

人类白细胞抗原-E基因多态性与乳腺癌遗传易感性的关系

周艳¹, 吴振村², 程健君¹, 贾天军¹

Association of HLA-E Gene Polymorphisms with Genetic Susceptibility to Breast Carcinoma

ZHOU Yan¹, WU Zhencun², CHENG Jianjun¹, JIA Tianjun¹

1. Department of Immunology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Laboratory Department, Maternal and Child Health Hospital of Zhangjiakou, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding Author: JIA Tianjun, E-mail: jiatianjun@yahoo.com



Abstract: Objective To investigate the association between HLA-E gene polymorphisms and genetic susceptibility of female breast carcinoma in Han Nationality in Zhangjiakou, China. **Methods** HLA-E typing was performed for 200 breast cancer patients and 114 healthy controls from Zhangjiakou area by polymerase chain reaction-sequence-specific priming (PCR-SSP). **Results** Two alleles of HLA-E could be detected, HLA-E*0101 and HLA-E*0103; simultaneously three genotypes were detected, namely HLA-E*0101/0101, HLA-E*0101/0103 and HLA-E*0103/0103. The frequencies of HLA-E*0103 allele and HLA-E*0103/HLA-E*0103 genotype were significant different between healthy controls and breast cancer patients ($P < 0.01$). The risk of breast cancer was significantly increased in HLA-E*0103/HLA-E*0103 genotype ($OR = 2.05$, $P = 0.004$). **Conclusion** HLA-E gene polymorphisms are associated with the development of female breast cancer of the Han in Zhangjiakou, China; moreover, HLA-E*0103/HLA-E*0103 genotype is probably the susceptible genotype.

Key words: Human leukocyte antigen-E (HLA-E); Polymerase chain reaction-sequence-specific priming; Breast carcinoma; Polymorphisms

摘要: 目的 探讨人类白细胞抗原-E (HLA-E) 基因多态性与中国张家口地区汉族女性乳腺癌遗传易感性的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-SSP) 法对中国张家口地区200例乳腺癌患者和114例健康对照人群HLA-E等位基因进行检测。**结果** 乳腺癌患者和健康对照组均检出两种等位基因: HLA-E*0101和HLA-E*0103; 共检出三种基因型: HLA-E*0101/HLA-E*0101、HLA-E*0101/HLA-E*0103和HLA-E*0103/HLA-E*0103。其中HLA-E*0103等位基因和HLA-E*0103/HLA-E*0103基因型在乳腺癌患者组的分布频率明显高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。且携带HLA-E*0103/HLA-E*0103基因型的个体乳腺癌发病风险明显增加 ($OR = 2.05$, $P = 0.004$)。**结论** HLA-E基因多态性与中国张家口地区汉族女性乳腺癌遗传易感性相关, 并且HLA-E*0103/HLA-E*0103等位基因可能是易感基因。

关键词: 人类白细胞抗原-E; 聚合酶链反应-序列特异性引物; 乳腺癌; 多态性

中图分类号: R737.9 文献标识码: A

0 引言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 发病率占全身各种恶性肿瘤的7%~10%, 是严重影响妇女身心健康

甚至危及生命最常见的恶性肿瘤之一。其发病机制与遗传因素和环境有关, 越来越多的研究表明基因多态性与乳腺癌的发病风险有关^[1]。人类白细胞抗原-E (HLA-E) 属于非经典的HLA-I类 (HLA-I b) 分子, 其编码基因具有有限多态性、组织分布广泛、正常细胞表面低水平表达等特点^[2]。研究显示, HLA-E可被自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK)、细胞毒性T细胞 (cytotoxic lymphocytes, CTLs) 和NK-CTLs细胞表面受体 (抑制性受体

收稿日期: 2014-02-20; 修回日期: 2014-09-17

基金项目: 河北省教育厅重点科研项目 (Z2011208); 河北北方学院青年基金资助项目

作者单位: 1. 075000 张家口, 河北北方学院免疫教研室; 2. 075000 张家口, 张家口市妇幼保健院检验科

通信作者: 贾天军, E-mail: jiatianjun@yahoo.com

作者简介: 周艳 (1980-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤方面的研究

CD94/NKG2A和活化性受体CD94/NKG2C) 识别, 通过影响细胞的功能而影响肿瘤的发生发展, 且HLA-E等位基因可影响NK细胞的功能^[3]。有研究发现HLA-E在神经胶质瘤^[4]、结肠癌^[3]、卵巢肿瘤^[5]中均高度表达; HLA-E基因多态性与肺癌^[6]、鼻咽癌^[7]的发病风险有关联。推测HLA-E基因多态性可能与乳腺癌发病风险有关, 本研究采用聚合酶链—序列特异性引物方法检测中国张家口地区汉族女性乳腺癌患者HLA-E基因多态性, 探讨其多态性与乳腺癌遗传易感性的关联, 为乳腺癌的预防、诊断和临床治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

乳腺癌患者200例和健康对照者114例, 所有研究对象均为中国张家口地区汉族女性。乳腺癌患者来源于张家口市妇幼保健院乳腺外科2012年10月—2014年1月住院就诊者, 所有患者均为新发肿瘤, 未接受任何治疗; 健康对照者来源于同期张家口市妇幼保健院体检中心健康女性体检者, 无其他疾病。所有个体间无任何血缘关系, 见表1。

表1 乳腺癌患者和健康对照组临床资料

Table1 Clinical characteristics of healthy controls and breast cancer patients

Groups	n	Age		
		Mean	Median	Range
Healthy	114	41.3	31	29-56
Breast cancer	200	46.6	47	33-66

1.2 主要试剂和仪器

盐酸胍(风船化学试剂公司, 天津); 无水乙醇(风船化学试剂公司, 天津); 蛋白酶K(Takara, 日本); Taq DNA聚合酶(Takara, 日本); dNTP(Takara, 日本); Tris碱(风船化学试剂公司, 天津) 低温高速离心机(Thermo, 美国); PCR扩增仪(Thermo, 美国); 电泳仪(北京六一仪器厂); 凝胶成像系统(WD-9403F, 北京)

1.3 方法

1.3.1 标本收集和DNA提取 抽取健康对照者和乳腺癌患者清晨空腹外周静脉血2 ml, 用EDTA-K2抗凝管收集, 盐酸胍法提取DNA, TE缓冲液溶解, -20℃保存。

1.3.2 HLA-E等位基因检测 采用序列特异性引物PCR方法检测HLA-E等位基因, 引物序列、特异性及扩增片段长度见表2。

(1) PCR反应体系的组成 10 μl反应体系中包括1×buffer(含Mg²⁺)、0.2 mM dNTP、1.0 U Taq

DNA聚合酶、上下游引物各1 μl、100 ng基因组DNA。(2) PCR循环条件 95℃预变性5 min; 按95℃ 30 s, 61℃ 1 min, 72℃ 1 min进行35个循环; 最后72℃延伸5 min。(3) PCR产物检测 配制2%琼脂糖凝胶(含0.5 μg/ml 溴化乙锭), 取6 μl PCR产物, 加1 μl 10×上样缓冲液, 在1×TAE缓冲液中电泳, 凝胶成像系统中观察记录结果。

1.4 统计学方法

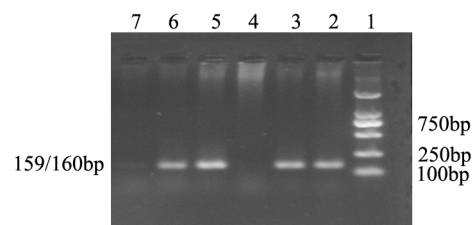
所有数据采用SPSS13.0统计软件包进行分析。用Hardy-Weinberg遗传平衡检验法进行吻合度检验; HLA-E基因型和等位基因频率由直接计数法得出, 各组间等位基因及基因型频率比较采用卡方检验, 用比值比(OR)及其95%可信区间(CI)表示相对风险度, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

HLA-E基因在乳腺癌患者组和健康对照组分布频率均符合Hardy-Weinberg遗传平衡($\chi^2=1.037$, $P=0.309$; $\chi^2=0.473$, $P=0.492$)。

2.1 HLA-E等位基因、基因型分布及其与乳腺癌发病风险的关系

200例乳腺癌患者组及114例健康对照组均检出2个等位基因: HLA-E*0101和HLA-E*0103, 未检出HLA-E*0104等位基因, 见图1。



1: marker(100-2000bp, from bottom:100, 250, 500, 750, 1000, 2000 bp); 2: E*0101 of sample 1; 3: E*0103 of sample 1; 4: E*0104 of sample 1; 5: E*0101 of sample 2; 6: E*0103 of sample 2; 7: E*0104 of sample 2

图1 HLA-E等位基因检测结果

Figure1 PCR-SSP gel results for HLA-E allele

HLA-E*0103等位基因在乳腺癌患者组中的频率(66.25%)明显高于健康对照组(55.26%), 两组间比较差异有统计学意义($P=0.006$; $OR=1.59$; 95%CI: 1.14~2.22); 共检出三种基因型: HLA-E*0101/HLA-E*0101、HLA-E*0101/HLA-E*0103、HLA-E*0103/HLA-E*0103。乳腺癌患者组三种基因型的分布频率分别为13.00%、41.50%、45.50%; 健康对照组三种基因型频率分别为18.42%、52.63%、28.95%, 两组间比较差异

表2 PCR-SSP检测HLA-E等位基因^[8]的引物序列

Table2 Primers sequences of HLA-E allele^[8] detected by PCR-SSP

Primer	Sequence	Primer pair	PCR products	Amplicon(bp)
HLA-E*0101AF	gcg agc tgg ggc ccg tca	E*0101AF+ER	HLA-E*0101	159
HLA-E*0103GF	tgcg agc tgg ggc ccg gcg	E*0103GF+ER	HLA-E*0103	160
ER	ccg cct cag agg cat cat ttg	—	—	—
HLA-EF	tac gac ggc aag gat tat ctc a	HLA-EF +HLA-E*0104R	HLA-E*0104	136
HLA-E*0104R	tgt ctt cca ggt agg ctc c			

Notes: —: not exist

有统计学意义（ $P=0.004$ ）。与携带HLA-E*0101/HLA-E*0101和HLA-E*0101/HLA-E*0103基因型个体比较，携带HLA-E*0103/HLA-E*0103基因型的个体乳腺癌的发病风险明显增加（ $OR=2.05$ ； $95\%CI$: 1.25~3.35），见表3。

2.2 HLA-E基因多态性与乳腺癌病理类型及临床分期的关系

经分析，HLA-E基因多态性与乳腺癌临床分期及病理类型无明显相关性（ $P=0.77$ ， $P=0.18$ ），见表4。

3 讨论

HLA-E基因位于6号染色体短臂，全长4 938 bp，由7个内含子和8个外显子组成。目前，10种HLA-E等位基因被世界卫生组织HLA命名委员会命名，

可分为三种亚型：HLA-E*0101、HLA-E*0103 和 HLA-E*0104^[8]。最近研究表明HLA-E基因多态性与多种疾病遗传易感性有关联，如HLA-E多态性与肺癌^[6]、强制性脊柱炎^[9]有显著相关性；Park等检测了312例白塞氏病患者HLA-E基因多态性，发现HLA-E*0101和HLA-E*0103等位基因与白塞氏病发病风险有关^[10]；Hirankarn等也发现HLA-E*0103等位基因与鼻咽癌的发生发展相关^[7]；朱子玲等采用PCR方法分析了119例造血干细胞移植者HLA-E多态性发现携带HLA-E*0103等位基因者移植后巨细胞病毒感染率明显增加^[11]。也有研究发现HLA-E*0101的低分布与银屑病的发生有关^[12]。上述研究是基于不同地区不同种族的疾病人群，由于人种之间的遗传差异，有待扩大人群研究HLA-E多态性与疾病的相关性。

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤，近年来其遗

表3 HLA-E基因多态性与乳腺癌遗传易感性的关系

Table3 Relationship between HLA-E gene polymorphisms and genetic susceptibility of breast cancer

Variable	Breast cancer patients(n, %)	Healthy controls(n, %)	χ^2	P	$OR(95\%CI)$
Alleles			7.46	0.006	
HLA-E*0101	135(33.75)	102(44.74)			1.00
HLA-E*0103	265(66.25)	126(55.26)			1.59 (1.14-2.22)
HLA-E*0104	0(0)	0(0)			
Genotypes			8.33	0.004	
HLA-E*0101/HLA-E*0101	26(13.00)	21(18.42)			
HLA-E*0101/HLA-E*0103	83(41.50)	60(52.63)			1.00
HLA-E*0103/HLA-E*0103 ^a	91(45.50)	33(28.95)			2.05 (1.25-3.35)
HLA-E*0101/HLA-E*0104	0(0)	0(0)			
HLA-E*0103/HLA-E*0104	0(0)	0(0)			
HLA-E*0104/HLA-E*0104	0(0)	0(0)			

Notes: ^a: χ^2 , P , OR and $95\%CI$ of HLA-E*0103/HLA-E*0103 were compared with HLA-E*0101/HLA-E*0101 merger with HLA-E*0101/HLA-E*0103

表4 HLA-E基因多态性与乳腺癌病理类型及临床分期的关系

Table4 Correlation between HLA-E gene polymorphisms and clinical stage, histological types of breast cancer

Clinical characteristics	n	Genotypes		χ^2	P
		HLA-E*0101/HLA-E*0101+ HLA-E*0101/HLA-E*0103	HLA-E*0103/HLA-E*0103		
TNM stage				0.51	0.77
I	65	37(33.94)	28(30.77)		
II	76	39(35.78)	37(40.66)		
III	59	33(30.28)	26(28.57)		
Histological type				1.78	0.18
Infiltrating ductal carcinoma	140	72(66.06)	68(74.73)		
Others	60	37(33.94)	23(25.27)		

传易感性的研究已成为肿瘤分子流行病学的热点。例如周鑫等^[13-14]报道CD44、P73基因多态性与中国重庆地区女性乳腺癌的遗传易感性有关; de Kruijf 等^[15]研究显示HLA-E的表达是预测乳腺癌患者预后的一个重要指标。

本研究结果显示: 在乳腺癌患者组及健康对照组均检出两种等位基因: HLA-E*0101和HLA-E*0103分布频率在两组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 其中HLA-E*0103在乳腺癌组出现频率最高, 提示该等位基因可能与中国张家口地区汉族女性乳腺癌的遗传易感性有关; 两组间共检出三种基因型HLA-E*0101/HLA-E*0101、HLA-E*0101/HLA-E*0103、HLA-E*0103/HLA-E*0103, 其中携带HLA-E*0103/HLA-E*0103基因型的个体发病风险明显增加, 因此, HLA-E*0103/HLA-E*0103基因型可能是中国张家口地区汉族女性乳腺癌的易感基因型。本研究结果还显示, HLA-E基因多态性与乳腺癌的病理类型及临床分期无明显相关性。而关于HLA-E基因多态性与乳腺癌的关联仍需在不同种族不同地区的人群中进一步进行验证, 且HLA-E的分子表达是否与乳腺癌的发生、发展及预后有关也是今后的研究内容。

参考文献:

- [1] Alanazi MS, Parine NR, Shaik JP, *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in Wnt signaling pathway genes with breast cancer in Saudi patients[J]. Plos One, 2013, 8(3): e59555.
- [2] Ferguson R, Ramanakumar AV, Richardson H, *et al.* Human leukocyte antigen(HLA)-E and HLA-G polymorphisms in human papillomavirus infection susceptibility and persistence[J]. Hum Immunol, 2011, 72(4): 337-41.
- [3] Benevolo M, Mottolese M, Tremante E, *et al.* High expression of HLA-E in colorectal carcinoma is associated with a favorable prognosis[J]. J Transl Med, 2011, 9: 184.
- [4] Leos Kren, Ondrej Slaby, Katarina Muckova, *et al.* Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance? [J]. Neuropathology, 2011, 31(2): 129-34.
- [5] Wang JY, Xu Q, Wu SJ, *et al.* Expression and significance of HLA-G and HLA-E in the tissue of ovarian malignant tumor[J]. Shangdong Yi Yao, 2010, 50(15): 1-3.[王建英, 许茜, 吴淑娟, 等. 卵巢恶性肿瘤组织中HLA-G、HLA-E的表达及意义[J]. 山东医药, 2010, 50(15): 1-3.]
- [6] Qiao GF, Wang XD, Pan YL. Study on the association of lung cancer with HLA-E allele[J]. Liaoning Yi Xue Yuan Xue Bao, 2007, 28(3): 50-2.[乔高峰, 王晓东, 潘玉玲. HLA-E基因多态性与肺癌的相关性研究[J]. 辽宁医学院学报, 2007, 28(3): 50-2.]
- [7] Hirankarn N, Kimkong I, Mutirangura A. HLA-E polymorphism in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Tissue Antigens, 2004, 64(5): 588-92.
- [8] Liu XX, Pan FH, Tian W. Characterization of HLA-E polymorphism in four distinct populations in Mainland China[J]. Tissue Antigens, 2012, 80(1): 26-35.
- [9] Paladini F, Belfiore F, Cocco E, *et al.* HLA-E gene polymorphism associates with ankylosing spondylitis in Sardinia[J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(6): R171.
- [10] Park KS, Park JS, Nam JH, *et al.* HLA-E*0101 and HLA-G*010101 reduce the risk of Behcet's disease[J]. Tissue Antigens, 2007, 69(2): 139-44.
- [11] Zhu ZL, Wu XJ, Wu DP, *et al.* Influence of HLA-E polymorphism on cytomegalovirus infection after HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2013, 21(4): 990-4.[朱子玲, 吴小津, 吴德沛, 等. HLA-E基因的多态性对同胞全相造血干细胞移植后巨细胞病毒感染的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(4): 990-4.]
- [12] Zeng X, Chen H, Gupta R, *et al.* Deletion of the activating NKG2C receptor and a functional polymorphism in its ligand HLA-E in psoriasis susceptibility[J]. Exp Dermatol, 2013, 22(10): 679-81.
- [13] Zhou X, Wu CY. Association of CD44 polymorphisms with genetic susceptibilities and clinico-pathologic characteristics in breast cancer[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao(Yi Xue Ban), 2012, 43(6): 807-11.[周鑫, 吴诚义. CD44基因多态性与乳腺癌遗传易感性及临床病理参数的关系[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(6): 807-11.]
- [14] Zhou X, Wu CY. Association of p73 polymorphisms with genetic susceptibilities to breast cancer: a case-control study[J]. Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang, 2012, 39(21): 1615-8.[周鑫, 吴诚义. p73基因多态性与乳腺癌遗传易感性的关系[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(21): 1615-8.]
- [15] 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.

[编辑: 周永红; 校对: 尤婷婷]