Human Papillomavirus in Squamous Cell Carcinoma of Esophagus in a High-Risk Population

Tahmasebi Fard Z
Department of Molecular Biology, Khatam Postgraduate Faculty, Tehran

Farhadi Langroody M
Shahrara Medical Laboratory, Tehran

Malekzadeh R
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Merat Sh
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Nasrollahzadeh D
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Kamangar F
Cancer Prevention Studies Branch, National Cancer Institute, Bethesda, USA

Corresponding Author:
Shahin Merat MD, Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital, Kargar-e-Shomali Ave., Tehran, Iran.
Telefax: +98 21 8012992
E-mail: merat@ams.ac.ir

ABSTRACT

Introduction and Aims: The role of human papillomavirus (HPV) in the etiology of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is not clear. Previous studies have found highly variable (from 0% to 67%) prevalence of HPV in ESCC tumor. However, prevalence of HPV in ESCC tumor seems to be higher in areas with high incidence of ESCC , such as China and South Africa. Iran is one of the areas of the world with the highest rates of ESCC. However, no previous study has reported the prevalence of HPV in ESCC tumor tissues from Iran**.**

Materials and Methods: In this study, we compared the prevalence of a common marker for the presence of HPV (MY09/MY11 consensus primers) and two markers for the presence of HPV-16 and HPV-18 (respective E6 /E7 primers) in tumor tissues from 38 ESCC cases and normal biopsied tissues from 38 Iranian individuals.

Results: 14 out of the 38 ESCC (36.8%) samples, but only 5 out of 38 control samples (13.2%) were positive for the common marker of HPV presence; this difference was statistically significant (p=0.02). Five ESCC samples (13.2%) but none of the control samples were positive for HPV16 E6 /E7 gene (p=0.05). Three of the ESCC samples (7.9%) and five of the control samples (13.2%) were positive for HPV18 E6 /E7 gene.

Conclusions: Our data are consistent with HPV DNA studies conducted in other high-risk areas for ESCC. HPV should be considered as a potential factor responsible for the increased incidence of ESCC in Iran and other high-incidence areas of the world. *Govaresh* 2004; **9**: 22-6

Keywords: Human papillomavirus (HPV), Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), Polymerase chain reaction (PCR)

گوارش، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۶-۲۲

پاپیلوما ویروس انسانی در سرطان سلول سنگفرشی مری در جمعیتهایی با خطر بالا

زهرا طهماسبی فرد[۱]، دکتر محمد فرهادی لنگرودی[۲]، دکتر رضا ملک‌زاده[۳]، دکتر شاهین مرآت [۴*]، دکتر داریوش نصراله‌زاده[۵]، دکتر فرین کمانگر[۶]

[۱]کارشناس ارشد، بخش بیولوژی ملکولی، دانشگاه خاتم، تهران

[۲]پژوهشگر، آزمایشگاه شهرآرا، تهران

[۳]استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۴]استادیار، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۵]پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۶]پژوهشگر، مؤسسه ملی سرطان، آمریکا

خلاصه

مقدمه

نقش پاپیلوما ویروس انسانی (Human Papillomavirus-HPV) در اتیولوژی سرطان سلول سنگفرشی مری (Esophageal Squamous Cell Carcinoma-ESCC) ناشناخته است. مطالعات قبلی شیوع بسیار متغیر (از ۰٪ تا ۶۷٪) HPV را در ESCC نشان داده‌اند. با این حال شیوع HPV در تومورهای ESCC، در مناطقی با شیوع بالای ESCC نظیر چین و جنوب آفریقا، شدیدتر به نظر می‌رسد. ایران یکی از نواحی دنیا است که نسبت بالایی از ESCC در آن مشاهده می‌شود. با این حال، تا کنون هیچ مطالعه‌ای از شیوع HPV در بافتهای توموری ESCC از ایران گزارش نشده است.

مواد و روشها

در این مطالعه ما شیوع یک مارکر عمومی برای وجود HPV (پرایمرهای MY09-MY11 consensus) و دو مارکر عمومی برای وجود HPV-16 و HPV-18 (پرایمرهای مخصوص E6/E7) را در بافتهای تومورِی ۳۸ مورد ESCC با ۳۸ مورد بافت بیوپسی شدهٔ افراد طبیعی (شاهد) مقایسه کردیم.

نتایج

۱۴ نمونه از ۳۸ نمونه ESCC (۳۶/۸٪) و فقط ۵ نمونه از ۳۸ نمونه شاهد (۱۳/۲٪) برای وجود مارکر عمومی HPV مثبت شدند (p=۰/۰۲). ۵ نمونه ESCC (۱۳/۲٪)، برای ژن HPV-16 E6/E7 مثبت شدند؛ برخلاف آن هیچ‌یک از نمونه‌های شاهد مثبت نشدند (p=۰/۰۵). سه عدد ازنمونه‌های ESCC (۷/۹٪) و ۵ عدد از نمونه‌های شاهد (۱۳/۲٪) برای ژن HPV-18 E6/E7 مثبت شدند.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، با مطالعات HPV DNA انجام گرفته در سایر نواحی با شیوع بالای ESCC مطابقت داشت. بنابراین HPV باید به‌عنوان یک عامل قوی مسئول افزایش شیوع ESCC در ایران و سایر نواحی با شیوع بالا در جهان، در نظرگرفته شود. *گوارش*، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۶-۲۲

واژه‌های کلیدی: پاپیلوما ویروس انسانی (HPV)، سرطان سلول سنگفرشی مری، واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)

مقدمه

نقش پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) در اتیولوژی سرطان سلول سنگفرشی مری (ESCC) طی بیست سال گذشته مورد شک و تردید بوده است. انواع HPV سرطانزا، بیشتر HPV-16 و HPV-18، به‌عنوان عواملی بسیار خطرناک برای سرطان رحم شناخته شده‌اند[۱]. نقش HPV در اتیولوژی سرطانهای آلت تناسلی زن و مرد، مقعد و حفره دهانی حلقی به اثبات رسیده است[۲]. با این حال نقش HPV به‌عنوان مسبب ESCC به‌صورت بحث برانگیزی باقی مانده است.

* *نویسنده مسئول: دکتر شاهین مرآت- تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد*

تلفن و نمابر: ۸۰۱۲۹۹۲

E-mail: merat@ams.ac.ir

Syrjanen اولین کسی بود که در سال ۱۹۸۲ نقش HPV را در اتیولوژی ESCC بیان کرد. او بر پایه مشاهده خصوصیات بافتی یافته‌هایش، احتمال وجود HPV را در اپیتلیوم خوش‌خیم مری و تومورهای بدخیم مری مطرح کرد[۳]. از این رو بعدها چندین مطالعه با تکنیک‌های متفاوت، نظیر شناسایی HPV DNA در بافتهای توموری مری و روشهای سرولوژیک انجام گرفت، تا ارتباط بین HPV و خطر ESCC بررسی شود[۴]. نتایج این مطالعات مطابق هم نبودند. سری نمونه‌های بررسی شده با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، شواهدی را برای وجود HPV در بافتهای توموری، به‌طور متغیر از ۰٪ تا ۶۷٪ نشان می‌دادند[۴].

پیشنهاد شده است که تنوع زیاد در مطالعات HPV DNA، ممکن است بخشی نشاندهنده تنوع جغرافیایی باشد. در بیشتر مطالعاتی که در مناطق کم‌خطر آمریکا یا اروپا انجام شده بود، هیچ نشانه‌ای از HPV DNA در تومورهای مری شناسایی نشد؛ در حالی‌که بیشتر مطالعات انجام شده در نواحی پرخطر (نظیر چین، جنوب آفریقا و ژاپن) به‌طور قابل ملاحظه‌ای درصد بالایی از HPV را در تومورهای مری نشان می‌داد[۴].

ایران به‌عنوان یک ناحیه بسیار پرخطر برای سرطان مری در نظر گرفته می‌شود[۵-۸]. در بعضی قسمتهای شمالی ایران، نسبت شیوع ESCC تا بیش از ۱۰۰ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ فرد در سال گزارش شده است[۵].

به‌منظور تحقیق شیوع عفونت HPV در تومورهای ESCC در ایران (کشوری با نسبت بالایی از ESCC)، ما بافتهای توموری را از مواردی با ESCC و بافتهای طبیعی مری را از افراد شاهد طبیعی، که مطابق سن نمونه‌های سرطانی بودند، از نظر وجود HPV DNA بررسی کردیم.

مواد و روشها

در این مطالعه مورد-شاهدی، ما نمونه‌های بافتی تثبیت شده با فرمالین و غوطه‌ور شده در پارافین را از بیمارانی که برای ESCC تحت جراحی قرار گرفته بودند، از سه بیمارستان تهران (شریعتی، مهر، آتیه) طی سالهای ۱۳۷۵ تا ۱۳۸۰ جمع‌آوری کردیم. نمونه‌های شاهد نیز از بیماران مراجعه‌کننده دارای علائم دیسفاژی به یک درمانگاه بیماریهای گوارش در تهران، تهیه شدند. مواردی که آندوسکوپی طبیعی (بدون هیچ نشانه‌ای از زخم و دیسفاژی) و مطابقت با سن (±۵ سال) یکی از نمونه‌های سرطانی داشتند، به‌عنوان نمونه شاهد انتخاب شدند. از موارد انتخاب شده، دو بیوپسی از یک سوم میانی مری (در حدود ۳۰ سانتیمتری از دندانهای پیشین) گرفته شد.

تمامی نمونه‌ها از هر دوی موارد سرطانی و شاهد، برای ژن HPV L1، با استفاده از پرایمرهای عمومی MY09/MY11 بررسی شدند. MY09/MY11 پرایمرهای دژنره‌اند که مکمل ۴۵۰ bp از سکانس‌های حفظ شده از ژن HPV L1 هستند و می‌توانند ژن L1 از طیف وسیعی از HPVها را تکثیر کنند. در نمونه‌هایی که ژن L1 توانست تکثیر یابد، آزمایشهای بیشتری انجام گرفت تا وجود ژنهای E6/E7 خاص HPV-16 و HPV-18 بررسی شود.

استخراج DNA

تکه‌هایی از نمونه‌های بافتی (۳ تا ۵ تکه، ضخامت هر یک ۲۰-۱۰ میکرومتر) از هر بلوک پارافینی، با استفاده از تیغه‌های یکبار مصرف میکروتوم، تهیه می‌شد. پارافین زدایی به‌وسیله تیمارکردن تکه‌های بافتی با استفاده متوالی از گزیلن و اتانول انجام می‌گرفت. برای استخراج DNA از یک بافر لیزکننده [Tris-HCl ۱۰ mM (pH=8) و NaCl ۱۰۰ mM و ۱٪ سدیم دو دسیل سولفات، ۲۰۰ µg/ml پروتئیناز k و ۰/۰۱٪ EDTA در ۵۶ºC برای ۴ ساعت و سپس یک شبانه روز در ۳۷ºC در محلول لیز کننده انکوباسیون شدند)] استفاده می‌شد. بعد از اینکه پروتئیناز k بافت را هضم می‌کرد، آن را به‌وسیله انکوباسیون در ۹۵ºC برای ۸ تا ۱۰ دقیقه غیرفعال می‌کردیم. سپس با افزودن ۱۵۰ µL کلروفرم-ایزوآمیل الکل و چرخش برای ۲ دقیقه با سرعت بالا، فاز رویی آن را برمی‌داشتیم و در لوله جدید می‌ریختیم.

نمونه مناسب

نمونه‌های مناسب برای تکثیر PCR با استفاده از ژن بتا گلوبین تعیین می‌شدند. تکثیر موفقیت‌آمیز قطعات ژن بتا گلوبین نشان می‌داد که نمونه‌های DNA برای آنالیز PCR مناسب هستند و هیچ نوع مهارکننده PCR وجود ندارد.

پرایمرها

برای بررسی وجود HPV DNA در بافتها، جفتهای پرایمری 5'CGTCC{C/A}A{G/A}GGA{T/A}ACTGATC 3' MY09 و 5'GC{C/A}CAGGG{T/A}CATAA{T/C}AATGG 3' MY11 برای تکثیر ژن L1 به کار رفت. برای HPV-16 جفتهای پرایمری ویژه ژن E6/E7 به طول ۲۴۰ bp (5'CCATGCATGATTACAGCTGG3', 5'GAACAGCAATACAACAAACCCG 3') و برای HPV-18 جفتهای پرایمری ویژه ژن E6/E7 به طول ۲۵۰ bp

(5'CAATGTCTTGCAATGTTGCC3',
5'TGCCAGAAACCGTTGAATCC3')
استفاده می‌شد. آب مقطر نیز به‌عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار می‌گرفت. وجود این شاهد برای مشخص شدن این امر که هیچ‌یک از معرفها با HPV DNA آلوده نبوده‌اند، ضروری بود.

تکثیر

مخلوط اصلی بافر PCR شامل Tris-Hcl (pH=8.4) ۱۰ mM، KCl ۵۰ mM، $MgCl_2$ ۲/۵ mM ، ژلاتین ۰/۰۱، ۰/۲ mM از هر یک از dNTPها (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) ۰/۵ mM از هر پرایمر و ۲/۵ واحد از Taq پلی‌مرازها بود. مخلوط PCR تا ۳۰ چرخه تکثیری شامل مرحله شروع تخریب در ۹۴°C برای مدت ۱ دقیقه و چسبیدن پرایمرها در ۶۰°C برای مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن در ۷۲°C برای مدت ۱ دقیقه انجام می‌گرفت.

محصولات PCR سپس بر روی ژل آگاروز، الکتروفورز شدند و به‌وسیله رنگ‌آمیزی با اتیدتوم بروماید مورد بررسی قرار می‌گرفتند و نتایج در سیستم نگهدارنده اسناد با استفاده از ترنس لومینیتور[1] حفظ می‌شدند.

روشهای آماری

ما آزمون کای- دو یا آزمون دقیق فیشر را، که برای مقایسه نتایج مثبت حاصل از موارد سرطانی و شاهد در مورد ژن L1 HPV و مارکرهای HPV-16 و HPV-18 (ژنهای خاص E6/E7) مناسب بودند، به کار بردیم.

نتایج

نمونه‌های بافتی از ۴۰ مورد ESCC جراحی شده در سالهای ۱۳۷۵ تا ۱۳۸۰ تهیه شده بودند که پس از استخراج DNA، دو نمونه که برای PCR نامناسب بودند از مطالعه خارج شدند. ۳۸ نمونه دیگر (۲۸ مرد و ۱۶ زن) در این مطالعه به‌عنوان موارد سرطانی نگه داشته شدند. ۳۸ مورد شاهد (۱۶ مرد و ۲۲ زن) که از لحاظ سنی مطابق موارد سرطانی بودند (از بیمارانی که با شکایت دیسفاژی آندوسکوپی شده بودند و آندوسکوپی طبیعی داشتند) انتخاب شدند.

میانگین سن (± انحراف معیار) (۱۳±) ۵۴/۲ سال در موارد سرطانی (طیف ۲۵ تا ۷۵ سال) و (۱۱/۳±) ۵۱/۶ سال در نمونه‌های شاهد (طیف ۲۲ تا ۷۸ سال) بود.

۱۴ نمونه از ۱۸ نمونه ESCC (۳۶/۸٪) و فقط ۵ نمونه از ۳۸ مورد شاهد (۱۳/۲٪) برای مارکر عمومی وجود HPV (ژن L1) مثبت شدند. این اختلافات از لحاظ آماری (p=۰/۰۲) مشخص شدند. ۵ نمونه ESCC (۱۳/۲٪) برای ژن HPV-16 E6/E7 (p=۰/۰۵) مثبت بودند، ولی هیچ‌یک از موارد شاهد مثبت نبودند. ۳ عدد از نمونه‌های ESCC (۷/۹٪) و ۵ عدد از نمونه‌های شاهد (۱۳/۲٪) برای ژن HPV-18 E6/E7 مثبت شدند. هیچ نمونه‌ای برای هر دوی HPV-16 و HPV-18 مثبت نبود.

بحث

سرطان سلول سنگفرشی مری (ESCC)، بزرگترین عامل مشترک مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان در قرن بیستم بوده است[۹]. در کشورهای غربی که خطر ESCC معمولاً کم است، مصرف تنباکو و الکل بیش از ۹۰٪ موارد ESCC را شامل می‌شود[۶،۱۰]. با این حال در کشورهای دارای نسبت بالایی از ESCC ، نظیر چین و ایران، فقط تعداد اندکی از موارد ESCC مربوط به کشیدن سیگار و مصرف الکل است[۶،۱۱]. بنابراین باید سایر عوامل خطرساز، مسئول شیوع بالای ESCC در این نواحی باشند. عوامل میکروبی خصوصاً HPV، به‌عنوان یکی از عواملی در نظر گرفته می‌شوند که احتمالاً در بخشهایی از این نواحی، با شیوع بالای ESCC ارتباط دارند.

نقش انواع سرطانزای HPV در اتیولوژی بیشتر سرطانهای اپیتلیال، خصوصاً در سرطان رحم، به اثبات رسیده است[۱،۲]. مطالعات قبلی نشان داده است که HPV-16 و HPV-18 مهمترین عوامل خطرساز در سرطان رحم هستند[۱]. مکانیسم‌هایی که طی آنها HPV می‌تواند نئوپلازی‌های اپیتلیال را القا کند، به‌طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است[۱۲-۱۵].

برخی از پروتئین‌های تولید شده به‌وسیله HPV ، خصوصاً E6 و E7 انکوپروتئین‌هایی می‌باشند که قادر به نامیرا کردن انواع متفاوت سلول‌های انسانی هستند. این پروتئین‌ها با تعداد زیادی از پروتئین‌های میزبان (نظیر P53 یا Rb) واکنش می‌دهند و آنها را غیرفعال می‌کنند و جهشهایی را در DNA سلول میزبان القا می‌کنند[۱۴،۱۶،۱۷].

نقش HPV در ESCC در چندین منطقه پرخطر و کم‌خطر جهان مطالعه شده است[۴،۱۸،۱۹]. بیشتر مطالعات انجام شده در نواحی پرخطر نظیر چین و جنوب آفریقا، نقش HPV را در ESCC نشان می‌دهند، در حالی‌که بیشتر مطالعات انجام شده در نواحی کم‌خطر، در نشان دادن هر گونه ارتباط بین این دو، نتیجه‌ای نمی‌دهند[۴،۱۹-۲۲].

این بررسی اولین مطالعه‌ای است که ارتباط بین مارکرهای DNA

1. trans-luminator

از HPV و خطر ESCC را در ایران (یک ناحیه بسیار پرخطر برای ESCC) گزارش می‌کند. نتایج ما نشان می‌دهد که HPV یک عامل خطرساز غالب برای ESCC در ایران نیست. فقط ۱۴ عدد از ۳۸ نمونه ESCC (۳۶/۸٪) برای مارکر عمومی HPV (ژن L1) مثبت بودند. با این حال، این رقم بیشتر از درصد نمونه مثبت برای نمونه‌های شاهد (۱۳/۲٪) بود و اختلاف مشخصی از لحاظ آماری (p=۰/۰۲) داشت. درصد بالای مارکر عمومی HPV در میان موارد ESCC نسبت به نمونه‌های شاهد ممکن است نشان‌دهنده سطح پایین بهداشت شخصی باشد، که عامل دیگر شناخته شده مرتبط با ESCC است. ولی مکانیسم‌های شناخته شده واضحی از سرطانزایی HPV به اثبات نرسیده است، و اعتقاد ما بر این است که HPV باید به‌عنوان یک عامل مسئول برای افزایش شیوع ESCC در ایران در نظر گرفته شود.

شیوع مارکر HPV-16 از لحاظ آماری در موارد ESCC بیشتر از موارد شاهد (p=۰/۰۵) بود، ولی از لحاظ آماری اختلاف مشخصی بین مارکر HPV-18 بین موارد سرطانی و شاهد وجود نداشت. این یافته نشان می‌دهد که فقط HPV-16 ، و نه HPV-18، ممکن است یک عامل خطرساز برای ESCC در ایران باشد. در یک مطالعه چینی انجام گرفته به‌وسیله Zhou و همکارانش نیز نتایج مشابهی به دست آمده است[۱۹]. ما مارکرهایی را برای HPV-16 و HPV-18 فقط در ۸ عدد از ۱۴ نمونه ESCC یافتیم، در حالی‌که این نمونه‌ها حاوی مارکر مشترک HPV (ژن L1) بودند. بنابر این، این احتمال وجود دارد که سایر انواع HPV که در این مطالعه آزمایش نشده‌اند با خطر ESCC در این نواحی مرتبط باشند. دلیل دیگر این است که بحثهایی برخلاف عرضه بالای HPV-16 و HPV-18 در بین جمعیتهای ایرانی وجود دارد و از این رو با اینکه این دو نوع HPV، عوامل بسیار خطرناک شروع بدخیمی ESCC در ایران هستند، در سرطان رحم در ایران شیوع کمی دارند[۷]. مواجهه کمتر با HPV-16 و HPV-18 در جمعیت ایرانی، احتمالاً مرتبط با نحوه زندگی و رفتارهای جنسی در جوامع مذهبی است.

نکته قابل توجه دیگر این است که به نظر می‌رسد HPV یک مکانیسم ضربه و فرار (hit-and-run) برای القای ESCC داشته باشد. در مطالعه بر روی مدل‌های گاوی نشان داده شده است که ویروسهای پاپیلومای گاوی در مراحل اولیه سرطانزایی در پیش‌روده (foregut) در گاو ضروری می‌باشند، ولی برای پیشرفت تا حالت بدخیمی ضروری نیستند[۲۳]. در مطالعه ما، شواهد HPV فقط در ۳۸٪ از نمونه‌های سرطانی یافت شدند ولی این احتمال وجود دارد که چنین شواهدی در سایر نمونه‌های سرطانی در ابتدای سیر بیماری وجود داشته و در هنگام انجام مطالعه ناپدید شده و یافت نشده باشند. این نکته یکی از نقاط ضعف مطالعه ما محسوب می‌شود. تاکنون هیچ مطالعه‌ای با استفاده از نمونه‌های بافتی این فرضیه را امتحان نکرده است؛ ولی دو مطالعه کوچک سرولوژیک، ارتباط قوی بین مارکرهای سرولوژیک HPV و خطر ESCC را نشان داده‌اند[۲۴،۲۵].

به‌طور خلاصه، اطلاعات ما مطابق با مطالعات HPV DNA انجام شده در سایر نواحی با خطر بالا برای ESCC می‌باشد. ما بر این باوریم که HPV باید به‌عنوان یک عامل مسئول قوی برای افزایش شیوع ESCC در ایران و در سایر نواحی جهان با شیوع بالا در نظر گرفته شود. مطالعات بیشتری در آینده لازم است تا فرضیه پدیده ضربه و فرار را مورد بررسی قرار دهد- مکانیسم تصور شده‌ای که برای ناپدید شدن HPV از تومورها، بعد از شروع آسیب DNA، ارائه شده است.

مراجع

1. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; **348**: 518-27.
2. Gillison ML, Shah KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; **31**: 57-65.
3. Syrjanen K, Pyrhonen S, Aukee S *et al*. Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumour probably caused by human papilloma virus (HPV). *Diagn Histopathol* 1982; **5**: 291-6.
4. Syrjanen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002; **55**: 721-8.
5. Mahboubi E, Kmet J, Cook PJ *et al*. Oesophageal cancer studies in the Caspian Littoral of Iran: the Caspian cancer registry. *Br J Cancer* 1973; **28**: 197-214.
6. Munoz N, Day NE. Esophageal cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. Cancer Epidemiology and Prevention. New York: Oxford University Press; 1996. p. 681-706.
7. Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH *et al.* Cancer occurrence in Ardabil: results of a population-based Cancer Registry from Iran. *Int J Cancer* 2003; **107**: 113-8.
8. Saidi F, Sepehr A, Fahimi S *et al.* Oesophageal cancer among the Turkomans of northeast Iran. *Br J Cancer*

2000; **83**: 1249-54.
9. Parkin DM, Bray F, Ferlay J *et al*. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; **94**: 153-6.
10. Brown LM, Hoover R, Silverman D *et al.* Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors. *Am J Epidemiol* 2001; **153**: 114-22.
11. Cook-Mozaffari PJ, Azordegan F, Day NE *et al*. Oesophageal cancer studies in the Caspian Littoral of Iran: results of a case control study. *Br J Cancer* 1979; **39**: 293-309.
12. Zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994; **48**: 427-47.
13. Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; **111**: 581-7.
14. Zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol* 1999; **9**: 405-11.
15. Chen HB, Chen L, Zhang JK *et al.* Human papillomavirus 16 E6 is associated with the nuclear matrix of esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2001; **7**: 788-91.
16. Mantovani F, Banks L. The interaction between p53 and papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 1999; **9**: 387-95.
17. Caldeira S, de Villiers EM, Tommasino M. Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein. *Oncogene* 2000; **19**: 821-6.
18. Lavergen D, de Villiers EM. Papillomavirus in esophageal papillomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1999; **80**: 681-4.
19. Zhou XB, Guo M, Quan LP *et al*. Detection of human papillomavirus in Chinese esophageal squamous cell carcinoma and its adjacent normal epithelium. *World J Gastroenterol* 2003; **9**: 1170-3.
20. Kok TC, Nooter K, Tjong AHS *et al*. No evidence of known types of human papillomavirus in squamous cell cancer of the oesophagus in a low-risk area. Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 1865-8.
21. Chen B, Yin H, 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**: 920-3.
22. Chang F, Syrjanen S, Shen Q *et al*. 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**: 123-30.
23. Campo MS. Papillomas and cancer in cattle. *Cancer Surv* 1987; **6**: 39-54.
24. Dillner J, Knekt P, Schiller JT *et al*. Prospective seroepidemiological evidence that human papillomavirus type 16 infection is a risk factor for oesophageal squamous cell carcinoma. *BMJ* 1995; **311** (7016): 1346.
25. Bjorge T, Hakulinen T, Engeland A *et al.* A prospective, seroepidemiological study of the role of human papillomavirus in esophageal cancer in Norway. *Cancer Res* 1997; **57**: 3989-92.