

3 个切口,但是均被衣物遮盖,因此在临床治疗过程中应该根据患者意愿及个体情况综合考虑手术方法的选择,但是本研究同样存在研究含量过小的局限性,难以避免结果存在偏差,因此本研究将进一步扩大样本量研究,以进一步明晰两种手术对患者免疫功能的影响。

参考文献

- 1 董秀志,黄新妍,晁杰伟,等.内镜辅助微创甲状腺手术和传统手术的临床效果比较[J].中国耳鼻咽喉科杂志,2011,11(5):312-314
- 2 于宏,吴硕东,范莹,等.经腋窝入路单孔内镜甲状腺切除术[J].中国内镜杂志 2014,20,(11):1184-1187
- 3 王征,李伟汉,张浩.腔镜辅助下甲状腺手术与传统开放性甲状腺手术的比较[J].重庆医学,2013,42(28):3432-3433
- 4 于晓会,单忠燕.甲状腺结节的病因与流行病学趋势[J].中国普外基础与临床杂志,2011,18(8):800-802
- 5 Gagner M. Endoscopic subtotal parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism[J]. Br J Surg,1996,83(6):875
- 6 Liu E, Qadir Khan A, Niu J, *et al.* Natural orifice total transtracheal endoscopic thyroidectomy surgery: first reported experiment [J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2015 ;25(7):586-591
- 7 Park KN, Mok JO, Chung CH, *et al.* Does postthyroidectomy syndrome really exist following thyroidectomy? prospective comparative analysis of open vs endoscopic thyroidectomy[J]. Clin Exp Otorhinolaryngol,2015,8(1):76-78
- 8 Capponi MG, Bellotti C, Lotti M, *et al.* Minimally invasive video-assisted thyroidectomy: ascending the learning curve[J]. J Minim Access Surg, 2015,11(2):119-122
- 9 Fan Y, Wu SD, Kong J. Single-port access transaxillary totally endoscopic thyroidectomy: a new approach for minimally invasive thyroid operation[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2011,21(3):243-247
- 10 王勇,张斌蓉,王青,等.腹腔镜胆囊切除术对机体炎症免疫反应的影响[J].中国微创外科杂志,2004,4(5):422-423
- 11 胡良安,李岱容,罗永艾,等.肺结核患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 调节 T 细胞增多并抑制抗结核免疫[J].第三军医大学学报,2011,33(20):2124-2127
- 12 Grotzke JE, Lewinsohn DM. Role of CD8⁺ T lymphocytes in control of Mycobacterium tuberculosis infection [J]. Microbes Infect, 2005,7(4):776-788
- 13 王国坚,赵正强,吴敏媚.不同甲状腺手术对机体免疫功能的影响[J].西南国防医药,2014,24(4):395-398
- 14 刘鸿,周恩亮,冯巧灵,等.内镜下甲状腺手术与开放性甲状腺手术对机体免疫反应的影响:Meta 分析[J].转化医学杂志 2012,1(2):88-94
(收稿日期:2015-11-09)
(修回日期:2015-11-20)

PNPLA3rs738409G/C 基因多态性与肝癌易感性关系的 Meta 分析

王 倩 马静静 吴鹏波 谭诗云 舒泳翔 柳 健

摘 要 **目的** 探讨 PNPLA3 基因多态性与肝癌易感性关系。**方法** 计算机检索数据库,收集有关 PNPLA3 基因多态性与肝病易感性关系病例对照研究,提取纳入文献的相关数据进行 Meta 分析,以病例组与对照组 PNPLA3 各种基因模型的比值比(OR)为效应指标,Egger's 检验和 Bgger's 检验偏倚。**结果** 共 8 篇研究符合纳入标准,累计病例数 1266 例,对照组 3529 例。Meta 分析表明 PNPLA3 基因多态性与肝病易感性有明显关联性。**结论** PNPLA3 基因多态性与肝病易感性明显关联性[GG vs CC:OR = 3.05, 95% CI: 2.42 ~ 3.86; CG vs CC: OR = 1.30, 95% CI: 1.13 ~ 1.50; CG/GG vs CC: OR = 1.39, 95% CI: 1.23 ~ 1.57; GG vs CG/CC:OR = 2.90, 95% CI: 2.32 ~ 3.63]。

关键词 PNPLA3 基因多态性 肝癌 易感性 Meta 分析

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.027

Association between PNPLA3 Polymorphism and Hepatocellular Carcinoma Susceptibility: A Meta-analysis. Wang Qian, Ma Jingjing, Wu Pengbo, *et al.* Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To explore the association between the PNPLA3 polymorphism and Hepatocellular carcinoma susceptibility. **Methods** Data bases were comprehensively searched to retrace all the related studies on the associations between PNPLA3 polymorphis-

作者单位:430060 武汉大学人民医院消化内科

通讯作者:谭诗云,主任医师,教授,博士生导师,电子邮箱:tanshiyun@126.com

mand hepatocellular carcinoma susceptibility in European population. The pooled odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CIs) of the association between PNPLA3 polymorphism and hepatocellular carcinoma susceptibility were performed in different genetic model comparison. Publication bias was detected by symmetry of funnel plot. **Results** Eight original studies with a total of 4795 subjects (1266 patients and 3529 controls) were entered the final data combination. The results of Meta - analyses showed that there were no significant associations between PNPLA3 polymorphism and hepatocellular carcinoma susceptibility [GG vs CC; OR = 3.05, 95% CI: 2.424 - 3.86; CG vs CC; OR = 1.30, 95% CI: 1.13 - 1.50; CG/GG vs CC; OR = 1.39, 95% CI: 1.23 - 1.57; GG vs CG/CC; OR = 2.90, 95% CI: 2.32 - 3.63]. **Conclusion** Meta - analysis strongly suggests that there are significant associations between PNPLA3 polymorphism and hepatocellular carcinoma susceptibility.

Key words PNPLA3; Polymorphism; Hepatocellular carcinoma; Susceptibility; Meta - analysis

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的一种肝脏原发性恶性肿瘤^[1]。现有研究发现,肝癌发病主要与肝炎病毒感染有关,此外还与接触环境中多环芳烃化合物等有害物质以及宿主遗传因素有关,其中宿主遗传因素在肝癌的发病中起着至关重要的作用^[2]。近年来发现 PNPLA3 多态性在肝癌发病中发挥着重要的作用,为此国内外研究者针对 PNPLA3 基因多态性与肝癌病易感性进行大量研究。但由于各研究结论一定程度上存在分歧,为统一这些分歧,笔者对已发表的相关研究进行 Meta 分析,以全面评估 PNPLA3 位点基因多态性与肝癌病易感性。

材料与方法

1. 纳入标准:①病例均为经确诊肝癌患者,诊断通过病理切片予以确认;②涉及 PNPLA3 基因多态性与肝癌病易感性相关性的文献;③纳入研究为病例对照研究;④可以通过不同渠道索取全文;⑤研究中有足够数据计算比值比 (odds ratio, OR) 及 95% CI 可信区间 (confidence interval, 95% CI)。排除标准:①不是病例对照研究;②无足够信息计算 OR;③重复研究;④其他有关非人体研究实验;⑤非 PNPLA3 位点。

2. 检索策略:计算机检索 PubMed 以及中国生物医学期刊网、中国知网、万方、维普数据库,检索时间均为 1990/2015 - 11;英文检索式:“Hepatocellular carcinoma or liver canaer” AND “mutation OR variant OR polymorphism” AND “PNPLA3 or Patatin - like phospholipase domain containing 3”;中文检索式:“肝癌”和“多态性”和“Patatin 样磷脂酶结构域蛋白 3”。手动检索纳入研究文献中相关参考文献。

3. 资料提取:2 位评价者 (王倩、吴鹏波) 阅读检索出的相关文献,通过阅读文题和摘要按照纳入文献标准进行初步的筛选。若在筛选过程中若有分歧,可通过另外 2 位评价者 (王倩、吴鹏波) 进行讨论达

成一致。两位评阅人 (舒泳翔、柳健) 独立完成对原始文献中记录数据的收集。提取作者、研究时间、研究地区及国家、病例组对照组基因型分布、对照组基因型分布是否符合 Hardy - Weinberg ($H - W$) 平衡。

4. 质量评价:按照相关文献报道评估各个纳入文献研究的质量标准^[3]。主要从以下几个方面对文献质量进行评估:①样本量大小;②研究中的病例诊断依据是否充分;③对照组与病例组的基线资料的是否匹配;④对照组 $H - W$ 平衡;⑤基因检测技是否准确可靠;⑥一般信息是否充分。以上 6 项,每 1 项记为 1 分,其中单篇评分总计 ≥ 3 分者为质量可靠。

5. 统计学方法:Meta 分析所有统计学处理均为 RevMan5.1 和 Stata12.0, χ^2 检验评估纳入文献研究的结果相互之间是否有异质性;异质性检验 $P_{het} < 0.05$,则表示各个研究之间有异质性,而异质性大小程度则用 I^2 衡量,若无异质性,则合并采用固定效应模型计算 OR;若存在异质性,则采用随机效应模型,合并效应 OR^[4,5];为分析异质性来源,可根据纳入研究的某些特征分层,最终进行亚组分析。敏感度分析操作如下:按顺序排除单个文献后进行 Meta 分析,观察剔除单个研究对合并综合效应量的影响。采用 χ^2 检验对照组基因分布是否符合 Hardy - Weinberg 平衡, $P_{H-W} < 0.05$ 认为不平衡。运用 Bgger's 以及 Eggers 结果 $P_{Begger's}$ 和 P_{Eggers} 分析是否有发表偏倚。

结 果

1. 文献检索结果:根据设置的检索公式初步检索出符合条件的文献 87 篇,经阅读文题和摘要排除非病例对照试验 78 篇;排除 1 篇涉及其他位点研究,最终纳入符合条件的研究 8 篇^[6-13]。文献纳入过程见图 1。

纳入研究的基本特征见表 1。最后纳入肝癌患者 1266 例,健康对照人群 3529 例。病例组基因型分

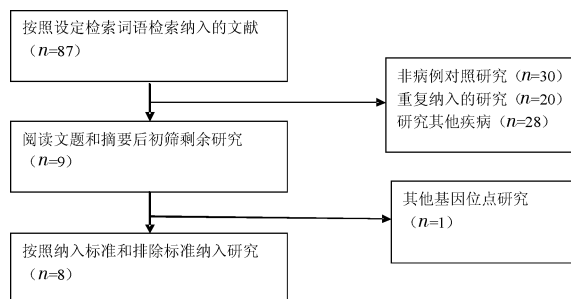


图1 Meta分析文献纳入过程

布为 CC (37.28%)、CG (41.79%)、GG (20.93%)；对照组基因型分布为 CC (55.51%)、CG (38.03%)、GG (6.46%)。研究时间主要在 2011 ~ 2015 年，研究人群主要分布于德国、意大利、美国、北美 4 个非亚洲国家及中国。纳入的 8 篇文献对照组基因型分布均符合 $H-W$ 遗传平衡 (表 1)。

2. 纳入研究质量评价：根据评分标准对文献评分，8 篇文献评分分别为 5、4、5、5、3、4、5、3 分，均分为 4 分，提示文献质量较好 (表 1)。

表1 Meta分析纳入研究的一般情况 ($\bar{x} \pm s$)

作者	发表年份 (年)	国别	肝癌			对照			H - W 平衡	文献 评分
			CC	CG	GG	CC	CG	GG		
Falleti ^[6]	2011	意大利	43	60	38	218	175	35	0.99	5
Falleti ^[7]	2015	意大利	45	64	41	116	90	22	0.46	4
Nischalke ^[8]	2011	德国	57	73	31	112	69	9	0.69	5
Friedrich ^[9]	2014	德国	33	41	12	1135	718	97	0.22	5
Valenti ^[10]	2013	意大利	194	187	79	146	95	16	0.92	3
Ezzikouri ^[11]	2014	北非	43	35	23	66	54	12	0.84	4
Liu ^[12]	2014	英国	28	43	29	125	117	33	0.49	5
高超 ^[13]	2014	中国	29	26	12	41	24	4	0.84	3

3. Meta 分析结果：PNPLA3 位点基因多态性与肝癌病风险 Meta 分析结果如下：[纯合子比较模型 (GG vs CC)：OR = 3.05, 95% CI: 2.42 ~ 3.86；杂合子比较模型 CG vs CC：OR = 1.30, 95% CI: 1.13 ~ 1.50；显性遗传模型 CG/GG vs CC：OR = 1.39, 95% CI:

1.23 ~ 1.57；隐性遗传模型 GG vs CG/CC：OR = 2.90, 95% CI: 2.32 ~ 3.63]，详见图 2。

4. 发表偏倚分析：4 种基因模型 Meta 分析 Egger 回归法和 Begg 秩相关法提示均无发表偏倚存在 (表 2)。

表2 PNPLA3 rs738409G/C 基因多态性与肝癌易感性关系的 Meta 分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

基因模型	关联性检验			异质性检验		发表偏倚检验	
	OR (95% CI)	Z	P value	I ² %	P _{het}	P _{Begg's}	P _{Egger's}
GG vs CC	3.05 (2.42 ~ 3.86)	9.40	0.000	0	0.918	0.711	0.703
CG vs CC	1.30 (1.13 ~ 1.50)	3.58	0.000	0	0.971	0.902	0.604
CG/GG vs CC	1.39 (1.23 ~ 1.57)	5.17	0.000	0	0.983	1.000	0.751
GG vs CG/CC	2.90 (2.32 ~ 3.63)	9.35	0.000	0	0.978	0.711	0.682

5. 敏感度分析：按顺序排除单个文献后进行 Meta 分析，结果未有明显的改变，表明 Meta 分析结果相对稳定。

讨 论

本研究 Meta 分析包含 8 个研究，其中共纳肝癌患者 1266 例，对照人群 3529 例。CC、CG、GG 基因型在病例组和对照组的分布分别为 37.28%、41.79%、20.93%、55.51%、38.03%、6.46%。Meta 分析显示，PNPLA3 基因多态性与肝癌病易感性有明显关联性。该项结果同时也与我国研究者研究 PNPLA3 基因多态性与肝硬化易感性关联性结果类似。PNPLA3 又

名脂肪营养素，PNPLA3 在哺乳动物的各个器官和组织均有表达，不同器官组织其表达量呈现较大的差异，其中上皮组织表达最少，肝脏表达量最多。目前 PNPLA3 多态性影响肿瘤易感性机制鲜见报道。众所周知，能量代谢紊乱在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的作用。相关动物实验也发现，在用质粒转染导致 PNPLA3 基因过表达 C57BL6 小鼠和 db/db 小鼠肝脏组织中，经典的胰岛素信号通路被显著的抑制，机体的葡萄糖耐受量可明显的降低。与之相反的是肝脏 PNPLA3 基因特异性敲除的 db/db 小鼠，肝脏组织的胰岛素信号通路亦可激活，进而改善了机体的胰

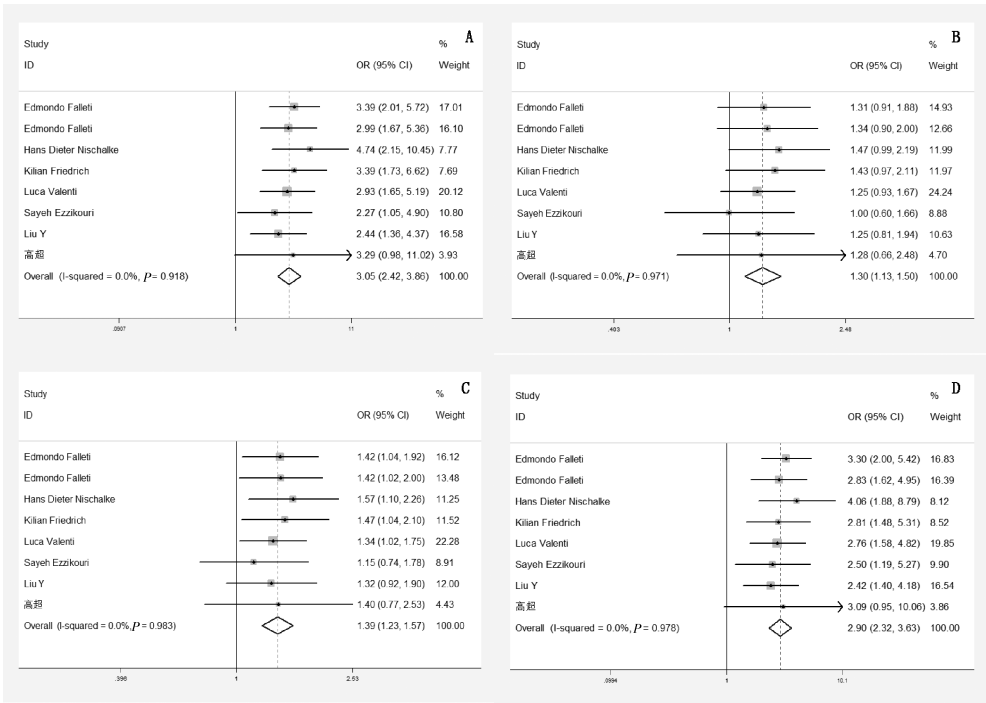


图 2 PNPLA3 基因多态性与肝癌易感性关系的 Meta 分析
A. GG vs CC; B. GC vs CC; C. GC/GG vs CC; D. GG vs GC/CC)

胰岛素抵抗^[14]。上述研究结果提示 PNPLA3 可能参与胰岛素抵抗发病和机体葡萄糖代谢平衡,可能导致肝癌的发生。

Meta 分析是一种能够采用合适数学模型将多个相同或者类似的研究结果进行综合分析的定量的统计学方法,以增加研究结果的检验效能,这同时也解决了类似结果存在一定分歧的问题。Meta 分析最显著的特点是加大样本量,有效提高研究结果的检验效能。本研究 Meta 分析通过依次排除单个文献后 Meta 分析结果进行敏感度分析,敏感度分析剔除单个研究并未对合并综合效应量产生影响,提示 Meta 分析结果相对稳定;发表偏倚是影响 Meta 分析的结论可靠性的重要因素之一,本研究运用 Bgger's 回归分析以及 Egger's 检验发现 Meta 分析未存在明显偏倚,提示结果可靠。而纳入研究文献质量较高为本文研究提供了可靠的原始资料。综上所述,Meta 分析结果具有科学性、稳定性和可靠性。然而尽管在探索 PNPLA3 基因多态性与肝癌风险及其发展之间的关联性上已作出相当大的努力,但是必须承认在这篇 Meta 分析中存在一定局限性,首先纳入文献较少,目前进行荟萃分析的样本量是有限的,且研究对象大多为白人,这就是为什么没有进行亚组分析的原因。其次肝癌个体易感性有可能是多基因及基因与环境暴

露交互作用的结果。此外,肝炎病毒感染、酒精滥用、吸烟和肥胖也会增加肝癌风险。

基于上述研究结果,PNPLA3 rs738409C/G 基因多态性与肝癌易感性有显著相关性。然而,受研究数量有限以及研究中不足的影响,仍需更多设计更为科学合理的病例对照研究进一步评估 PNPLA3 基因多态性与肝癌易感性之间的相关性。此外可以进一步研究是否可将 PNPLA3 rs738409C/G 基因筛查用于肝癌早期诊断中。

参考文献

- 1 Mittal S, El - Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population[J]. Clin Gastroenterol, 2013, 47 (Suppl): S2 - 6
- 2 Kato N, Muroyama R, Goto K. Hepatitis C virus induced hepatocellular carcinoma associated genes [J]. Nihon Rinsho, 2015, 73 (2): 333 - 338
- 3 Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, et al. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the STROBE statement[J]. Eur J Epidemiol, 2009, 24 (1): 37 - 55
- 4 Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease[J]. Natl Cancer Inst, 1959, 22 (4): 719 - 748
- 5 DerSimonian R, Laird N. Meta - analysis in clinical trials[J]. Control Clin Trials, 1986, 7 (3): 177 - 188
- 6 Falletti E, Fabris C, Cmet S, et al. PNPLA3 rs738409C/G polymor-

- phism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence[J]. *Liver Int.*, 2011, 31(8): 1137 – 1143
- 7 Falleti E, Cussigh A, Cmet S, *et al.* PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 variants increase the risk of hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis[J]. *Dig Liver Dis*, 2016, 48(1): 69 – 75
- 8 Nischalke HD, Berger C, Luda C, *et al.* The PNPLA3 rs738409 148M/M genotype is a risk factor for liver cancer in alcoholic cirrhosis but shows no or weak association in hepatitis C cirrhosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27087
- 9 Friedrich K, Wannhoff A, Kattner S, *et al.* PNPLA3 in end – stage liver disease: alcohol consumption, hepatocellular carcinoma development, and transplantation – free survival[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(7): 1477 – 1484
- 10 Valenti L, Motta BM, Soardo G, *et al.* PNPLA3 I148M polymorphism, clinical presentation, and survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75982
- 11 Ezzikouri S, Alaoui R, Tazi S, *et al.* The adiponutrin I148M variant is a risk factor for HCV – associated liver cancer in North – African patients[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 21: 179 – 183
- 12 Liu YL, Patman GL, Leathart JB, *et al.* Carriage of the PNPLA3 rs738409 C > G polymorphism confers an increased risk of non – alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 61(1): 75 – 81
- 13 高超, 王霞, 李立红, 等. PNPLA3 基因多态性与原发性肝癌遗传易感性的相关研究[J]. *中国医学创新*, 2014, 11(18): 12 – 14
- 14 Hao L, Ito K, Huang KH, *et al.* Shifts in dietary carbohydrate – lipid exposure regulate expression of the non – alcoholic fatty liver disease – associated gene PNPLA3/adiponutrin in mouse liver and HepG2 human liver cells[J]. *Metabolism*, 2014, 63(10): 1352 – 1362
- (收稿日期: 2015 – 11 – 19)
- (修回日期: 2015 – 11 – 30)

hsa – microRNA – 96 – 5p down 慢病毒 表达载体的构建与鉴定

竺王玉 张玉惠 张伟忠 董金良 梁金荣

摘 要 **目的** 构建 hsa – microRNA – 96 – 5p down 慢病毒表达载体并对其进行鉴定。**方法** 根据 hsa – miR – 9 – 5p 基因序列设计合成 hsa – miR – 96 – 5p – inhibition – a 和 hsa – miR – 96 – 5p – inhibition – b, 将合成后成对的引物干粉溶解于退火缓冲液中引物退火。将慢病毒 GV280 载体酶切产物通过 T4DNA 连接酶将双酶切线性化的载体和退火双链 DNA 连接。经菌落筛选, 菌落 PCR 及测序鉴定, 荧光法及药筛法测定病毒效价。**结果** 菌落 PCR 和测序验证成功构建了 hsa – miR – 96 – 5p down 慢病毒载体, 经荧光法及药筛法测定病毒效价为 3×10^8 TU/ml。**结论** 成功构建了 hsa – miR – 96 – 5p down 慢病毒表达载体, 为后续深入研究 miR – 9 – 5p 在肺癌细胞中的生物学行为及机制提供了前期实验基础。

关键词 hsa – miR – 96 – 5p 慢病毒载体 肺癌

中图分类号 R972 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.028

Construction and Identification of Hsa – micorRNA – 96 – 5p Down Lentivirus Expression Vector. Zhu Wangyu, Zhang Yuhui, Zhang Weizhong, *et al.* Department of General Surgery, Cell and Molecular Biology Laboratory, The Affiliated Zhoushan Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 316021, China

Abstract Objective To construct and identify a hsa – micorRNA – 96 down lentivirus expression vector. **Methods** According to the gene sequence of hsa – microRNA – 96, we designed and synthesized two pairs of single stranded oligonucleotides hsa – microRAN – 96 – 5p – inhibition – a and hsa – miR – 96 – 5p – inhibition – b. The powder of primers was then dissolved in the annealing buffer and to be annealed. The double enzyme digested GV280 lentivirus vectors were linked to the annealing double – stranded DNA via T4 DNA ligase. The constructed recombinant vectors were identified by single colony PCR and DNA sequencing after the colony isolation. The concentration of lentivirus was detected by the fluorescence and drug screening method. **Results** The single colony PCR and DNA sequencing confirmed that the purpose anti – hsa – microRNA – 96 oligonucleotide was correctly inserted into the lentivirus vectors. The concen-

基金项目: 浙江省科技厅公益类项目(2014C33244); 舟山市科技局项目(2012C13023, 2011C12040, 2014C31063)

作者单位: 316021 浙江省舟山医院细胞分子生物学实验室(竺王玉), 普外科(张玉惠、张伟忠、董金良、梁金荣)

通讯作者: 梁金荣, 电子信箱: zhuwangyu24@sina.cn