

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00005

肝细胞癌基因组 DNA 拷贝数变异的性别差异性

闻炳基¹, 丛文铭², 王爱忠³, 贺松琴¹, JIANG Hong-mei⁴, 董 辉², HOU Li-fang⁵, 朱忠政^{1*}

1. 解放军 113 医院肿瘤科, 宁波 315040

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病理科, 上海 200438

3. 解放军 113 医院病理科, 宁波 315040

4. Department of Statistics, Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA

5. Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL 60611, USA

[摘要] **目的** 比较男性与女性肝细胞癌(HCC)在基因组 DNA 拷贝数变异(CNA)方面的差异性。**方法** 采用高分辨率微阵列比较基因组杂交技术(array-CGH)检测 17 例女性与 46 例男性 HCC 患者的 CNA 差异。**结果** 女性 HCC 染色体片段 1q21.3-q22 扩增频率(76.5% vs 37.0%, $P=0.009$)、11q11 扩增频率(35.3% vs 0.0%, $P=0.0002$)、19q13.31-q13.32 扩增频率(23.5% vs 0.0%, $P=0.004$)和 16p11.2 丢失频率(35.3% vs 6.5%, $P=0.009$)显著高于男性,而男性则有更高频率的 11q11 丢失(63.0% vs 17.6%, $P=0.002$)。进一步统计分析结果显示,11q11 扩增与 19q13.31-q13.32 扩增($P=0.042$)及 16p11.2 丢失($P=0.033$)显著相关,而 1q21.3-q22 扩增与 19q13.31-q13.32 扩增($P=0.046$)显著相关。**结论** CNA 在性别特异性 HCC 演进过程中可能发挥重要作用。

[关键词] 微阵列比较基因组杂交;拷贝数变异;性别分布;肝肿瘤

[中图分类号] R 735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)01-0005-05

Sex-dependent differences in DNA copy number alterations in hepatocellular carcinoma

WEN Bing-ji¹, CONG Wen-ming², WANG Ai-zhong³, HE Song-qin¹, JIANG Hong-mei⁴, DONG Hui², HOU Li-fang⁵, ZHU Zhong-zheng^{1*}

1. Department of Oncology, No. 113 Hospital of PLA, Ningbo 315040, Zhejiang, China

2. Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

3. Department of Pathology, No. 113 Hospital of PLA, Ningbo 315040, Zhejiang, China

4. Department of Statistics, Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA

5. Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL 60611, USA

[Abstract] **Objective** To identify the sex-related DNA copy number alterations(CNA) in hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** High-resolution array comparative genomic hybridization(array-CGH) was used to examine 17 female and 46 male HCCs. Two-tailed Fisher's exact test or χ^2 test was used to compare the differences in CNA between females and males. **Results** The overall frequencies and patterns of CNA in female and male cases were similar. However, female HCC tumors presented more copy number gains compared to male on 1q21.3-q22(76.5% vs 37.0%, $P=0.009$), 11q11(35.3% vs 0.0%, $P=0.0002$) and 19q13.31-q13.32(23.5% vs 0.0%, $P=0.004$), and more loss on 16p11.2(35.3% vs 6.5%, $P=0.009$). Relative to females, male cases had more copy number loss on 11q11(63.0% vs 17.6%, $P=0.002$). Further analyses showed that 11q11 gain was correlated with 19q13.31-q13.32 gain($P=0.042$) and 16p11.2 loss($P=0.033$), while 1q21.3-q22 gain was correlated with 19q13.31-q13.32 gain($P=0.046$). **Conclusion** Our findings suggest that CNA may play an important role

[收稿日期] 2011-10-24

[接受日期] 2011-11-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30470791),南京军区医学科技创新基金(08MA023,09MA043),宁波市自然科学基金(2009A610126). Supported by National Natural Science Foundation of China(30470791), Medical Science and Technology Innovation Funds of PLA Nanjing Military Area Command(08MA023,09MA022), and Natural Science Foundation of Ningbo Municipality(2009A610126).

[作者简介] 闻炳基,硕士,副主任医师. E-mail: wenbingji@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0574-27754304, E-mail: zzzhu1170@yahoo.com

in sex-related difference in HCC development.

[Key words] array comparative genomic hybridization; copy number alteration; sex distribution; liver neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 5-9]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在男性中的发病率高于女性,男女比为2~4:1^[1]。流行病学研究提示,HCC发病的这种性别差异可能与男性更多地暴露于乙型肝炎病毒(HBV)/丙型肝炎病毒(HCV)感染、饮酒和吸烟等因素有关^[1]。近来越来越多的证据显示,遗传学因素在性别差异性HCC发生中扮演重要角色^[2-3]。DNA拷贝数变异(copy number alteration, CNA),即基因组DNA特定染色体片段的扩增和丢失,是包括HCC在内的实体性肿瘤最重要的分子遗传特征之一^[4]。既往研究显示,一些常见CNA与特定HCC临床病理学特征相关^[5-6]。

目前为止,国内外未见有关男性与女性HCC患者在CNA方面差异性的报道,本研究旨在以HBV相关HCC患者为研究对象探讨男性与女性HCC在CNA方面的差异性。

1 材料和方法

1.1 研究对象 63例HCC病例为2007年至2008年间在第二军医大学东方肝胆外科医院住院的患者,诊断结果均经组织病理学证实。其中男性46例、女性17例,年龄32~72岁,平均(50.0±10.2)岁。所有病例均符合慢性HBV诊断标准:(1)HBsAg持续阳性超过6个月;(2)血清学同时具备HBsAg阳性、anti-HBs阴性和IgG型anti-HBc阳性。术中切除的肿瘤组织标本储存于-80℃冰箱中备用。本研究获得医院医学伦理委员会批准,所有患者或家属均签署知情同意书。

1.2 微阵列比较基因组杂交(array-CGH)检测与数据处理 采用Qiagen全基因组DNA抽提纯化试剂盒提取肿瘤组织DNA。Array-CGH检测采用Agilent 244K(Hu-244A, Agilent公司)技术平台,具体操作按照说明书(Protocol v4.0, June 2006; <http://www.home.agilent.com/>)进行。该array-CGH检测平台共包含236 381个寡核苷酸探针,DNA编码区和非编码区分辨率分别高达7.4 kb和16.5 kb。分别采用Agilent G2565BA和Feature Extraction 9.5软件

(Agilent公司)进行微阵列扫描和数据提取。

利用循环二元分割法(circular binary segmentation)对全部样本进行基于探针log₂比值比水平的全基因组片段分割(R语言统计学软件包DNAcopy)^[7],目的是使片段内所有探针具有相同的log₂比值比水平,而邻近片段间log₂比值比水平不同,由此共获得3 500个基因组DNA分割片段。每一分割片段的log₂比值比被赋予该片段内所有探针log₂比值比的平均值。片段CNA扩增和丢失分别定义为log₂比值比平均值>0.5和<-0.5。

1.3 统计学处理 采用Stata 10.1软件进行统计分析,男性与女性HCC间各分割片段CNA差异的比较采用χ²检验或Fisher精确检验,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 男、女两组HCC间临床病理学因素比较 两组HCC病例的年龄、一级亲属HCC家族史、血清AFP水平、是否发生肝硬化以及肿瘤位置、数目、大小、Edmondson-Steiner分级、T分期构成的差异均无统计学意义;男性HCC组的吸烟和饮酒者比例高于女性组(P<0.05,表1)。

2.2 男、女两组HCC间CNA比较 全部63例样本的3 500个基因组DNA分割片段的扩增和丢失频率如图1A所示,染色体片段1q、8q扩增和1p、4q、8p、9p、10q、13q、16q、17p丢失为高频CNA改变。总体上,男、女两组HCC间具有相似的CNA谱(图1B、1C),但统计学分析结果显示男性与女性HCC在一些特定DNA片段的扩增和丢失频率方面存在显著差异。如表2所示,女性HCC在染色体片段1q21.3-q22扩增频率(76.5% vs 37.0%, P=0.009)、11q11扩增频率(35.3% vs 0.0%, P=0.000 2)、19q13.31-q13.32扩增频率(23.5% vs 0.0%, P=0.004)和16p11.2丢失频率(35.3% vs 6.5%, P=0.009)显著高于男性。与女性相比,男性则有更高频率的11q11丢失(63.0% vs 17.6%, P=0.002)。

表 1 男、女两组 HCC 间多种临床病理学因素比较

Tab 1 Comparison of demographic and clinicopathological characteristics between males and females

Variables	Male (N=46)	Female (N=17)	P value
Age(year, $\bar{x}\pm s$)	50.6 \pm 10.4	48.2 \pm 10.0	0.403
Cigarette smoking n(%)			0.001
No	25(54.3)	17(100.0)	
Yes	21(45.7)	0(0.0)	
Alcohol drinking n(%)			0.026
No	30(65.2)	16(94.1)	
Yes	16(34.8)	1(5.9)	
HCC family history in first-degree relatives n(%)			0.657
No	42(91.3)	15(88.2)	
Yes	4(8.7)	2(11.8)	
AFP n(%)			0.350
$\leq 20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	15(32.6)	3(17.6)	
$> 20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	31(67.4)	14(82.4)	
Cirrhosis n(%)			0.249
No	16(34.8)	9(52.9)	
Yes	30(65.2)	8(47.1)	
Tumor location n(%)			0.430
Left	13(28.2)	2(11.8)	
Right	28(60.9)	13(76.4)	
Left and right	5(10.9)	2(11.8)	
Number of tumors n(%)			0.522
Single	33(71.7)	14(82.4)	
Multiple	13(28.3)	3(17.6)	
Tumor diameter d/cm, $\bar{x}\pm s$	6.7 \pm 4.6	8.3 \pm 4.2	0.221
Tumor grade ^a n(%)			0.722
II	10(21.7)	3(17.6)	
III	36(78.3)	14(82.4)	
Tumor stage ^b n(%)			0.412
T1	21(45.6)	5(29.4)	
T2	8(17.4)	5(29.4)	
T3	16(34.8)	6(35.3)	
T4	1(2.2)	1(5.9)	

^a: According to the Edmondson-Steiner grading system; ^b: According to the TNM (tumor-node-metastasis) classification (6th edition). AFP: Alpha fetal protein

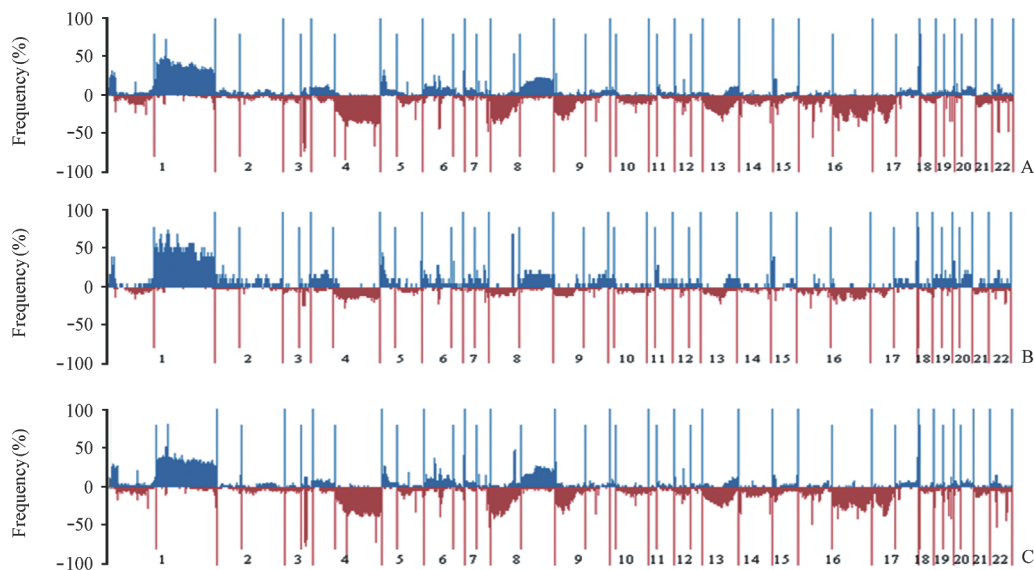


图 1 全基因组 DNA 分割片段拷贝数变异频率(剔除性染色体 X 和 Y)

Fig 1 Genome-wide frequencies of DNA copy number alterations (sex chromosomes X and Y excluded)

A: Sixty-three cases of HCC; B: Seventeen female cases of HCC; C: Forty-six male cases of HCC. The genome-wide frequencies of all gains (blue, top plot) and losses (dark red, bottom plot) for each test region are shown. A total of 3 500 test regions were ordered (X-axis) according to the map positions and the chromosome order from 1pter to 22qter. The boundaries of individual chromosome and location of centromere are indicated by long and short vertical bars, respectively. HCC: Hepatocellular carcinoma

表 2 男、女两组 HCC 间差异性拷贝数变异

Tab 2 Chromosomal regions of gains and losses present differently in female and male HCC tumors

Cytoband	Map position (start-end)	Size (bp)	Female ^a n(%)	Male ^b n(%)	P value
Gain					
1q21.3-q22	148 146 197-152 934 820	4 788 624	13(76.5)	17(37.0)	0.009
11q11	55 124 730-55 195 049	70 320	6(35.3)	0(0.0)	0.000 2
19q13.31-q13.32	49 842 066-50 295 822	453 757	4(23.5)	0(0.0)	0.004
Loss					
11q11	55 124 730-55 195 049	70 320	3(17.6)	29(63.0)	0.002
16p11.2	34 369 010-34 505 579	136 570	6(35.3)	3(6.5)	0.009

^a:N=17; ^b:N=46. Cytoband and map position are based on the public UCSC database (Human Genome Browser, May 2004 Assembly [hg17])

进一步统计分析显示,1q21.3-q22 扩增、11q11 扩增、19q13.31-q13.32 扩增、11q11 丢失及 16p11.2 丢失与各临床病理学特征之间均无显著相关性。基于吸烟或饮酒因素的分层分析结果显示,在非吸烟或非饮酒人群中,1q21.3-q22 扩增、11q11 扩增、19q13.31-q13.32 扩增、11q11 丢失和 16p11.2 丢失的性别差异均具有显著性。

2.3 性别差异性 CNA 间的相关性 11q11 扩增与 19q13.31-q13.32 扩增($P=0.042$)和 16p11.2 丢失($P=0.033$)相关,而 1q21.3-q22 扩增与 19q13.31-q13.32 扩增($P=0.046$)相关。

3 讨论

有关男性与女性间在 HCC 发病率方面存在明显差异的原因,目前尚不明确。以往分子水平上的研究结果提示,不同性别 HCC 间在 mRNA 和蛋白表达方面存在差异^[8]。本研究首次报道了男性与女性 HCC 在 CNA 方面存在显著差异性,提示 CNA 在性别特异性 HCC 演进过程中发挥重要作用。与 mRNA 或蛋白质水平上的分子标志相比,DNA 水平上的 CNA 分子标志具有稳定性好、易于检测等优点,因而具有独特的临床应用前景。

染色体 1q 扩增是 HCC 肿瘤组织 DNA 中最常见的 CNA 之一。有研究报道,1q 扩增产见于 HCC 前趋病变不典型增生(dysplastic nodule, DN)^[9],而且 1q 扩增与 HCC 内几乎所有其他常见的 CNA 显著相关^[10]。这些结果提示,1q 扩增可能是 HCC 早期演进过程中的关键事件之一。基于高分辨率 array-CGH 技术平台,本研究结果显示,女性 HCC 中 1q21.3-q22 扩增发生率高于男性(76.5% vs

37.0%, $P=0.009$)。在这 4.79 Mb 的染色体片段中,包含多个肿瘤相关基因,如 JTB、HAX-1、SHC1、CKS1B 和 MUC1 等^[11-12]。此外,本研究结果还显示,女性 HCC 中 19q13.31-q13.32 扩增频率高于男性(23.5% vs 0.0%, $P=0.004$),其内定位有 BCL3、BCAM 和 RELB 等肿瘤相关基因^[13-15]。有关这些肿瘤相关基因是否以及如何与性别相关的 HCC 演进过程中发挥不同作用有待进一步研究。

本研究的一个有趣发现是,11q11 丢失常见于男性 HCC 中,而 11q11 扩增仅见于女性 HCC 中。有报道 11q 扩增和丢失均常见于 DN 中,提示 11q 片段 CNA 是 HCC 演进过程中的一个早期事件^[16]。由于在 70 kb 的 11q11 片段中仅定位 4 个嗅觉受体基因(OR4C11、OR4P4、OR4S2 和 OR4C6),我们推测 11q11 CNA 的性别差异性可能是关联其他染色体片段 CNA 所致。与此推测相一致的是,本组数据显示,11q11 扩增与 19q13.31-q13.32 扩增呈显著性相关($P=0.042$)。

必须强调的是,由于不同病因学(如 HBV、HCV)基础上的 HCC 具有不同的 CNA 谱^[10, 17],本研究以 HBV-HCC 为对象的研究结果是否适用于其他病因基础上的 HCC 尚有待进一步验证。另外,在本组 HCC 人群中,吸烟和饮酒因素的分布存在明显性别差异,而已有报道吸烟者的肺癌组织 DNA 的 CNA 谱不同于非吸烟者^[18],因此我们不能除外本研究所筛选出的性别差异性 CNA 可能部分反映了吸烟相关的 CNA 差异。然而本研究基于吸烟因素的分层分析显示,所筛选出的 CNA 在非吸烟人群中仍具有性别差异,增加了本研究结果的可信性。由于本研究的 CNA 是通过芯片方法检测的,且未对

性别差异性 DNA 片段进行定量 PCR 等方法验证, 我们定义至少 3 个连续性探针发生同向变化(扩增或丢失)为候选 CNA, 以尽可能减少因实验技术局限性所致的假阳性结果。此外, 本研究样本量特别是女性样本量较小, 因此期待进行基于大样本的验证性研究。

综上所述, 本研究结果显示男性与女性 HCC 在 CNA 方面存在显著差异性, 提示 CNA 在性别特异性 HCC 演进过程中发挥重要作用。本研究所定位的性别差异性 CNA 可能有助于鉴定在不同性别 HCC 演进过程中发挥不同作用的肿瘤相关基因。鉴于 CNA 也是胃癌、结直肠癌等多种实体性肿瘤的重要分子特征之一^[19-20], 有关 CNA 是否在这些肿瘤演进过程中也发挥性别差异性作用值得深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] El-Serag H B, Rudolph K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132:2557-2576.
- [2] Naugler W E, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy A M, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production[J]. *Science*, 2007, 317:121-124.
- [3] Takemoto N, Iizuka N, Yamada-Okabe H, Hamada K, Tamesa T, Okada T, et al. Sex-based molecular profiling of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26:673-678.
- [4] Midorikawa Y, Tang W, Sugiyama Y. High-resolution mapping of copy number aberrations and identification of target genes in hepatocellular carcinoma[J]. *Biosci Trends*, 2007, 1:26-32.
- [5] Guan X Y, Fang Y, Sham J, Kwong D, Zhang Y, Liang Q, et al. Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001, 30:110.
- [6] Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Bi-not F, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2001, 120:1763-1773.
- [7] Venkatraman E S, Olshen A B. A faster circular binary segmentation algorithm for the analysis of array CGH data[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23:657-663.
- [8] Wands J. Hepatocellular carcinoma and sex[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357:1974-1976.
- [9] Tornillo L, Carafa V, Sauter G, Moch H, Minola E, Gambacorta M, et al. Chromosomal alterations in hepatocellular nodules by comparative genomic hybridization: high-grade dysplastic nodules represent early stages of hepatocellular carcinoma[J]. *Lab Invest*, 2002, 82:547-553.
- [10] Moinzadeh P, Breuhahn K, Stützer H, Schirmacher P. Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade—results of an explorative CGH meta-analysis[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92:935-941.
- [11] Wong N, Chan A, Lee S W, Lam E, To K F, Lai P B, et al. Positional mapping for amplified DNA sequences on 1q21-q22 in hepatocellular carcinoma indicates candidate genes over-expression[J]. *J Hepatol*, 2003, 38:298-306.
- [12] Wei X, Xu H, Kufe D. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha[J]. *Mol Cell*, 2006, 21:295-305.
- [13] Maldonado V, Espinosa M, Pruefer F, Patiño N, Ceballos-Canciano G, Urzua U, et al. Gene regulation by BCL3 in a cervical cancer cell line[J]. *Folia Biol(Praha)*, 2010, 56:183-193.
- [14] Drewniak C, Wienrich B G, Schön M, Ulrich J, Zen Q, Telen M J, et al. Molecular interactions of B-CAM (basal-cell adhesion molecule) and laminin in epithelial skin cancer[J]. *Arch Dermatol Res*, 2004, 296:59-66.
- [15] Slovak M L, Bedell V, Hsu Y H, Estrine D B, Nowak N J, Delioukina M L, et al. Molecular karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive versus refractory Hodgkin lymphoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17:3443-3454.
- [16] Raidl M, Pirker C, Schulte-Hermann R, Aubele M, Kandioler-Eckersberger D, Wrba F, et al. Multiple chromosomal abnormalities in human liver (pre)neoplasia[J]. *J Hepatol*, 2004, 40:660-668.
- [17] Wong N, Lai P, Pang E, Fung L F, Sheng Z, Wong V, et al. Genomic aberrations in human hepatocellular carcinomas of differing etiologies[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6:4000-4009.
- [18] Massion P P, Zou Y, Chen H, Jiang A, Coulson P, Amos C I, et al. Smoking-related genomic signatures in non-small cell lung cancer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178:1164-1172.
- [19] Park C H, Rha S Y, Jeung H C, Kang S H, Ki D H, Lee W S, et al. Identification of novel gastric cancer-associated CNVs by integrated analysis of microarray[J]. *J Surg Oncol*, 2010, 102:454-461.
- [20] Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, et al. Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99:1835-1840.