·现场调查·

血清钙离子水平与肝硬化发病风险相关性研究

尹梁宇 阴建 崔剑峰 刘彬 陈凤 范金虎 陈汶

【摘要】 **目的** 探讨成年人血清钙离子水平与肝硬化发病风险间的关系。**方法** 在河南省林县食管癌营养干预试验队列中开展巢式病例对照研究。利用全自动生物化学分析仪和酶联免疫法检测281名肝硬化病例和562名对照个体的基线血清钙浓度以及HBsAg、抗-HBc、抗-HCV，采用调查问卷收集研究对象相关基线特征信息。研究对象血钙水平以三分位分组并使用多因素logistic回归模型计算各组肝硬化发病*OR*值及其95%*CI*。**结果** 病例组血清钙离子水平为(1.81±0.84)mmol/L，高于对照组(1.65±0.79)mmol/L，$t=-2.640$，$P=0.008$。血清钙的不同取值水平与肝硬化发病率有关($\chi^2=6.888$，$P=0.0319$)。血钙浓度最高组患肝硬化的风险约为最低组的2倍($OR=2.261$，95%*CI*: 1.497～3.416，$P=0.002$)，且血钙水平与肝硬化风险呈正相关($\chi^2=6.842$，$P=0.0089$)。**结论** 中国人群中高血清钙水平可能作为肝硬化发生一项独立的危险因素，其机制尚需进一步研究。

【关键词】 肝硬化；血清钙；巢式病例对照研究

Association between serum calcium levels and the risk of liver cirrhosis

YIN Liang-yu, YIN Jian, CUI Jian-feng, LIU Bin, CHEN Feng, FAN Jin-hu, CHEN Wen. Department of Epidemiology, Cancer Hospital/Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

Corresponding author: CHEN Wen, Email: chenwen@cicams.ac.cn

This work was supported by a grant from the National Cancer Institute of the United States (No. N01-RC-47701).

【**Abstract**】 **Objective** To examine the association between serum calcium levels and the risk of liver cirrhosis. **Methods** A nested case-control study was performed based on the nutritional intervention trial of esophageal carcinoma in Linxian, Henan province. Serum samples of 281 liver cirrhosis cases and 562 controls were tested for calcium concentrations, surface antigen (HBsAg) and core antibody (anti-HBc) on Hepatitis virus B and antibody on Hepatitis virus C (anti-HCV), using automatic serum biochemical analysis system and enzyme-linked immunoassay. Data on baseline characteristics were collected via a questionnaire. Serum calcium value was divided into tertiles and logistic regression model was used to calculate odds ratios and 95% confidence intervals. **Results** Individuals in the case group showed higher calcium levels (1.81±0.84)mmol/L when compared to the controls (1.65±0.79)mmol/L, with $t=-2.640$ and $P=0.008$. The calcium levels were associated with the risk of liver cirrhosis ($\chi^2=6.888$, $P=0.0319$). Risks for the individuals in the highest tertile were doubled when compared to the lowest (adjusted $OR=2.261$, 95%*CI*: 1.497-3.416, $P=0.002$). A positive correlation was observed between serum calcium level and the risk of liver cirrhosis ($\chi^2=6.842$, $P=0.0089$). **Conclusion** Results from our study revealed that the elevated serum calcium level might be an independent risk factor for liver cirrhosis. However, further investigations are anticipated to explore its potential mechanisms.

【**Key words**】 Liver cirrhosis; Serum calcium; Nested case-control study

肝硬化是一种常见的肝脏疾病，表现为肝脏组织中再生小节的病理性增生与弥散性的纤维带形成[1]。前期基于动物模型的数项研究提示钙离子稳态在细胞老化、死亡以及致死性细胞损伤中发挥关键角色[2-4]。类似作用也可见于大鼠肝脏细胞中[5]。但目前尚未有人体血清钙离子稳态与肝硬化发病风险研究的文献报道。为此本研究基于1985年在河南省所建立的营养干预试验队列对该问题进行了探索。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.010

基金项目：美国国立癌症研究所合作项目(N01-RC-47701)

作者单位：100021 北京，中国医学科学院肿瘤医院/肿瘤研究所流行病学研究室

通信作者：陈汶，Email: chenwen@cicams.ac.cn

对象与方法

1. 研究队列：研究对象源自在河南省林县建立的营养干预试验队列。林县为我国食管癌高发区[6]，研究表明当地人群中普遍缺乏维生素和其他营养素[7]。为调查营养素缺乏与食管癌高发的关系，从1985年5月开始在该县进行营养干预试验[6]。该队列对纳入的32 902名40～69岁成年人分为两个亚组：第一组为重度不典型增生组（重增组），纳入3318例经细胞学诊断为食管上皮重度不典型增生但未患其他疾病的个体；第二组为普通人群组（n=29 584）。在研究开始的前一年即1984年底至1985年初，对所有研究对象进行身体检查，并采用标准化调查问卷收集人口学、饮食、生活习惯以及临床检查结果等相关特征信息。同时每名研究对象均空腹抽取10 ml血，经离心分装后将血清送至北京研究中心置-80 ℃储存。普通人群组实施干预时间为1986年3月至1991年5月，而重增组为1985年5月至1991年4月。自干预时始每月定期随访其发病、死亡情况。

2. 研究对象：本研究为巢式病例对照研究。经由各级医院报告，截止2007年12月15日，营养干预试验队列共随访325（普通人群组291、重增组34）例因肝硬化原因死亡的个体，其中281（普通人群组252、重增组29）例血清样品合格，作为病例组[肝硬化诊断依据包括临床检查（171例，60.9%）、生化检查（50例，17.8%）、影像学检查（21例，7.5%）、手术病理学检查（2例，0.7%）以及信息不详（37例，13.2%）]；同时选取病例组发病队列中仍存活且未患病的562例作为对照组。最终共选取843例进行实验室血清学检测。研究对象在入组时均签订知情同意书，本研究得到中国医学科学院肿瘤医院和美国国立癌症研究所伦理委员会批准。

3. 指标和变量：2011年6—7月检测研究对象血清钙离子浓度、HBsAg、抗-HBc以及抗-HCV 4项指标。基线调查采用问卷收集相关变量包括年龄、性别、身高、体重、BMI、干预试验分组、居家自来水使用情况、吸烟史及饮酒史。本研究“吸烟史”定义为二分类变量即是否存在持续>6个月的吸烟经历，“饮酒史”同样定义为二分类变量即在进入研究前12个月中是否有任意量的酒精摄入；在多因素分析中使用33.3%和66.6%百分位数为分割点，将血钙水平转换为三分类等级以定义暴露分级。

4. 实验室检测：检测均采用盲法。每份血样标有惟一研究序号，且每36份样品设立3份混合血清对照（源自营养干预试验队列中未入组的个体），其储存条件及保存年限同研究对象，并进行4项指标的预实验检测。血清钙离子检测使用德国罗氏诊断有限公司的钙检测试剂盒（比色法）与Cobas C 501全自动生化分析仪；3项肝炎病毒标志物检测均使用酶联免疫法，其中检测HBsAg采用Bio-Rad Genetic HBsAg 3.0酶联免疫试剂盒，抗-HCV采用ORTHO HCV第三代酶联免疫法，抗-HBc采用ORTHO酶联免疫检测系统。

5. 统计学分析：使用SAS 9.2统计分析软件。病例组与对照组间描述性连续变量的差异使用两独立样本t检验，而分类变量则使用χ^2检验。利用中位数对连续性变量年龄、身高、体重、BMI进行二分类化后，使用单因素非参数Wilcoxon秩和检验分析对照组人群各因素不同取值水平对血清钙浓度的影响，以筛选可能的混杂因素。与肝硬化发病相关的因素、血清钙的预测因素以及其他可疑变量纳入logistic回归模型，以分析血钙与疾病关系。对logistic回归模型的评价使用似然比检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

结　果

1. 一般情况：病例组和对照组在年龄、性别、身高、体重、BMI、干预试验分组、吸烟史、饮酒史以及居家自来水供应的差异无统计学意义。两组HBsAg、抗-HBc和抗-HCV阳性比较差异有统计学意义（χ^2值分别为100.906、12.994、20.840，P值均<0.05）。病例组血钙离子浓度为（1.81±0.84）mmol/L高于对照组（1.65±0.79）mmol/L，t=-2.640，P=0.008。不同血钙水平人群肝硬化患病率的差异有统计学意义（χ^2=6.888，P=0.0319），见表1。

2. 血钙浓度预测因子的筛选：年龄、身高、体重、3项肝炎病毒血清标志物、吸烟史、饮酒史以及居家自来水不同取值水平对血钙浓度的变化无统计学意义（P值均>0.05）。BMI、性别以及干预试验分组则对血钙浓度的变化有预测作用，Z值分别为-2.131、-2.435和9.083，P值均<0.05（表2）。

3. 多因素分析：对可能影响血钙浓度的因素（BMI、性别、干预试验分组）和混杂因素（年龄、肝炎病毒标志物）均纳入二分类logistic回归模型，分析血钙水平与肝硬化发生的关系。经统计学分析，HBsAg与抗-HBc存在相关性（Spearman r=0.252，P<0.01），故3项肝炎病毒标志物仅纳入HBsAg与

表1 研究对象一般特征

特 征	病例组 (n=281)	对照组 (n=562)	t/χ^2检验	P值
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	54.30±8.03	54.25±8.27	-0.070	0.941
身高($\bar{x}\pm s$,cm)	158.75±8.51	158.84±8.32	0.150	0.880
体重($\bar{x}\pm s$,kg)	55.64±8.60	55.01±7.90	-1.060	0.291
BMI[a]($\bar{x}\pm s$,kg/m²)	22.00±2.35	21.76±2.34	-1.440	0.151
营养干预试验分组				
重增	29(10.3)	78(13.9)	2.141	0.143
普通人群	252(89.7)	484(86.1)	-	-
性别				
男	141(50.2)	262(46.6)	0.951	0.330
女	140(49.8)	300(53.4)	-	-
吸烟史 (是)	95(33.8)	201(35.8)	0.315	0.575
饮酒史 (是)	62(22.1)	129(23.0)	0.085	0.771
饮用自来水(是)	52(18.5)	123(21.9)	1.302	0.254
肝炎病毒标志物阳性				
HBsAg	84(29.9)	28(5.0)	100.906	<0.001
抗-HBc	197(70.1)	322(57.3)	12.994	<0.001
抗-HCV	51(18.2)	43(7.7)	20.840	<0.001
血钙水平($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	1.81±0.84	1.65±0.79	-2.640	0.008
血钙水平分组(mmol/L)				
≤1.13	79(28.1)	203(36.1)	6.888	0.0319
1.14~	94(33.5)	186(33.1)	-	-
≥2.09	108(38.4)	173(30.8)	-	-

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比(%);连续性变量的比较使用t检验,分类变量使用χ^2检验;χ^2检验时自由度除血钙水平组为2外其余分类变量均为1

抗-HCV两项(表3、4)。血钙浓度分组(≤1.13、1.14~、≥2.09 mmol/L)中,≥2.09 mmol/L组与≤1.13 mmol/L组相比发生肝硬化的风险升高,OR=2.261,95%CI:1.497~3.416,P=0.002。似然比检验显示模型对数据的拟合有统计学意义(χ^2=142.680,P<0.01)。不同血钙水平组与肝硬化发生的概率,趋势检验呈正相关(χ^2=6.842,P=0.0089)。

讨 论

本研究前瞻性评估了血钙水平与肝硬化发生概率间的关系,在调整混杂因素后发现两者呈正相关。其中发生机制目前尚不清楚。钙离子依赖的细胞通路广泛参与人类神经元[8]、胰岛[9]及血管内皮[10]细胞凋亡过程。而大鼠肝细胞生长与胞内钙浓度关系的体外研究表明[4,11],钙离子作为调节因子,是产生致死性细胞损伤的关键[12],细胞外钙浓度与肝细胞损伤的研究则较少,但有证据显示细胞外钙浓度的升高可通过主动扩散提高细胞内钙离子水平,同时细胞外过载的钙离子可透过损伤的细胞渗透屏障,沿浓度梯度进入细胞内进而引起不可逆转的细胞损伤[13]。并有研究发现在无钙培养基中添加浓度

表2 血钙水平与各研究变量关系的单因素分析

特征分组	血钙(mmol/L)	Z值	P值
年龄(岁)		1.330	0.184
≤55(n=287)	1.61(1.14)		
≥56(n=275)	1.70(1.36)		
身高(cm)		0.984	0.325
≤159(n=286)	1.64(1.40)		
≥160(n=276)	1.67(1.14)		
体重(kg)		-0.198	0.843
≤55(n=289)	1.68(1.35)		
≥56(n=273)	1.63(1.14)		
BMI(kg/m²)		-2.131	0.033
≤21.63(n=284)	1.72(1.29)		
>21.63(n=278)	1.59(1.22)		
性别		-2.435	0.015
男(n=262)	1.60(1.34)		
女(n=300)	1.70(1.20)		
干预试验分组		9.083	<0.01
普通人群(n=484)	1.53(1.14)		
重增(n=78)	2.41(0.95)		
抗-HBc		0.123	0.902
阴性(n=240)	1.67(1.42)		
阳性(n=322)	1.64(1.17)		
抗-HCV		-1.412	0.158
阴性(n=519)	1.67(1.28)		
阳性(n=43)	1.52(1.28)		
HBsAg		-0.923	0.356
阴性(n=534)	1.66(1.29)		
阳性(n=28)	1.51(0.94)		
饮酒史		0.371	0.710
是(n=129)	1.67(1.32)		
否(n=433)	1.65(1.26)		
吸烟史		0.200	0.842
是(n=201)	1.62(1.05)		
否(n=361)	1.67(1.38)		
饮用自来水		-1.129	0.259
是(n=123)	1.59(1.33)		
否(n=439)	1.67(1.26)		

注:组间比较使用Wilcoxon秩和检验;血钙水平以中位数(四分位数间距)表示

表3 二分类logistic回归模型中各变量赋值

变 量	变量赋值及含义
应变量	
研究对象分组	0=对照组,1=病例组
自变量	
年龄(岁)	54.27±8.19 (连续性变量)
性别	0=男性,1=女性
BMI(kg/m²)	21.84±2.34(连续性变量)
干预试验分组	1=重增组,2=普通人群组
HBsAg	0=阴性,1=阳性
抗-HCV	0=阴性,1=阳性
血钙水平分组	1=第一分位,2=第二分位,3=第三分位

表4　血钙水平与肝硬化发病关系多因素logistic回归分析

变　量	β	$s_{\bar{x}}$	$Wald\chi^2$值	P值	OR值(95%CI)
年龄	0.018	0.010	2.998	0.083	1.018(0.998～1.038)
性别	-0.308	0.164	3.513	0.061	0.735(0.532～1.014)
BMI	0.063	0.035	3.309	0.069	1.065(0.995～1.140)
干预试验分组	0.519	0.265	3.843	0.050	1.681(1.000～2.825)
HBsAg阳性	2.348	0.249	88.902	<0.01	10.468(6.425～17.055)
抗-HCV阳性	1.161	0.238	23.844	<0.01	3.192(2.003～5.085)
血钙水平分组(mmol/L)	-	-	-	-	-
≤1.13	-	-	-	-	1
1.14～	0.103	0.115	0.805	0.370	1.755(1.169～2.633)
≥2.09	0.357	0.117	9.322	0.002	2.261(1.497～3.416)

注：似然比检验回归模型有统计学意义(χ^2=142.680，P<0.01)

范围为0.1～2.0 mmol钙离子可引起肝细胞死亡，并呈显著的浓度反应关系[14]，可部分解释本研究所得结果。

本研究logistic回归分析还纳入了干预试验分组、性别、BMI、HBsAg以及抗-HCV对模型进行调整，其中干预试验分组性别和BMI与血钙水平有关，而HBsAg和抗-HCV与肝硬化有关(P值均<0.05)，虽然年龄在病例组和对照组间分布均衡(P<0.05)，但作为重要的人口学指标也纳入模型。饮酒是肝硬化已知的危险因素，但本研究中饮酒与血钙水平(P=0.710)及肝硬化患病率(P=0.771)均无显著关系。可能的原因是血清标本采集时(20世纪80年代中后期)，当地人群中酒精的摄入量相对较低[15]。

本研究存在局限性。如病例组的确诊仅依据临床查体、影像学检查而非病理学诊断，不排除纳入非肝硬化患者，但这种情况并不影响本研究结果；研究中使用的血清标本经长期储存，检测时仅凭肉眼观察予以排除。本研究的优势在于前瞻性设计，即所有血清标本是在建立队列基线时采集，并在研究中检测了引起肝硬化主要危险因素(如乙、丙型肝炎病毒感染)且调整了多因素分析。综上所述，本研究结果提示成年人中高血钙水平可能作为肝硬化发生的一项独立危险因素，其确切的生物学机制还有待进一步研究。

参　考　文　献

[1] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. Lancet, 2008, 371: 838-851.

[2] Smaili SS, Pereira GJ, Costa MM, et al. The role of calcium stores in apoptosis and autophagy. Curr Mol Med, 2013, 13: 252-265.

[3] Tripathi A, Chaube SK. High cytosolic free calcium level signals apoptosis through mitochondria- caspase mediated pathway in rat eggs cultured in vitro. Apoptosis, 2012, 17: 439-448.

[4] Choi YH, Gwon AR, Jeong HY, et al. Contribution of gamma-secretase to calcium-mediated cell death. Neurosci Lett, 2010, 469: 425-428.

[5] Pronobesh C, Dagagi AV, Pallab C, et al. Protective role of the calcium channel blocker amlodipine against mitochondrial injury in ischemia and reperfusion injury of rat liver. Acta Pharm, 2008, 58: 421-428.

[6] Li B, Taylor PR, Li JY, et al. Linxian nutrition intervention trials. Design, methods, participant characteristics, and compliance. Ann Epidemiol, 1993, 3: 577-585.

[7] Yang CS, Sun Y, Yang QU, et al. Vitamin A and other deficiencies in Linxian, a high esophageal cancer incidence area in northern China. J Natl Cancer Inst, 1984, 73: 1449-1453.

[8] Ohkubo T, Yamazaki J. T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. Int J Oncol, 2012, 41: 267-275.

[9] Lei X, Zhang S, Bohrer A, et al. Role of calcium-independent phospholipase A (2) beta in human pancreatic islet beta-cell apoptosis. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 303: E1386-1395.

[10] Matsubara M, Hasegawa K. Benidipine, a dihydropyridine-calcium channel blocker, prevents lysophosphatidylcholine-induced injury and reactive oxygen species production in human aortic endothelial cells. Atherosclerosis, 2005, 178: 57-66.

[11] Smaili S, Hirata H, Ureshino R, et al. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. An Acad Bras Cienc, 2009, 81: 467-475.

[12] Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, et al. Calcium in cell injury and death. Annu Rev Pathol, 2006, 1: 405-434.

[13] Farber JL. The role of calcium ions in toxic cell injury. Environ Health Perspect, 1990, 84: 107-111.

[14] Starke PE, Hoek JB, Farber JL. Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes. J Biol Chem, 1986, 261: 3006-3012.

[15] McGlynn KA, Abnet CC, Zhang M, et al. Serum concentrations of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethane (DDT) and 1, 1-dichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethylene (DDE) and risk of primary liver cancer. J Natl Cancer Inst, 2006, 98: 1005-1010.

(收稿日期：2013-01-15)

(本文编辑：张林东)