepatocellular carcinoma without vascular invasion[J]. World J Surg, 2007, 31(7): 1469-1473.

2 Kuper H, Mantzoros C, Lagiou P, et al. Estrogens, testosterone and sex hormone binding globulin in relation to liver cancer in men[J]. Oncology, 2001, 60(4): 355-360.

3 Villanueva A, Hoshida Y, Battiston C, et al. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepato-

cellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2011, 140(5): e1501-e1512.

4 蔡荣耀, 黄志勇, 梁宾勇, 等. 原发性肝细胞癌根治术后肿瘤复发的影响因素及预后[J]. 中华消化外科杂志, 2011, 10(4): 263-266.

5 Dunning AM, Dowsett M, Healey CS, et al. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(12): 936-945.

6 Berndt SI, Chatterjee N, Huang WY, et al. Variant in sex hormone-binding globulin gene and the risk of prostate cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(1): 165-168.

7 Xita N, Tsatsoulis A. Genetic variants of sex hormone-binding globulin and their biological consequences[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 316(1): 60-65.

8 Freedman ND, Ahn J, Hou L, et al. Polymorphisms in estrogen and androgen-metabolizing genes and the risk of gastric cancer[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(1): 71-77.

9 Park SK, Andreotti G, Sakoda LC, et al. Variants in hormone-related genes and the risk of biliary tract cancers and stones: a population-based study in China[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(4): 606-614.

10 史炯, 钦伦秀. 肝细胞肝癌术后预后分子预测模型的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30(5): 402-406.

[收稿日期 2012-02-02][本文编辑 宋卓孙 韦颖]

课题研究 · 论著

温病湿热证大鼠 IL-23 表达水平的变化及应用加味藿朴夏苓汤干预后的影响

李曙光, 吕军影, 阙铁生, 常丽萍, 何雪萍

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:2010GXNSFA013146); 广西卫生厅中医药科技专项课题(编号:GZKZ 10-111)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院中医科

作者简介: 李曙光(1984-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合临床基础研究。E-mail: sanruan@163.com

通讯作者: 吕军影(1966-), 女, 大学本科, 医学学士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 脑病、风湿病的中西医结合诊治。

E-mail: lujunyiny007@163.com

[摘要] **目的** 观察大鼠血清与舌组织 IL-23 表达水平的变化以及应用加味藿朴夏苓汤干预后的影响, 探讨 IL-23 在湿热证发病中的作用和意义。**方法** 96 只大鼠随机分为正常组、模型组和干预组。多因素复合造模方法制备温病湿热证大鼠模型, 干预组第 25 天起予加味藿朴夏苓汤治疗, 连服 7 d。于造模后 4、24、48、72 h 四个时相点分批处死大鼠并取材。ELISA 法检测大鼠血清 IL-23 的水平, SP 免疫组化法检测舌组织 IL-23 的表达。**结果** 湿热模型组大鼠血清与舌 IL-23 表达水平在各时相点均显著高于正常组($P < 0.01$), 药物干预组则在各时相点均显著低于模型组($P < 0.01$)。随时间变化模型鼠血清与舌 IL-23 均呈逐渐下降趋势, 在 4 h 时最高, 血清 IL-23 的含量水平 48 h 和 72 h 时相点分别与 4 h 时相点比较差异有统计学意义($P <$