

单核苷酸多态性与原发性肝癌易感性及临床病理学的相关分析

唐豪言, 潘正龙, 荣翔, 王小磊, 刘小方*

青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院肝胆胰脾外科, 山东 烟台

收稿日期: 2023年3月5日; 录用日期: 2023年3月29日; 发布日期: 2023年4月10日

摘要

目的: 探讨单核苷酸多态性(SNP)与本地区原发性肝癌(PHC)遗传易感性的关系, 并探究SNP位点数目与肝癌患者临床病理学的相关性。方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术检测234例肝癌患者和234例阴性对照的27个PHC相关SNP位点基因型和等位基因分布频率, 并分析SNP位点与PHC遗传易感性、肝癌患者临床病理学和SNP位点数目相关性。结果: 1) *miR-34b/c*基因rs4938723位点CC基因型(调整OR = 1.736, 95%CI: 1.036~2.910, P = 0.036)、*EGF*基因rs4444903位点GG基因型(调整OR = 1.841, 95%CI: 1.103~3.071, P = 0.019)具有更高的PHC患病风险; *KIF1B*基因rs17401966位点GG基因型具有更低的PHC患病风险(调整OR = 0.540, 95%CI: 0.314~0.930, P = 0.026); 分层分析结果显示在男性(P = 0.039)和饮酒(P = 0.025)的人群中*EGF*基因rs4444903位点基因型GG相比AA + AG基因型PHC发病风险增加; 在女性(P = 0.013)、年龄 < 60岁(P = 0.026)及不饮酒(P = 0.039)人群中*KIF1B*基因rs17401966位点GG基因型相比AA + AG基因型PHC发病风险降低。2) SNP位点数目与门静脉癌栓发生率增加有关(调整OR = 1.122, 95%CI: 1.005~1.251, P = 0.040)。结论: *miR-34b/c*基因rs4938723、*EGF*基因rs4444903、*KIF1B*基因rs17401966单核苷酸多态性与本地区PHC风险相关, SNP位点数目与肝癌患者临床病理学具有相关性。

关键词

原发性肝癌, 单核苷酸多态性, 遗传易感性, 临床病理学, 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术

Correlation Analysis of Single Nucleotide Polymorphism with Susceptibility and Clinicopathology of Primary Hepatic Carcinoma

Haoyan Tang, Zhenglong Pan, Xiang Rong, Xiaolei Wang, Xiaofang Liu*

*通讯作者。

文章引用: 唐豪言, 潘正龙, 荣翔, 王小磊, 刘小方. 单核苷酸多态性与原发性肝癌易感性及临床病理学的相关分析[J]. 临床医学进展, 2023, 13(4): 5193-5204. DOI: 10.12677/acm.2023.134736

Abstract

Objective: To investigate the relationship between single nucleotide polymorphism (SNP) and genetic susceptibility to primary hepatic carcinoma (PHC) in local population, and to explore the correlation between the number of SNPs and clinicopathology in patients with PHC. **Methods:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the genotype and allele distribution frequency of 27 PHC-associated SNPs in 234 hepatocellular carcinoma patients and 234 negative controls, and to analyze the correlation between SNPs and genetic susceptibility to PHC, clinicopathology of hepatocellular carcinoma patients and the number of SNPs. **Results:** 1) The *miR-34b/c* gene loci rs4938723 CC genotype (adjusted *OR* = 1.736, 95%CI; 1.036~2.910, *P* = 0.036) and *EGF* gene loci rs4444903 GG genotype (adjusted *OR* = 1.841, 95%CI; 1.103~3.071, *P* = 0.019) had a higher risk of PHC. The *KIF1B* gene loci rs17401966 GG genotype (adjusted *OR* = 0.540, 95%CI; 0.314~0.930, *P* = 0.026) had lower risk of PHC. The stratification analysis showed that *EGF* rs4444903 GG genotype had a higher risk than AA + AG genotype in male (*P* = 0.039), and alcoholic population (*P* = 0.025), *KIF1B* rs17401966 GG genotype had a lower risk than AA + AG genotype in female (*P* = 0.013), age < 60 years (*P* = 0.026) and non-alcoholic population (*P* = 0.039). 2) More SNPs resulted in higher incidence of portal vein carcinoma thrombosis (adjusted *OR* = 1.122, 95%CI; 1.005~1.251, *P* = 0.040). **Conclusion:** Single nucleotide polymorphisms in *miR-34b/c* gene rs4938723, *EGF* gene rs4444903, and *KIF1B* gene rs17401966 were associated with PHC risk in the region, and the number of SNPs correlated with clinicopathology in patients with hepatocellular carcinoma.

Keywords

Primary Hepatic Carcinoma, Single Nucleotide Polymorphism, Genetic Susceptibility, Clinicopathology, PCR-RFLP

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

原发性肝癌(Primary hepatic carcinoma, PHC)在世界范围内发病率和死亡率位居恶性肿瘤第六位和第四位。PHC 主要由乙型肝炎病毒慢性感染所致, 中国是乙肝大国, 国家癌症中心数据显示, 2015 年中国肝癌发病率为 17.35/10 万, 男性为 26.15/10 万, 女性为 8.54/10 万[1], 肝癌发病率高居我国恶性肿瘤的第四位[2]。目前手术仍是 PHC 主流的治疗方案, 但治愈率不高, 生存周期短, 死亡率高居我国恶性肿瘤第二位[3]。PHC 的发生发展由环境 - 遗传共同决定的, 特别是与个体间基因型的遗传多态性密切相关[4]。全基因组分析关联研究(Genome-wide association studies, GWAS)是目前研究变异基因位点最常使用的方法, GWAS 能对 PHC 相关单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)位点进行筛查和关联分析, 确定了许多肝癌易感性、临床病理学相关的位点, 但流行病学调查后发现 PHC 在群体中表现出易感

个体和种族差异性[5] [6]。先前被筛选出的 SNP 位点是否在中国人群的 PHC 演变过程中也起着作用, 又是否与本地区 PCH 遗传易感性相关尚不清楚, 故选取 27 个 PHC 相关 SNP 位点对本地区人群进行研究。

2. 资料与方法

2.1. 一般资料

选自 2014 年 1 月至 2021 年 1 月在青岛大学附属烟台毓璜顶医院接受手术治疗的 PHC 患者 234 例与该院健康体检居民 234 例。病例纳入标准: 具备 PHC 的诊断, 诊断依据为《原发性肝癌诊疗规范(2019 年版)》; 临床检验、检查、病理及手术资料保存完整; 既往无其他癌症诊断史。对照纳入标准: 无 PHC 病史; 既往无其他癌症的诊断史; 与病例组来自同一地区。试验对象对试验知情同意, 且通过医院医学伦理委员会批准。病史采集和标准化问卷收集研究对象年龄、性别, 吸烟、饮酒情况, 乙型病毒性肝炎、肝硬化病史, 同时收集 PHC 患者相关临床病理学数据: 肿瘤大小、有无远处转移、有无门静脉癌栓及有无卫星灶。

2.2. SNP 位点的选择

利用 TRANSFACR 预测软件在 NCBI dbSNP 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)筛选出与 PHC 相关的 SNP 位点, 其选择标准为 1) SNP 位点的最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) > 0.05; 2) 低连锁不平衡(LD 值: $r^2 < 0.8$); 3) SNP 位点处于启动子区、外显子区、5'UTR 及 3'UTR 等重要功能区域; 4) 检索 2021 年 12 月 31 日前发表的易感相关位点的文献, 既往研究发现筛选位点与 PHC 有明确关联性。本研究最终筛选出 27 个 SNP 位点。

2.3. PCR-RFLP 与基因分型

采用血液基因组提取试剂盒(北京博奥医学检验所有限公司)提取样本 5ml 静脉血, DNA 片段需完整性好, 无降解, 无小片段 RNA 污染, 置于 -80°C 冰箱保存备用。利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物(中国上海生工公司), 各 SNP 位点均需要一条延伸引物和两条 PCR 扩增引物。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 30 S, 60°C 退火 30S, 72°C 延伸 1 min, 45 个循环; 72°C 延伸 5 min。将 PCR 产物使用限制性内切酶切断, 消化程序: 37°C 40 min; 85°C 5 min。按照延伸反应扩增程序进行 PCR 产物的延伸, 所得产物采用树脂板进行纯化。采用 MassARRAY™质谱分析仪(美国 Agena Bioscience 公司)对产物进行质谱基因分析, 检测数据使用 Typer 4.0 分析软件分析。

2.4. 统计学处理

使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。采用 χ^2 检验对两组一般资料进行比较; 拟合优度 χ^2 检验计算 SNP 位点各基因型在对照组中的分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡; 采用 Logistic 回归模型分析两组间 SNP 位点与 PHC 遗传易感性及肝癌患者 SNP 数目与临床病理特征相关性, 用比值比(Odds ratio, OR)及 95% 置信区间(Confidence interval, CI)来表示关联强度, 对年龄、性别、吸烟及饮酒等影响因素进行调整, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3. 结果

3.1. 研究对象一般资料

本次研究共纳入 234 例肝癌病例和 234 例阴性对照, 结果显示: 病例组和对照组的年龄($P = 0.136$)、性别($P = 0.766$)、吸烟情况($P = 0.501$)、饮酒情况($P = 0.163$)比例差异无统计学意义; 而在病例组中肝炎

病史($P < 0.001$)、肝硬化病史($P < 0.001$)分布差异具有统计学意义,即病例组中肝炎、肝硬化人群分布高于对照组(表 1)。

Table 1. Comparison of general data of research objects

表 1. 研究对象一般资料情况比较

变量	病例(n = 234)	对照(n = 234)	χ^2	P 值
年龄			2.225	0.136
<60 岁	94	110		
≥60 岁	140	124		
性别			0.089	0.766
男	161	158		
女	73	76		
吸烟			0.454	0.501
是	88	81		
否	146	153		
饮酒			1.949	0.163
是	111	96		
否	123	138		
乙型病毒性肝炎				
是	165	12	212.698	<0.001
否	69	222		
肝硬化			217.760	<0.001
是	152	2		
否	82	232		

3.2. 单核苷酸多态性与 PHC

3.2.1. SNP 检测结果

本次研究共纳入 27 个 SNP 位点进行二元 Logistic 回归分析(表 2), 有 3 个遗传变异(*miR-34b/c* 基因 rs4938723、*EGF* 基因 rs4444903、*KIF1B* 基因 rs17401966)具有统计学意义(表 3), 显露出 PHC 易感性的相关。3 个位点基因型分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$), 具有群体代表性和可比性。

Table 2. Analysis of 27 SNPs associated with PHC

表 2. 27 个 SNP 位点与 PHC 相关分析

序号	基因	SNP	基因型	病例[n(%)]	对照[n(%)]	OR	95% CI	P 值
1	<i>miR-34b/c</i>	rs4938723	TT	70 (29.9)	81 (34.6)	1.000 (Ref.)		
			TC	105 (44.9)	113 (48.3)	1.075	0.709~1.630	0.732
			CC	59 (25.2)	40 (17.1)	1.707	1.022~2.852	0.041

Continued

2	<i>KIF1B</i>	rs17401966	AA	111 (47.4)	101 (43.2)	1.000 (Ref.)		
			AG	95 (40.6)	86 (36.8)	1.005	0.676~1.495	0.98
			GG	28 (12.0)	47 (20.0)	0.542	0.316~0.930	0.026
3	<i>EFCAB11</i>	rs12100561	AA	86 (36.7)	77 (32.9)	1.000 (Ref.)		
			AG	57 (24.4)	46 (19.7)	1.109	0.676~1.821	0.681
			GG	91 (38.9)	111 (47.4)	0.734	0.485~1.110	0.143
4	<i>BACH2</i>	rs10944479	AA	64 (27.4)	68 (29.1)	1.000 (Ref.)		
			AC	86 (36.7)	91 (38.9)	0.84	0.529~1.334	0.461
			CC	84 (35.9)	75 (32.0)	0.844	0.550~1.296	0.438
5	<i>HLA-DRB1</i>	rs2647073	AA	91 (38.9)	76 (32.5)	1.000 (Ref.)		
			AC	85 (36.3)	93 (39.7)	1.342	0.841~2.141	0.217
			CC	58 (24.8)	65 (27.8)	1.024	0.646~1.623	0.919
6	<i>HLA-DRB1</i>	rs3997872	AA	79 (33.8)	77 (32.9)	1.000 (Ref.)		
			AT	48 (20.5)	61 (26.1)	0.921	0.606~1.398	0.697
			TT	107 (45.7)	96 (41.0)	0.706	0.442~1.127	0.145
7	<i>CCR4</i>	rs2228428	TT	57 (24.4)	52 (22.2)	1.000 (Ref.)		
			GT	92 (39.3)	103 (44.0)	0.982	0.604~1.594	0.94
			GG	85 (36.3)	79 (33.8)	0.815	0.510~1.303	0.393
8	<i>C2</i>	rs9267673	CC	113 (48.3)	113 (48.3)	1.000 (Ref.)		
			CT	48 (20.5)	53 (22.6)	0.932	0.612~1.419	0.741
			TT	73 (31.2)	68 (29.1)	0.844	0.506~1.407	0.515
9	<i>TP53</i>	rs28934571	CC	81 (34.6)	90 (38.5)	1.000 (Ref.)		
			AC	92 (39.3)	80 (34.1)	0.944	0.595~1.498	0.808
			AA	61 (26.1)	64 (27.4)	1.207	0.761~1.914	0.425
10	<i>DEPDC5</i>	rs1012068	TT	62 (26.5)	73 (31.2)	1.000 (Ref.)		
			GT	85 (36.3)	78 (33.3)	1.234	0.785~1.941	0.362
			GG	87 (37.2)	83 (35.5)	1.283	0.812~2.027	0.285
11	<i>EGF</i>	rs4444903	AA	92 (39.3)	104 (44.4)	1.000 (Ref.)		
			AG	86 (36.8)	94 (40.2)	1.034	0.690~1.551	0.871
			GG	56 (23.9)	36 (15.4)	1.758	1.062~2.911	0.028
12	<i>HULC</i>	rs7763881	AA	78 (33.3)	88 (37.6)	1.000 (Ref.)		
			AC	70 (29.9)	81 (34.6)	0.67	0.430~1.044	0.077
			CC	86 (36.8)	65 (27.8)	0.653	0.415~1.028	0.066
13	<i>STAT4</i>	rs11889341	GG	94 (40.2)	102 (43.6)	1.000 (Ref.)		
			GT	72 (30.8)	58 (24.8)	1.003	0.651~1.545	0.99
			TT	68 (29.0)	74 (31.6)	1.351	0.838~2.178	0.217

Continued

14	<i>HLA-DQB1</i>	rs1049055	AA	77 (32.9)	78 (33.3)	1.000 (Ref.)		
			AG	54 (23.1)	60 (25.6)	0.92	0.605~1.400	0.698
			GG	103 (44.0)	96 (41.1)	0.839	0.529~1.330	0.455
15	<i>XRCC1</i>	rs25487	GG	120 (51.3)	116 (49.6)	1.000 (Ref.)		
			GC	49 (20.9)	60 (25.6)	1.083	0.700~1.676	0.719
			CC	65 (27.8)	58 (24.8)	0.789	0.501~1.245	0.309
16	<i>HSPA5</i>	rs430397	CC	57 (24.4)	60 (25.6)	1.000 (Ref.)		
			CT	107 (45.7)	113 (48.3)	0.828	0.502~1.364	0.458
			TT	70 (29.9)	61 (26.1)	0.825	0.535~1.273	0.385
17	<i>XRCC4</i>	rs1805377	GG	61 (26.1)	69 (29.5)	1.000 (Ref.)		
			GA	57 (24.3)	65 (27.8)	1.312	0.848~2.029	0.222
			AA	116 (49.6)	100 (42.7)	0.992	0.605~1.627	0.974
18	<i>SMARCA4</i>	rs11879293	GG	128 (54.7)	115 (49.1)	1.000 (Ref.)		
			GA	65 (27.8)	64 (27.4)	0.67	0.416~1.078	0.099
			AA	41 (17.5)	55 (23.5)	0.912	0.595~1.399	0.674
19	<i>MTHFR</i>	rs9651118	TT	71 (30.3)	65 (27.8)	1.000 (Ref.)		
			TG	75 (32.1)	71 (30.3)	1.176	0.762~1.815	0.463
			GG	88 (37.6)	98 (41.9)	1.216	0.781~1.894	0.386
20	<i>ATF6</i>	rs2070150	CC	35 (15.0)	50 (21.4)	1.000 (Ref.)		
			GC	87 (37.1)	70 (29.9)	1.265	0.841~1.904	0.26
			GG	112 (47.9)	114 (48.7)	0.713	0.430~1.180	0.188
21	<i>SLIT3</i>	rs11134527	AA	97 (41.5)	90 (38.5)	1.000 (Ref.)		
			AG	81 (34.6)	75 (32.1)	1.002	0.655~1.533	0.992
			GG	56 (23.9)	69 (29.4)	0.753	0.478~1.186	0.221
22	<i>DICER1</i>	rs88603767 2	TT	122 (52.1)	119 (50.9)	1.000 (Ref.)		
			TC	94 (40.2)	86 (36.8)	1.066	0.319~1.148	0.124
			CC	18 (7.7)	29 (12.3)	0.605	0.319~1.148	0.124
23	<i>RAN</i>	rs3803012	AA	104 (44.4)	97 (41.5)	1.000 (Ref.)		
			AG	61 (26.1)	64 (27.3)	0.889	0.569~1.390	0.606
			GG	69 (29.5)	73 (31.2)	0.882	0.574~1.355	0.566
24	<i>PIWIL1</i>	rs10773771	TT	106 (45.3)	88 (37.6)	1.000 (Ref.)		
			TC	47 (20.1)	62 (26.5)	0.801	0.528~1.214	0.295
			CC	81 (34.6)	84 (35.9)	0.629	0.629	0.055
25	<i>XRCC4</i>	rs2075685	GG	90 (38.5)	86 (36.8)	1.000 (Ref.)		
			GT	39 (16.6)	51 (21.8)	0.731	0.438~1.218	0.229
			TT	105 (44.9)	97 (41.4)	1.034	0.690~1.550	0.87

Continued

26	<i>SLFN12L</i>	rs9909601	GG	120 (51.2)	101 (43.2)	1.000 (Ref.)		
			GA	28 (12.0)	45 (19.2)	0.958	0.644~1.425	0.834
			AA	86 (36.8)	88 (37.6)	0.648	0.374~1.120	0.12
27	<i>SLFN12L</i>	rs1838149	GG	97 (41.5)	86 (36.8)	1.000 (Ref.)		
			GA	59 (25.2)	70 (29.9)	0.887	0.578~1.360	0.581
			AA	78 (33.3)	78 (33.3)	0.747	0.476~1.174	0.206

Table 3. Analysis of rs4938723, rs4444903, rs17401966 and genetic susceptibility to PHC**表 3.** rs4938723、rs4444903、rs17401966 位点与 PHC 遗传易感性分析

SNP	基因型	病例[n(%)]	对照[n(%)]	OR*	95% CI*	P 值*
rs4938723	共显性模型					
	TT	70 (29.9)	81 (34.6)	1.000 (Ref.)		
	TC	105 (49.9)	11 (48.3)	1.081	0.711~1.642	0.716
	CC	59 (25.2)	40 (17.1)	1.736	1.036~2.910	0.036
	显性模型					
	TT	70 (29.9)	81 (34.6)	1.000 (Ref.)		
	TC + CC	164 (70.1)	15 (65.4)	1.251	0.846~1.849	0.261
	隐性模型					
	TT + TC	175 (74.8)	19 (82.9)	1.000 (Ref.)		
	CC	59 (25.2)	40 (17.1)	1.658	1.054~2.609	0.029
rs4444903	共显性模型					
	AA	92 (39.3)	10 (44.4)	1.000 (Ref.)		
	AG	86 (36.8)	94 (40.2)	1.058	0.701~1.596	0.788
	GG	56 (23.9)	36 (15.4)	1.841	1.103~3.071	0.019
	显性模型					
	AA	92 (39.3)	104 (44.4)	1.000 (Ref.)		
	AG + GG	142 (60.7)	13 (55.6)	1.272	0.876~1.849	0.207
	隐性模型					
	AA + AG	178 (76.1)	19 (84.6)	1.000 (Ref.)		
	GG	56 (23.9)	36 (15.4)	1.791	1.118~2.870	0.015
rs17401966	共显性模型					
	AA	111 (47.4)	10 (43.2)	1.000 (Ref.)		
	AG	95 (40.6)	86 (36.7)	1.014	0.678~1.516	0.946
	GG	28 (12.0)	47 (20.1)	0.540	0.314~0.930	0.026
	显性模型					
	AA	111 (47.4)	101 (43.2)	1.000 (Ref.)		
AG + GG	123 (52.6)	13 (56.8)	0.844	0.584~1.220	0.367	

Continued

		隐性模型				
rs17401966	AA + AG	206 (88.0)	18 (79.9)	1.000 (Ref.)		
	GG	28 (12.0)	47 (20.1)	0.537	0.322~0.895	0.017

注: *校正年龄、性别、吸烟及饮酒情况。

3.2.2. *miR-34b/c* 基因 rs4938723 与 PHC 易感性相关分析

miR-34b/c 基因 rs4938723 位点 CC (调整 $OR = 1.736$, 95%CI: 1.036~2.910, $P = 0.036$) 基因型较 TT、TC 基因型具有更高的 PHC 患病风险。隐性模型中 CC 基因型(调整 $OR = 1.658$, 95%CI: 1.054~2.609, $P = 0.029$)患病风险显著高于 TT + TC 组合基因型。

3.2.3. *EGF* 基因 rs4444903 与 PHC 易感性相关分析

EGF 基因 rs4444903 位点 GG 基因型较 AA、AG 基因型具有更高的 PHC 患病风险(调整 $OR = 1.841$, 95%CI: 1.103~3.071, $P = 0.019$)。隐性模型中 GG 基因型(调整 $OR = 1.791$, 95%CI: 1.118~2.870, $P = 0.015$)患病风险显著高于 AG + AA 组合基因型。

3.2.4. *KIF1B* 基因 rs17401966 与 PHC 易感性相关分析

KIF1B 基因 rs17401966 位点 GG 基因型较 AA、AG 基因型患 PHC 风险低(调整 $OR = 0.540$, 95%CI: 0.314~0.930, $P = 0.026$)；隐性模型中 GG 基因型(调整 $OR = 0.537$, 95%CI: 0.322~0.895, $P = 0.017$)患病风险低于 AG + AA 组合基因型。

3.2.5. 分层分析

本研究基于两组间一般资料比较结果,以性别、年龄、饮酒及吸烟情况进行分层分析后发现在男性(调整 $OR = 1.795$, 95% CI: 1.029~3.130, $P = 0.039$)及饮酒(调整 $OR = 2.513$, 95% CI: 1.124~5.616, $P = 0.025$)人群中 *EGF* 基因 rs4444903 位点处基因型为 GG 相比 AA + AG 基因型 PHC 发病风险明显增加;在女性(调整 $OR = 0.306$, 95% CI: 0.120~0.782, $P = 0.013$)、年龄 < 60 岁(调整 $OR = 0.403$, 95% CI: 0.181~0.899, $P = 0.026$)及不饮酒(调整 $OR = 0.489$, 95% CI: 0.248~0.964, $P = 0.039$)的人群中 *KIF1B* 基因 rs17401966 位点处基因型 GG 相比 AA + AG 基因型 PHC 发病风险明显下降(表 4)。

Table 4. Results of rs4938723, rs4444903 and rs17401966 stratification analyses

表 4. rs4938723、rs4444903、rs17401966 位点分层分析结果

因素	<i>miR-34b/c</i>		rs4938723			<i>EGF</i>		rs4444903		<i>KIF1B</i>		rs17401966	
	TT + TC		CC		AA + AG		GG		AA + AG		GG		
	<i>OR</i> (95% CI)*	<i>OR</i> (95% CI)*	<i>P</i> 值*	<i>OR</i> (95% CI)*	<i>OR</i> (95% CI)*	<i>P</i> 值*	<i>OR</i> (95% CI)*	<i>OR</i> (95% CI)*	<i>P</i> 值*	<i>OR</i> (95% CI)*	<i>OR</i> (95% CI)*	<i>P</i> 值*	
性别													
男	1.000 (Ref.)	1.668 (0.950~2.930)	0.075	1.000 (Ref.)	1.795 (1.029~3.130)	0.039	1.000 (Ref.)	0.692 (0.370~1.296)	0.250				
女	1.000 (Ref.)	1.598 (0.739~3.452)	0.233	1.000 (Ref.)	1.778 (0.731~4.323)	0.204	1.000 (Ref.)	0.306 (0.120~0.782)	0.013				
年龄													
<60	1.000 (Ref.)	2.012 (1.004~4.032)	0.051	1.000 (Ref.)	1.882 (0.838~4.226)	0.125	1.000 (Ref.)	0.403 (0.181~0.899)	0.026				
≥60	1.000 (Ref.)	1.466 (0.802~2.681)	0.214	1.000 (Ref.)	1.663 (0.925~2.987)	0.089	1.000 (Ref.)	0.674 (0.342~1.331)	0.256				

Continued

饮酒									
是	1.000 (Ref.)	1.554 (0.763~3.165)	0.224	1.000 (Ref.)	2.513 (1.124~5.616)	0.025	1.000 (Ref.)	0.603 (0.273~1.333)	0.212
否	1.000 (Ref.)	1.766 (0.978~3.187)	0.059	1.000 (Ref.)	1.532 (0.845~2.777)	0.160	1.000 (Ref.)	0.489 (0.248~0.964)	0.039
吸烟									
是	1.000 (Ref.)	1.683 (0.763~3.712)	0.197	1.000 (Ref.)	1.974 (0.888~4.271)	0.096	1.000 (Ref.)	0.522 (0.228~1.192)	0.123
否	1.000 (Ref.)	1.669 (0.958~2.907)	0.071	1.000 (Ref.)	1.779 (0.981~3.226)	0.058	1.000 (Ref.)	0.546 (0.281~1.059)	0.073

注: *校正年龄、性别、吸烟及饮酒情况。

3.3. 突变 SNP 数目与临床病理学相关分析

在所筛选的 27 个 SNP 位点中, 对 234 名 PHC 患者的 SNP 位点数目进行统计, 采用多因素 Logistic 回归分析肝癌患者 SNP 位点数目与肿瘤大小、卫星灶、远处转移及门静脉癌栓临床病理情况(表 4), 发现 SNP 位点数目与肿瘤大小($P = 0.373$)、卫星灶($P = 0.242$)、远处转移($P = 0.736$)方面无统计学意义; 在门静脉癌栓(调整 $OR = 1.122$, 95%CI: 1.005~1.251, $P = 0.040$)方面具有统计学意义(表 5), 即 SNP 数目是肝癌患者门静脉癌栓发生的危险因素, 随着 SNP 位点数目每增多 1 个, 优势增加 12.2%, 临床病理特征表现出更高的门静脉癌栓发生率。

Table 5. The number of SNPs and clinicopathology correlation analysis

表 5. SNP 数目与临床病理相关分析

因变量	B	S.E.	Wald	P 值*	OR*	95%CI*
SNPs 与肿瘤大小	-0.050	0.056	0.793	0.373	0.951	0.852~1.062
SNPs 与卫星结节	-0.078	0.067	1.369	0.242	0.925	0.812~1.054
SNPs 与远处转移	-0.031	0.092	0.114	0.736	0.969	0.809~1.161
SNPs 与门静脉癌栓	0.115	0.056	4.237	0.040	1.122	1.005~1.251

注: *校正年龄、性别、吸烟及饮酒情况。

4. 讨论

全世界每年肝癌新发约 63 万人, 有超过一半发生在中国, 极大地威胁着居民健康[7]。地域因素、生活方式等外部环境差异造成的患癌风险是不相同的, 肿瘤的大小、分期分级, 是否发生转移、有无门静脉癌栓等内部因素对患者预后影响也有差别, 有研究表明 *TP53* 基因该位点的多态性可能会让其失去抑制肿瘤的功能, 与之相反会获得一种推进肿瘤发生发展的新能力。杨等人研究发现 *TP53* 基因的变异会促进血管新生, 肝脏肿瘤病灶转移发生率增高, 肿瘤更具侵袭性[8]。如果提前对 PHC 高危人群进行筛查, 或许能更早制定出针对性的诊疗方案来延长患者生存期。

SNP 指的是单个核苷酸所引起的突变的 DNA 序列多态性。有研究证实单核苷酸多态性与 PHC 多个方面相关, 如 *patatin* 样磷脂酶域 3 基因 rs738409 SNP 为病毒性、酒精性肝癌易感的危险因素[9]; 脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶基因单核苷酸多态性与 PHC 的分期、门静脉侵犯、淋巴结转移存在关联[10]。但目前所确定的 SNP 位点可能会因为环境因素、遗传背景差异表现出不同的肿瘤易感性。

首先,我们发现 234 名病例中乙型肝炎、肝硬化病史的人群分布明显高于 234 例阴性对照,这符合 PHC 病因学,即 HBV 感染是致使 PCH 发生的高危因素[11]。其次,我们发现本地区 *miR-34b/c* 基因 rs4938723、*EGF* 基因 rs4444903、*KIF1B* 基因 rs17401966 多态性与 PHC 易感性相关。*miR-34b/c* 基因 rs4938723 的多态性是本地区 PHC 发生的危险因素,基因型为 CC 的个体较基因型为 TT、TC 的个体更易导致 PHC 的发生。MicroRNA 影响着细胞增殖分化、组织和器官发育乃至肿瘤的发生发展,*miR-34b/c* 基因通过转录形成细胞周期蛋白依赖性激酶和促凋亡蛋白进而增强对肿瘤发展的抑制;rs4938723 位点恰好处于 *miR-34b/c* 基因的核心启动子区域,其多态性会改变启动子的转录活性,最终导致携带 CC 基因型的个体具有更高的患癌风险,Xu 也发现亚洲群体在该位点携带等位基因 C 与肝癌易感高度相关,Mohammad Hashemi、Liu 等人在后续的研究中也证实了这一点[12] [13] [14] [15]。*EGF* 基因 rs4444903 SNP 早前就有多项研究发现与黑色素瘤、小细胞肺癌、大肠癌等多种恶性肿瘤相关,Jiang、Li 等人发现该位点基因频率尽管在白种人、黄种人及黑种人中有所差异,但遗传多态性都与肝癌风险增加有显著关联[16] [17] [18] [19],本研究证实了其多态性在本地区同样是 PHC 发生的危险因素之一,即 GG 基因型较 GA、AA 基因型更易导致 PHC 的发生,而且对于本地区年龄 < 60 岁、女性及饮酒人群增加患癌风险更为明显。造成这一结局可能在于 *EGF* 基因参与肝组织的再生,该位点携带 G 等位基因会造成 *EGF* 的过度表达,使肝组织不受控制地增殖、发展为肝硬化最终癌变[20]。*KIF1B* 基因 rs17401966 位点基因型为 GG 的人群较 GA、AA 基因型的人群患癌风险更低,我们同样发现这种保护作用在本地区年龄 < 60 岁、男性及不饮酒的人群中更强。Luo、Wang 等人统计分析了不同国家 rs17401966 多态性与 PHC 易感相关性,发现该位点的遗传多态性对于多数人种来说是一种保护因素,能够减少肝癌的易感,而这种患癌风险降低情况在中国人群中则更为明显,究其原因可能是 *KIF1B* 基因编码的蛋白参与细胞器、囊泡的运输,同时通过调节线粒体的运输,消耗癌细胞的能量,抑制癌细胞的生长[21] [22] [23]。

另一研究结果是发现随着 SNP 位点数目的增多,肝癌患者门静脉癌栓发生率更高。Hsieh 等人早前就证实了 SNP 位点数目与 PHC 临床病理学之间的关系,他们发现 *VEGF-C* 基因出现更多遗传多态性位点会增加 PHC 的发生,其中 rs7664413、rs3775194 单核苷酸多态性同时存在则会导致更高的肝硬化发病频率[24]。Zhang 等人发现当 *HOTAIR* 基因存在 3 个 SNP 的个体患肝癌的风险会增加 8.46 倍,而存在 4 个 SNP 的个体患肝癌的风险则将增加 11.75 倍[25]。基因多态性数目与临床病理学的相关性在其他肿瘤中也得到了体现,范等人发现 *BRCA1* 基因 SNP 阳性检出率与子宫肌层浸润深度有关,SNP 阳性率更高的组别其肿瘤浸润深度更深[26]。樊等人证实了个体双基因位点突变较单基因位点突变更易造成甲状腺癌的多发病灶和淋巴结的转移,说明多位点遗传变异更具侵袭性[27]。Yuan 发现随着遗传变异位点数目的增加,胰腺神经内分泌肿瘤的增殖指数和神经血管侵犯、器官受累概率也会增加[28]。张发现多位点突变的甲状腺癌患者较单位点突变患者具有更强的侧颈淋巴结及远处转移能力[29]。林的研究也证实非小细胞肺癌中,单遗传位点突变患者的 6 个月生存率优于多遗传位点突变患者[30]。这种多遗传位点突变造成肿瘤生物信息行为更差的机制并没被完全被揭示,有的学者猜测可能是因为多基因位点合并突变导致肿瘤高负荷,使肿瘤的增长及扩散更易发生[31]。但目前该领域相关研究还是过少,SNP 数目所造成临床病理学差异的具体机制尚不明确,还需要大量实验数据进行佐证。

综上所述,研究结果证实了 3 个 SNP 位点与本地区 PHC 易感性的关联,这或许能从遗传学角度为 PHC 发生机制提供额外数据,为筛选出 PHC 遗传标志物提供靶点。本研究虽未能直接揭示单核苷酸多态性位点数目造成临床病理学差异的机制,但提供了一个新思路,即通过 SNP 位点变异对 PHC 演变过程进行分析,以此预测不同基因型的肝癌临床病理学特征,帮助制定出临床治疗策略,改善患者治疗效果。

参考文献

- [1] 何凤蝶, 王秋童, 胡亚男, 等. 中国人群肝癌发病危险因素病例对照研究的 meta 分析[J]. 现代预防医学, 2022, 49(23): 4230-4240.
- [2] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., *et al.* (2018) Global Cancer Statistics 2018: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [3] Chen, W., Sun, K., Zheng, R., *et al.* (2018) Cancer Incidence and Mortality in China, 2014. *Chinese Journal of Cancer Research*, **30**, 1-12. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2018.01.01>
- [4] Li, Y., Zhang, F. and Yang, D. (2017) Comprehensive Assessment and Meta-Analysis of the Association between Ctnnb1 Polymorphisms and Cancer Risk. *Bioscience Reports*, **37**, 432-440. <https://doi.org/10.1042/BSR20171121>
- [5] 沈影, 夏霁, 韩凤娟. 基因单核苷酸多态性在卵巢癌精准医疗中的应用探析[J]. 中南药学, 2020, 18(4): 627-629.
- [6] 周泽文, 张若昕, 魏庆义, 等. 肝细胞癌全基因组关联分析研究进展及展望[J]. 中国癌症防治杂志, 2020, 12(1): 6-13.
- [7] Wang, C., Lu, D., Ling, Q., *et al.* (2019) Donor Onecarbon Metabolism Gene Single Nucleotide Polymorphisms Predict the Susceptibility of Cancer Recurrence after Liver Transplantation. *Gene*, **68**, 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.035>
- [8] 杨怡, 席子涵, 张林颖. 极光激酶 B、肿瘤蛋白 53 在肝细胞癌中的表达及与临床病理特征、预后的关系[J]. 肝脏, 2022, 27(2): 188-192.
- [9] Le, P.H., Kuo, C.J., Hsieh, Y.C., *et al.* (2019) Ages of Hepatocellular Carcinoma Occurrence and Life Expectancy Are Associated with a UGT2B28 Genomic Variation. *BMC Cancer*, **19**, Article No. 1190. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6409-3>
- [10] Huang, Z., Guo, X., Zhang, G., *et al.* (2019) Correlation between PNPLA3 rs738409 Polymorphism and Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis of 10,330 Subjects. *The International Journal of Biological Markers*, **34**, 117-122. <https://doi.org/10.1177/1724600818812471>
- [11] 陆小华, 朱小庆, 袁洪新, 等. APE1 基因单核苷酸多态性与肝细胞癌临床表型的相关性研究[J]. 中国当代医药, 2020, 27(13): 13-17.
- [12] Liu, W., Ma, N., Zhao, D., *et al.* (2019) Correlation between the DEPDC5 rs1012068 Polymorphism and the Risk of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, **43**, 446-450. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.12.005>
- [13] Xu, B., Zhu, Y., Tang, Y., Zhang, Z., *et al.* (2018) Rs4938723 Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma Risk and Is a Protective Factor in Leukemia, Colorectal, and Esophageal Cancer. *Medical Science Monitor*, **24**, 7057-7071. <https://doi.org/10.12659/MSM.912534>
- [14] Hashemi, M., Moazeni-Roodi, A., Bahari, G., *et al.* (2019) Association between miR-34b/c rs4938723 Polymorphism and Risk of Cancer: An Updated Meta-Analysis of 27 Case-Control Studies. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120**, 3306-3314. <https://doi.org/10.1002/jcb.27598>
- [15] Liu, Q., Yang, G., Song, X.L., *et al.* (2015) Association between rs4938723 Functional Polymorphism in the Promoter Region of miR-34b/c Gene and Cancer Risk. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, **39**, 526-533. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.10.007>
- [16] Zhu, Y., Chen, Z., Jiang, H., *et al.* (2019) The Genetic Association between EGF A61G Polymorphism (rs4444903) and Risk of Colorectal Cancer: An Update Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *Medicine*, **98**, e14007. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014007>
- [17] Laus, A.C., De Paula, F.E., De Lima, M.A., *et al.* (2019) EGF+61 A>G Polymorphism Is Not Associated with Lung Cancer Risk in the Brazilian Population. *Molecular Biology Reports*, **46**, 2417-2425. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04702-0>
- [18] Jiang, G., Yu, K., Shao, L., *et al.* (2015) Association between Epidermal Growth Factor Gene +61A/G Polymorphism and the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis Based on 16 Studies. *BMC Cancer*, **15**, Article No. 314. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1318-6>
- [19] Li, Y.L., Tian, Z., Zhao, L., *et al.* (2014) Association between the EGF rs4444903 Polymorphism and Liver Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Genetics and Molecular Research*, **13**, 8066-8079. <https://doi.org/10.4238/2014.October.7.1>
- [20] Wang, J., Zhong, Y. and Meng, G. (2021) EGF rs4444903 Polymorphism Is Associated with Risk of HCV-Related Cirrhosis and HBV/HCV-Related Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology Volume*, **26**, 2053-2064. <https://doi.org/10.1007/s10147-021-01994-w>

- [21] Zhang, Y.F., Zeng, X.L., Lu, H.W., *et al.* (2018) Association between KIF1B (rs17401966) Polymorphism and Hepatocellular Carcinoma Susceptibility: A Meta-Analysis. *OncoTargets and Therapy*, **11**, 3225-3235. <https://doi.org/10.2147/OTT.S162205>
- [22] Wang, Z.C., Gao, Q., Shi, J.Y., *et al.* (2013) Genetic Polymorphism of the Kinesin-Like Protein KIF1B Gene and the Risk of Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE*, **8**, 62571-62573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062571>
- [23] Luo, Y.Y., Zhang, H.P., Huang, A.L., *et al.* (2019) Association between KIF1B rs17401966 Genetic Polymorphism and Hepatocellular Carcinoma Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *BMC Medical Genetics*, **20**, Article No. 59. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0778-y>
- [24] Hsieh, M.C., Hsu, H.T., Hsiao, P.C., *et al.* (2014) Role of VEGF-C Gene Polymorphisms in Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma and Its Pathological Development. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **28**, 237-244. <https://doi.org/10.1002/jcla.21672>
- [25] Zhang, J., Liu, L., Lin, Z., *et al.* (2019) SNP-SNP and SNP-Environment Interactions of Potentially Functional Hotair SNPs Modify the Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, **58**, 633-642. <https://doi.org/10.1002/mc.22955>
- [26] 范余娟, 孙丹, 徐红, 等. 子宫内膜癌组织 BRCA1 单核苷酸多态性与临床病理因素相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(16): 1283-1286.
- [27] 樊菁, 吕勇刚, 赵戈, 等. 甲状腺乳头状癌 BRAFV600E、NRAS、TERT 基因的突变特征及其与临床病理特征的相关性[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(5): 769-773.
- [28] Yuan, F., Shi, M., Ji, J., *et al.* (2014) KRAS and DAXX/ATRAX Gene Mutations Are Correlated with the Clinicopathological Features, Advanced Diseases, and Poor Prognosis in Chinese Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *International Journal of Biological Sciences*, **10**, 957-965. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9773>
- [29] 张冉, 杨洁, 冯恩梓, 等. 甲状腺乳头状癌基因突变与其侵袭性相关性研究[J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(2): 125-132.
- [30] 林晓, 董文韬, 赖霄晶, 等. 晚期非小细胞肺癌 ctDNA 检测及其临床意义的研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(99): 18-20.
- [31] 贺佳子, 黄清洁, 李莉, 等. 396 例非小细胞肺癌 EGFR, KRAS, ALK 和 BRAF 基因突变状态及其临床病理特征[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(9): 2252-2258.