

人白细胞抗原- G 基因多态性与脑胶质瘤易感性之间的关系

赵开胜¹, 折盼¹, 白利芬²

摘要 目的:探讨人白细胞抗原- G(HLA-G)基因多态性和血清中可溶性 HLA-G(sHLA-G)水平与脑胶质瘤易感性之间的关系。方法:选择 264 例脑胶质瘤患者(脑胶质瘤组)和 264 例健康志愿者(对照组),采用测序检测 HLA-G 的等位基因,采用 ELISA 测定血清中 sHLA-G 水平。结果:G:010101、G:010102、G:010404 和 G:010401 与脑胶质瘤的风险转变和疾病分级相关;多因素回归分析表明年龄、性别、吸烟状态和脑胶质瘤切除程度均非Ⅲ~Ⅳ级脑胶质瘤风险因素;G:010101($OR=2.06, P=0.009$), G:010102($OR=1.24, P=0.012$), G:010404($OR=1.88, P=0.035$), G:010401($OR=1.88, P=0.017$)与Ⅲ~Ⅳ级脑胶质瘤发生风险显著相关;脑胶质瘤患者血清中 sHLA-G 水平显著高于对照组($P<0.001$);sHLA-G 水平 ≥ 32.0 U/mL 的神经胶质瘤患者的生存时间短于 sHLA-G 水平 <32.0 U/mL 的患者($\chi^2=9.088, P=0.033$)。结论:HLA-G 等位基因突变是脑胶质瘤的独立危险因素,血清中 sHLA-G 水平也许可作为评估脑胶质瘤患者预后的生物标志物。

关键词 脑胶质瘤;HLA-G 等位基因突变;人白细胞抗原- G;侵袭性程度分级;易感性

中图分类号 R741;R741.02;R730.264 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2020.03.015

赵开胜, 折盼, 白利芬. 人白细胞抗原- G 基因多态性与脑胶质瘤易感性之间的关系[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(3): 173-176.

作者单位

1. 延安大学附属医院东关分院神经外科

陕西 延安 716000

2. 延安大学附属医院检验科

陕西 延安 716000

收稿日期

2019-03-06

通讯作者

白利芬
xbyxlt123@163.com

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,总体预后差,占有中枢神经系统原发性恶性肿瘤的 40%~50%^[1]。经标准治疗(手术、放疗和化疗)后的恶性脑胶质母细胞瘤患者的中位总生存期不超过 15 月^[2]。由于病因不明,目前尚无有效的手段来预防脑胶质瘤的发生^[3]。胶质瘤根据侵袭程度分为四个等级:I 级(毛细胞星形细胞瘤)、II 级(弥漫性浸润性低级别胶质瘤)、III 级(间变性胶质瘤)和 IV 级(多形性胶质母细胞瘤)^[4]。现阶段尽管在肿瘤全切除、化疗和放疗方面取得了进展,但胶质瘤患者的预后仍较差^[5]。宿主免疫系统可通过免疫监视体系来检测并消除肿瘤细胞^[6],同样肿瘤细胞也可通过不同的机制逃避免疫系统有效监视^[7]。人白细胞抗原-G(human leukocyte antigen-G, HLA-G)基因序列与经典的膜结合 HLA I 类分子高度同源。作为非经典的 HLA I 类分子,它包含 8 个外显子、7 个内含子和 3 个 UTR^[8]。HLA-G 基因编码 4 种结合蛋白(HLA-G 1~4)和 3 种可溶性蛋白(HLA-G 5~7)^[8],HLA-G 阻止抗原识别和 T 细胞迁移,并抑制作为免疫应答的负调节因子 T 细胞和 NK 细胞的细胞毒性作用^[9]。在多数肿瘤中均观察到异常的 HLA-G 表达,如结肠直肠癌、肝癌、肺癌、膀胱癌、子宫颈癌、胃癌、食道癌和乳腺癌^[10-13]。与良性病变相比,恶性肿瘤中 HLA-G 的表达量更高。与正常脑组织相比,HLA-G 在胶质瘤(胶质母细胞瘤、间变性胶质瘤、低级别胶质瘤)中过表达,低级别和高级别胶质瘤之间差异性显著^[14,15]。但对于 HLA-G 等位基因与脑胶质瘤之间的关联以及 HLA-G 的表达是否依赖于脑胶质瘤的分级目前仍不清楚。因此

本研究分析脑胶质瘤患者 HLA-G 基因多态性和血清中可溶性 HLA-G(soluble HLA-G, sHLA-G)水平与脑胶质瘤易感性和分级之间的关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2012 年 3 月至 2017 年 3 月我院收治的脑胶质瘤患者,病理学诊断和肿瘤分级参照 WHO 分级标准。纳入标准:可完成定期随访;无其它肿瘤病史;先前未接受放化疗;无亲属关系。排除标准:复发性脑胶质瘤或转移至其它部位;意识认知功能障碍;病历资料不完整。共纳入脑胶质瘤患者 264 例为胶质瘤组,男 133 例(50.4%),女 131 例(49.6%);年龄(55.7 ± 4.3)岁, <50 岁 51 例(19.3%), ≥ 50 岁 213 例(80.7%);吸烟 124 例(47.0%);整体切除(gross total resection, GTR)147 例(55.7%),部分切除(sub-total resection, STR)117 例(44.3%)。同期纳入健康志愿者 264 例为对照组,男 139 例(52.7%),女 125 例(47.3%);年龄(53.5 ± 3.2)岁, <50 岁 57 例(21.6%), ≥ 50 岁 207 例(78.4%);吸烟 110 例(41.7%)。胶质瘤组根据级别分为两亚组:① I ~ II 级亚组 125 例,男 55 例(44.0%),女 70 例(56.0%);年龄(54.1 ± 2.4)岁, <50 岁 44 例(35.2%), ≥ 50 岁 81 例(64.8%);吸烟 59 例(47.2%);GTR 62 例(49.6%),STR 63 例(50.4%);② III ~ IV 级亚组 139 例,男 78 例(56.1%),女 61 例(43.9%);年龄(56.3 ± 4.4)岁, <50 岁 18 例(12.9%), ≥ 50 岁 121 例(87.1%);吸烟 65 例(46.8%);GTR 80 例(57.6%),STR 59 例(42.4%)。2

组年龄、性别、吸烟等差异无统计学意义($P>0.05$),2亚组一般资料差异均无统计学意义($P>0.05$)。所有患者均签订知情同意书,本研究经医院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取和HLA-G基因分型 采用苯酚-氯仿抽提法从血清(5 mL)中提取基因组DNA,并进行纯化,DNA测序分析确定包含外显子2-4的核苷酸区域的HLA-G等位基因。3个引物对的序列:①上游5'GGG TCG GGC GGG TCT CAA3',下游3'TCC GTG GGG CAT GGA GGT5';②上游5'GGG GCT GAC CGA CCG AGG GGG T3',下游3'GCT AGG CCA GGC TGA GAG G5';③上游5'CCA TGA GAG ATG CAA AGT GCT3',下游3'TGC TTT CCC TAA CAG ACA TGA T3'。PCR条件:95 ℃ 5 min; 35个循环,95 ℃ 30 s,64 ℃(或68 ℃或56 ℃)1 min,72 ℃ 30 s; 72 ℃ 8 min。PCR产物由北京基因组研究所(BGI)测序。

1.2.2 血清中sHLA-G的测定 采用ELISA试剂盒(购于美国MyBioSource公司)测量血清可溶性HLA-G水平。所有受试者各取血样2 mL,1 000 g离心10 min分离以获得血清。在96孔板中加入50 μL血清,然后加入50 μL生物素标记的抗体。将96孔板充分混合后37 ℃下放置60 min。除去上清液,将板洗涤3次,每次加洗涤液350 μL。然后每孔加入80 μL抗体,并在37 ℃下孵育30 min。除去上清液,将板洗涤3次,每次加洗涤液350 μL。每孔加入总共100 μL工作液,37 ℃孵育15 min。加入

终止溶液,通过酶标仪在450 nm记录OD值,进而计算血清sHLA-G水平。

1.3 统计学处理

所有数据均采用Graph Pad PRISM 5.0和SPSS 17.0软件进行分析,计量资料以(平均值±标准偏差)表示,计数资料以率(百分比)表示。多变量逻辑回归分析用于计算优势比(OR)和95%置信区间(CI)。总生存期定义为从诊断日期到最后一次随访日期或任何原因导致患者死亡日期的时间。采用Kaplan-Meie法进行生存分析,采用Log-rank检验对生存曲线进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HLA-G基因型分布

HLA-G 8个等位基因分别为G:010101、G:010102、G:010404、G:0105N、G:010401、G:010114、G:010115和G:010117。风险分析模型显示G:010101、G:010102、G:010404和G:010401的4种基因型与神经胶质瘤或疾病阶段的风险转变相关,见表1。G:010101的杂合基因型与神经胶质瘤($P=0.009$)、Ⅰ~Ⅱ级($P=0.009$)和Ⅲ~Ⅳ级($P=0.016$)的风险增加显著相关;G:010102和G:010404杂合基因型与临床疾病分级Ⅲ~Ⅳ级的风险增加相关($P=0.008$, $P=0.043$);G:010401的杂合基因型与脑胶质瘤($P=0.006$)和Ⅲ~Ⅳ级($P=0.023$)的风险增加相关。

表1 4种HLA-G基因型分布[例(%)]

组别	例数	010101			010102		
		纯合子	杂合子	缺失	纯合子	杂合子	缺失
对照组	264	55(20.8)	102(38.6)	107(40.5)	0(0.0)	53(20.1)	211(79.9)
胶质瘤组	264	34(12.9)	152(57.6)	78(29.5)	26(9.8)	33(12.5)	205(77.7)
		OR(95%CI)	0.85(0.33~1.91)	2.04(1.89~7.08)	1.0	/	0.64(0.31~1.29)
		P值	0.171	0.009	/	/	0.253
I ~ II 级亚组	125	22(17.6)	68(54.4)	35(28.0)	8(6.4)	2(1.6)	115(92.0)
		OR(95%CI)	1.22(1.55~3.31)	2.04(1.85~7.81)	1.0	/	0.11(0.05~0.96)
		P值	0.046	0.009	/	/	0.804
III ~ IV 级亚组	139	12(8.6)	84(60.4)	43(30.9)	18(12.9)	31(22.3)	90(64.7)
		OR(95%CI)	0.52(0.22~1.05)	1.96(1.87~6.34)	1.0	/	2.14(1.52~7.36)
		P值	0.389	0.016	/	/	0.008

组别	010404			010401		
	纯合子	杂合子	缺失	纯合子	杂合子	缺失
对照组	0(0.0)	29(11.0)	235(89.0)	0(0.0)	22(8.3)	242(91.7)
胶质瘤组	0(0.0)	18(6.8)	246(93.2)	1(0.5)	48(18.2)	216(81.8)
	OR(95%CI)	/	0.59(0.25~1.08)	1.0	/	2.44(1.95~7.58)
	P值	/	0.344	/	/	0.006
I ~ II 级亚组	0(0.0)	8(6.4)	117(93.6)	0(0.0)	12(9.6)	113(90.4)
	OR(95%CI)	/	0.93(0.43~2.26)	1.0	/	0.48(0.19~0.99)
	P值	/	0.085	/	/	0.487
III ~ IV 级亚组	0(0.0)	10(7.2)	129(92.8)	0(0.0)	36(25.9)	103(74.1)
	OR(95%CI)	/	1.06(1.02~4.17)	1.0	/	1.57(1.33~5.02)
	P值	/	0.043	/	/	0.023

2.2 多因素回归分析

多因素回归分析表明临床因素(包括患者年龄、性别、吸烟状况和胶质瘤切除程度)与胶质瘤患者的Ⅲ~Ⅳ级发生风险无关,HLA-G基因型是Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤发生风险的独立危险因素。G:010101($OR=2.06$,95% CI 1.87~6.34, $P=0.009$),G:010102($OR=2.01$,95% CI 1.52~7.36, $P=0.012$),G:010404($OR=1.24$,95% CI 1.02~4.17, $P=0.035$),G:010401($OR=1.88$,95% $CI=1.33\sim 5.02$, $P=0.017$)和Ⅲ~Ⅳ级脑胶质瘤患者发生风险显著相关,见表2。

2.3 sHLA-G血清水平

对照组的血清sHLA-G水平为(6.06±1.3)U/mL,胶质瘤组的血清sHLA-G水平为(29.7±3.2)U/mL,显著高于对照组($t=8.664$, $P<0.001$);其中Ⅰ~Ⅱ级亚组的血清sHLA-G水平为(9.4±1.5)U/mL,与对照组比较差异无统计学意义($t=1.051$, $P=0.063$);Ⅲ~Ⅳ级亚组为(48.2±6.5)U/mL,显著高于对照组($t=19.003$, $P<0.001$);胶质瘤组中,男、女性的血清sHLA-G水平分别为(29.5±2.9)U/mL、(32.6±3.1)U/mL,差异无统计学意义($t=0.962$, $P=0.421$);<50岁与≥50岁患者的血清sHLA-G水平分别为(30.9±2.5)U/mL、(33.6±3.2)U/mL,差异无统计学意义($t=0.884$, $P=0.561$);吸烟与非吸烟患者的血清sHLA-G水平分别为(31.8±2.6)U/mL、(28.5±2.9)U/mL,差异无统计学意义($t=1.002$, $P=0.089$);GTR与STR患者的血清sHLA-G水平分别为(31.2±2.2)U/mL、(28.4±2.4)U/mL,差异无统计学意义($t=0.801$, $P=0.585$)。

2.4 生存分析

脑胶质瘤组中存活患者的中位随访时间为25.5月(5~59月)。随访期间死亡221例(83.7%)。sHLA-G水平≥32.0 U/mL的神经胶质瘤患者的生存时间短于sHLA-G水平<32.0 U/mL的患者,差异有统计学意义($\chi^2=9.088$, $P=0.033$),见图1。

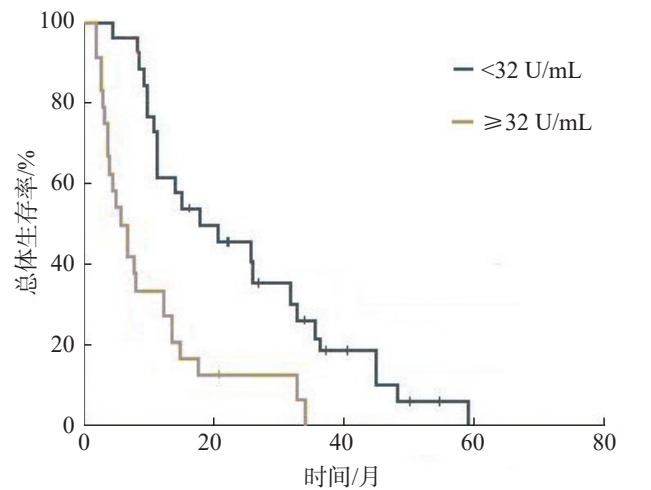


图1 胶质瘤患者的Kaplan-Meier生存分析

3 讨论

HLA-G是肿瘤细胞中一种有效的免疫耐受分子,可通过逃避免疫识别而促进肿瘤细胞的存活和增殖^[16]。血清中sHLA-G水平在预测肿瘤患者的预后生存情况方面有重要价值^[17]。本研究结果表明,HLA-G:010101、G:010102、G:010404、G:010401和

表2 多因素回归分析Ⅲ~Ⅳ级脑胶质瘤的临床影响因素

变量	分类	例(%)	β	SE	Wald	Ⅲ~Ⅳ级 OR (95%CI)	P值
年龄	<50	18(12.9)	-1.728	0.954	3.346	0.97(0.75~1.28)	0.071
	≥50	121(87.1)					
性别	女性	61(43.9)	-1.096	0.721	1.586	0.43(0.22~0.88)	0.175
	男性	78(56.1)					
吸烟状态	是	124(89.2)	-0.988	0.633	1.002	0.22(0.03~0.47)	0.845
	否	15(10.8)					
切除程度	GTR	80(57.6)	1.011	0.938	1.304	0.69(0.38~1.43)	0.522
	STR	59(42.4)					
010101	纯合子	12(8.6)	2.766	1.126	7.046	2.06(1.87~6.34)	0.009
	杂合子	84(60.4)					
	缺失	43(30.9)					
010102	纯合子	18(12.9)	3.088	1.426	5.724	2.01(1.52~7.36)	0.012
	杂合子	31(22.3)					
	缺失	90(64.7)					
010404	纯合子	0(0.0)	1.209	0.577	4.099	1.24(1.02~4.17)	0.035
	杂合子	10(7.2)					
	缺失	129(92.8)					
010401	纯合子	0(0.0)	1.644	0.701	5.011	1.88(1.33~5.02)	0.017
	杂合子	36(25.9)					
	缺失	103(74.1)					

血清 sHLA-G 水平是胶质瘤患者的关键风险因素,而非临床因素(年龄、性别、吸烟状况和切除范围)。

本文发现,HLA-G:010102 和 G:010404 的杂合基因型与Ⅲ~Ⅳ级风险增加显著相关,HLA-G:010101 和 G:010401 的杂合基因型与胶质瘤和Ⅲ~Ⅳ级显著相关。Ben Amor 等^[18]研究表明 HLA-G:010101 和 G:010401 的杂合基因型是 NSCLC 和晚期 NSCLC 分期的关键危险因素。Khorrami 等^[19]发现,与健康对照组相比,胃癌患者的 HLA-G:01010201 和 G:010401 基因型频率更高。在本研究中,多因素分析表明临床因素(年龄、性别、吸烟状况和胶质瘤切除程度)与Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤患者无关,而 HLA-G 基因多态性是胶质瘤的独立危险因素。

本研究还证实高级别(Ⅲ~Ⅳ级)胶质瘤患者血清 sHLA-G 水平与预后之间的相关性。sHLA-G 水平 ≥ 32.0 U/mL 的神经胶质瘤患者的生存时间明显短于 sHLA-G 水平 < 32.0 U/mL 的患者。此外,Ⅲ~Ⅳ级患者的平均血清 sHLA-G 水平高于对照组,其与Ⅰ~Ⅱ级差异无统计学意义。Lin 等^[20]研究显示血浆 sHLA-G 水平 ≥ 32.0 U/mL 的患者存活时间明显短于正常对照组,这与 NSCLC 分期显著相关。Ben Amor 等^[18]研究发现血清 sHLA-G 水平 ≥ 50.0 U/mL 的 NSCLC 患者的生存时间明显短于 sHLA-G 水平 < 50.0 U/mL 的患者。Fan 等^[14]表明,与低级别相比,HLA-G 在高级别胶质瘤组织样本中过表达。Kowal 等^[21]研究表明携带 HLA-G:010401 等位基因的个体血液 sHLA-G 水平升高,携带 HLA-G:0105N 等位基因的个体血液 sHLA-G 水平降低。这种差异可能是由于不同的入选标准、取样地点、种群和遗传背景所导致。

综上所述,本研究结果表明 HLA-G 多态性与胶质瘤易感性和晚期胶质瘤分级相关,而临床因素与胶质瘤之间无相关性;虽然分子机制尚不清楚,但 HLA-G 等位基因突变是胶质瘤的独立危险因素,血清 sHLA-G 水平可作为评估胶质瘤患者预后的生物标志物。本研究首次探讨中国群体中 HLA-G 多态性脑胶质瘤易感性和分级之间的关系,为临床上评估脑胶质瘤易感性提供重要的理论支持,也为晚期脑胶质瘤分级提供临床参考。

参考文献

[1] Wrensch M, Minn Y, Chew T, et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature [J]. *Neuro Oncol*, 2002, 4: 278-299.
[2] Polivka J Jr, Polivka J, Holubec L, et al. Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma

Multiforme [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37: 21-33.
[3] Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas [J]. *Acta Neuropathol*, 2005, 109: 93-108.
[4] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114: 97-109.
[5] Lamborn KR, Yung WK, Chang SM, et al. Progression-free survival: an important end point in evaluating therapy for recurrent high-grade gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2008, 10: 162-170.
[6] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting [J]. *Immunity*, 2004, 21: 137-148.
[7] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion [J]. *Science*, 2011, 331: 1565-1570.
[8] Frumento G, Franchello S, Geraghty E, et al. Analysis of HLA-G expression in tumor cell lines [J]. *Transplant Proc*, 1999, 31: 1847-1848.
[9] Sheu J, Shih Ie M. HLA-G and immune evasion in cancer cells [J]. *J Formos Med Assoc*, 2010, 109: 248-257.
[10] Kirana C, Ruzkiewicz A, Stubbs RS, et al. Soluble HLA-G is a differential prognostic marker in sequential colorectal cancer disease stages [J]. *Int J Cancer*, 2017, doi:10.1002/ijc.30667.
[11] Jeong S, Park S, Park BW, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e98284.
[12] 谭银利, 陈和安, 刘飞. 外周血胃蛋白酶原 I 与胃泌素-17 及可溶性人白细胞抗原-G 检测对胃癌的诊断价值[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33: 945-947.
[13] 彭丹, 刘东利. 人白细胞抗原 G 基因多态性与非小细胞肺癌易感性的相关性研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2017, 36: 638-641.
[14] Fan X, Wang Y, Zhang C, Liu X, Qian Z, Jiang T. Human leukocyte antigen-G overexpression predicts poor clinical outcomes in low-grade gliomas [J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 294: 27-31.
[15] 韩福新, 张蕊, 马善波, 等. miRNA-21、miRNA-221、miRNA-222 与脑胶质瘤发生发展的相关性[J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 12: 175-177.
[16] Zambra FM, Biolchi V, de Cerqueira CC, et al. Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia--the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk [J]. *HLA*, 2016, 87: 79-88.
[17] Kirana C, Ruzkiewicz A, Stubbs RS, et al. Soluble HLA-G is a differential prognostic marker in sequential colorectal cancer disease stages [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140: 2577-2586.
[18] Ben Amor A, Beauchemin K, Faucher MC, et al. Human Leukocyte Antigen G Polymorphism and Expression Are Associated with an Increased Risk of Non-Small-Cell Lung Cancer and Advanced Disease Stage [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0161210.
[19] Khorrami S, Rahimi R, Mohammadpour H, et al. Association of HLA-G*01:01:02:01/G*01:04:01 polymorphism with gastric adenocarcinoma [J]. *Hum Immunol*, 2016, 77: 153-157.
[20] Lin A, Zhu CC, Chen HX, et al. Clinical relevance and functional implications for human leucocyte antigen-g expression in non-small-cell lung cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14: 2318-2329.
[21] Kowal A, Wisniewski A, Kusnierczyk P, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-G gene polymorphism in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6: 613-619.

(本文编辑:王晶)