

HPV16E6、HLA-DR9 与新疆哈萨克族人群食管癌交互作用的 1:2 病例对照研究

廖佩花 秦江梅 曾同霞 李锋 蔡金凤 何玲

【摘要】目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)16E6 感染、人类白细胞抗原(HLA)-DR9 免疫相关基因对新疆哈萨克族人群食管癌的影响及相互关系。**方法** 采用 1:2 配比的病例对照研究方法,收集 63 例哈萨克族食管癌患者,按同性别、同民族、年龄相差 ≤ 5 岁且居住同一地区等选取对照 126 例,运用序列特异性聚合酶链反应(PCR-SSP),检测 HPV16E6 的感染率及 HLA-DR9 等位基因阳性率。交互作用采用分层分析的方法。**结果** HPV16E6 感染和 HLA-DR9 等位基因阳性均为哈萨克族食管癌的危险因素,OR 值分别为 2.67(95%CI:1.38~5.17)和 3.83(95%CI:1.48~9.96)。在食管癌组中 HLA-DR9 等位基因阳性组 HPV16E6 感染率为 69.2%,明显高于 HLA-DR9 等位基因阴性组的 28.0%($\chi^2=7.57, P=0.006$),OR=5.79(95%CI:1.53~21.87),对照组中,HLA-DR9 等位基因阳性和阴性组的 HPV16E6 感染率分别 22.2%和 16.2%,差异无统计学意义($\chi^2=0.22, P=0.643$)。交互作用提示:HPV16E6 及 HLA-DR9 等位基因存在交互作用,其危险性高于各单独作用之和。**结论** HPV16E6 感染及 HLA-DR9 等位基因阳性与哈萨克族人群食管癌发生密切相关,两者在食管上皮细胞恶性转化的过程中起到协同作用,共同促进食管癌的发生和发展。

【关键词】 食管癌;人乳头瘤病毒;人类白细胞抗原;病例对照研究;哈萨克族

A 1:2 matched case-control study on the interaction of HPV16E6 and HLA-DR9 allele to esophageal cancer in Kazakh ethnicity, Xinjiang LIAO Pei-hua, QIN Jiang-mei, ZENG Tong-xia, LI Feng, CAI Jin-feng, HE Ling. Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University, Shihezi 832002, China

Corresponding author: QIN Jiang-mei, Email: qinjiangmei@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To evaluate the role and the association between HPV16E6 infection and HLA-DR9 immune-associated gene to esophageal cancer (EC) in Kazakh of Xinjiang, China. **Methods** A 1:2 matched case-control study was conducted with 63 cases of EC and 126 controls involved. The controls were matched by sex, nationality, area of residence and age within 5-year difference. HPV16E6 and HLA-DR9 allele were identified by PCR-SSP. Interaction was performed to identify risk factors. **Results** HPV16E6 infection and HLA-DR9 allele positive status were the risk factors for EC, with OR values as 2.67(95%CI:1.38-5.17) and 3.83(95%CI:1.48-9.96) respectively. The rate of HPV16E6 infection in individuals with HLA-DR9 allele was different from the ones who were HLA-DR9 allele free ($\chi^2=7.57, P=0.006$), with OR value as 5.79(95%CI:1.53-21.87). In the controls, the rates of HPV16E6 infection were 22.2% and 16.2% among individuals with HLA-DR9 allele status as positive or negative, and without statistically significant difference. Interaction analysis showed there was an interaction of HPV16E6 with HLA-DR9 and were higher than the sum of the two factors presented individually. **Conclusion** In our study, we found that the HLA-DR9 allele and HPV16E6 infection had a function of synergy in the process of malignant transformation of esophageal epithelial cells, and jointly promoting the occurrence and development of EC.

【Key words】 Esophageal cancer; Human papillomavirus; Human leukocyte antigen; Case-control study; Kazakh

人乳头瘤病毒(HPV)-16、18 高危型与食管癌

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.09.022

基金项目:国家自然科学基金(30660161);国家“973”计划前期研究专项(2007CB516804)

作者单位:832002 石河子大学医学院预防医学系 新疆地方与民族高发疾病部共建教育部重点实验室

通信作者:秦江梅, Email: qinjiangmei@yahoo.com.cn

发生发展密切相关,其中 HPV16 的感染率要高于 HPV18^[1,2]。本课题组前期研究发现 HPV16、18 在哈萨克族人群食管癌病例的检出率分别为 41.4% 和 25.3%^[3]。高危型 HPV E6、E7 是最有效的病毒癌蛋白,可能是食管癌发生的危险因素之一^[4]。对新疆哈萨克族食管癌的研究发现^[5], HPV16E6、E7 基因

与食管癌病理组织学分级的生物学行为密切相关,本课题组前期研究发现 HPV16E7 与哈萨克族食管鳞癌有关^[3]。研究发现,免疫相关基因与 HPV 感染机体后的病毒清除过程有关。人类白细胞抗原(HLA)是迄今发现具有最高度多态性的系统,决定着人类的遗传多态性。研究表明 HLA-DRB1*0901(HLA-DR9)等位基因是湖北省汉族食管癌易感基因^[6],而其与 HPV 相关食管癌的相互关系未见报道。本研究收集新疆哈萨克族食管癌高发区食管癌病例和对照的流行病学资料、静脉血及食管黏膜组织,采用 PCR-SSP 技术,从 HPV16E6 感染以及 HLA-DR9 基因相互作用的角度探讨其与新疆哈萨克族食管癌的关系。

对象与方法

1. 研究对象:2005 年 3 月至 2008 年 10 月在新疆北部哈萨克族聚集地区的 6 所医院共收集哈萨克族新发食管癌病例 63 例(均经组织病理学确诊为食管鳞癌),对照来源于同一所医院门诊胃镜检查非食管疾病患者和食管癌高发区正常人群,其组织标本均经病理学确诊,排除食管疾病。对照的匹配条件:与病例同民族、同性别、年龄相差不超过 5 岁、居住同一地区。病例和对照均签署知情同意书。

2. 研究方法:静脉采血 3 ml,乙二胺四乙酸二钠盐-K2(EDTA-K2)抗凝,分装,-80℃低温保存。食管癌病例取石蜡包埋组织,对照取正常食管黏膜组织,新鲜组织-80℃低温保存备用。基因组 DNA 抽提分三组:①血样中 DNA 提取采用上海生物工程基因组小量抽提试剂盒 II;②新鲜食管黏膜组织 DNA 提取采用酚-氯仿-异戊醇法;③石蜡包埋组织 DNA 提取采用 Tris-饱和酚法。所有抽提的 DNA 均经琼脂糖凝胶电泳及 β-globin PCR 法验证。引物及 PCR 反应试剂均购自大连宝生物公司。HPV16E6 PCR 反应总体积 25 μl,基因组 DNA 2 μl,引物(20 pmol/μl)各 0.8 μl,dNTP 2.0 μl,Taq 酶(5 U/μl)0.2 μl,10 × PCR buffer(含 Mg²⁺)2.5 μl。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 45 s,58℃ 45 s,72℃ 45 s,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。HLA-DR9 PCR 反应总体积 25 μl,基因组 DNA 2 μl,引物(20 pmol/μl)各 0.8 μl,dNTP 2.0 μl,Taq 酶(5 U/μl)0.2 μl,10 × PCR buffer(含 Mg²⁺)2.5 μl。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,62℃ 45 s,72℃ 45 s,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增所使用的引物序列:HPV16E6(268 bp):5' -GAC CCA GAA

AGT TAC CAC AG -3', 5' -CAC AAC GGT TTG TTG TAT TG -3';HLA-DR9(193 bp):5' -AGA GCT TCA CAG TGC AGC GG-3', 5' -GGA CGG AGC GGG TGC GGT ATC-3'。

3. 统计学分析:采用 EpiData 软件建库,用 SPSS 13.0 软件进行分析,以 χ² 检验确定 HPV16E6 及 HLA-DR9 等位基因在病例组和对照组中的分布,计算回归系数估计值、标准误(s_e)、P 值、OR 值及 95%CI。计算 HPV16E6 及 HLA-DR9 等位基因与食管癌关系的公式^[4]:

$$n_2 \text{ 的期望值: } E(n_2) = \frac{1}{3}(n_2 + n_4),$$

$$n_2 \text{ 的方差: } \text{Var}(n_2) = \frac{2}{9}(n_2 + n_4)$$

$$n_1 \text{ 的期望值: } E(n_1) = \frac{2}{3}(n_1 + n_3),$$

$$n_1 \text{ 的方差: } \text{Var}(n_1) = \frac{2}{9}(n_1 + n_3)$$

$$\chi^2 = \frac{[n_2 - E(n_2) + n_1 - E(n_1)]^2}{\text{Var}(n_2) + \text{Var}(n_1)}, \quad OR = \frac{(n_1 + 2n_2)}{(2n_3 + n_4)}$$

结果

1. 一般情况:调查对象中食管癌组 63 例(男性 39 例,女性 24 例),对照组 126 例(男性 78 例,女性 48 例)。病例组平均年龄 56.75 岁 ± 10.26 岁,对照组 54.73 岁 ± 10.02 岁,两组差异无统计学意义(t=1.30, P=0.20)。病例组和对照组性别、年龄分布均衡。

2. HPV16E6 感染与哈萨克族食管癌的关系:食管癌组 HPV16E6 感染率为 36.5%(23/63),对照组感染率为 16.7%(21/126),两组差异有统计学意义(χ²=9.26, P=0.002)。

HPV16E6 阳性以“+”表示,阴性以“-”表示,1:2 配对,每个对子有 3 人,1 个病例,2 个对照,三者暴露情况可能有 6 种组合:+++、++- (或+-+),+-+、-++、-+- (或--+),---,经 1:2 配对资料的 χ² 检验,差异有统计学意义(χ²=8.45, P<0.05),HPV16E6 感染增加哈萨克族患食管癌的风险,OR=2.67(95%CI:1.38 ~ 5.17),见表 1。

表 1 HPV16E6 与新疆哈萨克族人群食管癌的关系

病例暴露史	对照暴露史			合计
	++	+-	--	
+	0	6	17	23
-	1	13	26	40
合计	1	19	43	63

3. HLA-DR9 基因阳性与哈萨克族食管癌的关系:食管癌组 HLA-DR9 等位基因阳性率为 20.6%

(13/63), 对照组阳性率为 7.1%(9/126)。两组差异有统计学意义($\chi^2=7.43, P=0.006$)。

HLA-DR9 等位基因阳性以“+”表示, 阴性以“-”表示, 食管癌病例组和对照组 HLA-DR9 等位基因阳性率差异有统计学意义($\chi^2=7.61, P<0.05$), HLA-DR9 等位基因阳性与哈萨克族食管癌的发生有关, $OR=3.83(95\%CI: 1.48 \sim 9.96)$, 见表 2。

表 2 HLA-DR9 等位基因与新疆哈萨克族人群食管癌的关系

病例暴露史	对照暴露史			合计
	++	+-	--	
+	0	3	10	13
-	0	6	44	50
合计	0	9	54	63

4. HPV16E6 与 HLA-DR9 的关系: 由表 3 可知, 食管癌病例组中, HPV16E6 感染率在 HLA-DR9 等位基因阳性组和阴性组分别为 69.2% 和 28.0%, 两组差异有统计学意义($\chi^2=7.57, P=0.006$), $OR=5.79(95\%CI: 1.53 \sim 21.87)$; 对照组中, HPV16E6 感染率在两组中的差异无统计学意义。

表 3 HPV16E6 与 HLA-DR9 的关系

分组	HPV16E6 (+) ^a	HPV16E6 (-) ^a	P 值	OR 值 (95%CI)
病例组				
HLA-DR9(+)	9(69.2)	4(30.8)	-	1.00
HLA-DR9(-)	14(28.0)	36(72.0)	0.006	5.79(1.53 ~ 21.87)
对照组				
HLA-DR9(+)	2(22.2)	7(77.8)	-	1.00
HLA-DR9(-)	19(16.2)	98(83.8)	0.643	1.47(0.28 ~ 7.65)

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比(%)

5. HPV16E6 与 HLA-DR9 的交互作用分析: 以 HPV16E6 阴性、HLA-DR9 等位基因阴性为对照, HPV16E6 阳性、HLA-DR9 等位基因阴性的个体发生食管癌的风险为 2.00(0.91 ~ 4.42), HPV16E6 阴性、HLA-DR9 等位基因阳性的个体发生食管癌的风险为 1.56(0.43 ~ 5.56), 与对照组相比差异均无统计学意义; HPV16E6、HLA-DR9 等位基因两者均为阳性的个体发生食管癌的风险为 12.25(2.53 ~ 59.42), 其危险性远高于两者单独作用之和, 两因素具有协同作用(表 4)。

讨 论

分子生物学和流行病学已证实 HPV16 在宫颈癌的发生中具有重要作用, 但与食管癌的关系不明确。高危型 HPV E6 和 E7 基因主要涉及细胞转化,

表 4 HPV16E6、HLA-DR9 等位基因与食管癌相关性的交互作用分析

HPV16E6	HLA-DR9	病例数	对照例数	χ^2 值	P 值	OR 值(95%CI)
-	-	36	98	-	-	1.00
+	-	14	19	3.06	0.08	2.00(0.91 ~ 4.42)
-	+	4	7	0.46	0.50	1.56(0.43 ~ 5.56)
+	+	9	2	14.34	0.00	12.25(2.53 ~ 59.42)

当 HPV 的 DNA 整合到宿主细胞核内基因组中, 激活调节病毒生长的 E6 和 E7 基因片段, 使其无限转录, 从而导致癌变的发生^[7]。许春雷等^[4]采用免疫组化法对食管癌的研究表明, HPV16E6、E7 蛋白在食管癌组织中的表达要高于正常食管黏膜组织 ($P<0.05$), 推测二者可能是食管癌发生、发展的重要因素之一。邹塞英等^[2]采用 PCR 及免疫组化技术对 104 例食管鳞癌进行 HPV16E6 蛋白的检测, 发现 HPV16E6 在食管鳞癌的发生发展中有重要的作用。本研究通过 PCR-SSP 技术检测食管癌病例及对照组中 HPV16E6 的感染率, 结果发现 63 例食管癌中 HPV16E6 感染者有 23 例(36.5%), 高于对照组的感染率 16.7% ($P=0.002$), HPV16E6 感染的个体发生食管癌的风险是 HPV16E6 阴性个体的 2.67 倍 ($95\%CI: 1.38 \sim 5.17$)。

HLA 分为 I、II 和 III 类基因区, 其中 HLA-II 类基因区主要包括 DR、DQ 和 DP 三个亚区。由 HLA-II 类基因编码的分子所表达的抗原称为 HLA-II 类抗原。II 类抗原表达于成熟 B 细胞、抗原递呈细胞 (APC) 及活化细胞表面, 将加工过的、来源于内源性或外源性肽类抗原呈递至 CD_4^+ T 辅助细胞, 参与机体对抗原的免疫应答反应。HLA-DR9 是 HLA-DR 区的一个等位基因, 研究表明^[8,9], 其与多种免疫性疾病有关, 但其具体的作用机制尚不清楚。有关 HLA-DR9 等位基因与食管癌的相关性, 国内外仅有林军等^[6]的研究报道。本研究采用 PCR-SSP 技术通过对食管癌病例及对照组 HLA-DR9 的检测, 结果显示食管癌组 HLA-DR9 阳性率为 20.6%(13/63), 高于对照组阳性率 7.1%(9/126) ($P=0.006$), $OR=3.83(95\%CI: 1.48 \sim 9.96)$, 此结果与林军等^[6]的研究结果一致。

有关 HLA 与 HPV 相关肿瘤的研究近年来报道多见, 但大多数集中于对宫颈疾病的研究。Bontkes 等^[10]在对宫颈癌前病变的研究中发现 HLA DRB1*07 可增加个体感染 HPV 的危险性。De Araujo Souza 和 Villa^[11]的研究也提示: HLA-II 类等位基因多态性影响 HPV 感染后的清除与持续状态。在食管癌的

研究中也类似的发现,河南省安阳地区食管癌高发区的研究显示,HPV 阳性组 HLA-DQB1*04 等位基因频率高于 HPV 阴性组,提示 HLA-DQB1*04 是 HPV 感染的高危因素^[12]。Cao 等^[13] 研究显示 HLA-II 类基因区的 LMP7/TAP2 基因多态性与安阳地区 HPV 相关食管癌有关,并推测宿主的某些免疫相关基因将影响宿主对 HPV 病毒的清除,而导致细胞恶性转化。本研究结果显示:在食管癌组中,HPV16E6 感染率在 HLA-DR9 等位基因阳性组为 69.2%,高于 HLA-DR9 等位基因阴性组 28.0% ($P=0.006$);在对照组中,HPV16E6 感染率在 HLA-DR9 等位基因阳性和阴性两组中的差异无统计学意义 ($P=0.643$),结合 HPV16E6 与 HLA-DR9 等位基因交互作用分析,HPV16E6、HLA-DR9 等位基因两者均为阳性的个体发生食管癌的危险性为两因素均为阴性者的 12.25 倍(95%CI: 2.53 ~ 59.42),其共同作用远大于两因素单独作用之和[单独 HLA-DR9 等位基因阳性的个体发生食管癌的风险为 1.56 (95%CI: 0.43 ~ 5.56),单独 HPV16E6 阳性的个体发生食管癌的风险为 2.00(95%CI: 0.91 ~ 4.42)],推测 HLA-DR9 的存在,使外源性抗原 HPV16E6 在抗原递增的过程中所形成的 HLA-抗原肽复合物无法被 T 细胞识别,从而使 HPV16E6 抗原逃脱机体的免疫监视,并持续存在于宿主上皮细胞,随上皮细胞而分化和复制,参与对机体的致癌过程。但 HPV 与遗传易感的共同致癌机制仍需进一步深入研究,为食管癌的防治提供确切的生物学依据。

参 考 文 献

[1] 陆哲明,陈克能,郭梅,等. 食管癌高发区 HPV 检测及与 p53 的关系. 中华肿瘤杂志,2001,23(3):220-223.
 [2] 邹塞英,刘旭明,唐新萍,等. 食管鳞癌 HPV 感染与病毒癌基因

E6 的关系. 临床与实验病理学杂志,1998,14(1):50-52.
 [3] 陈玲. HPV 感染及 TAP1 基因多态性与新疆哈萨克族食管癌的相关性研究. 新疆:石河子大学医学院,2007.
 [4] 许春雷,千新来,周小山,等. HPV16E6 型-E6、E7 在食管鳞癌组织与非癌组织中的表达. 癌症,2004,23(2):165-168.
 [5] 卢晓梅,温浩,刘辉,等. 新疆哈萨克族食管癌组织中 HPV16 E6、E7 基因的检测与 p53 的关系. 肿瘤,2004,24(5):464-466.
 [6] 林军,邓长生,朱尤庆,等. HLA-DRB1,-DQB1 基因多态性与食管鳞癌遗传关联性. 中华消化杂志,2002,22(12):726-729.
 [7] Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: classification, virol, pathology, and epidemiology. J Clin Pathol,1994,47(12):1066.
 [8] Itoh A, Shimada A, Koddama K, et al. GAD-reactive T cells were mainly detected in autoimmune-related type 1 diabetic patients with HLA-DR9. Ann N Y Acad Sci,2004,1037:33-40.
 [9] Rudwaleit M, Gibson K, Wordsworth P, et al. HLA associations of systemic lupus erythematosus in Chinese from Singapore. Ann Rheum Dis,1995,54:686-687.
 [10] Bontkes HJ, Vanduin M, Degruel TD, et al. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV16E6 sequence variants. Int J Cancer,1998,78(2):166-171.
 [11] De Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. Mutat Res,2003,544(2-3):375-383.
 [12] 张春风. 河南安阳食管癌高发区普查人群 HLA 多态性和 HPV 感染易感性关系的研究. 呼和浩特:内蒙古医学院,2006.
 [13] Cao BW, Tian XY, Li Y, et al. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China. Carcinogenesis,2005,26(7):1280-1284.

(收稿日期:2009-02-27)

(本文编辑:张林东)