

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

雌性荷爾蒙相關因子和女性罹患肝細胞癌危險性：一個多醫學中心之病例對照研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-002-080-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學公共衛生學院公共衛生學系

計畫主持人：于明暉

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 9 月 19 日

題目：雌性荷爾蒙相關因子和女性罹患肝細胞癌危險性：一個多醫學中心之病例對照研究

**Female Hormone-Related Factors and Risk of
Hepato-cellular Carcinoma among Women: A Multicenter
Case-control Study**

計劃編號：NSC 91-2320-B-002-080

執行期限：九十一年八月一日 至 九十二年七月三十一日

主持人：于明暉

執行機構：台大公共衛生學院

中文摘要

全世界肝細胞癌發生率均是男性大於女性，雌激素可能在肝細胞癌發展過程中扮演一個角色，我們因此進行一個多醫學中心的病例對照研究，探討雌激素受體 α 和代謝相關的基因多形性(包括：cytochrome P450c17 α [CYP17], CYP19, CYP1A1, 和 UDP-glucuronosyltransferase 2B15)對肝細胞癌發展的作用。本研究包括 378 名女性肝細胞癌病例和 559 名對照個案(包括男性肝細胞癌病例之 343 名一等親和男女性病例之姻親 216 名)，對照個案係隨機選取自一個遺傳流行病學研究。病例組中 70% 帶有 CYP17 A1 基因，相比於 64.5% 的對照個案帶此基因。控制多變項以後，和 CYP17 A2/A2 基因型比較，異合子和 A1/A1 野生型基因同合子的對比值(和 95% 信賴區間)各為 1.68 (1.03, 2.74) 和 1.77 (0.97, 3.25)。UGT2B15 第 1 exon 上 T 變異型基因在病例組的比率為 64.3%，在對照組的比率為 69.2%。和 UGT2B15 G/G 基因型比較，異合子和 T/T 變異型基因同合子的多變項控制後對比值(和 95% 信賴區間)各為 0.61 (0.38, 0.97) 和 0.87 (0.46, 1.63)。我們並未發現其他基因多形性(包括 CYP19 第 4 intron 上 TTTA 微衛星重複序列變異、CYP1A1 3'-UTR T 多形性、及 ER α 第 1 intron 上 T C 多形性)和肝細胞癌危險性具顯著相關。

英文摘要

The incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) is higher in men than in women throughout the world. Estrogen may play some role in the development of HCC. We conducted a multicenter case-control study to investigate the effects of genetic polymorphisms in genes involved in estrogen transport (estrogen receptor [ER] α) and metabolism (cytochrome P450c17 α [CYP17], CYP19, CYP1A1, and UDP-glycuronosyltransferase 2B15) on the risk of HCC. A total of 378 women with HCC and 559 unrelated controls (comprising 343 biological and 216 non-biological relatives of patients with HCC) who were randomly selected from a genetic epidemiology study of HCC were included in this study. Seventy percent of cases either carried or was homozygous for the CYP17 A1 allele compared with 64.5% of

controls. The adjusted odds ratio [OR] (and 95% confidence interval [CI]) of HCC was 1.68 (1.03, 2.74) for heterozygosity of the A1 allele and 1.77 (0.97, 3.25) for the homozygous genotype A1/A1, as compared with A2/A2 genotype. The UGT2B15 exon 1 T variant allele was present in 64.3% of cases and 69.2% of controls. The adjusted OR (and 95% CI) was 0.61 (0.38, 0.97) for heterozygous women and 0.87 (0.46, 1.63) for women homozygous for the T/T variant allele, as compared with those homozygous for the wild-type allele G/G. No significant association with the risk of HCC was found for the CYP19 TTTA microsatellite repeat length in intron 4, CYP1A1 3'-UTR T C polymorphism, and ER α T C poly-morphism in intron 1.

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、和多種代謝酵素基因多形性(1-5)等，已被發現和增加男性 B 或 C 型肝炎慢性感染者之罹病的危險性有關，但目前對於女性罹病的危險因子則少有研究。

幾乎全世界均是男性罹患肝細胞癌的危險性較女性高(1)。多個動物實驗顯示內生性雌性荷爾蒙可能降低肝細胞癌危險性(6-10)。然而；對人類而言，目前對雄性荷爾蒙影響肝細胞癌發展的作用較為瞭解(11-13)，對雌性荷爾蒙而言，除了口服避孕藥和肝細胞癌的相關性報告以外(14)，有關內生性女性荷爾蒙和肝細胞癌的研究相當缺乏，且以往的研究有樣本數不足的困擾(15)。

本研究小組最近對女性肝細胞癌的病例對照研究，包括 218 名病例和 729 名對照個案，發現停經愈早和 50 歲以前切除卵巢增加肝細胞癌的危險性 (16)，此研究結果和過去大多數動物實驗所獲推論一致，雌性荷爾蒙可能降低肝細胞癌危險性。人類性荷爾蒙的狀態，雖有部份是受環境因子影響，但近年來的研究已發現大部份性荷爾蒙的狀態是由遺傳因子決定。研究女性荷爾蒙對疾病發展的作用，可以透過對相關女性荷爾蒙合成、異化、和轉運的基因標記進行研究。Cytochrome P450c17 α (CYP17)和 CYP19 在女性荷爾蒙合成路徑扮演重要角色，合成的女性荷爾蒙會經 CYP1A1 和 Uridine diphospho-glucuronosyltransferases (UGTs)等酵素催化的異化反應，或和雌性荷爾蒙受體(estrogen receptor, ER)結合，影響基因的表現(17)。

本研究假說為女性荷爾對肝細胞癌發生具有保護作用。在本年度計劃結止前，我們已選擇以上基因之單核甘多形性或微衛星標誌，對 378 名女性肝細胞癌病例和 559 名女性對照個案進行分析。這些基因標記的選擇主要以可能影響功能，或過去的研究顯示和性荷爾蒙有關的癌症發生或預後有關為依歸。

結果

病例組包括 378 名確診的女性肝細胞癌病例，其中 172 名(46.6%)為 B 型肝炎

帶原者(9名病例缺乏資料),C型肝炎病毒抗體陽性率為52.9%(17名缺乏資料)。對照組來自一肝細胞癌家族研究,包括男性病例的女性一等親屬343名(高危險性對照),同一家只有一名女性親屬進入分析,另外納入男女性病例之姻親216名為對照個案(一般對照)。對照組B型肝炎帶原率和C型肝炎病毒抗體陽性率各為41.2%和3.4%。

本研究分析的標誌包括:CYP17之5'-UTR位置T C變異、CYP19之intron 4上(TTTA)_n重複序列、CYP1A1之3'-UTR位置T C變異、UGT2B15之exon 1位置G T變異、和ER α 之intron 1上T C變異。高危險性對照和一般對照之各基因標記的基因型分佈無顯著差異,因此之後在計算odds ratio (OR)時兩組合併和病例組比較。

在對照組中,所有基因標誌的基因型分佈均符合哈-溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)。CYP17之A2/A2、A1/A2和A1/A1基因型在對照組的頻率各為:35.4%、47.8%和16.7%;在病例組的頻率各為:29.6%、50.4%和20.0%。和A2/A2基因型比較,A1/A2和A1/A1基因型之單變項OR各為1.26(95%CI:0.94-1.70)和1.43(95%CI: 0.98-2.10)。ER α 之p/p、P/p和P/P基因型在對照組的頻率各為:41.5%、44.8%和13.7%;在病例組的頻率各為:36.8%、47.3%和15.9%。和p/p基因型比較,P/p和P/P基因型之單變項OR各為1.19(95%CI: 0.90-1.59)和1.31(95%CI: 0.88-1.95)。CYP1A1之m1/m1、m1/m2和m2/m2基因型在對照組的頻率各為:36.4%、48.5%和15.1%;在病例組的頻率各為:33.3%、49.2%和17.5%。和m1/m1基因型比較,m1/m2和m2/m2基因型之單變項OR各為1.11(95%CI: 0.83-1.48)和1.26(95%CI: 0.85-1.87)。UGT2B15之G/G、G/T和T/T基因型在對照組的頻率各為:30.8%、52.7%和16.5%;在病例組的頻率各為:35.7%、45.6%和18.7%。和G/G基因型比較,G/T和T/T基因型之單變項OR各為0.75(95%CI: 0.56-1.00)和0.97(95%CI: 0.66-1.43)。CYP19上(TTTA)_n重複序列變異範圍為7-13次,病例組和對照組在此重複序列數目的分佈上相當接近。

在控制年齡、一等親肝癌家族史、HBsAg和anti-HCV狀態、以及其他基因多形性的作用後,只有CYP17和UGT2B15的作用達到統計顯著意義水準,其他基因多形性的OR變動不大。對CYP17而言,和A2/A2基因型比較,A1/A2和A1/A1基因型之OR各為1.68(95%CI: 1.03-2.74)和1.77(95%CI: 0.97-3.25)。對UGT2B15而言,和G/G基因型比較,G/T和T/T基因型之OR各為0.61(95%CI: 0.38-0.97)和0.87(95%CI: 0.46-1.63)。

對各基因多型性兩兩進行累乘模式的交互作用分析,均未發現具統計顯著意義。

討論

本研究係利用candidate gene approach進行病因研究,是否能達成研究目的,所選擇分析的雌激素相關基因多形性和功能的關係,是決定成敗的關鍵因素之

一。五個基因標記中，以 CYP17 和 CYP1A1 兩個基因變異型和酵素功能的關係有較完整的研究 (18, 19)，因之瞭解較為透徹。我們選擇其他 3 個基因多形性的理由，主要來自它們和其他受性荷爾蒙影響之疾病存有相關的報告 (20-22)。因此；若發現這 3 個基因多形性和肝細胞癌具顯著相關，需要特別考慮和同一條染色體相鄰基因，因連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) 之故，導致次級相關的可能性。

在多變項複迴歸分析中，我們發現只有 CYP17 和 UGT2B15 的作用達到統計顯著意義水準。CYP17 是雌激素合成路徑的酵素基因，以往 CYP17 5'-UTR 位置之基因多形性和血清雌激素濃度的相關性研究中，已發現帶有 A2 變異型基因，雌激素濃度顯著較高 (18)，大部份病例對照研究也發現，和 A1/A1 基因型比較，A2/A2 基因型和增加的乳癌罹病危險性有關(17)。本研究卻發現帶有 A1 基因，增加肝細胞癌之危險性。有一篇報告指出 UGT2B15 之 exon 1 位置上 G T 變異，導致酵素的催化效率增加兩倍(20)，本研究發現帶有 T 基因者，肝細胞癌的危險性下降，但並無 allelic dosage effect。

以目前具統計顯著意義的結果觀之，CYP17 A2 基因相對於 A1 基因增加雌激素濃度，我們發現帶 A1 基因增加肝細胞癌罹病危險性，支持本研究假說-雌激素對肝細胞癌具保護作用。但 UGTs 和雌激素的異化代謝有關，本研究發現帶 UGT2B15 快代謝基因降低危險性，似乎並不符合雌激素對肝細胞癌具保護作用的假說，但有關 UGT2B15 exon 1 位置上 G T 變異和功能的相關性，迄今僅一篇報告(20)，除了需要考慮連鎖不平衡的影響外，UGTs 也和多種環境中致癌物的去活性有關(23)，因此本研究所發現 UGT2B15 T 基因和肝細胞癌相關的機轉，未來有必要深入探討。

本研究中各基因多形性的相對危險性均不高 (在 2 倍以下)，我們並未發現任兩個基因多形性間具有基因-基因交互作用存在，但是否存在 3 個基因多形性以上的交互作用關係，以目前本研究的樣本數而言，按以往傳統的分層分析或邏輯斯複迴歸模式，分析 3 個因子以上的交互作用均有困難。

另外；傳統的交互作用分析，大多需要先建立特定的前提假說，但 3 個以上的因子，其間的交互作用也可能透過複雜的生物機轉，牽涉非線性關係的複雜數學模式，因此在多基因交互作用的探討上，未來需要引入或發展類似 data mining，不需先建立前提假設的分析方法。先在眾多候選基因標記間篩選出一組可能具有交互作用的基因，再就特定的一組基因進行深入分析。目前所發展的 multifactor-dimensionality reduction approach 即可應用在初步多基因交互作用的分析，這個方法最近被成功的應用在一個雌激素路徑基因和乳癌的病例對照研究 (24)，本研究室已開始有關此法程式的撰寫，不久之後將可應用於此病例對照研究的再分析。

另一個在考慮本研究之效度需要思考的問題是，本研究的對照組包括未進入研究之男性病例的女性一等親屬，雖然這群一等親屬和姻親對照組比較，各基因多形性的基因頻率均無統計顯著差異，但些微的差異並不易達到統計顯著意義。為

了解決對照組之 comparability 的問題，我們已開始增加收集和病例無血緣關係的對照個案，目前已收集約 100 名對照個案，在近期將可對這群對照個案施行這 5 個基因多形性的實驗分析，我們預期 3-4 個月後，將可收集齊 540 名對照個案，合併原有的 216 名姻親對照個案，每名病例具兩名配對的對照個案，相信研究結論將更具有說服力。

計劃成果自評

本年度計劃目標為探討雌激素路徑基因多形性和女性罹患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病因探討的研究，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 hepato-carcinogenesis. *Cancer Res* 1980;40:1538-42.
7. Kemp CJ, Leary CN, Drinkwater NR. Promotion of murine hepato-carcinogenesis 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. Mokrohsy ST, Ambruso DR, Hathaway WE. Fulminant hepatic neoplasia after androgen therapy. *N Engl J Med* 1977;296:1411-2.
12. 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.

13. Yu MW, Yang YC, Yang SY, et al. Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1644-51.
14. 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.
15. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, et al. Reproductive factors and the risk of hepatocellular carcinoma in women. *Int J Cancer* 1992;52:351-4.
16. Yu MW, Chang HC, Chang HC, et al. Role of Reproductive Factors in Hepatocellular Carcinoma: Impact on Hepatitis B and C-Related Risk. *Hepatology* 2003 (in press).
17. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344: 276-85.
18. Feigelson HS, Shames LS, Pike MC, et al. Cytochrome P45017 α gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res* 1998;58:585-7.
19. Landi MT, Bertazzi PA, Shields PG, et al. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics* 1994;4:242-6.
20. Lampe JW, Bigler J, Bush AC, et al. Prevalence of polymorphisms in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4(D458E), UGT2B7(H268Y) and UGT2B15 (D85Y). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:329-33.
21. Kristensen VN, Andersen TI, Lindblom A, et al. A rare CYP19 (aromatase) variant may increase the risk of breast cancer. *Pharmacogenetics* 1998;8:43-8.
22. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996;11:306-11.
23. Green MD, Oturu EM, Tephly TR. Stable expression of a human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B15) with activity toward steroid and xenobiotic substrates. *Drug Metab Dispos* 1994;22:799-805.
24. Ritchie MD, Hahn LW, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* 2001;69:138-47.