

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.02.024

免疫相关基因 Tap2、HLA-DR9 与新疆哈萨克族食管癌 的交互作用

曾同霞¹, 马彦清², 徐 莉², 蔡金凤¹, 李 锋¹, 何 玲¹, 秦江梅¹

A 1: 2 Case-control Study of Tap2/HLA-DR9 Gene Polymorphism with Esophageal Cancer in Kazakh

ZENG Tong-xia¹, MA Yan-qing², XU Li², CAI Jin-feng¹, LI Feng¹, HE Ling¹, QIN Jiang-mei¹

1. Laboratory of Xinjiang Epidemic and Ethnic Diseases Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. The Friendship Hospital Cancer Surgery of Kazak Autonomous Preecture in Xinjiang

Corresponding Author: QIN Jiang-mei, E-mail: qinjiangmei@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To evaluate the association between Tap2379/Tap2665 genetic polymorphisms/HLA-DR9 immune-associated gene and esophageal cancer (EC) in a high incidence Kazakh of Xinjiang. **Methods** A case-control study was conducted with 194 cases of EC and 388 controls. Tap2379/Tap2665 genotypes were detected by PCR-RFLP and HLA-DR9 allele gene were identified by PCR. The conditional logistic regression model was performed in this study. **Results** Tap2379 genotype frequencies of esophageal cancer group was different from the controls ($\chi^2 = 18.247, P < 0.05, OR = 2.347, 95\%CI: 1.587 \sim 3.471$); Tap2665 genotype did not find this difference ($\chi^2 = 2.175, P > 0.05, OR = 1.317, 95\%CI: 0.919 \sim 1.899$); HLA-DR9 allele positive of case group was different from the controls ($\chi^2 = 13.443, P < 0.05, OR = 2.343, 95\%CI: 1.486 \sim 3.693$). Multivariate conditional logistic regression analysis showed: Tap2379 genetic polymorphisms/HLA-DR9 gene and history of esophageal or stomach disease were risk factors of Kazakh esophageal cancer. The interaction analysis showed Tap2379 genetic polymorphisms with HLA-DR9 allele gene significantly increased risk to the development of esophageal cancer 5.302 (95%CI: 2.363 ~ 11.900). **Conclusion** Tap2379 genetic polymorphisms and HLA-DR9 allele gene are important risk for EC, Tap2665 genotype did not found this action. Tap2379 and HLA-DR9 showed an additive risk to develop esophageal carcinoma.

Key words: Kazakh; Esophageal cancer; Tap2379; Tap2665; HLA-DR9

摘要:目的 探讨 Tap2379、Tap2665 基因多态性、HLA-DR9 等位基因频率与新疆哈萨克族(简称哈族)食管癌的相关性。**方法** 采用 1:2 配比的病例对照研究,收集哈族食管癌 194 例,健康对照 388 例,运用序列特异性引物聚合酶链反应-限制片段长度多态技术(PCR-RFLP)检测 Tap2379、Tap2665 基因多态性,序列特异性引物聚合酶链反应(PCR)检测 HLA-DR9 等位基因频率,采用 χ^2 检验、多因素条件 Logistic 回归进行统计分析。**结果** 病例组与对照组间比较, Tap2379 基因型差异有统计学意义 ($\chi^2 = 18.247, P < 0.05, OR = 2.347, 95\%CI: 1.587 \sim 3.471$); Tap2665 基因型差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.175, P > 0.05, OR = 1.317, 95\%CI: 0.919 \sim 1.899$); HLA-DR9 等位基因频率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.443, P < 0.05, OR = 2.343, 95\%CI: 1.486 \sim 3.693$)。多因素条件 Logistic 回归示: Tap2379 位多态性分布、HLA-DR9 等位基因阳性率、食管或胃疾病史在哈萨克族食管癌和

健康对照间存在差异。交互作用示: Tap2379 位多态性与 HLA-DR9 等位基因协同作用时可使食管癌的发生危险性增加到 5.302 倍 (95% CI: 2.363 ~ 11.900)。**结论** Tap2379 位 Val(G) → Ila(A) 转变、HLA-DR9 等位基因阳性为哈族食管癌的危险因素,两者对食管癌的发生存在效应修饰作用。

关键词: 哈萨克族; 食管癌; Tap2379; Tap2665; HLA-DR9

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)02-0210-04

收稿日期: 2010-01-06; **修回日期:** 2010-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660161); 国家重点基础研究发展规划资助项目(973 计划)(2005CCA03700); 2006 年教育部科学技术研究重点项目(206167); 国家 973 计划前期研究专项(2007CB516804); 新疆民族高发 HPV 相关肿瘤病因防治应用基础合作研究(2009R0003)

作者单位: 1. 832002 新疆石河子, 石河子大学医学院预防医学系 新疆地方与民族高发病省部共建教育部重点实验室; 2. 新疆伊犁哈萨克自治州友谊医院肿瘤外科

通信作者: 秦江梅, E-mail: qinjiangmei@yahoo.com.cn

作者简介: 曾同霞(1980-), 女, 硕士在读, 住院医师, 主要从事肿瘤分子流行病学研究

0 引言

食管癌的发生发展与多种癌基因、抑癌基因改变有关,有研究显示 GST-ECRG-I 融合蛋白对肿瘤细胞生长有抑制作用^[1]。新疆哈萨克族(哈族)是食管癌的高发民族,课题前期研究显示:哈族食管癌高发与少食蔬菜水果、吸烟饮酒相关,且这些与相关代谢基因亚甲基四氢叶酸还原酶(C677T)、细胞色素 P4502E1(CYP2E1)多态性存在交互作用^[2-4]。抗原加工相关转运体在 MHC-I 类分子的成熟及膜表面表达中起着十分重要的作用, Tap 具有多态性,其多态性影响到对肽的选择性转运^[5],其基因的单个氨基酸取代也可能导致对抗原肽的选择转运产生较大变化^[6-7]。Tap2379、Tap2665 处存在 2 个位点多态性: Tap2379 处存在 G→A 的多态性, Tap2665 处位点存在 A→G 的多态性。Tap2379 位异亮氨酸携带者是新疆哈族食管癌的危险因素^[8]。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)对新疆哈族食管癌进行 HLA-DRB1 * 0901(HLA-DR9)的基因频率检测,结果显示: HLA-DR9 是新疆哈族食管癌的易感基因(OR = 2.97, 95%CI: 1.78~4.96)^[9],但 Tap2 与 HLA-DR9 共同作用于哈族食管癌的研究尚未见报道。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2005 年 3 月—2009 年 8 月期间在新疆北部哈族聚集地区的六所医院共收集哈萨克族新发食管癌病例 194 例,对照 388 例。对照部分来源于同一所医院门诊胃镜非食管疾病患者,部分来源于食管癌高发区正常人群,所有标本均经组织病理学确诊或排除。对照的匹配条件:同民族、同性别、年龄相差不得超过 5 岁、居住同一地区。病例和对照均要签署知情同意书。

1.2 问卷调查

采用自行设计的调查表进行问卷调查,内容包括(1)一般情况:年龄、性别、婚姻状况等社会学指标;(2)饮食、生活习惯:包括吸烟史、饮酒史、饮茶、饮水、新鲜蔬菜水果摄入、蛋白摄入、热烫饮食、不规律饮食、特色饮食等;(3)病史:消化道疾病史及食管癌家族史。

1.3 实验方法

1.3.1 主要仪器与试剂 PCR 仪(德国 Biometra 公司);离心机(德国 Thermo 公司);紫外分光光度仪(北京普析通用仪器公司);琼脂糖(上海杰瑞公司);PCR 扩增试剂:三磷酸碱基脱氧核苷酸

(dNTP),Taq 酶,10×PCR Buffer 及 *MspI* 内切酶(大连宝生物公司),*Bst*uI(Fermentas)。

1.3.2 DNA 抽提、PCR 扩增及酶切 食管癌病例及对照均取新鲜全血,-80℃低温保存备用。基因组 DNA 提取采用酚-氯仿-异戊醇法;所有抽提的 DNA 均经 1%凝胶电泳验证。PCR 扩增所使用的引物参考文献^[8-9], Tap2379: F 5'-GCCCCGTGCCT-TGTACCTGCGC-3', R 5'-ACCCCCAAGTGGAG-CAC-3',共 212bp; Tap2665: F 5'-GGTGATTGCT-CACAGGCTGCCG-3', R 5'-CACAGCTCTAGG-GAAACTC-3',共 227bp。Tap2379 和 Tap2665 反应总体积 25 μl,基因组 DNA 2 μl,引物(25 pmol/μl)各 0.8 μl,dNTP 2.0 μl、Taq 酶(2.5U/μl)0.4 μl,10×PCR Buffer(含 Mg²⁺)2.5 μl。PCR 扩增条件为:94℃预变性 5 min,94℃ 45 s、56℃ 45 s、72℃ 45 s,共 35 个循环,最后 72℃延伸 10min。Tap2379 PCR 产物用 *Bst*uI 内切酶酶切,Tap2665 PCR 产物用 *MspI* 内切酶酶切,37℃水浴 12 h;HLA-DR9: F 3'-CCGCTGCACTGTGAAGCTCT - 5', R 5'-GGACGGAGCGGGTGC GG TATC-3'。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(2.5 U/μl)0.4 μl,10×PCR Buffer(含 Mg²⁺)2.5 μl。PCR 扩增条件为: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。

1.3.3 PCR 产物及酶切产物鉴定 3%和 2%琼脂糖凝胶电泳分别用于鉴定 Tap2 基因型和 HLA-DR9 等位基因频率,用 DNA Marker I(100~600bp)作为参照。Tap2379 基因型分三种: Val(G)/Val(G)、Val(G)/Ile(A)、Ile(A)/Ile(A),片段长度分别为(193+20)bp、(213+193+20)bp、213bp; Tap2665 基因型分三种: Thr(A)/Thr(A)、Thr(A)/Ala(G)、Ala(G)/Ala(G),片段长度分别为 227bp、(227+207+20)bp、(207+20)bp; HLA-DR9 等位基因阳性者出现 193 bp 的目的片断,阴性者不出现。

1.4 统计学方法

使用 Epidata 建立数据库,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,以 1:2 配对资料 χ^2 检验、P 值、OR 值及 CI(95%)确定 Tap2379、Tap2665 基因多态性及 HLA-DR9 基因频率在病例和对照组中的分布差异,多因素条件 Logistic 回归进行危险度分析,1:2 配对资料 χ^2 检验涉及到的公式^[11]有:

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

$Var(n_2) = (n_2 + n_4)$, n_1 的期望值: $E(n_1) = \frac{2}{3}(n_1 + n_3)$, n_1 的方差: $Var(n_1) = \frac{2}{3}(n_1 + n_3)$, $\chi^2 = \frac{[n_2 - E(n_2) + n_1 - E(n_1)]^2}{Var(n_2) + Var(n_1)}$, $OR = \frac{n_1 + 2n_2}{2n_5 + n_4}$.

2 结果

2.1 一般情况

调查对象均为哈族,食管癌组 194 人,其中男 128 人,女 66 人;对照组 388 人,其中男 256 人,女 132 人,两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.00$, $P = 1.00$);病例组与对照组年龄比较差异无统计学意义($t = 1.902$, $P = 0.058$)。为检验人群 Tap2379、Tap2665 基因型频率是否达到 Hardy Weinberg 遗传平衡,将对照组 Tap2379 基因型频率观察值与期望值进行比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 4.19$, $P > 0.05$);将对照组 Tap2665 基因型频率观察值与期望值进行比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.039$, $P > 0.05$);说明 Tap2379、Tap2665 基因型频率已达到遗传平衡,具有人群代表性。

2.2 Tap2 基因多态性、HLA-DR9 等位基因与哈族食管癌的关系

Tap2379 以突变杂合型(A/G)和突变纯合型(A/A)为暴露,用“+”表示,野生纯合型(G/G)为非暴露,用“-”表示,1:2 配对,每个对子有 3 人,1 个病例,2 个对照,三者的暴露情况出现六种可能组合:+++、++-、+-、--、-+-、--。经 1:2 配对资料的卡方检验 Tap2379: $\chi^2 = 18.247$, $P < 0.05$, 差异有统计学意义,其 OR 值为 2.347(95%CI: 1.587~3.471); Tap2665: $\chi^2 = 2.175$, $P > 0.05$, 其 OR 值为 1.317(95%CI: 0.919~1.899), 差异无统计学意义; 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 等位基因阳性率比较: $\chi^2 = 13.443$, $P < 0.05$, 差异有统计学意义,其 OR 值为 2.343(95%CI: 1.486~3.693), 见表 1。

表 1 Tap2、HLA-DR9 基因多态与哈萨克族食管癌的关系
Table 1 The genetic polymorphisms of Tap2 and HLA-DR9 for esophageal carcinoma

Genotype	control			amount	χ^2	P
	++	+-	--			
Tap2379	+	6	27	44	77	18.247 <0.05
	-	6	37	74	117	
Tap2665	+	20	38	35	93	2.175 >0.05
	-	17	48	36	101	
HLA-DR9	+	0	4	39	43	13.443 <0.05
	-	1	33	117	151	

2.3 哈族食管癌的多因素条件 Logistic 回归分析

本研究对年龄、性别、民族、居住地等易成为混杂因素的因子进行了严格匹配,为进一步控制可能同遗传、免疫相关的其他混杂因素的作用,将调查因素中的食管或胃疾病史、食管癌家族史与单因素结果分析中有意义的 Tap2379、HLA-DR9 等位基因频率分布结果引入多因素条件 Logistic 回归模型,结果显示:有食管或胃疾病史的个体患食管癌的风险是无疾病史的 1.318 倍(95%CI: 1.061~1.637);在控制了食管或胃疾病史、食管癌家族史的情况下, Tap2379 位 A/A 型及 A/G 的个体患食管癌的风险是 G/G 型的 1.206 倍(95%CI: 1.006~1.447); HLA-DR9 等位基因阳性者患食管癌的风险是阴性者的 1.228 倍(95%CI: 1.018~1.629), 见表 2。

2.4 Tap2379 基因多态性与 HLA-DR9 等位基因频率的交互作用

以 Tap2379 野生纯合型、HLA-DR9 等位基因阴性发生食管癌的危险性为基数 1, Tap2379 突变杂合型或突变纯合型、HLA-DR9 等位基因阴性者发生食管癌的危险性是对照组的 2.228 倍(95%CI: 1.475~3.366)。 Tap2379 野生纯合型、HLA-DR9 等位基因阳性发生食管癌的危险性是对照组的 2.539 倍(95%CI: 1.415~4.557)。 Tap2379 突变杂合型或突变纯合型、HLA-DR9 等位基因阳性发生食管癌的危险性是对照组的 5.302 倍(95%CI: 2.363~11.900), 见表 3。

表 2 哈族食管癌的多因素条件 Logistic 回归分析

Table 2 Multivariate conditional logistic regression analysis of esophageal carcinoma

Factors	B	SE	χ^2	P	OR(95%CI)
History of esophageal or gastric disease(control = no)	0.276	0.111	6.204	0.013	1.318(1.061~1.637)
Family history(control = no)	0.105	0.150	0.448	0.485	1.111(0.827~1.491)
Tap2379(control = G/G)	0.188	0.093	4.099	0.043	1.206(1.006~1.447)
HLA-DR9(control = negative)	0.253	0.120	4.457	0.035	1.228(1.018~1.629)

表 3 Tap2379 多态性与 HLA-DR9 等位基因与哈族食管癌的交互作用

Table 3 The interaction analysis of the Tap2379 and HLA-DR9 for esophageal carcinoma

Tap2379	HLA-DR9	Case	Control	χ^2	<i>P</i>	OR(95%CI)
-	-	92	271	—	—	1.000
+	-	59	78	14.818	0.000	2.228(1.475~3.366)
-	+	25	29	10.223	0.001	2.539(1.415~4.557)
+	+	18	10	19.497	0.000	5.302(2.363~11.900)

3 讨论

本研究结果提示:在控制了食管或胃疾病史、食管癌家族史的情况下, Tap2379 位 A/A 型及 A/G 的个体患食管癌的风险是 G/G 型的 1.206 倍(95% CI:1.006~1.447); HLA-DR9 等位基因阳性者患食管癌的风险是阴性者的 1.228 倍(95% CI:1.018~1.629)。 Tap2379 基因多态性与 HLA-DR9 等位基因频率的交互作用提示:两者协同作用时可使食管癌的发生危险性增加到 5.302 倍(2.363~11.900), 大于两者单独作用之和。其原因可能是:肿瘤细胞在与宿主的相互作用中, 为求生存可建立一系列免疫逃避机制以抵抗机体免疫系统的攻击。 Tap 基因的缺失或突变可能导致 Tap 表达下降或功能障碍, 当 Tap 功能障碍或表达下降将影响 MHC-I 类抗原肽复合物的形成, 导致肿瘤抗原不能被有效地转运, 从而使肿瘤逃逸免疫监视。由 HLA 等位基因产物决定特定的抗原肽能否与其抗原结合凹槽有效结合, 并被递呈给 T 细胞。由于 HLA-II 具有高度的多态性, 能产生多数等位基因, 每个个体所携带的 HLA-II 等位基因型别不同, 其所能递呈的抗原肽也就不同。 HLA-DR9 的多态改变使肿瘤抗原不能被有效地转运, 癌细胞就可能在体内迅速分裂增殖, 形成肿瘤。这两种免疫相关基因共同作用于

食管癌时, 对其抗原肽复合物的形成有累积作用, 故而使肿瘤逃逸免疫监视的效应增强。本研究结果为新疆哈萨克族食管癌免疫学治疗及肿瘤疫苗研制提供生物学依据。

参考文献:

- [1] 王越英, 唐槐静, 苏涛, 等. 人食管癌相关基因编码蛋白的表达及其对肿瘤细胞生长的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志 1999, 6(3):229-230.
- [2] 王秀梅, 张卫群, 陈波, 等. MTHFR 基因多态性与哈族食管癌易感性[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(8):937-938.
- [3] 陈波, 马彦清, 杨磊, 等. 哈族食管癌与 CYP2E1 基因多态性及烟酒嗜好关系[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(36):3 852-3 855.
- [4] 秦江梅, 王秀梅, 陈波, 等. 新疆哈族食管癌与叶酸摄入水平、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态关系的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(1):27-30.
- [5] Lauvau G, Kakimi K, Niedermann G, et al. Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells[J]. J Exp Med, 1999, 190(9):1 227-1 240.
- [6] Powis SJ, Young LL, Joly E, et al. The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER[J]. Immunity, 1996, 4(2):159-165.
- [7] Yan G, Shi L, Faustman D. Novel splicing of the human MHC-encoded peptide transporter confers unique properties[J]. J Immunol, 1999, 162(2):852-859.
- [8] 曾同霞, 张海峰, 雷丽娟, 等. TAP2 基因多态及遗传因素与新疆哈萨克族食管癌的相关性. [J]世界华人消化杂志, 2009, 17(31):3 255-3 258.
- [9] 廖佩花, 马彦清, 曾同霞, 等. 哈萨克族食管癌与 HLA-DR9 等位基因关系[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(7):798-800.
- [10] 瞿金霞, 沈冲, 叶冬青. 抗原肽处理相关运载蛋白体基因多态性与 1 型糖尿病[J]. 中国慢性病预防与控制, 2007, 15(1):28-31.
- [11] 沈福民编著. 流行病学原理与方法[M]. 上海:复旦大学出版社, 2001:50.

[编辑:黄国玲;校对:贺文]