

HPV6b感染与新疆哈萨克族食管癌的关系

廖佩花, 谭晓华, 张海峰, 雷丽娟, 曾同霞, 陈波, 李锋, 杨磊, 秦江梅

■背景资料

HPV与多种肿瘤的发生有关, 高危型的HPV16是宫颈癌的主要病因之一已经得到公认, 低危型的HPV6与尖锐湿疣的发生有关, 且在食管癌中也检测到HPV6亚型。本文将运用假病毒中和试验对HPV6b与哈萨克族食管癌的关系进行研究。

廖佩花, 谭晓华, 曾同霞, 李锋, 杨磊, 秦江梅, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室 石河子大学医学院预防医学系 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
张海峰, 雷丽娟, 伊犁州新华医院消化内科 新疆维吾尔自治区伊犁州伊宁市 835000
陈波, 石河子大学第一附属医院儿科 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
国家自然科学基金资助项目, No. 30660161
国家重点基础研究发展规划资助项目(973计划), No. 2005CCA03700
2006年教育部科学技术研究重点资助项目, No. 206167
国家973计划前期研究专项基金资助项目, No. 2007CB516804
国际抗癌联盟奖学金资助项目, No. NO2-CO-41101
作者贡献分布: 此课题由秦江梅, 李锋及杨磊设计; 研究过程由廖佩花, 谭晓华, 张海峰, 雷丽娟, 曾同霞及陈波操作完成; 数据分析由廖佩花, 曾同霞及陈波完成; 本论文写作由廖佩花, 谭晓华及秦江梅完成。
通讯作者: 秦江梅, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室。
qinjiangmei@yahoo.com.cn
电话: 0993-2057153 传真: 0993-2057153
收稿日期: 2008-11-05 修回日期: 2008-12-19
接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-01-18

Relationship between HPV6b infection and esophageal cancer in Kazakh in Xinjiang Uygur Autonomous Region

Pei-Hua Liao, Xiao-Hua Tan, Hai-Feng Zhang, Li-Juan Lei, Tong-Xia Zeng, Bo Chen, Feng Li, Lei Yang, Jiang-Mei Qin

Pei-Hua Liao, Xiao-Hua Tan, Tong-Xia Zeng, Feng Li, Lei Yang, Jiang-Mei Qin, Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases Shihezi University, Department of Preclinical Medicine, Shihezi Medical University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Hai-Feng Zhang, Li-Juan Lei, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital of Yili Canton, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Bo Chen, Department of Pediatrics, the First Subsidiary Hospital of Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30660161; the Major State Basic Research Development Program of China (973 program), No. 2005CCA03700; the Scientific and Technology Research Key Program of Ministry in Education, No. 206167; the Preliminary Studies of 973 Program of China, No. 2007CB516804; and the Fellowship and with Federal funds from the National Cancer Institute, No. NO2-CO-41101
Correspondence to: Jiang-Mei Qin, Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. qinjiangmei@yahoo.com.cn
Received: 2008-11-05 Revised: 2008-12-19
Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-01-18

■同行评议者

伊力亚尔·夏合丁, 教授, 新疆医科大学第一附属医院胸外科

Abstract

AIM: To evaluate the association between HPV6b infection and esophageal cancer (EC) in Kazakh of Xinjiang, China.

METHODS: A case-control study was conducted with 120 cases of EC and 120 controls. The controls were matched by sex, nationality, area of residence and age difference within 5 years. HPV6b infection was identified by PsV neutralization assay from blood-serum. Chi-square was performed to identify risk factors.

RESULTS: The esophageal cancer infection rate was 27.5% in the cases while it was 22.5% in the controls. Infection rate of esophageal cancer in experiment group was not statistically different from the controls ($\chi^2 = 0.80$, $P = 0.371$). HPV6b infection rate of the males was not statistically different from the females in both the cases and the controls ($\chi^2 = 0.31$, 0.01 , $P = 0.58$, 0.92). The infection rates of HPV6b in < 50, 50-59, 60-69 and ≥ 70 age groups, were 31.0%, 29.0%, 20.9% and 35.3%, respectively with no statistical differences detected among these groups in EC group ($\chi^2 = 1.67$, $P = 0.64$). The infection rates of HPV6b were 19.4%, 13.5%, 30.6% and 31.3%, respectively in the controls with no statistical differences either ($\chi^2 = 3.93$, $P = 0.27$).

CONCLUSION: The infection of HPV6b is common. The EC in Kazakh of Xinjiang has no association with HPV6b infection.

Key Words: Kazakh; Esophageal Cancer; Human papilloma virus 6b; PsV neutralization assay

Liao PH, Tan XH, Zhang HF, Lei LJ, Zeng TX, Chen B, Li F, Yang L, Qin JM. Relationship between HPV6b infection and esophageal cancer in Kazakh in Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(2): 194-197

摘要

目的: 探讨人乳头状瘤病毒6b(human papilloma virus 6b, HPV6b)的感染与新疆哈萨克族食管癌的关系。

方法: 收集哈萨克族食管癌标本120例, 按同性别、同民族、年龄相差小于5岁、同一个居住地选取对照120例. 运用假病毒中和实验(PsV neutralization assay)检测血清中HPV6b感染率.

结果: 食管癌组HPV6b感染率为27.5%, 对照组感染率为22.5%, 两组差别无统计学意义($\chi^2 = 0.80, P = 0.37$). 食管癌组与对照组不同性别HPV6b感染率差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.31, 0.01, P = 0.58, 0.92$). 食管癌组<50岁, 50-59岁, 60-69岁以及≥70岁年龄组HPV6b感染率分别为31.0%, 29.0%, 20.9%和35.3%, 差异无统计学意义($\chi^2 = 1.67, P = 0.64$), 对照组中分别为19.4%, 13.5%, 30.6%和31.3%, 差异亦无统计学意义($\chi^2 = 3.93, P = 0.27$).

结论: HPV6b感染在哈萨克族人群中普遍存在, 哈萨克族食管癌的发生与HPV6b感染无相关性.

关键词: 哈萨克族; 食管癌; 人乳头状瘤病毒6b; 假病毒中和实验

廖佩花, 谭晓华, 张海峰, 雷丽娟, 曾同霞, 陈波, 李锋, 杨磊, 秦江梅. HPV6b感染与新疆哈萨克族食管癌的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(2): 194-197

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/194.asp>

0 引言

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是一组双链DNA病毒, 普遍存在于生物界, 目前已经分离鉴定出100多种基因型, 依其致癌性不同将其分为高危型和低危型, 高危型有HPV16、18等; 低危型有HPV6、11等. HPV6b是一种黏膜型乳头瘤病毒, 主要侵犯人体黏膜组织, 使其发生增生性改变. 国内外相关报道均提示HPV6b与尖锐湿疣的发生有关^[1-3]. 早在1982年, Si *et al*就提出食管癌的形态学改变与生殖道疣很相似^[4], 因此推测食管癌的发生与HPV6b的感染存在联系. 近年的研究也发现食管癌中存在HPV6的感染, 非食管癌高发区的食管癌HPV感染主要为HPV6、16两型^[5], 河南、河北、广东、广西、新疆、四川、陕西等以原位杂交法和PCR法, 检测食管癌中HPV感染以HPV6、11、16、18、30型为主^[6], 但HPV6与食管癌相关性研究未见报道. 为证实HPV6b与哈萨克族食管癌的关系, 本研究在澳大利亚昆士兰大学戴曼蒂娜研究所实验室采用HPV假病毒中和实验检测新疆哈萨克族食管癌和对照血清中HPV6b抗体, 分析

HPV6b在哈萨克族食管癌病例与对照中的感染率, 阐述其与食管癌的关系, 为进一步干预研究提供生物学证据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-03/2007-12新疆北部哈萨克族聚集地区的六所医院哈萨克族新发食管癌患者120例; 对照按照同性别、同民族、年龄相差≤5岁、同一个居住地1:1匹配, 其中一部分对照来源于同一所医院的非肿瘤、非消化系统疾病的就诊或住院患者, 另一部分来源于同一乡镇或市区的正常人群, 共计120例. 所有病例均经组织病理学确诊, 对照为胃镜下的非食管病变者, 且排除其他系统肿瘤. 研究对象抽取静脉血3 mL, 4000 r/min, 离心10 min, 取上层血清. -80℃低温保存. 质粒p6sheLL, pYSEAP及293TT细胞由美国国立癌症研究所(national cancer institute, NCI)John Schiller教授惠赠. 培养基DMEM-10(DMEM含100 mL/L 56℃灭活补体的胎牛血清, 1%非必需营养氨基酸(non-essential amino acids, NEAA), 1% Glutamax-I, 0.05% Trypsin/EDTA, OptiMEM-I由Invitrogen, Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司. Diethanolamine 99%(Cat#113920025)是Acros Organics产品. 10% Brij58为Sigma, 磷酸酶反应底物P-Nitrophenyl phosphate tablets(PNP)(Cat# N-2765)以及CHAPS(Cat# C5070-1G)是Sigma公司产品. 50 g/L Hygromycin B stock为Roche产品. 96孔酶标板由丹麦Nunc公司提供. 美国宝特仪器有限公司Bio-tek ELx800全自动酶联仪.

1.2 方法 HPV假病毒(pseudotype virus)中和实验(PSV neutralization assay)是一种敏感度和特异度均较好的HPV抗体检测技术. 实验参考Buck *et al*^[7]的方法. 293TT细胞按50%密度接种于细胞培养瓶中, 加入DMEM-10培养3 d. 当细胞达到70%-80%融合度时, 用脂质体转染法将质粒p6sheLL, pYSEAP转染入293TT细胞. 6 h后去除转染液, 加入新的培养液继续培养48 h, 收集细胞于50 mL离心管中. 裂解细胞, 获取SEAP-PSV6b. 稀释SEAP-PSV6b到合适的浓度(具体方法参见网页<http://home.ccr.cancer.gov/Lco/neutralizationassay.htm>). 稀释293TT细胞到 3×10^5 /mL, 按100 μ L/孔铺于96孔细胞培养板中. 37℃培养4 h. 按1:20稀释的血清; 按1:1000稀释SEAP-PSV6b. 将20 μ L稀释血清加入到80 μ L稀释PSV中, 孵育1 h. 将混合液加入293TT细胞中, 继续培养72 h. 未加入血清的孔作为阴性对

■ 相关报道

Suzuk *et al*用原位杂交方法未发现任何类型的HPV感染, 而用PCR方法在4.29%的中国肿瘤标本和4.35%的辛辛那提食管癌中检出了HPV. Han *et al*采用酶联免疫吸附法对西安市90例食管癌和121例非癌对照的血清HPV16抗体进行检测, 发现食管癌病例HPV16抗体阳性率为24%, 对照为7%. Chang *et al*用³⁵S标记的HPV探针对我国林县的51例食管癌标本进行原位杂交, 结果发现HPV16 DNA阳性率43.1%. 说明HPV感染率可能与检测方法有关.

■应用要点

本研究首次采用假病毒中和实验方法对新疆哈萨克族食管癌及对照人群血清中HPV6b抗体进行检测,分析哈萨克族食管癌与HPV6b感染的相关性,为食管癌的预防及干预策略提供有价值的参考依据。

照。每个标本及阴性对照为3复孔。在酶标板的孔中先加入0.05% CHAPS in PBS, 20 μ L/孔。加入细胞上清液40 μ L/孔, 65 $^{\circ}$ C, 30 min灭活内源性碱性磷酸酶。加入200 μ L PNP反应底物, 避光孵育4 h, 测定 A_{405nm} 。结果判定: 以 A_{405nm} 值低于阴性对照50%判为阳性。

统计学处理 使用Epidata建立数据库, 采用SPSS13.0软件进行分析, 以 χ^2 检验确定HPV6b在病例和对照组中的分布, 计算P值、OR值及OR值的95%可信区间。

2 结果

2.1 一般情况 调查对象均为哈萨克族, 食管癌病例组120例, 其中男性81例, 女性39例, 平均年龄 59.2 ± 10.5 岁; 对照组120例, 其中男性81例, 女性39例, 平均年龄 57.8 ± 10.2 岁。病例组与对照组年龄差别无统计学意义($t = 1.08$, $P = 0.28$), 性别分布均衡。

2.2 HPV6b感染与哈萨克族食管癌的关系 在120个病例中, HPV6b阳性有33例, 感染率27.5%, 120例对照中, 27例HPV6b阳性, 感染率为22.5%, 两组差异无统计学意义($\chi^2 = 0.80$, $P = 0.371$), OR值为1.31(95% CI: 0.73-2.35), HPV6b感染率与哈萨克族食管癌无联系(表1)。

2.3 食管癌组和对照组中不同性别的HPV6b感染率 120例食管癌病例中, 男性HPV6b感染率25.9%(21/81), 女性感染率为30.8%(12/39), 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.31$, $P = 0.578$)。对照组男性感染率为22.2%(18/81), 女性为23.1%(9/39), 两组差异无统计学意义($\chi^2 = 0.01$, $P = 0.916$)。病例组和对照组HPV6b感染率均与性别无关(表2)。

2.4 食管癌组和对照组中不同年龄HPV6b感染率 将食管癌组与对照组按照年龄分为<50岁、50-59岁、60-69岁和 ≥ 70 岁, 在食管癌组中, 各年龄组HPV6b感染率分别为31.0%, 29.0%, 20.9%, 35.3%, 经卡方检验, $\chi^2 = 1.67$, $P = 0.664$, 差异无统计学意义; 对照组中, 各年龄组HPV6b感染率分别为19.4%, 13.5%, 30.6%, 31.3%, 经卡方检验, $\chi^2 = 3.93$, $P = 0.269$, 对照组中各年龄组HPV6b感染率差异无统计学意义(表3)。

3 讨论

HPV是一种亲上皮细胞的双链DNA病毒, 目前鉴定分离了100多种, E6、E7是最有效的病毒癌蛋白, 与病毒的细胞转化功能及致癌性有关。按病毒致癌能力的大小可将HPV分为高危型和低

表 1 HPV6b在新疆哈萨克族食管癌病例和对照人群的感染率 $n(\%)$

HPV6b	病例组	对照组	P	ORs(95% CI)
阴性	87(72.5)	93(77.5)		1.00
阳性	33(27.5)	27(22.5)	0.371	1.31(0.73-2.35)

危型, 其高危型16及18是人类宫颈癌致癌的环境危险因素。目前的研究除了明确90%的宫颈癌有HPV感染外, HPV作为其他人类肿瘤的病因并无明确定论。多数学者发现了食管癌组织中有HPV感染的存在, 但结果差异很大, Zhu *et al*^[8]采用原位杂交(ISH)技术对不同地区食管癌患者HPV16检测发现: 河南安阳食管癌患者HPV16感染率为81.4%, 高于北京(69.8%)和内蒙古(63.6%)。Han *et al*^[9]采用酶联免疫吸附法对西安市90例食管癌和121例非癌对照的血清HPV16抗体进行了检测, 发现食管癌病例HPV16抗体阳性率为24%, 而对照仅为7%。Dillner *et al*^[10]在芬兰低发区进行的巢式病例对照研究中发现: 血清HPV16抗体阳性者患食管癌的危险性为阴性者的14倍。本课题组前期采用PCR方法对哈萨克族食管癌组织、癌旁组织和正常组织各80例进行HPV16的检测, 结果显示HPV16感染率分别为42.5%、25.0%和13.8%, 差异有统计学意义^[11]; 对316例食管癌蜡块标本进行高危型的HPV检测, 发现HPV18是哈萨克族食管癌主要高危型^[12]。本课题组研究结果提示HPV16、18与新疆哈萨克族食管癌的发生有关。

食管癌中HPV感染率的不同, 可能与使用的检测方法不同有关。以往对HPV的检测通常用形态学观察、免疫组化、原位杂交以及PCR等方法, 但这些方法受到主观因素、病毒整合入宿主的DNA片段、以及标本的保存处理等影响, 会出现假阴性和低敏感性的问题。近年来HPV抗体检测的研究较多见, 目前所采用的许多抗体中和实验是通过替代方法进行的, 如利用HPV VLP进行的ELISA检测和血凝抑制实验等, 这些方法相对较为简单, 灵敏度也较好, 但容易产生较多的假阳性结果, 不能完全真实地表现抗体的中和能力^[13]。2004年Buck *et al*^[7]应用密码子优化后的HPV结构蛋白表达质粒与报告质粒通过脂质体共转染293TT细胞后可有效获得包装报告质粒的HPV假病毒。此种病毒颗粒在中和实验中的应用, 具有效率高、成本低、操作简便和易于检测等优点。

表 2 哈萨克族食管癌组与对照组不同性别HPV6b感染率

性别	n	食管癌组		对照组	
		HPV6b阳性(n)	HPV6b感染率(%)	HPV6b阳性(n)	HPV6b感染率(%)
男性	81	21	25.9	18	22.2
女性	39	12	30.8	9	23.1
合计	120	33	27.5	27	22.5

■同行评价
本研究首次采用假病毒中和实验方法对新疆哈萨克族食管癌与HPV6b感染情况进行检测,实验设计合理,方法及数据可靠,有一定的学术价值。

表 3 哈萨克族食管癌组和对照组不同年龄的HPV6b感染率

年龄组(岁)	病例组			对照组		
	n	HPV6b阳性(n)	HPV6b感染率(%)	n	HPV6b阳性(n)	HPV6b感染率(%)
<50	29	9	31.0	31	6	19.4
50-59	31	9	29.0	37	5	13.5
60-69	43	9	20.9	36	11	30.6
≥70	17	6	35.3	16	5	31.3
合计	120	33	27.5	120	27	22.5

澳大利亚昆士兰大学戴曼蒂娜研究所主任 Ian Frazer教授是HPV疫苗的主要发明人。目前,该研究所对HPV的检测采用假病毒中和实验,此种检测方法在该研究所疫苗免疫效果的评价中,灵敏度高于病毒样颗粒(virus like particle, VLP)ELISA实验,特异度与VLP-ELISA相当^[7]。本研究运用假病毒中和实验在该研究所检测哈萨克族食管癌及对照人群血清中HPV6b抗体,结果显示, HPV6b感染率为25.0%, 病例组及对照组中感染率分别为27.5%和22.5%, 两组差异无统计学意义, 且食管癌组和对照组中HPV6b感染均与年龄及性别无关。根据本研究结果, 认为HPV6b感染在新疆哈萨克族食管癌及对照人群中普遍存在, 哈萨克族食管癌的发生没有显示出与HPV6b感染有相关性。

致谢: 感谢澳大利亚昆士兰大学戴曼蒂娜研究所的Yvonne Gautam, James Pang, Ian Frazer教授在实验过程中给予的指导。

4 参考文献

1 龚向东, 叶顺章, 张君炎, 张国成, 邵长庚, 梁国钧, 姜文华, 夏强, 王全佩. 1991-2001年我国性病流行病学分析. 中华皮肤科杂志 2002; 35: 178-182
2 熊瑛. 108例尖锐湿疣患者HPV的基因分型及临床分析. 社区医学杂志 2007; 5: 16-17
3 赵俊郁, 岳学苹, 王爱平. 474例尖锐湿疣患者HPV检测与分型. 中国麻风皮肤病杂志 2007; 23: 80
4 Si HX, Tsao SW, Poon CS, Wang LD, Wong YC, Cheung AL. Viral load of HPV in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 103: 496-500
5 Suzuk L, Noffsinger AE, Hui YZ, Fenoglio-Preiser

CM. Detection of human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1996; 78: 704-710
6 Chang F, Syrjänen S, Shen Q, Cintorino M, Santopietro R, Tosi P, Syrjänen K. Human papillomavirus involvement in esophageal carcinogenesis in the high-incidence area of China. A study of 700 cases by screening and type-specific in situ hybridization. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 123-130
7 Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med* 2005; 119: 445-462
8 Zhu LZ, Su XL, Chen KN, Yang RJ, Xing HP, Cui JG, Ke Y. [Detection rate of human papillomavirus-16 in esophageal squamous cell carcinoma from different Chinese populations] *Ai Zheng* 2005; 24: 870-873
9 Han C, Qiao G, Hubbert NL, Li L, Sun C, Wang Y, Yan M, Xu D, Li Y, Lowy DR, Schiller JT. Serologic association between human papillomavirus type 16 infection and esophageal cancer in Shaanxi Province, China. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1467-1471
10 Dillner J, Knekt P, Schiller JT, Hakulinen T. Prospective seroepidemiological evidence that human papillomavirus type 16 infection is a risk factor for oesophageal squamous cell carcinoma. *BMJ* 1995; 311: 1346
11 陈云昭, 姚恩生, 杨兰, 刘春霞, 李洪安, 蒋金芳, 秦江梅, 杨磊, 李锋. 人乳头状瘤病毒感染与新疆哈萨克族食管癌发生关系的探讨. 现代预防医学 2008; 35: 2407-2409
12 杨兰, 陈玲, 孙振柱, 张海洋, 田秀云, 齐妍, 朱敬, 杨磊, 秦江梅, 李锋. 新疆哈萨克族食管癌中HPV感染状况分析. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2114-2119
13 卢五迅, 程通, 李少伟, 潘晖榕, 沈文通, 陈毅歆, 张涛, 郑舟, 张军, 夏宁邵. 人乳头瘤病毒16型假病毒中和实验的建立和初步应用. 生物工程学报 2006; 22: 990-995