

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

建立一個女性肝細胞癌的多基因致病模式：病例對照研究

(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-002-147-

執行期間：92年08月01日至93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

計畫參與人員：張順喬，陳愷瑤，楊士儀，廖運範，林錫銘，李壽東，陳培哲，劉俊人，林志陵

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 24 日

計劃名稱：建立一個女性肝細胞癌的多基因致病模式：病例對照研究

計劃編號：NSC 92-2320-B-002-147 (92/08/01~93/07/31)

主持人：于明暉

前言

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma ; HCC) 的發生率具有相當顯著的性別差異，性比例介於 2-4 倍間。雖然 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus ; HBV) 慢性感染是臺灣地區 HCC 高發生率的主因，但根據以往的研究，男性之 HBV 慢性感染率和女性相似(1, 2)。HCC 的發生和慢性 B 或 C 型肝炎病毒持續感染所引起的肝炎、肝硬化高度相關 (2)，而慢性肝炎和肝硬化的危險性，也是男性較女性為高 (3, 4)。

男女 HCC 罹病率的差異，可能和環境因子暴露的不同有關 (5)，如臺灣地區一般女性之抽菸喝酒習慣的盛行率遠低於男性。但性荷爾蒙的不同，也可能是一個解釋這個差異的主要原因。我們已經進行了一個生殖因子和 HCC 的病例對照研究，此研究中包括 218 名罹病婦女和 729 名對照個案，分析結果顯示在控制主要干擾因子之後，生產數愈多，HCC 的危險性愈低，早期停經、或自然停經前切除卵巢增加 HCC 危險性，使用口服避孕藥或荷爾蒙補充治療降低危險性；尤其是使用荷爾蒙補充治療；隨使用期間延長，HCC 危險性顯著下降，以上這些雌激素相關因子的作用並不隨 HBV 帶原狀態或是否具有 HCV 慢性感染而變異 (6)。這些發現指出高雌激素暴露可能對 HCC 具有保護作用。

個體間雌激素濃度的差異受到遺傳因子的重要影響，目前其代謝和訊息傳導路徑中許多蛋白質；大部份是酵素，已被報告具有遺傳多形性存在(7-9)，可能和個體間差異有關。為深入瞭解內生性雌激素狀態對女性 HCC 發展的影響，去年我們已針對 *CYP17*、*CYP19*、*CYP11A1*、*UGT2B15* (UDP-glucuronosyltransferase 2B15)和雌激素受體 (estrogen receptor ; ER)等五個和雌激素合成、異化及訊息傳導有關的基因多形性對 378 名罹病婦女和 559 名對照個案進行基因型分析，今年截至目前為止，我們進一步完成和合成、異化有關的三個基因包括 *HSD17B1*、*CYP1A2*、和 *COMT*，並針對以上八個基因，利用 multifactor-dimensionality reduction (MDR)方法(10, 11)進行初步複雜交互作用分析。

研究個案和方法

本研究是採病例對照研究設計。HCC 的診斷是採以下兩個標準之一：1)病理組織切片或細胞學檢查確診；或 2) α -胎兒蛋白 ≥ 400 ng/ml 且合併至少一項影像檢查(包括：血管攝影、超音波、電腦斷層掃描和磁振造影) 陽性。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 HCC 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%。

本研究利用 PCR-RFLP 分析 CYP17 5'-UTR T→C 變異、HSD17B1 exon 6 A→G 變異、CYP1A1 3'-UTR T→C 變異、CYP1A2 5'-UTR G→A 變異、COMT exon 4 G→A 變異、和 ER α intron 1 T→C 變異。UGT2B15 exon 1 G→T 變異是利用 real time quantitative PCR 分析。CYP19 之 intron 4 上(TTTA)_n重複序列則先進行 PCR 後，再以 GeneScan 軟體測 DNA 精確長度。

對照組中每個基因標記是否處於哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)狀態是利用適合度 (goodness-of-fit)檢定。單變項和多變項控制後相對危險性是利用 unconditional logistic regression model 估計，多基因間複雜交互作用是參考 Ritchie 和 Hahn 等人發展的 MDR 方法(10, 11)撰寫 SAS IML 程式進行分析。所有的統計檢定均為雙尾檢定。

結果

在對照組中，所有基因標記的基因型分佈均符合哈-溫平衡。我們首先分析各基因的獨立作用。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，CYP1A2 和 HCC 呈邊緣性統計相關。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 CYP1A2 而言，和 G/G 基因型比較，G/A 和 A/A 基因型之 OR 各為 1.12 (95%CI= 0.70-1.80)和 2.37 (95%CI= 0.97-5.77)。兩兩基因間並未呈現值得注意的交互作用。

利用 MDR 進行多基因交互作用的模式篩選，分析結果發現包括 ER α 和 CYP1A1 之兩個基因模式的 cross-validation prediction error 最低 (44.73%)，但是 cross-validation consistency 只有 0.6。故選擇 cross-validation prediction error (45.66%) 次之的五個基因模式；包括：ER α CYP17、HSD17B1、CYP1A1 和 UGT2B15，其 cross-validation consistency 為 8.5，也就是說十次交差驗證中出現此相同模式的平均數目為 8.5 次，在此模式下，cross-validation prediction error 和 cross-validation consistency 這兩個值經 1000 次 permutation testing，獲得 P 值分別為 <0.002 和 0.073。

接著對 MDR 所篩選出的五個基因模式所包含的基因以 additive model 進行

交互作用分析，在控制年齡、一等親肝癌家族史、HBsAg 和 anti-HCV 狀態、以及 CYP1A2、COMT 和 CYP19 等基因多形性的作用後，帶有<1、2、3、4、5 個危險性基因的 OR 各為 1.00 (基準組)、1.59 (95% CI=0.76-3.34)、2.38 (95% CI=1.15-4.96)、2.29 (95%CI= 0.98-5.32)、和 6.54 (95% CI=1.62-26.41)。

討論

動物實驗已發現雌性動物切除卵巢增加 HCC 的發生率(12, 13)，本研究室之前的病例對照研究也發現切除卵巢的女性有顯著較高的 HCC 危險性(6)。雖然這樣的研究支持雌激素和 HCC 有關的假說，但必竟卵巢切除代表內生性雌激素環境急遽的變化，要瞭解生理正常範圍雌激素對 HCC 發展的作用，需要利用生物標記。

目前已知內生性性荷蒙狀態有大部份受到遺傳的影響(7-9)。雌激素訊息傳遞路徑已有許多基因都被發現有多形性(polymorphism)，且部份多形性的變異和基因功能有關 (7-9)。本研究係利用這些基因多形性標記探討生理正常範圍之雌激素狀態和 HCC 發展的關係。我們初步分析獨立作用，發現各基因多形性之相對危險性的估計值均不高 (在 2 倍以下)，且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，若以傳統的分層分析或邏輯斯複迴歸模式進行探討，大多數研究皆會遭遇樣本數不足的困難；即使是具有上千名病例和對照的大型研究。

為探討二十個基因以下的交互作用，Ritchie 和 Hahn 等人已發展出一種 multifactor-dimensionality reduction (簡稱 MDR)的方法，且成功的使用在對乳癌相關的十個基因多形性之交互作用分析(10, 11)。我們嘗試利用 MDR 方法篩選多個基因的交互作用模式，結果發現包含 ER α 、CYP17、HSD17B1、CYP1A1 和 UGT2B15 五個基因的交互作用模式是最佳模式。接著以 additive model 對這五個基因進行分析，結果發現和帶有一個以下危險性基因者相比，具有五個危險基因者的相對危險性估計值可達 6 倍以上。既然這五個基因多形性中只有 CYP17 和 UGT2B15 具顯著的獨立作用，且獨立作用的相對危險性估計值在 2 倍以下，而五個基因的協同交互作用可達 6 倍以上，此現象反應出對於像 HCC 這樣的複雜疾病，大部份罹病者的機轉和 polygenic model 有關，分析多個基因交互作用模式實有其重要性。

本研究亦發現部份做為對照組的 HCC 病例一等親屬，在少數基因多形性的分佈和姻親對照不同。為進一步釐清這些基因多形性和 HCC 的關係，和正確估計相對危險性指標，本研究已另外選取 300 名無相關對照，且準備進行實驗分析。

參考資料

1. Yu MW, Tsai SF, Hsu KH, et al. Epidemiologic characteristics of malignant neoplasms in Taiwan. II Liver cancer. *J Natl Public Health Assoc (ROC)* 1988; 8: 125-38.
2. Yu MW, Chen CJ. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994; 17: 71-91.
3. Chu CM, Liaw YF, Sheen IS, et al. Sex difference in chronic hepatitis B virus infection: an appraisal based on the status of hepatitis B e antigen and antibody. *Hepatology* 1983; 3: 947-50.
4. Lin TM, Tsu WT, Chen CJ. Mortality of hepatoma and cirrhosis of liver in Taiwan. *Br J Cancer* 1986; 54: 969-76.
5. Chen CJ, Liang KY, Chang AS, et al. Effects of hepatitis B virus, alcohol drinking, cigarette smoking and familial tendency on hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1991; 13: 398-406.
6. Yu MW, Chang HC, Chang SC, et al. Role of reproductive factors in hepatocellular carcinoma: impact on hepatitis B and C-related risk. *Hepatology* 2003; 38: 1393-1400.
7. Thompson PA, Ambrosone C. Molecular epidemiology of genetic polymorphisms in estrogen metabolizing enzymes in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000; 27: 125-34.
8. Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J. Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000; 27: 113-24.
9. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 276-85.
10. Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 138-47.
11. Hahn LW, Ritchie MD, Moor JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics* 2003; 19: 376-82.
12. Vesselinovitch SD, Itze L, Mihailovich N, Rao KV. Modifying role of partial hepatectomy and gonadectomy in ethylnitrosourea-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1980; 40: 1538-42.
13. Nakatani T, Roy G, Fujimoto N, Asahara T, Ito A. Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 249-56.