بررسی تیپ های پر خطر پاپیلوما ویروس انسانی در سرطان سلول سنگفرشی مری بوسیله PCR و سکوانسینگ DNA

علی اسلامی فر*[۱]، آرزو آقاخانی[۱]، رسول همکار[۲]، آمیتیس رمضانی[۳]، فرخ تیرگری [۴]، حسین فروتن[۵]، شهرام میرمومن[۶]، محمد حسین قینی[۷]، زهرا دلجودخت[۸]، ژاله تائب [۹] و علی اکبر ولایتی[۱۰]

۱. پاتولوژیست، استادیار انستیتو پاستور ایران
۲. PhD ویروس شناسی،استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. متخصص بیماری های عفونی، استادیار انستیتو پاستور ایران
۴. پاتولوژیست، استاد انستیتو کانسر ایران
۵ . فوق تخصص گوارش، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶. فوق تخصص گوارش، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۷. پاتولوژیست، دانشگاه علوم پزشکی شاهد
۸. کارشناس آزمایشگاه، انستیتو پاستور ایران
۹. فوق لیسانس بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران
۱۰. فوق تخصص بیماری های عفونی کودکان ، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* نشانی برای مکاتبه:تهران ،خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران،بخش تحقیقات بالینی، تلفن:۶۶۴۶۵۱۴۷ ، نمابر۶۶۴۰۹۴۶۷ ، shafaghlab@yahoo.com
دریافت مقاله: فروردین هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: تیر هشتاد و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *پاپیلوما ویروس انسانی(HPV) از عوامل احتمالی دخیل در ایجاد سرطان سلول سنگفرشی مری(ESCC) بویژه در مناطق پر خطر می باشد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی تیپ های پر خطر HPV درESCC می باشد.*

روش کار: *در این مطالعه تیپ های پر خطر HPV در ۱۴۰ مورد ESCC بوسیله PCR با استفاده از پرایمرهای GP5+/GP6+ جهت تکثیر یک قطعه bp- ۱۵۰ از ژنومHPV بررسی شدند. در مرحله بعدی در نمونه های HPV مثبت ، سکوانسینگ DNAجهت تعیین نوع HPV انجام شده است.*

یافته ها: *از ۱۴۰ بیمار دارایESCC مورد مطالعه ۵۰/۷٪ زن و ۴۹/۳٪ مرد بودند. سنین بیماران بین ۲۰ تا ۸۱ سال بوده و نیمی از آنها بین ۶۰ تا ۷۰ سال قرار داشتند. ۲۳/۶٪ نواحی تومورال و ۸/۶٪ لبه های غیر درگیر اطراف تومور از نظر HPV مثبت بوده اند. بیماران HPV مثبت ۲۱/۷٪ مرد و ۲۵/۳٪ زن بوده اند. در ۳۶٪ موارد HPV همزمان در ناحیه تومورال و لبه ها غیر درگیر وجود داشته است. فراوانی انواع پر خطر HPV در نواحی تومورال به ترتیب زیر بوده است: HPV-۱۶: ۶۰/۶٪، HPV-۱۸ : ۳۰/۳٪، HPV-۳۳ : ۶/۱٪ و HPV-۳۱ : ۳٪. تنها HPV بدست آمده از لبه های غیر درگیر HPV-۱۶ بوده است. ارتباطی بین وجود HPV و سن و جنس بیماران مشاهده نگردید.*

نتیجه گیری: *همانند سایر مناطق پر خطر ، در کشور ما نیز HPV از عوامل اتیولوژیک دخیل در ایجاد ESCC است . مشابه سایر گزارشات HPV تیپهای ۱۶ و ۱۸ شایعترین فرمهای پر خطر HPV در ESCC می باشند.*

واژگان کلیدی: ***پاپیلوما ویروس انسانی(HPV)، سرطان سلول سنگفرشی مری(ESCC)، واکنش پلیمراز زنجیره ای(PCR)***

مقدمه

کانسر مری در سراسر جهان با توزیع جغرافیائی متفاوت مشاهده می شود(۱). دو عامل مصرف سیگار و الکل مهمترین فاکتوهای دخیل در ایجاد این بدخیمی می باشند(۲). در نواحی که این بدخیمی شیوع بیشتری دارد(نواحی پر خطر) ، عوامل دیگری مانند مصرف غذاهای نگهداری شده که اغلب با موادی مانند N –نیتروزآمین یا سموم قارچی آلوده هستند(۳،۴)، کمبود ویتامینها از جمله ویتامینهای A، C ، E و مواد مغذی جزئی از عوامل اتیولوژیک در ایجاد این کانسر به شمار می آیند(۵). مصرف نوشیدنیهای داغ مانند چای، التهابات موضعی، بیماریهائی مانند آشالازی، دیورتیکولهای مری، سلیاک اسپرو، تایلوزیس و رادیاسیون جهت درمان بعضی بدخیمی ها از جمله عوامل دیگر مطرح شده در اتیولوژی این سرطان محسوب می شوند(۶)

در مطالعات متعدد در مناطق پر خطر بر نقش عوامل میکروبی از جمله HPV در ایجاد این بدخیمی تاکید شده است(۹-۷). HPV های جدا شده از ضایعات مختلف به دو دسته پر خطر (شامل HPV های تیپ ۱۶،۱۸،۳۱ و ۳۳) و کم خطر (شامل HPV های تیپ ۶و۱۱) تقسیم می گردند (۱۰،۱۱). فرم های پر خطر معمولا با تومورهای بدخیم در ارتباطند، در حالیکه فرم های کم خطر اغلب در ضایعات سنگفرشی خوش خیم مشاهده می شوند(۱۲،۱۳).

از آنجا که توزیع جغرافیائی HPV در جهان متفاوت می باشد، لذا بر آن شدیم که در یک مطالعه مقطعی ، فراوانی تیپ های پر خطر HPV را در بیماران مبتلا به ESCC توسط PCR و سکوانسینگ DNA بررسی نمائیم.

روش کار

در این مطالعه مقطعی، ۱۴۰ بیمار دچار دیس فاژی که مشکوک به ESCC بوده و جهت اندوسکوپی به بخش گوارش بیمارستان امام خمینی ارجاع شده بودند، مورد بررسی قرار گرفته اند.

سه بیوپسی یکی از ناحیه مشکوک به بدخیمی، دیگری از لبه فوقانی غیر درگیر و سومی از لبه تحتانی غیر درگیر برداشته شد. بیوپسی ها در فرمالین ۱۰٪ ثابت شده، در بلوک پارافینی قرار گرفتند و توسط رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین(H&E) رنگ امیزی شدند.این نمونه ها جهت بررسی وجود ESCC در اختیار پاتولوژیست قرار گرفتند.

پس از اثبات ESCC توسط پاتولوژیست، برشهای ۵ تا ۱۰ میکرومتر از بلوکها جهت استخراج DNA تهیه شد. سپس این برشها توسط گزیلن دپارافینه شده و توسط بافر حاوی پروتئیناز K هضم شدند(۱۴،۱۵). سپس DNA توسط فنل و کلروفرم استخراج گردید(۱۶،۱۷) .

کیفیت DNA توسط PCR با استفاده از پرایمرهای PCO3/PCO4 که یک قطعه bp-۱۱۰ از محصول ژن بتا گلوبین انسانی را تکثیر می نمایند، مورد ارزیابی قرار گرفت و نمونه های بتا گلوبین مثبت از نظر حضور HPV توسط PCR با استفاده از پرایمرهای GP5+/GP6+ برای HPV L1 open reading frame (ORF) که یک قطعه bp-۱۵۰ از HPV L1 ORF را تکثیر می نمایند، مورد بررسی قرار گرفتند.

PCR بر اساس روش Yi Ting و همکاران صورت گرفت (۱۸،۱۹) و محصول آن تحت الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ قرار گرفته و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. سپس محصولات PCR که از نظر HPV مثبت بودند، جهت تعیین انواع HPV تحت سکوانسینگ DNA " Macrogen (Seoul, South Korea) facility" قرار گرفتند. تیپ های بدست آمده در GenBank وارد شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار .Epi Info(version 3.3.2) و تست chi-square انجام و P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

از ۱۴۰ مورد ESCC که توسط پاتولوژیست تایید گردید، ۵۰/۷٪ بیماران زن و ۴۹/۳٪ مرد بودند. سنین بیماران بین ۲۰ تا ۸۱ سال بوده و نیمی از آنها بین ۶۰ تا ۷۰ سال قرار داشتند. در ۳۳ نمونه(۲۳/۶٪) در نواحی تومورال و در ۱۲ نمونه(۶ /۸٪) در لبه های غیر درگیر اطراف تومور، HPV بدست آمد . افرادیکه دارای HPV در نواحی تومورال بودند، ۲۱/۷٪ مرد و ۲۵/۳٪ زن بوده اند. در ۳۶٪ موارد HPV همزمان در ناحیه تومورال و لبه های غیر درگیر وجود داشته است. فراوانی انواع پر خطر HPV در نواحی تومورال به ترتیب زیر بوده است:

در نمونه های تومورال ۲۰، ۱۰، ۱ و ۲ نمونه به ترتیب مربوط HPV نوع ۱۶، ۱۸، ۳۱ و ۳۳ بود. در تمام موارد مربوط به نمونه های لبه فوقانی و تحتانی غیر درگیر فقط HPV نوع ۱۶ به دست آمد. ارتباط معنی داری بین حضور HPV و سن و جنس بیماران مشاهده نگردید.

بحث

کانسر مری در سراسر جهان با توزیع جغرافیائی متفاوت مشاهده می شود(۱) که در برخی نواحی مانند ایران، چین و آفریقا شیوع بیشتری دارد(۲۲-۲۱). این بدخیمی هشتمین بدخیمی شایع در سراسر جهان می باشد که در مردان بیشتر دیده می شود(۱).

در مناطق کم خطر مانند کشورهای غربی ، مصرف سیگار و الکل مهمترین عوامل اتیولوژیک هستند(۲۴،۲۵) . در حالیکه در مناطق پر خطر مانند ایران سایر عوامل از جمله HPV از فاکتورهای دخیل در ایجاد این بدخیمی می باشند(۶،۲۶) . عوامل دیگری مانند مصرف غذاهای نگهداری شده که اغلب با موادی مانند N –نیتروزآمین یا سموم قارچی آلوده هستند(۳،۴)، کمبود ویتامینها از جمله ویتامینهای A، C ، E و مواد مغذی جزئی از عوامل اتیولوژیک در ایجاد این کانسر به شمار می آیند(۵).

HPV های جدا شده از ضایعات مختلف به دو دسته پر خطر (شامل HPV های تیپ ۱۶،۱۸،۳۱ و ۳۳) و کم خطر (شامل HPV های تیپ ۶و۱۱) تقسیم می گردند (۱۰،۱۱). فرم های پر خطر معمولا با تومورهای بدخیم در ارتباطند، در حالیکه فرم های کم خطر اغلب در ضایعات سنگفرشی خوش خیم مشاهده می شوند(۱۲،۱۳).

شیوع HPV در مناطق کم خطر بین ۰ تا ۳ درصد و در مناطق پر خطر تا ۸۰ درصد گزارش شده است(۲۳). در آفریقای جنوبی ، HPV در ۷۱٪ بیماران مبتلا به کانسر مری مثبت بوده است(۲۷) و شایعترین تیپ جدا شده در این کشور HPV-۱۶ بوده است(۲۸). در چین این شیوع بین ۶/۷٪ تا ۸۳/۳٪ در مناطق مختلف کشور متفاوت بوده است(۲۹،۳۰) و شایعترین تیپهای HPV تیپهای ۱۶ و ۱۸ بوده اند(۳۱). در ژاپن اغلب تیپهای انکوژن HPV (۱۶ و ۱۸) توسط PCR از کارسینوم مری جدا شده اند(۳۲). در مطالعه ای در ایران ،۳۶/۸٪ نمونه های ESCC از نظر HPV مثبت بوده اند که در این مطالعه شیوع HPV - ۱۶ : ۱۳/۲٪ و HPV-۱۸ : ۷/۹٪ گزارش شده است(۹). در مطالعه دیگر شیوع تیپهای مختلف HPV در ESCC به صورت زیر گزارش شده است:HPV-۱۶ :۵۴/۷٪ ، HPV-۱۸ :۴/۸٪ ، HPV-۶ : ۱۴/۳٪ ، HPV-۶۶ : ۷/۱٪ ، HPV -۵۲: ۴/۸٪ و ۱۴/۳٪ نمونه ها برای بیش از یک نوع HPV مثبت بوده اند(۳۳). در فرانسه از ۱۲ بیمار مبتلا به کارسینوم مری ، ۵ بیمار آلودگی با HPV را نشان دادند و شایعترین تیپهای یافته شده HPV ۱۶ و ۱۸ بودند. بنابراین عفونت با ویروس فوق می تواند همراه با دیگر ریسک فاکتورها در ایجاد ESCC نقش داشته باشد(۳۴).

در مطالعه ما فراوانی HPV در نواحی تومورال ۲۳/۶٪ بوده که با آمار مناطق پر خطر مطابقت می کند. همانند سایر گزارات از مناطق پر خطر ، شایعترین تیپهای HPV در ESCC تیپهای ۱۶ و ۱۸ بوده اند. بنابراین مطالعه ما نقش HPV به عنوان عامل اتیولوژیک در ایجاد ESCC را تایید می نماید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از انستیتوپاستور ایران برای حمایت مالی از این تحقیق تشکر می نمایند.

REFERENCES

1. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective, 1997
2. Wynder EL and Bross IJ. A study of etiological factors in cancer of the esophagus. Cancer14, 1961: 389–401
3. Tuyns AJ. Recherches concernant les facteurs etiologiques du cancer de l'oesophage dans l'ouest de la France. Bull. Cancer 67, 1980: 15–28
4. Ribeiro Jr, Posner, MC, Safatle-Ribeiro AV and Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the esophagus. Br. J. Surg 83, 1996:1174–1185
5. Li MN and Cheng SJ. Etiology of carcinoma of the esophagus. In Huang, G.J. and Kai, W.Y. (Eds) Carcinoma of the Esophagus and Gastric Cardia. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1984:26–51
6. Rosai J. Surgical pathology. Gastrointestinal tract. 2004: 625-627.
7. Syrjanen KJ**.** HPV infections and esophageal cancer. J Clin Pathol 2002; 55**:** 721-728
8. Lavergne D**,** de Villiers EM. Papillomavirus in esophageal papillomas and carcinomas. Int J Cancer 1999; 80**:** 681-684
9. Farhadi M, Tahmasebi Z, Merat S, et al.Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of esophagus in a high-risk population, World J Gastroenterol 2005; 28:1200-1203
10. Togawa, K., Jaskiewicz, K., Takahashi, H., Meltzer S.J. and Rustigi, A.K. Human papillomavirus DNA sequences in esophageal squamous cell carcinoma. Gastroenterology, 1994; 107:128–136
11. Chen B, Yin H and Dhurandhar N. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal squamous cell carcinomas by the polymerase chain reaction using general consensus primers. Hum. Pathol. 1994; 25: 920-923

12. Chang F, Syrjanen S., Shen Q, Hongxiu JI and Syrjanen K. Human papillomavirus (HPV) DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinomas from China. Int. J. Cancer 1990; 45:21-25

13. Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Wang L and Syrjanen K. Screening for human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. Cancer 1993; 72: 2525-2530

14. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Harbor Laboratory Press, New York, 1989

15. Hamkar R, Mokhtari-Azad T. Prevalence of Various Types of Human Papilloma Virus among Cervical Cancer and Normal Biopsy Specimens in the Mazandaran Province in Iran. Eastern Mediterranean Health J., 2002; 6:1-7

16. Hamkar R., Mokhtari_Azad T. Prevalence of various types of HPV among cervical cancer and normal biopsy in north of Iran, Iranian J. of Infectious Diseases and Tropical Medicine, 2004; 8:21-22

17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Woodbury, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987

18. Snijders PJ. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. Journal of general virology, 1990, 71:173–81

19. Innis MA. PCR protocol. A guide to methods and applications. London, Academic Press, 1990

20. Robbins SL, Kumar V. Basic Pathology, 4th Edition. Uluoglu O. (Translationed.). Ankara, WB Saunders/GunesKitabevi. 1990, P: 664-7 (In Turkish10.Morris H, Price S. Langerhans Cells, Papillomaviruses and esophageal carcinoma. A Hypothesis. South African Medical Journal; 1986; 69: 413-7

21. Chang F, Shen Q, Zhou J, et al. Detection of Human Papillomavirus DNA in Cytologic Specimens Derived from Esophageal Precancer Lesions and Cancer. Scand.J. Gasroenterol; 1990; 25:383-8

22. Williamson AN L, Jaskiesicz K, Gunning A. The Detection of Human Papillomavirus in esophageal Lesions.Anticancer Research; 1991; 11: 263-6

23. Syrjänen K. HPV and esophageal Carcinoma In M. Saveria Campo**,** Papillomavirus Research: From Natural History To Vaccines and Beyond, Caister Academic Press, 2006

24. Lu SH, Chui SX, Yang WX., Hu XN, Guo LP. Relevance of N-nitrosamines to esophageal cancer in China. In O'Neill,I.K., Chen,J. and Bartsch,H. (eds) Relevance to Human Cancer of N-nitroso

25. Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxin, IARC Scientific Publications no. 105. IARC, Lyon, 1991:11–17

26. Li MN and Cheng SJ. Etiology of carcinoma of the esophagus. In Huang, G.J. and Kai, W.Y. (Eds) Carcinoma of the Esophagus and Gastric Cardia. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1984:26–51

27. Li MH, Ji C and Cheng S.J. Occurrence of nitroso compounds in fungi-contaminated foods: a review. Nutr. Cancer 8, 1986: 63–69

28. Williamson AL, Jaskiesicz K, Gunning A. The detection of human papillomavirus in esophageal lesions**.** 1991; 11(1):263-5

29. Cooper K, Taylor L, Govind S. Human papillomavirus DNA in esophageal carcinomas in South Africa**:** J Pathol. 1995; 175(3):273-7

30. Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Honxjiu J, Syrjanen K. Human papillomavirus (HPV) DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinoma from China. Int. J. Cancer1990; 45: 21–25

31. Ting-Ting Li, Li-Na Zhao, Zhi-Guo Liu, Ying Han, Dai-Ming Fan. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene**.** World J Gastroenterol 2005; 11(7):931-937

32. Shen ZY, Hu SP, Lu LC, Tang CZ, Kuang ZS, et al**.** Detection of human papillomavirus in esophageal carcinoma**. :** J Med Virol. 2002; 68(3):412-6

33. Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, et al. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction**.** Cancer. 1992; 70(9):2234-8

34. Moradi A, Villiers E, Mokhtari-Azad T, et al. Detection of Human Papillomavirus DNA by PCR in Esophageal Squamous Cell Carcinoma from Turkmen Sahra, North-East of Iran Iran. Biomed. J. 2002: 19-23

35. Benamouzig R, Pigot F, Quiroga G, Validire P, Chaussade S, Catalan F. Human papillomavirus infection in esophageal squamous cell carcinoma in western countries. Int. J. Cancer1992; 50: 549–552