

专家
介
绍

马红霞,女,博士,副教授。2006年7月毕业于南京医科大学流行病与卫生统计学专业并获硕士学位,同年留校任教。2010年3月-2011年4月作为访问学者赴美国 M.D.Anderson 癌症研究中心进修学习,2012年获南京医科大学流行病学专业博士学位,2013年破格晋升副教授。近年来针对肺癌、头颈部鳞癌等常见恶性肿瘤,在分子与遗传流行病学研究领域开展了系列研究,目前已发表 SCI 收录论文 90 余篇,SCI 他引 1 700 余次,其中以第一或通讯作者(含并列)在《Nat Commun》、《Am J Hum Genet》、《Int J Cancer》等杂志发表论文 30 余篇。已完成国家自然科学基金青年基金项目 1 项,主持国家自然科学基金面上项目 2 项,作为主要参与者获教育部自然科学奖一等奖 2 项、江苏省科学技术一等奖 1 项、教育部自然科学奖二等奖 1 项、中华医学科技奖二等奖 1 项等。现担任《European Journal of Cancer》、《Int J Cancer》、《BMC Cancer》、《Neoplasma》等多本杂志的审稿专家。

外周血相对端粒长度与头颈部鳞癌死亡风险的关联研究

余成啸,许冲全,王礼华,马红霞*

(南京医科大学公共卫生学院流行病学系,江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:探讨中国汉族人群中端粒长度与头颈部鳞癌患者死亡风险的关联。方法:应用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 241 例头颈部鳞癌患者外周血 DNA 端粒相对长度,结合临床信息和随访资料,进行端粒长度与头颈部鳞癌死亡风险的关联分析。通过 Kaplan-Meier 方法和 Log-rank 检验比较生存时间差异,COX 比例风险回归模型估计风险比(hazard ratio,HR)及 95%CI。结果:将头颈部鳞癌病例按照端粒长度的三分位数分为 3 组后,端粒长度由短至长的第 1、2 和 3 组的平均生存期显著增加(分别为 40.46、41.76 和 46.18 个月,趋势性 $P=0.009$)。与相对端粒长度 <1.19 的患者相比,相对端粒长度 >1.49 的患者死亡风险显著降低(HR:0.40,95%CI:0.20~0.80)。分层分析结果表明,较长的端粒长度与头颈部鳞癌患者死亡风险的关联在 <62 岁的患者、女性、不吸烟者以及不饮酒者中更为显著。结论:端粒长度可能与头颈部鳞癌患者的预后存在一定关联,还需要其他更大样本的研究进一步验证。

[关键词] 头颈部鳞癌;相对端粒长度;死亡风险

[中图分类号] R730.231

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-648-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160602

The association of relative telomere length in peripheral bloods with the death risk of head and neck squamous cell carcinoma

Yu Chenxiao, Xu Chongquan, Wang Lihua, Ma Hongxia*

(Department of Epidemiology, School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship of telomere length with the death risk of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in Chinese Han population. **Methods:** Relative telomere length (RTL) were measured using Real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR) technique in the peripheral blood DNA from 241 cases of HNSCC. Additionally, clinical information and follow-up data were collected for statistical analysis. Kaplan-Meier method and Log-rank test were performed to compare differences of survival time in groups with different RTL. Hazard ratios and 95% confidence interval were estimated by

[基金项目] 国家自然科学基金(81473048);江苏高校优势学科建设工程项目;江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(201310312003Z)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:hongxiama@njmu.edu.cn

COX proportional hazards regression model. **Results:** We categorized HNSCC patients into 3 groups according to tertiles of their relative telomere length and found that the groups with longer relative telomere length had statistically increased mean survival time (40.46 vs. 41.76 vs. 46.18 months, P for trend = 0.009). Compared to cases with relative telomere length <1.19, those patients with length >1.49 had significantly decreased death risk (HR: 0.40, 95% CI: 0.20-0.80). However, after the multivariate adjustment, no association was found between RTL and death risk of HNSCC. **Conclusion:** Relative telomere length may be associated with prognosis of HNSCC patients, but studies with larger samples are needed to further validate such findings.

[**Key words**] head and neck squamous cell carcinoma; relative telomere length; the death risk

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06): 648-652, 675]

端粒位于染色体末端,由串联的 TTAGGG 重复核苷酸序列结合端粒结合蛋白组成^[1]。端粒的作用主要在于保护染色体末端免于非典型重组、断裂、降解、核苷酸丢失以及末端-末端融合,为染色体提供了保护性帽子^[2-4]。人类的端粒长度一般为 15 kb 左右,而且在每个细胞有丝分裂周期中,端粒都会因为 DNA 链 3' 末端的不完全复制而缩短 30~200 bp^[5],因此有学者认为端粒长度决定了细胞的生命周期和细胞分裂次数^[6-7]。越来越多的证据证实端粒长度的变化以及端粒功能紊乱会促进致瘤性转变以及肿瘤的进展^[8-12]。此外,一系列人群研究还探讨了端粒长度与多种肿瘤预后的关联,但结论并不一致^[13-16]。

头颈部肿瘤的发病率在所有恶性肿瘤中位列第 5^[17]。2008 年,全球范围内约有 348 300 人被诊断为口腔或咽癌的新发病例,有 179 600 人因口腔癌或咽癌而死亡^[18]。尽管目前有部分研究探讨了端粒长度和头颈部鳞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)发病风险之间的联系^[19-20],但尚无研究评估端粒长度与 HNSCC 死亡风险的关联。因此,本研究采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术测定外周血 DNA 中端粒相对长度(relative telomere length, RTL),并结合 HNSCC 患者随访信息,首次探讨了 RTL 与中国人 HNSCC 预后的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

2007 年 1 月—2013 年 10 月在江苏省口腔医院和南京医科大学第一附属医院经病理确诊为原发 HNSCC 的患者,采取外周血样本并进行流行病学调查。通过电话随访,获得 241 例患者生存信息。样本及资料的收集均经研究对象知情同意。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及浓度测定

采用酚-氯仿法从外周血中提取基因组 DNA。每个 DNA 样本在进行基因分型之前都用紫外分光光度计和凝胶电泳实验进行浓度和纯度测定。

1.2.2 RTL 测定

用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 RTL^[21]。端粒定量 PCR 探针序列分别为:TEL1(5'-GGTTTTTGA[GGGTGA]4GGGT-3')和 TEL2(5'-TC-CCGACTAT [CCCTAT]4CCCTA-3');单拷贝基因(36B4)探针序列为 36B4u(5'-CAGCAAGTGGGAAG-GTGTAAATCC-3')和 36B4d(5'-CCCATTCTATCAT-CAACGGGTACAA-3')。实验采用盲法进行测量,每一轮 PCR 反应均有阴性对照。每孔加入 50 ng DNA 样本和 10 μ L SYBR[®] Green (Applied Biosystems) PCR 混合试剂。利用公式 $2^{-(\Delta Ct1-\Delta Ct2)}=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 RTL。

1.3 统计学方法

通过 HNSCC 的诊断时间和死亡时间或者最后一次随访的时间计算生存时间,Kaplan-Meier 方法和 Log-rank 检验比较生存时间差异。运用单因素和多因素 COX 比例风险回归模型来估计粗风险比(hazard ratio, HR)或者经过校正的风险比 HR 及 95% 可信区间,校正因素包括年龄、性别、吸烟、饮酒和临床分期。统计学显著性标准为双侧检验 $P \leq 0.05$ 。所有数据分析均运用 Statistical Analysis System 软件(version 9.1.3)进行。

2 结果

2.1 患者基本情况和临床特征

纳入本研究的 241 例 HNSCC 患者的人口学特征和临床信息见表 1。所有研究对象的年龄 28.32~88.79 岁,中位年龄 62.33 岁。其中,男 134 例,吸烟者 90 例,饮酒者 86 例; I/II 期 114 例, III/IV 期 80 例; 197 例为口腔癌患者, 4 例为咽癌, 其余 40 例均为喉癌。截至 2016 年 12 月(最后一次随访), 合计有 59 例患者死于头颈部鳞癌, 平均生存时间为

42.82个月。此外,相较于晚期(Ⅲ/Ⅳ期)及口腔癌患者,早期(Ⅰ/Ⅱ期)及非口腔癌患者的平均生存时间较长,差异接近于统计学意义($P=0.084$ 和 0.071)。

表1 患者基础信息及临床特征

变量	病例数 [n(%)]	死亡 人数	平均生存 时间(月)	Log-rank P值
总数	241(100)	59	42.88	
年龄				0.212
<62岁	120(49.79)	24	42.44	
≥62岁	121(50.21)	35	43.21	
性别				0.99
女	107(44.40)	25	41.25	
男	134(55.60)	34	44.08	
吸烟 ^a				0.222
否	150(62.66)	32	42.69	
是	90(37.34)	27	43.05	
饮酒 ^a				0.796
否	154(64.32)	38	42.16	
是	86(35.68)	21	43.84	
临床分期 ^a				0.084
Ⅰ/Ⅱ	114(58.76)	22	42.54	
Ⅲ/Ⅳ	80(41.24)	25	41.89	
部位				0.071
口腔癌	197(81.74)	52	41.05	
非口腔癌	44(18.26)	7	50.77	

a:变量中存在缺失值。

2.2 RTL与HNSCC癌患者死亡风险的关联

所有患者RTL中位数为1.35(0.25~4.20)。将RTL按三等分数分组后,分析其与HNSCC患者生存时间的关联。结果表明,随着RTL的增加,患者的平均生存时间也在增加。与RTL<1.19的患者相比,RTL分别为1.19~1.49和>1.49的患者平均生存时间显著延长(趋势性 $P=0.009$,表2)。Cox比例风险模型的结果表明,与RTL<1.19的患者相比,RTL为1.19~1.49和>1.49的患者其死亡风险分别降低20%(HR:0.80,95%CI:0.45~1.44)和60%(HR:0.40,95%CI:0.20~0.80),但经多因素校正后,RTL与死亡风险之间的关联无意义(表2)。

2.3 RTL与HNSCC死亡风险的分层分析

RTL与死亡风险的关联进行了进一步的分层分析。如表3所示,较长端粒长度(RTL>1.49)的保护效应在<62岁的患者(校正HR:0.31,95%CI:0.09~0.99)、女性患者(校正HR:0.30,95%CI:0.10~0.92)、不吸烟患者(校正HR:0.21,95%CI:0.06~0.76)以及不饮酒患者(校正HR:0.25,95%CI:0.09~0.73)中更为显著。异质性检验显示,在以吸烟和饮酒状况分层时,RTL与HNSCC死亡风险关联存在异质性(P 值分别为0.023和0.016)。

3 讨论

本研究中探讨了241例中国汉族人群中RTL

表2 相对端粒长度与头颈部肿瘤死亡风险的关联

相对端粒长度	病例数 [n(%)]	死亡人数	平均生存 时间(月)	Log-rank P值	未校正HR (95%CI)	校正HR (95%CI) ^a	P值 ^a
<1.19	79(32.78)	26	40.46	0.03	1	1	
1.19~1.49	81(33.61)	21	41.76		0.80(0.45~1.44)	0.84(0.42~1.67)	0.618
>1.49	81(33.61)	12	46.18		0.40(0.20~0.80)	0.55(0.25~1.19)	0.128

a:校正年龄、性别、吸烟、饮酒和临床分期。

与HNSCC死亡风险之间的联系。研究结果表明,端粒长度可能与HNSCC预后相关,端粒长度较长的患者,平均生存时间更长。

已有研究报道,肿瘤细胞的端粒长度明显短于正常细胞^[22-23],并且肿瘤细胞中端粒长度的改变一定程度上给予了肿瘤细胞迁移的能力,可能导致肿瘤复发,从而影响肿瘤患者的预后和死亡风险^[24]。目前研究认为,检测患者端粒长度或者其替代指标可以作为评估患者死亡风险和预后的生物标志^[25]。已有多篇文献报道了端粒长度与肿瘤死亡风险之间的关联,研究的肿瘤类型包括了前列腺癌、肺癌、结

直肠癌、食管癌、乳腺癌等^[13,24,26-30],但不同部位的肿瘤患者预后与端粒长度的关联不完全一致,如非小细胞肺癌患者中过长或者过短的端粒长度均与较差的预后相关^[31];在前列腺癌和食管癌患者中端粒长度越短,越有可能发生较差的预后^[26,28];而在结肠直肠癌患者中,端粒较长的患者预后更差,死亡风险更高^[13,16,32]。因此,端粒长度与肿瘤预后二者之间的关联还可能取决于肿瘤所在的部位^[30]。本研究分析结果表明,端粒较短的HNSCC患者较端粒长的患者,生存时间更短,与食管癌的相关研究报道的结论一致^[26]。细胞衰老和死亡通路功能的丧失^[33],或者与维持端

表 3 相对端粒长度与头颈部肿瘤预后分层分析
Table 3 Stratification analysis of RTL and HNSCC survival

分组变量		RTL			
		<1.19	1.19~1.49	>1.49	
年龄	<62 岁	死亡/患者	10/31	8/39	6/50
		校正 HR(95%CI)	1	1.32(0.48~3.64)	0.31(0.09~0.99)
		P 值 ^a		0.589	0.049
	≥62 岁	死亡/患者	16/48	13/42	6/31
		校正 HR(95%CI)	1	0.64(0.23~1.75)	0.63(0.22~1.77)
		P 值 ^a		0.379	0.380
性别	女	死亡/患者	12/36	8/33	5/38
		校正 HR(95%CI)	1	0.46(0.15~1.39)	0.30(0.10~0.92)
		P 值 ^a		0.171	0.035
	男	死亡/患者	14/43	13/48	7/43
		校正 HR(95%CI)	1	1.68(0.65~4.33)	1.14(0.39~3.34)
		P 值 ^a		0.288	0.808
吸烟 ^b	否	死亡/患者	17/53	12/51	3/46
		校正 HR(95%CI)	1	0.65(0.27~1.59)	0.21(0.06~0.76)
		P 值 ^a		0.348	0.018
	是	死亡/患者	9/26	9/29	9/35
		校正 HR(95%CI)	1	1.32(0.42~4.15)	1.52(0.51~4.54)
		P 值 ^a		0.626	0.451
饮酒 ^b	否	死亡/患者	18/53	15/52	5/49
		校正 HR(95%CI)	1	0.60(0.26~1.40)	0.25(0.09~0.73)
		P 值 ^a		0.235	0.012
	是	死亡/患者	8/26	6/28	7/32
		校正 HR(95%CI)	1	1.54(0.43~5.47)	1.73(0.54~5.52)
		P 值 ^a		0.502	0.352
临床分期 ^b	I/II	死亡/患者	8/33	8/45	6/36
		校正 HR(95%CI)	1	0.71(0.26~1.95)	0.60(0.20~1.82)
		P 值 ^a		0.506	0.368
	III/IV	死亡/患者	13/36	7/21	5/23
		校正 HR(95%CI)	1	0.97(0.37~2.53)	0.44(0.14~1.33)
		P 值 ^a		0.944	0.146
部位	口腔癌	死亡/患者	23/48	18/61	11/54
		校正 HR(95%CI)	1	1.07(0.52~2.20)	0.66(0.29~1.50)
		P 值 ^a		0.860	0.318
	非口腔癌	死亡/患者	3/8	3/20	1/16
		校正 HR(95%CI)	1	0.07(0.00~3.46)	0.18(0.01~6.10)
		P 值 ^a		0.181	0.340

a: COX 回归计算 HR, 调整年龄、性别、吸烟、饮酒和临床分期(除去分层因素); b: 变量中存在缺失值。

粒长度和基因稳定相关的分子变化^[34]可以一定程度上解释 RTL 较短的肿瘤患者具有较差的预后。此外, 分层分析表明, 端粒长度与 HNSCC 死亡风险的关联在 <62 岁的患者、女性、不吸烟者以及不饮酒者

中更为显著, 并且在吸烟和饮酒分层时还存在显著的异质性, 提示端粒长度与上述因素在 HNSCC 的预后中可能存在交互作用, 该结论还需要更大样本研究的证实。

值得一提的是,本研究还存在一些局限性。第一,本研究仅纳入了 241 例 HNSCC 患者,样本量较小,随访时间相对较短,死于 HNSCC 的患者仅有 59 例;第二,有部分患者的临床分期信息缺失,对多因素校正后的关联结果可能影响较大(校正前后 HR 及 95%CI 相差较大)。因此,本研究的结果还需要更大样本量、更长时间随访的其他研究进一步证实。

[参考文献]

- [1] Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(24): 5600-5604
- [2] Li Z, Tang J, Li H, et al. Shorter telomere length in peripheral blood leukocytes is associated with childhood autism[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7073
- [3] Bodelon CS, Gadalla SM. telomeres in molecular epidemiology studies[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2014, 125(1): 113-131
- [4] Di Domenico EG, Romano E, Del Porto P, et al. Multifunctional role of ATM/Tel1 kinase in genome stability: from the DNA damage response to telomere maintenance[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 787404
- [5] Bojesen SE. Telomeres and human health[J]. *J Intern Med*, 2013, 274(5): 399-413
- [6] Harley CB. Human ageing and telomeres[J]. *Ciba Found Symp*, 1997, 211(1): 129-139
- [7] Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere[J]. *Cell*, 2001, 106(6): 661-673
- [8] Calado RT, Young NS. telomere diseases[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(24): 2353-2365
- [9] Artandi SE, Depinho RA. telomeres and telomerase in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(1): 9-18
- [10] Hsu CP, Lee LW, Shai SE, et al. Clinical significance of telomerase and its associate genes expression in the maintenance of telomere length in squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(44): 6941-6947
- [11] Wu X, Amos CI, Zhu Y, et al. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(16): 1211-1218
- [12] Gramatges MM, Telli ML, Balise R, et al. Longer relative telomere length in blood from women with sporadic and familial breast cancer compared with healthy controls[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(2): 605-613
- [13] Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, et al. Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(10): 1807-1814
- [14] Russo A, Modica F, Guarrera S, et al. Shorter leukocyte telomere length is independently associated with poor survival in patients with bladder cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(11): 2439-2446
- [15] Liu HQ, An JZ, Liu J, et al. Leukocyte telomere length predicts overall survival in hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(5): 1040-1045
- [16] Svenson U, Nordfjäll K, Stegmayr B, et al. Breast cancer survival is associated with telomere length in peripheral blood cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(10): 3618-3623
- [17] Marcu LG, Yeoh E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(10): 1303-1314
- [18] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90
- [19] Gu Y, Yu C, Miao L, et al. Telomere length, genetic variants and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck in Southeast Chinese [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20675
- [20] Liu Z, Ma H, Wei S, et al. Telomere length and TERT functional polymorphisms are not associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(12): 2642-2645
- [21] Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): e47
- [22] Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, et al. Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22): 6405-6409
- [23] Vukovic B, Park PC, Al-Maghrabi J, et al. Evidence of multifocality of telomere erosion in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HPIN) and concurrent carcinoma[J]. *Oncogene*, 2003, 22(13): 1978-1987
- [24] Fernández-Marcelo T, Gómez A, Pascua I, et al. Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 78
- [25] Bisoffi MH, Griffith JK. telomeres: prognostic markers for solid tumors[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(10): 2255-2260
- [26] Zhang DH, Chen JY, Hong CQ, et al. High-risk human papillomavirus infection associated with telomere elongation in patients with esophageal squamous cell carcinoma with poor prognosis[J]. *Cancer*, 2014, 120(17): 2673-2683
- [27] Zhang C, Chen X, Li L, et al. The association between telomere length and cancer prognosis: evidence from a