

论 著 临床研究

新疆汉族鼻咽癌患者 HLA-A * 02 基因表达及多态性分析

刘 凯, 谭 瑶, 李亚伟, 王多明, 吾甫尔江·艾克木, 王若峥

新疆医科大学附属肿瘤医院头颈放疗科, 乌鲁木齐 830011

[摘要] 目的 探讨新疆汉族鼻咽癌患者 HLA-A * 02 等位基因及其亚型的表达与鼻咽癌发病的关系。方法 采用聚合酶链反应/序列特异性引物(PCR-SSP)的方法对 63 例新疆汉族鼻咽癌患者和 51 名汉族健康志愿者 HLA-A 等位基因进行分析,比较 2 组 HLA-A * 02 等位基因及其亚型的差异。结果 鼻咽癌患者共检出 HLA-A * 02 等位基因 51 个(频率 39.7%),健康人群检出 HLA-A * 02 等位基因 17 个(频率 16.7%),2 组比较差异有统计学意义($P=0.002$);鼻咽癌患者共检出 7 个 HLA-A * 02 等位基因亚型,健康人群检出 4 个等位基因亚型,2 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),各亚型构成比比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 HLA-A * 02 等位基因与新疆汉族鼻咽癌患者的发病有关,新疆鼻咽癌患者 HLA-A * 02 等位基因亚型分布存在自身特点。

[关键词] 头颈部肿瘤;鼻咽癌;HLA;多态性;T 细胞免疫

[DOI] 11.3969/j.issn.1674-8115.2015.01.011 **[中图分类号]** R739.63 **[文献标志码]** A

Analysis of gene expression and polymorphism of allele HLA-A * 02 of Han patients with nasopharyngeal carcinoma in Xinjiang

LIU Kai, TAN Yao, LI Ya-wei, WANG Duo-ming, WUFUERJIANG Aikemu, WANG Ruo-zheng

Department of Head and Neck Radiation, the Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

[Abstract] *Objective* To explore the relationship between the polymorphism of allele HLA-A * 02 and the incidence of nasopharyngeal carcinoma (NPC) of Han patients in Xinjiang. *Methods* Polymerase chain reaction/sequence-specific primers (PCR-SSP) method was adopted to analyze HLA-A alleles of 63 Han patients with NPC in Xinjiang and 51 health Han volunteers. The differences of allele HLA-A * 02 and its subtypes of two groups were compared. *Results* The frequency of allele HLA-A * 02 in NPC patients was 39.7% (51/126) and the frequency of allele HLA-A * 02 in healthy people was 16.7% (17/102). The difference was statistically significant ($P=0.002$). Seven subtypes of allele HLA-A * 02 were detected in NPC patients and 4 subtypes of allele HLA-A * 02 were detected in healthy people. The difference was not statistically significant ($P>0.05$). The differences of constituent ratios of subtypes were not statistically significant ($P>0.05$). *Conclusion* The allele HLA-A * 02 is relevant to the incidence of NPC of Han patients in Xinjiang. The distribution of subtypes of allele HLA-A * 02 of NPC patients in Xinjiang have their own features.

[Key words] head and neck cancer; nasopharyngeal carcinoma; HLA; polymorphism; T cell immunity

鼻咽癌是原发于鼻咽腔的恶性肿瘤,在我国东南沿海地区高发,流行病学研究^[1,2]提示与疱疹病毒感染、环境和遗传因素相关。在鼻咽癌相关的遗传因素研究^[3-5]中发现,经典的人类白细胞抗原

(human leukocyte antigen, HLA)即人类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC),其 I 类分子与鼻咽癌的发病密切相关。Simons 等^[6]研究发现 HLA-A * 02 与鼻咽癌的发病相关。HLA-A * 02

[基金项目] 国家自然科学基金(81160327);新疆维吾尔自治区国际合作基金(20126024;201141138)(National Natural Science Foundation of China, 81160327; The Xinjiang International Collaboration Foundation of China, 20126024; 201141138)。

[作者简介] 刘 凯(1989—),男,硕士生;电子信箱:15199146547@126.com。

[通信作者] 王若峥,电子信箱:wzm8526@163.com。

等位基因的亚型 HLA-A * 0206、HLA-A * 0207 与鼻咽癌的发生呈正相关^[2]。HLA 等位基因的分布存在人种差异,北方人群与南方人群在个别等位基因表达上也存在差异^[7,8]。本研究对新疆汉族鼻咽癌患者的 HLA-A * 02 等位基因亚型进行分析,并与健康人群进行比较。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2008 年 1 月—2014 年 5 月在新疆医科大学附属肿瘤医院头颈放疗科收治的初治汉族鼻咽癌患者(鼻咽癌组)63 例,其中男 45 例,女 18 例,年龄 17~83 岁,中位年龄 47 岁。所有患者均有完整的临床资料,经纤维鼻咽镜检查活检病理明确诊断,所有患者均行鼻咽和颈部 MRI 扫描分期。鼻咽癌组 Karnofsky 评分 ≥ 80 分,且均无严重的心、肝、肾及骨髓功能障碍,能顺利完成治疗。根据 WHO 分型标准进行病理分类。I 型:角化性癌 1 例;II 型:非角化性癌 27 例;III 型:未分化癌 35 例。根据 2002 年国际抗癌联盟(UICC)/美国癌症联合会(AJCC)分期,分为 I 期 5 例,II 期 5 例,III 期 23 例,IV 期 30 例。

所有患者在治疗前从肘静脉抽取静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝。51 例汉族健康对照(健康组)同样抽取肘静脉血 5 mL 用于 HLA-A * 02 亚型分析,献血者为该院学生和职工,均无鼻咽癌家族史,与研究对象均无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 全血基因组 DNA 的提取 试剂盒采用北京

天根生物技术有限公司的全血基因组 DNA 提取系统,严格按照说明书操作步骤进行 DNA 提取。浓度和纯度测定采用紫外分光光度计(Thermo Spectrophotometer-1510),吸光度 260/280 比值为 1.8~1.9, DNA 终质量浓度为 0.3~0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,取 10 μg -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存,待检测。

1.2.2 HLA-A 基因亚分型 采用聚合酶链反应/序列特异性引物(polymerase chain reaction sequence specific primers,PCR-SSP)的方法进行检测。

1.3 统计学方法

采用 SAS 9.3 软件进行统计学分析。HLA 等位基因频率(AF)计算采用直接计数法,组间 HLA-A * 02 亚型的比较采用 χ^2 检验,不满足 χ^2 检验标准的采用 Fisher 精确概率法进行校正,计算比值比(OR)和 95% 置信区间(95% CI);校正后 P 值(P_c 值)由 Bonferroni 法校正得出, $P_c = P \times$ 比较等位基因数。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HLA-A * 02 等位基因频率

全组患者共检出 12 个等位基因型(表 1)。其中鼻咽癌组共检出 11 个等位基因,未检出 HLA-A * 30 基因;健康组检出 11 个等位基因,未检出 HLA-A * 29 等位基因。健康组 HLA-A * 02 基因频率为 0.167,鼻咽癌组基因频率为 0.397,2 组频率比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $OR = 3.289$)。在所有检查的 HLA-A 等位基因中,HLA-A * 30 在健康组中的频率明显高于鼻咽癌组($P < 0.01$)。

表 1 2 组 HLA-A 等位基因频率比较

Tab 1 Comparisons of the frequency of allele HLA-A of two groups

HLA-A	鼻咽癌组/(n=63)		健康组/(n=51)		P 值	P_c 值	OR	95% CI
	阳性/n	频率	阳性/n	频率				
HLA-A * 01	8	0.063	4	0.039	0.555	>0.05	1.661	0.486~5.681
HLA-A * 02	51	0.397	17	0.167	0.000	0.002	3.289	1.750~6.186
HLA-A * 03	3	0.024	6	0.059	0.305	>0.05	0.390	0.095~1.601
HLA-A * 11	18	0.143	24	0.235	0.087	>0.05	0.542	0.275~1.066
HLA-A * 20	1	0.008	1	0.010	1.000	>0.05	0.808	0.050~13.079
HLA-A * 24	27	0.214	21	0.206	1.000	>0.05	1.052	0.554~1.998
HLA-A * 26	5	0.040	2	0.020	0.464	>0.05	2.066	0.392~10.878
HLA-A * 29	1	0.008	0	0.000	1.000	>0.05	-	-
HLA-A * 30	0	0.000	13	0.127	0.000	0.000	-	-
HLA-A * 31	1	0.008	6	0.059	0.047	>0.05	0.128	0.015~1.081
HLA-A * 32	1	0.008	1	0.010	1.000	>0.05	0.808	0.050~13.079
HLA-A * 33	11	0.087	7	0.069	0.632	>0.05	1.298	0.484~3.479

2.2 HLA-A * 02 亚型频率分布

HLA-A * 02 等位基因共检出 7 个亚型(表 2)。其中鼻咽癌组检出全部 7 个等位基因亚型,健康组共检出 4 个亚型;各亚型表达频率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 2 组 HLA-A * 02 等位基因亚型频率比较

Tab 2 Comparisons of the frequency of subtype allele HLA-A * 02 of two groups

HLA-A	鼻咽癌组/(N=63)		健康组/(N=51)		P 值	Pc 值	OR	95% CI
	阳性/n	频率	阳性/n	频率				
A * 0201	27	0.214	10	0.098	0.019	>0.05	2.509	1.151 ~ 5.496
A * 0202	1	0.008	0	0.000	1.000	>0.05	-	-
A * 0203	1	0.008	1	0.010	1.000	>0.05	0.808	0.500 ~ 13.079
A * 0204	1	0.008	0	0.000	1.000	>0.05	-	-
A * 0205	2	0.016	0	0.000	0.503	>0.05	-	-
A * 0206	6	0.048	2	0.020	0.302	>0.05	2.500	0.494 ~ 12.660
A * 0207	13	0.103	5	0.049	0.147	>0.05	2.232	0.768 ~ 6.484

表 3 2 组 HLA-A * 02 构成比比较

Tab 3 Comparisons of the constituent ratio of allele HLA-A * 02 of two groups

HLA-A	鼻咽癌组/(N=51)		健康组/(N=18)	
	阳性/n	构成比/%	阳性/n	构成比/%
A * 0201	27	52.94	10	55.56
A * 0202	1	1.96	0	0.00
A * 0203	1	1.96	1	5.56
A * 0204	1	1.96	0	0.00
A * 0205	2	3.92	0	0.00
A * 0206	6	11.76	2	11.11
A * 0207	13	25.49	5	27.78

3 讨论

鼻咽癌是一种较为常见的头颈部恶性肿瘤,该病的发生具有明显的地域性分布和家族聚集性,遗传因素被认为是鼻咽癌发病因素中不可忽视的部分^[1,2]。HLA 等位基因作为人类数目最多、最复杂和多态性最为明显的一类基因^[9],一直是肿瘤免疫研究的热点。

HLA 位于人类第 6 号染色体上,包含数量庞大的连锁基因座,与人类的免疫系统功能密切相关。HLA 被认为与机体免疫监视和维持免疫内环境稳定密切相关,同时也与感染性疾病以及肿瘤等的发病存在一定的关联性^[10,11]。HLA-A * 02 在任何人群中均为优势基因,在各地均有分布,正常人群中的表达比例在 17.78%~58.16%,在鼻咽癌患者人群中基因的分布频率在 14.0%~37.1%^[12-15]。大量的研

2.3 HLA-A * 02 亚型构成

鼻咽癌组共检出 7 个 HLA-A * 02 等位基因亚型,共 51 例;健康组检查 4 个 HLA-A * 02 等位基因亚型,共 18 例;2 组各等位基因亚型的构成比经比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 3)。

究^[3,16,17]表明,HLA 与鼻咽癌的关系密切,HLA 可以与抗原多肽形成复合物,被 T 细胞识别,诱发特异性 T 细胞免疫反应。Goldsmith 等^[18]通过 meta 分析发现,HLA-A * 02 等位基因与鼻咽癌的发病呈正相关,我国东南沿海和台湾地区的研究也进一步证实了鼻咽癌的发病与 HLA-A * 02 的表达呈正相关^[3]。本研究中鼻咽癌患者 63 例,共检出 HLA-A * 02 等位基因 51 个,基因频率为 39.7%;汉族健康人员 51 名,共检出 HLA-A * 02 等位基因 17 个,基因频率为 16.7%,差异有统计学意义。可以推测 HLA-A * 02 与新疆汉族鼻咽癌的发病呈正相关($OR = 3.289$),与新加坡、我国南方及台湾地区等地华人群体的研究结果相似。因此认为 HLA-A * 02 等位基因表达可能是新疆汉族发生鼻咽癌的危险因素之一。

对鼻咽癌患者的 HLA-A * 02 等位基因亚型进一步分析后,Burt 等^[19]研究发现,HLA-A * 0201 在美国白种人鼻咽癌患者中的分布比例达到 96%,与鼻咽癌发病呈负相关。Tang 等^[3]分析了 985 例鼻咽癌患者及健康人群,结果显示:HLA-A * 0201、* 0203、* 0206、* 0207 的分布频率较多,其中分布最多的是 * 0203 亚型,HLA-A * 0206、* 0207 与南方鼻咽癌患者发病相关。Hidesheim 和 Yu 等^[4,20]的研究也进一步证实了 HLA-A * 0206、* 0207 是鼻咽癌的易发因素。本研究对新疆汉族鼻咽癌患者和健康人群进行 HLA-A * 02 等位基因亚型分析,结果显示:HLA-A * 0201、* 0206、* 0207 是新疆汉族鼻咽癌患者和健康人群中分布较高的 3 个 HLA-A * 02 等位基因亚型,与程良红等^[4]对北方人群的研究结果相似。本

研究中鼻咽癌患者并未检出 HLA-A*0203 等位基因高表达,可能有其自身的遗传学特点,与我国南方鼻咽癌高发地区有一定差异,尚需进一步扩大样本深入研究。

综上所述,新疆汉族鼻咽癌患者与健康人群 HLA-A*02 等位基因的表达存在差异,HLA-A*02 与新疆汉族鼻咽癌的发病相关,各亚型的比较上 2 组患者无明显差异,新疆汉族鼻咽癌患者人群及健康人群的 HLA-A*02 等位基因各亚型的分布存在自身的特点,与南方人群有一定差异。通过对新疆鼻咽癌患者的 HLA 基因型进行分析,寻找与新疆鼻咽癌发病相关的遗传因素,从而对疾病能够早期发现、早期干预,为改善预后提供新的途径。

参考文献

- [1] 曾毅. 遗传因素、环境因素及 EB 病毒在鼻咽癌发生中的作用研究[J]. 中国肿瘤, 1995, 4(3): 24-25.
- [2] Hildesheim A, Wang CP. Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: a review of epidemiological association studies, 2000-2011; Rosetta Stone for NPC: genetics, viral infection and other environmental factors[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(2): 107-116.
- [3] Tang M, Zeng Y, Poisson A, et al. Haplotype-dependent HLA susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Southern Chinese population[J]. Genes Immun, 2010, 11(4): 334-342.
- [4] Hildesheim A, Apple RJ, Chen CJ, et al. Association of HLA class I and II extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(23): 1780-1789.
- [5] Zhao ML, Cai HB, Li X, et al. Future evidence for the existence of major susceptibility of nasopharyngeal carcinoma in the region near HLA-A locus in Southern Chinese[J]. J Transl Med, 2012, 10: 57.
- [6] Simons MJ, Wee GB, Goh EH, et al. Immunogenetic aspects of nasopharyngeal carcinoma. IV. Increased risk in Chinese of nasopharyngeal carcinoma associated with a Chinese-related HLA profile (A2, Singapore 2)[J]. J Natl Cancer Inst, 1976, 57(5): 977-980.
- [7] 张丽雄. HLA 与鼻咽癌易感风险的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(9): 1337-1341.
- [8] 程良红, 金士高, 高素青, 等. 中国南北汉族人群 HLA-A*02 等位基因分布差异[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(3): 321-324.
- [9] Duquesnoy RJ. A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level[J]. Hum Immunol, 2006, 67(11): 847-862.
- [10] Baines M, Ebringer A. HLA and disease[J]. Mol Aspects Med, 1992, 13(4): 263-278.
- [11] Ghadiri N, Gabbouj S, Farhat K, et al. Association of HLA-G polymorphisms with nasopharyngeal carcinoma risk and clinical outcome[J]. Hum Immunol, 2011, 72(2): 150-158.
- [12] Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, et al. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Database issue): D913-D919.
- [13] Wang R, Hu Y, Yindem LM, et al. Association analysis between HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 with nasopharyngeal carcinoma among a Han population in Northwestern China[J]. Hum Immunol, 2014, 75(3): 197-202.
- [14] 杨敏中, 李军, 蔡永林, 等. 鼻咽癌高发区非癌人群 HLA-A*02 分子多态性及分布[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(4): 320-323.
- [15] 徐筠筠, 邓志辉, 邹红岩, 等. 中国汉族个体 HLA-A、-B 基因全长序列的测定及调控区多态性[J]. 遗传, 2010, 32(5): 473-479.
- [16] Chan SH, Day NE, Kumaratma N, et al. HLA and nasopharyngeal carcinoma in Chinese: a further study[J]. Int J Cancer, 1983, 32(2): 171-176.
- [17] Makni H, Daoud J, Ben Salah H, et al. HLA association with nasopharyngeal carcinoma in southern Tunisia[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(5): 2533-2539.
- [18] Goldsmith DB, West TM, Morton R, et al. HLA associations with nasopharyngeal carcinoma in southern Chinese: a meta analysis[J]. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2002, 27(1): 61-67.
- [19] Burt RD, Vaughan TL, McKnight B, et al. Associations between human leukocyte antigen type and nasopharyngeal carcinoma in Caucasians in the United States[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996, 5(11): 879-887.
- [20] Yu KJ, Gao XJ, Chen CJ, et al. Association of human leukocyte antigens with nasopharyngeal carcinoma in high-risk multiplex families in Taiwan[J]. Hum Immunol, 2009, 70(11): 910-914.

[收稿日期] 2014-10-16

[本文编辑] 朱宝洲