

• 论 著 •

肝癌组织中 D-氨基酸氧化酶基因表达的临床意义

樊 斌, 张家耀, 张 勇, 李锦貌, 丁 俊, 张 建[△], 李庆贺
(恩施土家族苗族自治州中心医院肝胆外科, 湖北恩施 445000)

摘 要:目的 探讨肝癌组织中 D-氨基酸氧化酶(DAO)基因表达水平与其临床特征及预后的相关性。方法 收集 214 例肝癌患者的肝癌组织的基因表达谱及相关临床数据,对 DAO 基因表达水平与其临床特征及预后进行单变量和多变量分析。结果 单变量分析提示,DAO 高表达组中,血 AFP 水平较低($P=0.001$),结节数目较少($P=0.042$),TNM 分期较好($P=0.014$),转移风险较低($P=0.001$),且预后较好($P=0.011$)。多变量分析发现,DAO 高表达组中,血 AFP 水平较低(OR 为 0.162,95% CI 为 0.078~0.336),转移风险较低(OR 为 0.140,95% CI 为 0.069~0.284),且预后明显优于低表达组患者(OR 为 0.833,95% CI 为 0.700~0.992)。结论 肝癌组织中,DAO 表达水平与患者血 AFP 水平、转移风险及预后相关,其高表达是肝癌的保护性因素之一。

关键词:肝癌; D-氨基酸氧化酶; 表达

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.15.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)15-2068-03

Clinical significance of the expression of D-amino acid oxidase gene in hepatocellular carcinoma tissues

FAN Bin, ZHANG Jiayao, ZHANG Yong, LI Jinmao, DING Jun, ZHANG Jian[△], LI Qinghe

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China)

Abstract: Objective To study the clinical significance of the expression of D-amino acid oxidase(DAO) in hepatocellular carcinoma(HCC) tissues. Methods The gene expression profiles and related clinical data of 214 HCC cases were collected. Univariate and multivariate analyses were conducted to investigate the association between DAO expression levels, clinical traits, the prognosis. Results Univariate analysis indicated that there were a lower level of blood alpha fetoprotein(AFP, $P=0.001$), a smaller number of nodules($P=0.042$), a better TNM stage($P=0.014$), a lower metastasis risk($P=0.001$) and a better prognosis($P=0.011$) in the samples with high DAO expression. Multivariate analysis also indicated a lower AFP level(OR : 0.162, 95% CI : 0.078—0.336) and metastasis risk(OR : 0.140, 95% CI : 0.069—0.284) in the samples with high DAO expression, as well as a better prognosis(OR : 0.833, 95% CI : 0.700—0.992). Conclusion DAO expression was associated with blood AFP levels, metastasis risk and prognosis in HCC, and its high expression was a protective factor for HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; D-amino acid oxidase; expression

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,其病死率占恶性肿瘤的第 2 位,其中约一半患者及病死患者在我国^[1-2]。肝癌起病隐匿,大多数患者初次诊断时,便已进入中晚期,预后较差。对于未转移患者,手术切除和肝移植是肝癌根治的主要治疗方法。肝癌发生、发展机制已研究多年,但仍不完全明了^[3-4]。目前认为,肝炎病毒感染、长期饮酒等因素导致的多基因异常与肝癌的发生、发展密切相关^[5-6]。因此,从基因水平研究肝癌病理机制对明确肝癌发病,提高早期诊断率,寻找治疗靶点,改善患者预后至关重要。D-氨基酸氧化酶(DAO)是一种以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅基的典型黄素酶,可特异性催化 D-氨基酸生成相应的 α -酮酸、氨和过氧化氢^[7]。目前,系统论述肝癌组织中 DAO 表达的临床意义的报道鲜见。为此,本研究利用公共数据库中肝癌基因表达谱及相应临床数据,探讨肝癌组织中 DAO 表达水平与其临床特征及预后的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 共 214 例肝癌患者,平均(50.7±6.9)岁,其中男 185 例,女 29 例。97 例(45.3%)血甲胎蛋白(AFP)水平大于 300 ng/mL,87 例(40.7%)患者血丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平大于 50 U/L,77 例(36.0%)患者肿瘤直径大于 5

cm,44 例(20.6%)多发结节,197 例(92.1%)合并肝硬化, TNM 分期 I、II、III 期分别有 89(41.6%)、77(36.0%)、48(22.4%),103(48.1%)例具有转移高风险。Roessler 等^[8]发现 161 个基因表达谱组成的分子指纹(gene signature)可以预测肝癌转移,本研究中根据分子指纹情况来评估转移风险。

1.2 方法 从 GEO(Gene Expression Omnibus)公共数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)中下载肝癌基因表达谱及相关临床数据(研究号为 GSE14520)。GSE14520 包含两个芯片平台,分别为 Affymetrix HT Human Genome U133A Array(GPL3921)和 Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array(GPL571)。应用 GPL3921 和 GPL571 平台检测肝癌组织的患者分别为 220 例和 22 例。所有标本提取 RNA 后,经过生物素标记后与芯片杂交,采用 GeneChip scanner 3000 扫描,应用 GCOS1.0 进行初步分析。本研究中,为了排除平台差异,仅选用 GPL3921 平台检测的 220 例肝癌数据。

1.3 数据筛选及分组 经过数据筛选在 220 例肝癌患者中,排除 6 例临床数据缺失的患者,保留剩下 214 例临床数据完整的患者。基因表达谱中,所有基因的相对表达量均以探针信号强度以 2 为底数对数化后的值衡量。DAO 基因对应的检测探针为 206878_at,为特异性探针。根据探针号,提取 214 例患者

对应的 DAO 基因表达数据,然后根据该基因的表达水平进行由高到低排序后,前 50% 的样本($n=107$)作为高表达组,后 50% 的样本($n=107$)作为低表达组。

1.4 统计学处理 计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,多变量分析采用 Logistic 回归分析。生存分析中,单变量分析采用 Log-rank 检验和 Gehan-Breslow-Wilcoxon 检验,多变量分析采用 COX 回归分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。Log-rank 检验、Gehan-Breslow-Wilcoxon 检验及作图在 GraphPad 5.0 软件上完成, χ^2 检验、Logistic 回归及 COX 回归分析在 SPSS20.0 软件上完成。

2 结 果

2.1 肝癌组织 DAO 基因表达水平与其临床特征的相关性分析 DAO 高表达组中,血 AFP 水平较低($P=0.001$),结节数目较少($P=0.042$),TNM 分期较好($P=0.014$),转移风险较

低($P=0.001$)。而不同的 DAO 基因表达水平患者年龄、性别、ALT 水平、肿瘤大小,以及是否合并肝硬化比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。Logistic 回归分析发现,DAO 高表达组中,血 AFP 水平较低($P=0.001$;OR 为 0.162,95%CI 为 0.078~0.336),且转移风险较低($P=0.001$;OR 为 0.140,95%CI 为 0.069~0.284)。

2.3 肝癌组织 DAO 基因表达水平与其预后的相关性分析 DAO 高表达组患者预后明显优于低表达组患者($P=0.011$,HR 为 0.570,95%CI 为 0.371~0.877),见图 1。考虑年龄、性别、AFP、ALT、肿瘤大小、结节数目、合并肝硬化、TNM 分期、转移风险等因素后,多变量分析也提示 DAO 表达水平与肝癌预后呈负相关($P=0.040$;OR 为 0.833,95%CI 为 0.700~0.992)。见表 2。

表 1 不同临床特征患者的肝癌组织基因表达水平比较

变量	DAO 表达水平[n(%)]		组间比较		Logistic 回归分析	
	高表达组	低表达组	χ^2	P	P	OR(95%CI)
年龄(岁)						
≤50	61(57.0)	47(43.9)	3.664	0.056	0.127	0.575(0.282~1.172)
>50	46(43.0)	60(56.1)				
性别						
男	17(15.9)	12(11.2)	0.997	0.318	0.122	0.454(0.167~1.236)
女	90(84.1)	95(88.8)				
AFP(ng/mL)						
≤300	72(67.3)	25(23.4)	41.654	0.001	0.001	0.162(0.078~0.336)
>300	35(32.7)	82(76.6)				
ALT(U/L)						
≤50	48(44.9)	39(36.4)	1.569	0.210	0.197	0.616(0.296~1.285)
>50	59(55.1)	68(63.6)				
肿瘤大小(cm)						
≤5	42(39.3)	35(32.7)	0.994	0.319	0.425	1.438(0.589~3.508)
>5	65(60.7)	72(67.3)				
结节数目						
单发	28(26.2)	16(15.0)	4.120	0.042	0.897	1.068(0.396~2.883)
多发	79(73.8)	91(85.0)				
肝硬化						
是	101(94.4)	96(89.7)	1.597	0.206	0.424	0.596(0.168~2.120)
否	6(5.6)	11(10.3)				
TNM 分期						
I	32(29.9)	16(15.0)	8.594	0.014	0.835	—
II	39(36.4)	38(35.5)				
III	36(33.6)	53(49.5)				
转移风险						
高	29(27.1)	82(76.6)	52.578	0.001	0.001	0.140(0.069~0.284)
低	78(72.9)	25(23.4)				

注:—为无数据。

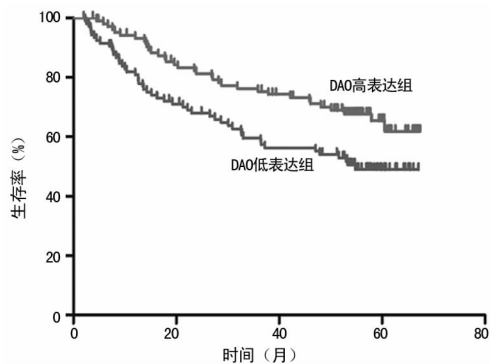


图 1 肝癌组织 DAO 基因表达水平与其预后的关系

表 2 肝癌组织 DAO 表达水平与预后的 COX 回归分析

变量	β	SE	Wald	P	OR(95%CI)
年龄	0.000	0.008	0.000	0.998	1.000(0.984~1.017)
性别	-0.086	0.267	0.104	0.747	0.917(0.544~1.548)
AFP	-0.072	0.227	0.100	0.752	0.931(0.596~1.453)
ALT	-0.379	0.197	3.694	0.055	0.685(0.466~1.008)
肿瘤大小	0.321	0.238	1.822	0.177	1.378(0.865~2.196)
结节数目	-0.239	0.285	0.701	0.402	0.788(0.451~1.377)
肝硬化	0.157	0.303	0.270	0.603	1.170(0.646~2.119)
TNM分期	—	—	3.809	0.149	—
转移风险	-0.366	0.236	2.411	0.121	0.693(0.436~1.101)
DAO 表达水平	-0.182	0.089	4.224	0.040	0.833(0.700~0.992)

注：—为无数据。

3 讨 论

DAO 基因位于第 12 号染色体 q24.11 区域,含八个外显子,编码的蛋白质含 347 个氨基酸。DAO 可以催化多种 D-氨基酸,但不能催化 L-氨基酸。人体内 D-氨基酸水平可随年龄增长而不断增加,DAO 可以通过降解 D-氨基酸来达到解毒作用。

目前,研究报道 DAO 与中枢神经系统病变相关。中枢神经系统中,DAO 主要分布在后脑,在小脑中水平最高,在大脑皮层水平最低^[9]。电子显微镜研究发现,DAO 存在于星形胶质细胞及 Bergmann 胶质细胞的过氧化物酶体内。DAO 可参与 D-丝氨酸的清除和灭活,及时清除释放入突触间隙多余的 D-丝氨酸,以防止其持续兴奋神经元。李悦等^[10]对西安地区 112 例精神分裂症患者进行研究后,发现 DAO 基因多态性与精神分裂症相关联。另外有大样本的病例-对照研究发现 D-氨基酸氧化酶激活剂(DAOA)多态性与精神分裂症发病相关^[11-12]。

DAO 在肿瘤中的作用报道较少,在肝癌中鲜有报道。目前认为,DAO 可以通过与相关底物作用,诱导氧化应激,而被认为是一个潜在的肿瘤治疗靶点^[13]。Bava 等^[14]将四氧化三铁与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷组成的纳米颗粒通过戊二醛与 DAO 交联,体外实验发现该系统在人卵巢癌、结肠癌、胶质母细胞瘤等细胞株中,有明显的抗肿瘤作用,提示 DAO 可进一步用于肿瘤的基因治疗研究。由此来看,DAO 在肿瘤中可能起到抑癌基因作用,与本研究结果一致。

综上所述,本研究通过对公共数据库中肝癌基因表达谱及相应临床数据分析发现,肝癌组织中,DAO 基因表达水平与患者血 AFP 水平、转移风险及预后相关,其高表达是肝癌的保护性因素之一。

参考文献

[1] 王黎君,殷鹏,刘韞宁,等. 1990 年与 2013 年中国人群肝癌疾病负担研究[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(6): 758-762.

[2] Torre LA, Siegel RL, Ward EM, et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends-An update[J]. Cancer Epid Biom Prev, 2016, 25(1): 16-27.

[3] 张金坤,王燕燕. 原发性肝癌发生机制及其治疗的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(29): 4171-4173.

[4] 黄伟,张欣欣. 非酒精性脂肪性肝病相关肝癌发病机制的研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(2): 157-160.

[5] 王宏利,沙小莹,郭雅玲,等. 乙肝相关性肝癌组织中 HBx 和 CEACAM1 的表达水平及意义[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(3): 384-388.

[6] 雷蕾,李旭,贺建华,等. 恩施地区人群 MTHFR C677T 多态性和饮酒在肝癌中的交互作用研究[J]. 河北医药, 2016, 38(21): 3339-3343.

[7] 平军娇,杜国宝,蒋廷云,等. 丝氨酸消旋酶及 D 构象氨基酸氧化酶与精神分裂症的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18): 2713-2715.

[8] Roessler S, Jia HL, Budhu A, et al. A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients [J]. Cancer Res, 2010, 70(24): 10202-10212.

[9] 赵冉冉,冯利伟,张金秀,等. D-氨基酸氧化酶结构的研究进展[J]. 生物技术通报, 2013, 29(12): 27-35.

[10] 李悦,陈元堂,胡江,等. D-氨基酸氧化酶基因多态性与精神分裂症的关联研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(9): 2142-2147.

[11] 杨丽,邵静茹,阮冶,等. D-氨基酸氧化酶激活剂基因多态性与精神分裂症的关联研究[J]. 中华精神科杂志, 2011, 44(2): 70-74.

[12] 胡国芹,杨程青,吕钦谕,等. DAOA 基因 rs2391191 位点多态性与中国汉族精神分裂症的相关性[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015, 35(10): 1443-1447.

[13] Sayed SM, Magd RM, Shishido Y, et al. D-Amino acid oxidase-induced oxidative stress, 3-bromopyruvate and citrate inhibit angiogenesis, exhibiting potent anticancer effects[J]. J Bioenerg Biomembr, 2012, 44(5): 513-523.

[14] Bava A, Gornati R, Cappellini F, et al. D-amino acid oxidase-nanoparticle system: a potential novel approach for cancer enzymatic therapy [J]. Nanomedicine (Lond), 2013, 8(11): 1797-1806.

(收稿日期:2017-02-27 修回日期:2017-04-27)