

载脂蛋白与肝细胞癌发病风险的双样本孟德尔随机分析

陆思敏 乐宁 于丽 杨洋*

广西中医药大学

DOI:10.12238/ffcr.v3i5.16273

[摘要] 该研究采用双样本孟德尔随机化 (MR) 方法, 利用 GWAS 数据探讨载脂蛋白 (APO) 与肝细胞癌 (HCC) 发病风险的因果关系。结果显示, 载脂蛋白 F (APOF) 水平与 HCC 风险呈显著反比关系, 该关联在多种 MR 模型中一致且经敏感性分析验证。进一步分析提示, APOF 的保护作用亦涉及肝纤维化和肝硬化。研究表明, APOF 有望作为 HCC 及其他肝脏疾病的潜在生物标志物和治疗靶点。

[关键词] 孟德尔随机化; 载脂蛋白; 载脂蛋白质; 肝癌

中图分类号: R735.7 文献标识码: A

Two-sample Mendelian Randomization Analysis of Apolipoproteins and the Risk of Hepatocellular Carcinoma

Simin Lu, Ning Le, Li Yu, Yang Yang*

Guangxi University of Chinese Medicine

Abstract: This study employed the dual-sample Mendelian randomization (MR) method using GWAS data to investigate the causal relationship between apolipoprotein (APO) and hepatocellular carcinoma (HCC) risk. Results demonstrated that APOF levels showed a significant inverse correlation with HCC risk, a finding consistent across multiple MR models and validated by sensitivity analysis. Further analysis suggested that the protective effects of APOF also involve liver fibrosis and cirrhosis. The research indicates that APOF has potential as a biomarker and therapeutic target for HCC and other liver diseases.

Keywords: Mendelian randomization; apolipoprotein; apolipoproteins; liver cancer

引言

肝癌是全球常见且致死率高的恶性肿瘤, 在男性中发病率居第六位, 女性居第九位^[1-2]。其危险因素包括病毒性肝炎、长期饮酒、肝硬化及代谢性疾病, 如高脂血症和糖尿病^[3-5]。目前治疗手段涵盖手术、放疗、化疗和靶向治疗, 但多在晚期诊断, 预后不佳, 因此早期生物标志物的探索尤为关键。其中, 载脂蛋白 (APOs) 作为脂质代谢和肝脏功能的重要调控因子, 其异常表达与多种肝脏疾病及癌症发生密切相关。

1 资料和方法

1.1 研究报告指南和研究设计

本研究采用两样本孟德尔随机化 (two-sample MR) 和公开数据集来研究载脂蛋白 (apolipoprotein, APO) 对肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma) 的影响。研究报告根据孟德尔随机化报告指南^[1]进行报道, 研究设计示意图如图 1 所示。

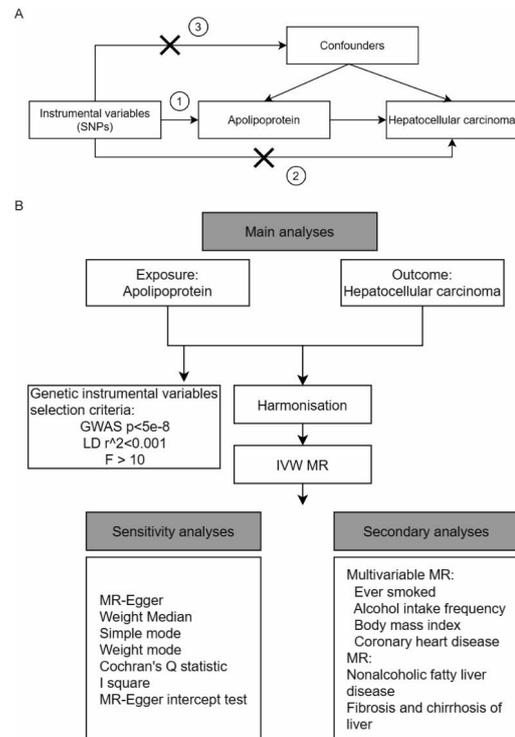


图 1 研究设计

1.2 数据来源

载脂蛋白 GWAS 数据来自 deCODE Genetics, 对近 5 万名冰岛人进行全基因组测序并检测血浆蛋白水平, 最终选取 11 种载脂蛋白 (APOA1/2/5、APOB、APOC1/2/3、APOD、APOE、APOF、APOL1) 用于分析。肝细胞癌 GWAS 数据取自 IEU open GWAS project, 病例 1,866 例, 对照 195,745 例。非酒精性脂肪肝、肝纤维化和肝硬化的 GWAS 数据来源于 FinnGen Consortium, 病例数分别为 894 例和 811 例, 对照均超过 21 万例。

1.3 工具变量选择

本研究中, 暴露的工具变量筛选标准如下: GWAS 中 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 的 $P < 5 \times 10^{-8}$ 作为首要筛选条件; 排除了处于连锁不平衡 ($r^2 < 0.001$ 的 SNP, 且每两个基因之间的物理距离 > 10000 kb) 的 SNP。然后, 再根据筛选出的 SNP 提取结局数据 GWAS 中工具变量。

1.4 敏感性分析

为验证结果稳健性, 采用 Cochran Q 检验与 I^2 统计量评估异质性, 异质性显著时使用 IVW 随机效应模型; 采用 MR-Egger 方法检验多效性, 截距 $P < 0.05$ 提示存在水平多效性; 并通过逐个剔除 (leave-one-out) 分析评估单一 SNP 对结果的影响。

1.5 统计分析

所有分析在 R 4.3.0 环境下进行, 主要使用 TwoSampleMR 包。结果以比值比 (OR) 和 95% 置信区间 (CI) 表示, SNP 筛选阈值为 $P < 5 \times 10^{-8}$, 其余统计检验以 $P < 0.05$ 为显著。

2 结果

2.1 工具变量筛选

根据本研究工具变量的筛选标准, 去除存在连锁不平衡的 SNP, 与肝细胞癌 GWAS 数据匹配后, 纳入与载脂蛋白水平相关的 SNP 作为工具变量。各蛋白的工具变量数量如表 1 所示, 由于暴露数量较多, 表中仅展示 MR 分析显著 ($P \text{ value} < 0.05$) 的指标, 详细工具变量筛选及 MR 分析结果见表 1。这些指标的工具变量的 F 检验统计量均大于 10, 说明本研究筛选的 SNP 多为强效应工具变量, 弱工具变量造成的可能偏倚是有限的。

表 1 载脂蛋白和肝细胞癌工具变量的选择

Exposure	Number of SNPs	Median of F	Minimum of F	Maximum of F
APOA1	2	161.37	42.68	280.05
APOC2	3	30.75	30.57	84.12
APOF	8	54.03	30.27	460.76

2.2 MR 因果效应估计

结果如图 2 所示, IVW 模型结果表明 APOA1、APOC2、APOF 均和肝细胞癌具有显著的因果关联。APOA1 (图 3A)、APOC2 (图 3B)、APOF (图 3C) 所有模型的 MR 分析如图 3 所示。

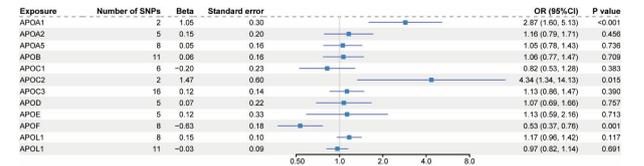


图 2 载脂蛋白和肝细胞癌的孟德尔随机化分析的多种模型分析结果

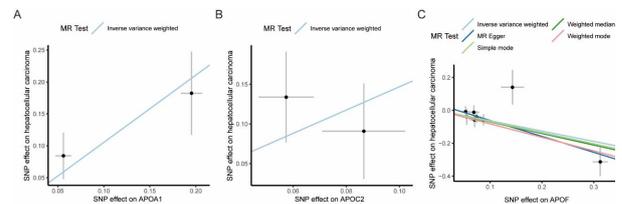


图 3 载脂蛋白和肝细胞癌的孟德尔随机化分析不同模型的效应估计

图 3 A-C: 散点图显示载脂蛋白 APOA1 (A)、APOC2 (B)、APOF (C) 和肝细胞癌的因果关系, 直线的斜率表示不同模型预测的因果关系的大小。

2.3 敏感性分析

APOA1 (图 4A)、APOC2 (图 4B)、APOF (图 4C) 的工具变量的漏斗图如图 4 所示, APOF 因果关联效应的散点基本呈对称分布, 表明结果不存在潜在的偏倚, APOA1、APOC2 由于工具变量较少, 可能存在潜在的偏倚。

表 2 载脂蛋白与肝细胞癌相关性的孟德尔随机化分析异质性检验

Exposure	Q	Q df	Cochran Q p-value
APOA1	0.61	1	0.434
APOC2	1.11	1	0.292
APOF	7.85	7	0.346

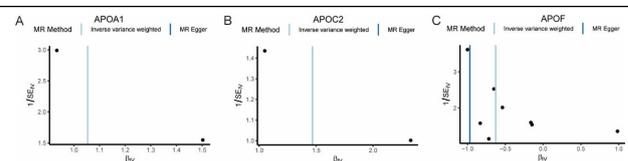


图 4 载脂蛋白和肝细胞癌的孟德尔随机化分析异质性检验漏斗图

采用 MR-Egger 回归进行工具变量水平多效性检验, 各指标的截距项的统计学假设检验 P 值均大于 0.05, 截距接近 0, 表明本研究的因果推断不受水平多效性的影响 (见表 3)。

采用逐个剔除检验对结果进行敏感性分析, 未发现 APOF (图 5) 效应估计值显著性发生变化, 提示结果稳定性。

表3 载脂蛋白与肝细胞癌相关性水平多效性的孟德尔随机化分析

Exposure	MR-Egger intercept	Standard error	P value
APOA1	0.052	0.163	0.779
APOC2	-0.062	0.126	0.658
APOF	0.036	0.032	0.306

Note: MR, Mendelian randomization

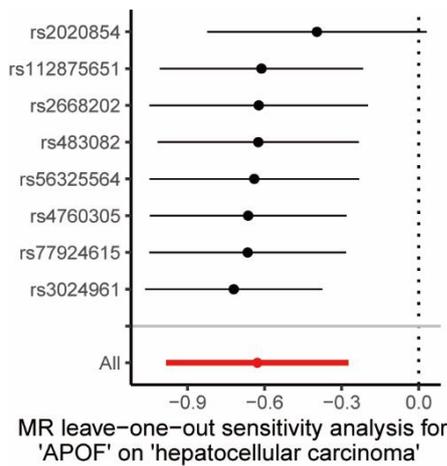


图5 载脂蛋白 F 和肝细胞癌的孟德尔随机化 leave-one-out 分析

2.4 多变量 MR 分析

模型1校正吸烟的间接影响,结果表明APOF仍然对肝细胞癌具有显著的影响($P < 0.05$);模型2校正饮酒频率影响,APOF存在显著直接影响($P < 0.05$);模型3校正BMI影响,APOF存在显著直接影响($P < 0.05$);模型4校正冠心病影响,APOF存在显著直接影响($P < 0.05$);模型5同时校正了吸烟、饮酒频率、BMI、冠心病的间接影响,结果显示APOF仍然具有对肝细胞癌的直接影响($P < 0.05$) (见表4)。

表4 载脂蛋白 F 与肝细胞癌影响的多变量孟德尔随机化分析结果

Model	Exposure	Number of SNPs	OR (95%CI)	P value
Model 1	Ever smoked	60	1.45 (0.74, 2.83)	0.281
	APOF	6	0.54 (0.41, 0.71)	<0.001
Model 2	Alcohol intake frequency	16	1.91 (0.65, 5.60)	0.236
	APOF	7	0.48 (0.33, 0.71)	<0.001
Model 3	BMI	417	1.05 (0.82, 1.34)	0.688
	APOF	3	0.74 (0.56, 0.96)	0.025

Model 4	CAD	45	0.82 (0.68, 0.98)	0.028
	APOF	5	0.53 (0.34, 0.83)	0.006
Model 5	APOF	3	0.72 (0.55, 0.94)	0.017
	BMI	384	1.07 (0.82, 1.38)	0.633
	CAD	21	0.80 (0.69, 0.93)	0.004
Alcohol intake frequency		5	1.29 (0.66, 2.49)	0.454
ever smoked		21	1.78 (0.64, 4.98)	0.269

2.5 APOF 和其他肝病的关系

IVW 模型结果表明 APOF 和肝纤维化/肝硬化具有显著的因果关联 ($OR = 0.48$, $P \text{ value} = 0.001$), APOF 水平越高肝细胞癌的发生风险越低。



图6 载脂蛋白 F 和其他肝病的孟德尔随机化分析的多种模型分析结果

3 讨论

本研究利用多种 MR 模型 (IVW、MR Egger、加权中位数、简单模式和加权模式) 进行综合分析,发现 APOA1、APOC2 和 APOF 与 HCC 存在显著因果关系,其中 APOF 水平升高与 HCC 风险降低呈稳定的负相关。APOA1 作为 HDL 主要成分,除促进胆固醇清除、改善心血管和肝脏功能外,还具备抗炎作用;APOC2 参与 LDL 代谢,其异常可能导致代谢紊乱并诱发肝脏应激反应;APOF 在脂质代谢、炎症和凝血中发挥关键作用,可能通过抑制炎症信号通路减缓癌症进展。敏感性分析显示, APOF 在所有模型中结果一致,工具变量数量充足,漏斗图对称性良好,剔除单一 SNP 后效应依旧稳健,进一步强化了其保护作用的证据。在多变量 MR 中, APOF 对 HCC 的影响在调整吸烟、饮酒、BMI 和冠心病等混杂因素后仍然显著,提示其独立效应。结合既往研究, APOF 可能在肝脏炎症、纤维化和脂肪沉积等关键环节中发挥作用,本研究亦发现其与肝纤维化和肝硬化风险降低相关。

4 总结

我们的研究初步探讨了 APOF 与肝细胞癌以及肝纤维化和肝硬化之间的关联。研究结果表明, APOF 在肝细胞癌中具有显著的因果效应,即使在调整了其他癌症风险因素后,其直接效应仍持续存在。

[参考文献]

- [1]Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
- [2]Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–249. e
- [3]El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011 Sep 22;365(12):1118–27. en
- [4]Simon TG, King LY, Chong DQ, Nguyen LH, Ma Y, VoPham T, Giovannucci EL, Fuchs CS, Meyerhardt JA, Corey KE, Diabetes, metabolic comorbidities, and risk of hepatocellular carcinoma: Results from two prospective cohort studies. *Hepatology*. 2018 May;67(5):1797–1806
- [5]Singal AK, Batailler R, Ahn J, Kamath PS, Shah VH. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2018 Feb;113(2):175–194.

作者简介:

杨洋 (1987.07-), 女, 壮族, 广西南宁人, 博士, 助理研究员, 研究方向为民族医药抗感染免疫、民族医药治疗肝病。

基金项目:

广西中青年教师基础研究能力提升项目(2024KY0299); 国家自然科学基金(81860780); 广西省自然科学基金(2021GXNSFBA220036、2020GXNSFAA297162); 中药新兴生物材料与智能装备开发关键技术跨学科创新研究团队(GZKJ23035); 广西中医药大学校级面上项目(2024MS033); 广西中医药大学研究生教育创新计划(XYJ25039)。