

題目：女性肝細胞癌之病因研究：一個多醫學中心之病例對照研究
Etiology of Hepatocellular Carcinoma in Females : A Multicenter
Case-Control Study

計劃編號：NSC 89-2314-B-002-372

執行期限：八十九年八月一日 至 九十年七月三十一日

主持人：于明暉

執行機構：台大公共衛生學院

中文摘要

對238名女性肝細胞癌病例和354名女性對照個案(包括選自一肝細胞癌的家族研究的188名無親屬關係的病例之女性血親和166名病例的姻親)進行CYP1B1及雄性荷爾蒙受體基因多形性分析。CYP1B1 432和453譯碼子的突變基因頻率在病例組各為7.3%和0%；在對照組各為8.8%和0.3%。具兩雄性荷爾蒙受體基因之CAG重複次數均在23以上的女性，相較於其他基因型，控制年齡後的對比值為1.82 (95%信賴區間：1.06-3.14)，帶兩個長基因的作用在B肝帶原者中較為顯著；尤其是年齡在53歲以下者(控制年齡後兩雄性荷爾蒙受體基因之CAG重複次數均在22以上的對比值：3.16；95%信賴區間：1.13-8.82)。以一等親肝細胞癌家族史進行分層分析，在具有一等親家族史的婦女中，兩雄性荷爾蒙受體基因中較短者上，其CAG重複次數和肝細胞癌危險性有正線性關係存在(線性趨勢檢定 $P=0.033$)，而在無家族史的婦女中，未見類似的相關。

英文摘要

Genetic polymorphisms in the CYP1B1 and androgen receptor (AR) were analyzed for 238 women with hepatocellular carcinoma (HCC) and 354 unrelated controls (comprising 188 biological and 166 non-biological relatives randomly selected from a family study). The mutant allele of the CYP1B1 polymorphism at codon 432 and 453 in exon 3 was found in 7.3% and 0% of cases, respectively. The corresponding figure for controls was 8.8% and 0.3%. Women with more than 23 AR-CAG repeats in both alleles had a significantly increased risk of HCC (age-adjusted odds ratio= 1.82; 95%

confidence interval [CI]= 1.06-3.14), compared with women harbouring only short alleles or a single long allele. The effect of harbouring two AR alleles with longer CAG-repeat lengths on the risk of HCC was more striking among hepatitis B carriers than among noncarriers, and particularly prominent among hepatitis B carriers under 53 years of age (age-adjusted odds ratio for having more than 22 repeats in both alleles= 3.16, 95% CI= 1.13-8.82). Stratification by a first-degree family history of HCC revealed a linear trend for increasing risk of HCC with an increasing number of CAG repeat in the shorter allele of a given genotype ($P=0.033$) among women with a first-degree family history of HCC. However, no such linear relationship was detected among those with no first-degree relative with HCC.

計劃緣由與目的

B或C型肝炎病毒慢性感染是臺灣地區肝細胞癌發生的主要致因，但只有一小部份的慢性肝炎病毒感染者會罹患肝細胞癌(1)。除了肝炎病毒，許多環境或內生性因子，主要包括：黃麴毒素暴露、抽菸、喝酒、和代謝酵素基因多形性(1-5)，已被發現增加男性B/C型肝炎感染者的罹病危險性，但目前對於女性罹病的危險因子則少有研究。

男性罹患肝細胞癌的危險性較女性高(1)。多個動物實驗顯示性荷爾蒙可能在肝細胞癌致病機轉中扮演重要的角色(6-10)。然而；除了合成性雄性類固醇荷爾蒙治療，口服避孕藥和肝細胞癌的相關性報告以外(11, 12)，目前有關內生性性荷爾蒙和人類肝細胞癌的研究仍相當稀少。

雌二醇在體內經碳-4位置氫氧化，形成可致癌產物，這個反應主要由CYP1B1負責

(13), CYP1B1也和許多環境中的致癌物代謝活化有關,包括多環狀碳氫化合物和異環胺(heterocyclic amines),對多種環境中的前致癌物質,其代謝活化的能力高於CYP1A1和CYP1A2。對鼠類的實驗,已發現CYP1B1經誘導可在肝組織表現。對CYP1B1基因序列的研究,發現分別在432和453譯碼子具有多形性,由於這兩個多形性位置是在第三外顯基因內一個主要和受質結合的血基質(heme)有關的部位,CYP1B1基因多形性在女性荷爾蒙相關的癌症發展過程中所扮演的角色,已受到關切,一篇乳癌的病例對照研究報告中,其研究結果並不支持CYP1B1基因多形性和乳癌危險性有關,但發現和雌性荷爾蒙受體的表現有關(14)。

雄性荷爾蒙受體基因第一外顯基因內具有CAG微星體(microsatellite)多形性,CAG重複次數和影響其他基因的轉錄作用呈反比(15),已有多篇報告探討此多形性和性荷爾蒙相關的癌症之危險性(15-19)。最近本研究小組對男性B型肝炎帶原者的病例對照研究和重疊病例對照研究中,發現較少的CAG重複次數增加肝細胞癌危險性,且和睪固酮濃度間具有累加模式的協同作用(20)。本研究小組對CAG重複次數和女性肝細胞癌的初步分析,反而出乎意料的發現CAG重複次數較多增加危險性,這個相關性只有在B型肝炎帶原者中達到顯著意義,由於這個初步分析只包括103名女性病例,其中只有43名B型肝炎帶原者,而且未分析雄性荷爾蒙受體基因多形性對肝細胞癌家族聚集的影響。利用在台北地區四家大型醫院廣泛收集的女性肝細胞癌病例,本研究小組本年度增加病例數至238名,再對這個問題深入分析。

結果

病例組包括238名確診的女性肝細胞癌病例,其中103名(44.2%)為B型肝炎帶原者(5名病例缺乏資料),C型肝炎病毒抗體陽性率為58.0%(7名缺乏資料)。對照組分為兩組,來自一家族研究(20),包括和本研究病例無關係之病例的母親和姐妹188

名,同一家只有一名女性血親進入分析,這組對照和一般族群比較,有較高的B型肝炎帶原率(48.7%);另一組對照個案是病例之無血緣關係的姻親166名。

對110名病例和182名對照初步分析CYP1B1 432和453譯碼子上多形性後,發現突變基因頻率在中國人相當低。CYP1B1 432和453譯碼子的突變基因頻率在病例組,分別為7.3%和0%;在對照組分別為8.8%和0.3%,病例組突變基因頻率和對照組相似,故未再繼續分析。

血親和姻親對照組在雄性荷爾蒙受體短(兩股染色體CAG重複序列較短)或長CAG基因上的分佈皆相似,故在相對危險性分析中將兩組合併。首先將CAG重複次數以連續變項放入對數複迴歸模式分析,在控制年齡以後,對所有研究個案的分析或對B型肝炎帶原狀態進行的分層分析中,均未發現顯著相關。但對一等親肝細胞癌家族史進行分層分析,發現在兩雄性荷爾蒙受體基因之較短者上,CAG次數影響家族史的危險性,在無家族史的婦女中,CAG重複次數和肝細胞癌無關;在有家族史的婦女中,每增加一次CAG的年齡控制後對比值(odds ratio, OR)為1.18(95%信賴區間:1.01-1.37;線性趨勢檢定 P 值=0.033)。

再將CAG重複次數分為兩組進行分析,利用sensitivity analysis找尋高危險性組別。結果發現無論長CAG基因如何分組,均和肝細胞癌無關,對短基因而言,重複次數在23次以上的年齡控制後OR為1.82(95%信賴區間:1.06-3.14)。在短基因上,具較長的CAG重複序列所增高的危險性對B型肝炎帶原者(重複次數在22次以上的年齡控制後OR:2.23;95%信賴區間:1.14-4.34)較非帶原者顯著(OR:1.24;95%信賴區間:0.69-2.22);尤其是較年輕的B型肝炎帶原者,重複次數在22次以上的年齡控制後OR達到3.16(95%信賴區間:1.13-8.82)。

討論

本研究並未發現CYP1B1基因多形性和

女性罹患肝細胞癌危險性相關，雖然以目前分析的樣本數，無法排除突變基因仍具有微小的作用存在，但以低基因頻率而言，突變基因的族群可歸因危險性必然相當低。

對雄性荷爾蒙受體CAG重複次數和女性肝細胞癌危險性的研究，大幅增加病例和對照組人數後，仍相當一致的發現具正相關存在。這個研究結果和對男性的研究發現較少的CAG重複次數增加肝細胞癌危險性相反 (20)，暗示雄性荷爾蒙受體可能在男性和女性肝細胞癌發展過程中扮演不同的角色。

事實上相對於多個病例對照研究已一致的發現較少的雄性荷爾蒙受體CAG重複次數，增加前列腺癌的危險性(15)，研究對於CAG重複次數和性荷爾蒙相關的女性癌症的分析結果相當不一致。一個對BRCA1突變基因攜帶者的追蹤研究，報告較多的CAG重複次數增加乳癌危險性(16)，但另一個病例對照研究並未發現類似的關係(17)。一個對卵巢癌的大型病例對照研究並未發現CAG重複次數和癌症危險性有關(18)，但對卵巢癌的case-series study發現早發的卵巢癌病例具有較短的CAG重複序列(19)。雖然目前不瞭解導致這些不一致結果的原因，但有可能同樣的雄性荷爾蒙受體基因型的作用，會因所在不同的內生性環境而異。

對於停經前期的女性而言，睪固酮濃度至少較男性低10倍。有研究已發現在缺乏睪固酮及其代謝產物dihydrotestosterone的情況下，其它因子也具有活化雄性荷爾蒙受體transcriptional activity的能力。體外實驗發現在特殊cofactor存在的狀況下，雌二醇可以和雄性荷爾蒙受體結合，並影響下游基因的表現(21)。如果在女性睪固酮濃度較低的狀況下，雌二醇可以和雄性荷爾蒙受體結合，引發不同的基因表現，則有可能雄性荷爾蒙受體CAG基因在男性和女性肝細胞癌發展過程中扮演不同的角色。這個猜測並非不可能，既然某些促進細胞分化的分子(如：維生素D)也可經由活化雄性荷爾蒙受體的路徑，促進細胞分化

(22)。另外；和這個假說相當一致的是，長CAG重複序列的作用對較年輕，停經前的女性較顯著，既然停經後使得雌性荷爾蒙急遽下降，如果本研究發現在女性中雄性荷爾蒙受體CAG基因和肝細胞癌的正相關確實是因雌性荷爾蒙介入的影響，那麼我們應該會看到在雌性荷爾濃度較高者，不同CAG重複次數之作用的差異更為明顯，因此相對危險性估計值較高。

計劃成果自評

本年度計劃目標為探討CYP1B1及雄性荷爾蒙受體基因多形性和肝細胞癌危險性的關係。研究結果達到原擬定目標。既然有關女性肝細胞癌的研究目前相當稀少，本研究結果將適合發表在世界知名的雜誌。

參考文獻

1. Yu MW, Chen CJ. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994;17:71-91.
2. Yu MW, Lien JP, Chiu YH, et al. Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. *J Hepatol* 1997;27:320-30.
3. Yu MW, Gladek-Yarborough A, Chiamprasert S, et al. Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995;109:1266-73.
4. Yu MW, Chiu YH, Chiang YC, et al. Plasma carotenoids, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, and risk of hepatocellular carcinoma: independent and interactive effects. *Am J Epidemiol* 1999;149:621-9.
5. Yu MW, Chiu YH, Yang SY, et al. Cytochrome P450 1A1 genetic polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers. *Br J Cancer* 1999;80:598-603.

6. Vesselinovitch SD, Itze L, Mihailovich N, et al. Modifying role of partial hepatectomy and gonadectomy in ethylnitrosourea-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1980;40:1538-42.
7. Kemp CJ, Leary CN, Drinkwater NR. Promotion of murine hepatocarcinogenesis by testosterone is androgen receptor-dependent but not cell autonomous. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7505-9.
8. Dunsford HA, Sell S, Chisari FV. Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res* 1990;50:3400-7.
9. Kim CM, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317-20.
10. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065-7.
11. Mokrohisky ST, Ambruso DR, Hathaway WE. Fulminant hepatic neoplasia after androgen therapy. *N Engl J Med* 1977;296:1411-2.
12. Yu MC, Tong MJ, Govindarajan S, et al. Nonviral risk factors for hepatocellular carcinoma in a low-risk population, the Non-Asians of Los Angeles County, California. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1820-6.
13. Hayes CL, Spink DC, Spink BC, et al. β -Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9776-81.
14. Bailey LR, Roodi N, Dupont WD, et al. Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5038-41.
15. Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, et al. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res* 1998;58:4497-504.
16. Rebbeck TR, Kantoff PW, Krithivas K, et al. Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen-receptor CAG repeat. *Am J Hum Genet* 1999;64:1371-7.
17. Spurdle AB, Dite GS, Chen X, et al. Androgen receptor exon 1 CAG repeat length and breast cancer in women before age forty years. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:961-6.
18. Spurdle AB, Webb PM, Chen X, et al. Androgen receptor exon 1 CAG repeat length and risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* 2000;87:637-43.
19. Levine DA, Boyd J. The androgen receptor and genetic susceptibility to ovarian cancer: results from a case series. *Cancer Res* 2001;61:908-11.
20. Yu MW, Cheng SW, Lin MW, et al. Androgen-receptor gene CAG repeats, plasma testosterone levels, and risk of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:2023-8.
21. Yeh S, Miyamoto H, Shima H, et al. From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5527-32.
22. Zhao XY, LY LH, Peehl DM, et al. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 actions in LNCaP human prostate cancer cells are androgen-dependent. *Endocrinology* 1997; 138:3290-8.