

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.02.010

新疆哈萨克族食管鳞癌中 HLA-G 的表达及其意义

刘杨正¹, 胡建明², 李 锋², 李 玲³, 闫小龙¹, 李 鑫¹, 陈文娟¹, 熊洋洋¹

Expression and Significance of HLA-G in Kazak Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Liu Yangzheng¹, Hu Jianming², Li Feng², Li Ling³, Yan Xiaolong¹, Li Xin¹, Chen Wenjuan¹, Xiong Yangyang¹

1. Laboratory of Xinjiang Epidemic and Ethnic Diseases Shihezi University, Shihezi 832002, China, 2. Department of Pathology, Shihezi University School of Medicine; 3. Shihezi University School of Life Science

Corresponding Author: Hu Jianming, E-mail: Jianming_120@Yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of HLA-G in Xinjiang Kazak patients with esophageal squamous cell carcinoma(ESCC). **Methods** The expression of HLA-G was detected using SP immunohistochemical staining in 30 ESCC and 20 cases of tumor adjacent normal tissues. **Results** The positive rate of HLA-G expression in ESCC was 66.7%(20/30), significantly higher than that in tumor adjacent normal tissues(20%)($P<0.05$). The positive rate of HLA-G was closely related with depth of invasion and clinical stage($P<0.05$ for all), but not with age, gender, tumor location, histologic grade and lymphnode metastasis($P>0.05$ for all). **Conclusion** The significantly over expression of HLA-G might play a key role in the pathogenesis of Kazak ESCC in Kazak population.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; Human leucocyte antigen; Immunohistochemistry; Kazak

摘 要:目的 探讨人类白细胞抗原-G(human leucocyte antigen, HLA-G)在新疆哈萨克族食管鳞癌中的表达及临床意义。**方法** 应用免疫组织化学 SP 法对 30 例哈族食管鳞癌及 20 例癌旁正常组织中 HLA-G 的表达进行检测。**结果** 哈族食管鳞癌组织中 HLA-G 的表达率为 66.7%, 明显高于癌旁正常组织 20.0%, 差异具有统计学意义($P<0.05$); HLA-G 的表达与哈族食管癌浸润深度和临床分期关系密切(P 均 <0.05), 而与患者年龄、性别、食管癌发生部位、分化程度和淋巴结转移无明显相关性(P 均 >0.05)。**结论** HLA-G 的高表达可能在新疆哈族食管鳞癌的发生发展中起重要作用。

关键词: 食管鳞癌; 人类白细胞抗原-G; 免疫组织化学; 哈萨克族

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A

0 引言

食管癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是威胁人类健康的最常见恶性肿瘤之一, 由于早期临床表现不明显, 患者确诊时多为中晚期, 预

后极差, 5 年生存率仅为 5%~20%^[1]。食管癌组织学分类主要为鳞癌和腺癌, 我国 90% 以上食管癌为鳞癌, 其分布具有一定的民族性和地域性, 位于我国新疆的哈萨克族(哈族)聚集区是食管癌高发地区之一, 其食管癌死亡率达 155.9/10⁶, 明显高于我国平均水平 15.23/10⁶^[2], 为本地区重点防治的恶性肿瘤。

人类白细胞抗原-G(human leucocyte antigen, HLA-G)属于非经典的 HLA I 类抗原, 早期研究发现 HLA-G 表达于胎盘绒毛膜外细胞滋养叶细胞, 通过抑制 NK 和 T 细胞的功能, 在母胎界面免疫耐受中起重要作用^[3-4]。近年来研究发现 HLA-G 在多种肿瘤细胞中异常表达, 提示其可能参与肿瘤

收稿日期: 2012-03-15; 修回日期: 2012-06-27
基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助课题(2009BAI8203); 国际科技交流与合作项目资助课题(2010DFB34100)
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省部共建教育部重点实验室, 2. 石河子大学医学院病理教研室; 3. 石河子大学生命科学学院
通信作者: 胡建明, E-mail: jianming120@yahoo.com.cn
作者简介: 刘杨正(1990-), 男, 本科在读, 主要从事肿瘤流行病学研究

的免疫逃逸^[5-7]。目前对哈族食管癌高发原因的研究已有一些,但其病因及发病机制仍未完全明确,且至今尚未见到关于 HLA-G 蛋白在其食管鳞癌组织中表达的研究报道。

本研究通过免疫组织化学方法对哈族食管鳞癌组织和癌旁正常组织 HLA-G 的表达进行检测,旨在初步探讨 HLA-G 与高发的哈族食管癌的相关性,为明确哈族食管癌发病机制提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 资料

选取 2004 年—2009 年由新疆伊犁友谊医院病理确诊的哈族原发性食管鳞状细胞癌病例 30 例,其中男 20 例,女 10 例;年龄 37~71 岁,平均 59.37 岁。癌旁正常组织 20 例,其中男 10 人,女 10 人;年龄 46~67 岁,平均年龄 60.30 岁。两组年龄、性别经比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有食管癌均做常规 HE 染色,由 2 名病理学专家对 HE 染色切片进行组织学观察和复诊并分级,食管癌病理诊断标准参照《WHO Classification Tumours of the Digestive System》^[8]。所有患者术前均未接受放疗或化疗。

实验试剂:鼠抗人 HLA-G 单克隆抗体,购自北京博奥试剂公司;免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学 SP 法 主要步骤如下:(1)切片脱蜡、水化;(2)3%的 H₂O₂ 甲醇溶液中室温孵育 10 min;(3)微波修复抗原 15 min;(4)山羊血清室温孵育 10 min;(5)滴加小鼠抗人 HLA-G 单抗 37℃ 孵育 2 h;(6)滴加生物素标记的二抗,37℃ 温箱孵育 15 min;(7)滴加辣根酶标记的链霉卵白素溶液,37℃ 温箱孵育 20 min;(8)DAB 光镜下控制染色 3~5 min,苏木精对比染色,10 g/L 盐酸酒精分化;(9)切片脱水、透明、干燥、封片。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果判定标准 食管组织细胞胞质呈现棕黄色染色判为阳性,在 200 倍光学显微镜下至少观察 5 个视野,组织中被染成棕黄色的阳性细胞占 5% 以上者,为阳性病例,否则为阴性;每张切片均经 2 位有经验的病理医师双盲法阅片,观察结果一致后决定阳性或阴性。镜检结果根据胞质的染色程度及染色细胞的百分比分为:阴性(-)无阳性细胞或 $\leq 5\%$;弱阳性(+)阳性细胞百分率为 $\geq 5\% \sim 25\%$;胞质着色浅;阳性(++)阳性细胞百分率为

$>25\% \sim 50\%$,胞质着色较深;强阳性(+++),阳性细胞百分率 $>50\%$,胞质着色深。

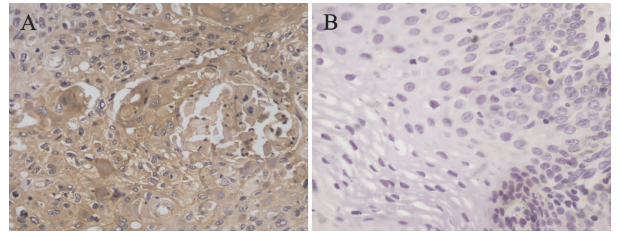
1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,采用 F 检验判断样本的方差齐性,计量资料分析用 t 检验,计数资料分析用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哈族食管鳞癌及癌旁正常组织 HLA-G 的蛋白表达

HLA-G 主要表达于细胞的胞质中,见图 1;对哈族 30 例食管鳞癌组织的检测发现,20 例 HLA-G 表达阳性,阳性表达率为 66.7%,明显高于食管癌旁正常组织(20.0%),差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。



A: positive expression of HLA-G in ESCC; B: negative expression of HLA-G in normal tissues adjacent to ESCC; HLA-G: human leucocyte antigen G; ESCC: esophageal squamous cell carcinoma

图 1 HLA-G 在哈族食管鳞癌和癌旁正常组织中的表达 (SP $\times 200$)

Figure 1 Expressions of HLA-G in ESCC and normal tissues adjacent to ESCC in Kazak Race (SP $\times 200$)

表 1 哈族食管鳞癌与癌旁正常组织中 HLA-G 的表达
Table 1 The expressions of HLA-G in ESCC and the normal tissues adjacent to ESCC in Kazak Race

Groups	Cases	Positive(%)	Negative	χ^2	P
Normal	20	4(20.0)	16		
ESCC	30	20(66.7)	10	10.47	0.003

2.2 HLA-G 表达与哈族食管鳞癌临床病理学参数的相关性

为了探明 HLA-G 在食管癌发生发展中的临床意义,我们分析了食管癌患者的一些临床病理参数,包括患者年龄、性别、肿瘤部位、病理学分化程度、浸润深度、淋巴结转移及临床分期。研究发现,HLA-G 的阳性表达率与食管癌的浸润深度和临床分期关系密切,浸润深度越深,临床分期越高,HLA-G 表

达率越高,差异具有统计学意义(P 均 ≤ 0.05),但与食管癌患者的年龄、性别、肿瘤部位、分化程度及淋巴结转移无明显相关性($P>0.05$),见表 2。

表 2 哈萨克族食管鳞癌 HLA-G 的表达与临床病理资料的关系

Table 2 Correlation between clinicopathologic factors and HLA-G expression in the Kazak's ESCC

Clinicopathologic data	Expressions of HLA-G			χ^2	P
	Cases	Positive	Negative		
Age(year)					
≤Median(59)	12	9	3	0.156	0.693
>Median	18	11	7		
Gender					
Male	20	14	6	0.300	0.584
Female	10	6	4		
Tumor location					
Upper + middle	15	9	6	0.150	0.699
Lower	15	11	4		
Histologic grade					
Well	12	9	3	0.156	0.693
Moderate + poor	18	11	7		
Depth of invasion					
T1-T2	10	2	8	5.625	0.018
T3-T4	20	15	5		
Metastasis					
Yes	10	7	3	0.000	1.000
No	20	13	7		
TNM stages					
I - II	18	6	12	5.363	0.021
III - IV	12	10	2		

3 讨论

HLA-G 在对肿瘤免疫应答和免疫调节中具有重要作用。HLA-G 通过抑制 CD4 + T 细胞的增殖,阻止 NK 细胞和部分 T 细胞的溶解作用^[9-12]。此外,HLA-G 还可诱导 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-10 等)的产生,促使辅助性 T 细胞(Th1、Th2)平衡发生偏移,Th1/Th2 平衡偏向 Th2 方向,使 Th1 细胞免疫应答功能降低^[13-14]。近年来对多种肿瘤的检测研究(包括卵巢癌、肾透明细胞癌、宫颈癌、恶性间皮瘤、乳腺癌等)^[15-18]发现 HLA-G 表达呈现明显上调,其异常高表达可能是肿瘤细胞得以逃避宿主免疫监视的重要手段。然而有一些矛盾的结果,如 Palmisano 等^[19]用 RT-PCR、Western blot 和免疫组织化学的方法在乳腺癌组织中均不能检测到 HLA-G 的表达,甚至有研究显示 HLA-G 在肿瘤细胞系的表达相当罕见^[20]。这可能与食管癌复杂的

发生发展机制有关,也可能与研究人群、标本类型和实验方法等因素有关,亦可能与所用单抗的特异性和敏感度及对 HLA-G 不同异构体的检出能力有关。哈萨克族遗传背景及生活方式较一致,人口流动性小,有效群体大,是进行食管癌研究的较好群体^[21]。

本研究结果显示,哈族食管鳞癌 HLA-G 阳性表达明显高于癌旁正常组织,提示 HLA-G 在哈族食管癌的发生中起到重要的作用,可能参与食管癌细胞免疫逃逸,进而促进肿瘤生长。通过对哈族食管鳞癌 HLA-G 的表达与临床病理资料分析发现,HLA-G 的表达与哈族食管鳞癌浸润深度和临床分期关系密切,浸润深度越深,临床分期越高,HLA-G 表达率越高;与其他临床病理资料比较发现 HLA-G 表达与哈族食管癌的年龄、性别、发生部位、肿瘤分化程度及淋巴结转移情况无明显相关性。结果与 Yie 等^[22]的报道类似,同时在肝癌^[6]、乳腺癌^[18]、肺癌^[23]、子宫内膜癌^[24]等其他肿瘤的研究中也有类似报道。表明 HLA-G 的表达与食管癌的发展过程关系密切,进一步提示 HLA-G 可能参与食管癌细胞逃避宿主免疫监控和杀伤,从而促进肿瘤的发生发展。

本研究通过对哈族食管鳞癌 HLA-G 进行检测,发现 HLA-G 与哈族食管鳞癌发生发展关系密切,进一步证实了 HLA-G 在食管癌细胞免疫逃逸机制中的潜在作用。因此 HLA-G 的表达水平可作为食管癌患者病情进展的监测,并有望成为一种新的治疗食管癌的基因靶点,为高发的哈族食管鳞癌的诊断和临床治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1): 10-30.

[2] Hou J, Chen ZF, He YT. Esophageal cancer epidemiology[J]. Hebei zhi gong yi xue yuan xue bao, 2000, 17(4): 27-9. [侯浚, 陈志峰, 贺宇彤. 食管癌的流行病学[J]. 河北职工医学院学报, 2000, 17(4): 27-9.]

[3] Bainbridge D, Ellis S, Le Bouteiller P, et al. HLA-G remains amystery[J]. Trends Immunol, 2001, 22(10): 548-52.

[4] Selmani Z, Naji A, Gaiffe E, et al. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells[J]. Transplantation, 2009, 87(Suppl 9): S62-6.

[5] Wang F, Li H, Wen ZQ. HLA-G and escape mechanism of tumor cells[J]. Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi, 2007, 14(22): 1751-4. [王飞, 李辉, 温泽清. HLA-G 与肿瘤细胞的免疫逃逸[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(22): 1751-4.]

[6] Wang Y, Ye Z, Meng XQ, et al. Expression of HLA-G in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancre-

at Dis Int,2011,10(2):158-63.

[7] de Kruijf EM,Sajet A,van Nes JG,et al. HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients [J]. J Immunol,2010,185(12):7452-9.

[8] Hamilton SR,Aaltonen LA. WHO classification of tumours of the digestive system[M]. Lyon:IARC Press,2000:9-11.

[9] Bainbridge DR,Ellis SA,Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes [J]. J Reprod Immunol, 2000,48(1):17-26.

[10] Lila N,Rouas-Freiss N,Dausset J,et al. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response; a CD4+ T cell regulatory mechanism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2001,98(21):12150-5.

[11] Wiendl H,Mitsdoerffer M,Hofmeister V,et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas; an alternative strategy of immune escape [J]. J Immunol, 2002, 168 (9): 4772-80.

[12] Lin A,Chen HX,Zhu CC,et al. Aberrant human leucocyte antigen-G expression and its clinical relevance in hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Mol Med,2010,14(8):2162-71.

[13] Kanai T,Fujii T,Unno N,et al. Human leukocyte antigen-G expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood [J]. Am J Reprod Immunol,2001,45(2):94-9.

[14] Rieger L,Hofmeister V,Probe C,et al. Th1 and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E [J]. Mol Hum Reprod,2002,8(3):255-61.

[15] Davidson B,Elstrand MB,McMaster MT,et al. HLA-G expression in effusions is a possible marker ovarian carcinoma to chemotherapy in ovarian carcinoma [J]. Gynecol Oncol,2005, 96(1):42-7.

[16] Ibrahim EC,Guerra N,Lacombe MJ,et al. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma[J]. Cancer Res,2001,61(18):6838-45.

[17] Zhou JH,Ye F,Chen HZ,et al. Altered expression of cellular membrane molecules of HLA-DR,HLA-G and CD99 in cervical intraepithelial neoplasias and invasive squamous cell carcinoma[J]. Life Sci,2006,78(22):2643-9.

[18] Kleinberg L,Flørenes VA,Skrede M,et al. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma[J]. Virchows Arch,2006,449(1):31-9.

[19] Palmisano GL,Pistillo MP,Fardin P,et al. Analysis of HLA-G expression in breast cancer tissues [J]. Hum Immunol,2002, 63(11):969-76.

[20] Pangault C,Le Fricc G,Caulet-Maugendre S,et al. Lung macrophages and dendritic cells express HLA-G molecules in pulmonary diseases[J]. Hum Immunol,2002,63(2):83-90.

[21] Lu XM,Zhang YM,Lin RY,et al. Screening and cloning differentially expressed genes of esophageal cancer in Kazakh [J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu,2005,32(2):79-81. [卢晓梅,张月明,林仁勇,等. 哈萨克族食管癌差异表达基因的研究[J]. 肿瘤防治研究,2005,32(2):79-81.]

[22] Yie SM,Yang H,Ye SR,et al. Expression of HLA-G is associated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Am J Clin Pathol,2007,128(6):1002-9.

[23] Urošević M,Kurrer MO,Kamarashev J,et al. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology,human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production [J]. Am J Pathol,2001,159(3):817-24.

[24] Barrier BF,Kendall BS,Sharpe-Timms KL,et al. Characterization of human leukocyte antigen-G(HLA-G) expression in endometrial adenocarcinoma [J]. Gynecol Oncol,2006,103(1): 25-30.

[编辑:刘红武;校对:邱颖慧]