

# 人乳头瘤病毒与喉癌关系的研究进展

纪旭 李虹 综述,姜学钧 审校

(中国医科大学附属第一医院 耳鼻咽喉科,辽宁 沈阳 110001)

关键词:喉癌;人乳头瘤病毒;发病机制  
中图分类号:R739. 65 文献标识码:A 文章编号:1007-1520(2013)06-0564-04

近年来,人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染作为恶性肿瘤的病因被广泛研究。据估计,80%的侵袭性宫颈癌是由 HPV16/18 的感染引起<sup>[1]</sup>。在头颈癌中,尤其是扁桃体癌,HPV 也被公认具有致癌作用<sup>[2]</sup>。随着研究的深入,HPV 作为喉癌的高危因素越来越引起人们的关注。国内最近的一个关于 HPV 与喉癌的 Meta 分析<sup>[3]</sup>表明喉癌中存在 HPV 的阳性表达,高危型明显多于低危型,而且吸烟是诱发感染的因素之一。本文对 HPV 的分类、结构、功能、致癌机制及检测手段进行了介绍,并着重对 HPV 与喉癌的关系作一综述。

## 1 HPV 的分类、结构与功能

到目前为止,已经发现了 200 多种 HPV 的类型,并被分为黏膜型和皮肤型两组。在各组中,根据病毒是否具有致癌作用,又可以分成高危型(HPV16, 18 等)和低危型(HPV6, 11 等)<sup>[4]</sup>。低危型只引起局部的良性病变,即使不治疗,也很少转化为恶性。而高危型目前证实与多种恶性肿瘤如生殖系癌、头颈癌等的致病作用有关。

HPV 是一组二十面体的、无包膜、双链环状 DNA 病毒,约含有 8k 个碱基对<sup>[5]</sup>。HPV 具有严格的嗜上皮性,只感染皮肤或肛门生殖道、口咽黏膜的上皮细胞。HPV 通常含有 9 个开放读码框架序列,都位于 DNA 双链中的一条链上,分为 7 个早期区 E1-E7 和 2 个晚期区

L1、L2,分别编码产生多种不同功能的病毒蛋白<sup>[6]</sup>。E1 与 E2 蛋白构成复合物,与病毒复制起始序列相结合,募集细胞聚合酶和辅助蛋白,参与复制<sup>[7]</sup>。同时,E1 蛋白还具有解旋酶活性,能够在复合物形成之前分开 DNA 双链<sup>[8]</sup>。E2 是一个特异性位点结合蛋白,负责招募 E1 与复制起始序列结合,同时还能够调节早期启动子的转录<sup>[9]</sup>。低水平的 E2 可以激活早期启动子,但是当浓度较高时,却通过阻碍细胞转录因子的结合起抑制作用<sup>[10]</sup>。高危型 HPV 的 E6 和 E7 蛋白具有细胞转化能力和致癌作用。它们单独表达都可以转化 NIH3T3 细胞和人类角化细胞,但是更有效的细胞永生代则需要 E6、E7 蛋白的协同作用<sup>[11]</sup>。E4 和 E5 研究较少,一般认为 E4 与宿主细胞的中间丝相互作用,E5 具有较弱的细胞转化能力。E3 的功能目前还不清楚。L1 和 L2 编码结构性衣壳蛋白,在病毒粒子成功组装之后,成熟的病毒将从上皮细胞的最上层释放出来<sup>[12]</sup>。

## 2 HPV 的致癌机制

HPV 致癌作用的关键之一是病毒基因组与宿主染色体的整合,整合通常发生在宿主基因组的脆性位点附近<sup>[13]</sup>。整合之后 E6、E7 仍持续表达,但是其他基因被清除或者表达被破坏<sup>[14]</sup>。尤其是转录抑制剂 E2 的失表达解除了对 E6、E7 表达的控制,增强了 E6、E7 mRNA 的稳定性。有证据表明,与含有游离基因的细胞相比,表达整合 E6、E7 的细胞具有选择性的生长优势<sup>[15]</sup>。而且,E6、E7 的表达能够极大增加宿主基因组的不稳定性导致突变,从而导致癌的形成。

作者简介:纪旭,男,博士,主治医师。  
通讯作者:纪旭,Email: hlantior@163. com

众所周知,p53是一个著名的肿瘤抑制因子,调节参与细胞周期调控的蛋白如细胞周期素抑制因子p21的表达。在DNA损伤时,p53被激活,诱导p21的高表达,导致细胞周期捕获以及凋亡。高危型E6通过一种叫做E6 AP的泛素连接酶与p53结合,导致p53的泛素化继而降解<sup>[16]</sup>。

视网膜母细胞瘤肿瘤抑制蛋白(Rb)是人类克隆成功的第一个抗癌基因。在G1期,脱磷酸化的Rb与E2F/DP1转录因子形成复合物,导致转录抑制,细胞周期停滞。在从G1期进入S期时,细胞周期素激酶复合物使Rb磷酸化,并从E2F复合物中释放出来,使转录得以进行。而E7可以通过与Rb结合促进Rb释放和通过泛素蛋白酶体途径使Rb降解两种方式激活转录,促进细胞周期的进展<sup>[17]</sup>。

正常体细胞的每一轮DNA复制都会导致染色体端粒的末端侵蚀,从而导致端粒缩短。端粒酶的作用就是防止端粒缩短,在保持端粒稳定、基因组完整、细胞长期的活性和潜在的继续增殖能力等方面有重要作用。但是,在正常人体细胞中,端粒酶的活性受到相当严密的调控,只有在造血细胞、干细胞和生殖细胞这些必须不断分裂克隆的细胞之中,才可以侦测到具有活性的端粒酶。而高危型E6能够激活端粒酶的催化亚单位hTERT的表达。通过诱导端粒酶的活性,高危型E6与E7结合,共同实现对人类初级上皮细胞的永生化<sup>[18]</sup>。

### 3 HPV 的检测

目前较常用的HPV检测方法主要包括免疫组化(IHC)、原位杂交(ISH)和聚合酶链式反应(PCR)等。IHC检测病毒抗原,操作简单且能定位,但阳性率低。原因可能是现有抗体多针对病毒衣壳蛋白,病毒整合后,编码衣壳蛋白部分基因常有缺失;HPV整合入宿主细胞后,转录的mRNA结合一段宿主基因导致其抗原性改变。ISH敏感性较高,还可以用于分型,但是仍受限于病毒DNA的拷贝数。

PCR具有简单快速、灵敏、特异性高等优点,在HPV检测中得到广泛引用。PCR甚至可以对病毒的单个拷贝数作出检测。通常有通用型和型特异性两种引物可供选择。通用型

引物较常用的有MY09/11和GP5+/GP6+两种,都是从HPV-L1区中选择保守序列设计合成的,分别可以扩增450个碱基对片段和150个碱基对片段,都具有高度的敏感性和特异性<sup>[19]</sup>。但是也有研究认为,扩增E6和E7区的型特异性引物更加有效,因为在病毒整合过程中L1区可能会丢失,所以应用通用型引物得出的检测率可能较真实的低<sup>[20]</sup>。而国内陈卫刚等<sup>[21]</sup>在检测食管癌的HPV感染率时进行了改进,先后应用MY09/11和GP5+/GP6+引物进行巢式PCR法扩增后大大提高了阳性率。

### 4 HPV 与喉癌

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,据北美及欧洲流行病学研究显示其发病率为7.0~16.2/10万人。既往认为吸烟与饮酒是喉癌的主要病因,随着认识的深入,人们发现高危型HPV(尤其是HPV16/18型)感染与喉癌的发生关系比较密切。1982年Syriänen等<sup>[22]</sup>首次提出HPV与喉癌的发生有关,用免疫过氧化物酶PAP法发现36例伴有良性病变(扁平疣、喉乳头状瘤等)的浸润性喉鳞癌中13例HPV-Ag阳性。1985年Abramson等<sup>[23]</sup>应用免疫组化和分子杂交的方法,研究了5例喉疣状癌标本,在所有的标本中均检测到了HPV16型的DNA序列。后来,随着PCR技术的不断发展,越来越多的学者选择了这种既灵敏又特异的方法应用于喉癌中HPV的检测。尽管研究结果由于不同的原因存在一定差异,但是大部分学者都倾向于HPV DNA在喉癌的致癌过程中确实具有一定的作用。而且,在1990年,Hoshikawa等<sup>[24]</sup>应用PCR技术在34例喉癌的淋巴结转移灶中发现6例含有HPV-16型DNA,认为HPV在喉癌中并非只是一过性感染或由癌旁HPV感染性良性病变污染所致。2005年,Kreimer等<sup>[25]</sup>选取了5046例头颈癌标本进行荟萃分析,当中有1435例为喉癌。结果显示在24%的喉癌标本中检测到了HPV DNA。当然,也有研究认为HPV在喉癌的致癌过程中并不起作用,如Lindeberg等<sup>[26]</sup>选取了30例既往无复发性喉乳头状瘤的喉癌标本,应用PCR进行检测,结果只有1例检测到了HPV DNA,而且还不是高危型16/18或低危型6/11中的一种。

所以他认为,在既往无复发性喉乳头瘤的喉癌病人中,HPV 并不具有致癌作用。国内学者吴俊福等<sup>[27]</sup>应用流式荧光杂交法以及型特异性 PCR 法检测了 46 例喉癌组织,只有 2 例 HPV16 阳性,1 例 HPV11 阳性,他认为 HPV 与喉癌的发生关系似乎不是很密切,但尚待进一步大样本研究。关于 HPV 与喉癌患者的预后方面,各家报道不一,暂无定论。

自 20 世纪 90 年代始,基因治疗已在恶性肿瘤的治疗中展现出广阔的应用前景,而关于 HPV 与喉癌发生的功能研究则是基因治疗开展的实验依据和理论基础。为了揭示 HPV 在喉癌中的作用机制,适合的细胞模型是必不可少的。国内外诸多学者都致力于此。国内学者蔡萍等<sup>[28]</sup>用阳离子脂质体基因转染技术将携带有 HPV16-E6/E7 DNA 的真核表达质粒导入体外连续传 20 代的 HPV 阴性的 Lscc-02 喉鳞癌细胞系,成功地建立了表达 HPV16-E6/E7 基因的人喉鳞癌细胞系。利用该细胞系可以研究 HPV16-E6/E7 在喉癌细胞中的作用机制,观察 HPV16-E6/E7 对喉鳞癌细胞恶性表型的影响,即增殖和分化能力、侵袭和转移潜能的变化,从而有助于理解 HPV16-E6/E7 在喉癌演进中的作用。

## 5 展望

尽管近年来 HPV 作为喉癌的致病因素受到越来越多的关注,但是对 HPV 与喉癌关系的研究仍是非系统和不全面的。因此,建立完善、系统、全面和适宜的研究方案,采取便捷、灵敏的检测手段,对进一步认识 HPV 的生物学特性、喉癌的发病机理及两者之间的关系将会大有裨益,为最终预防和治疗 HPV 引起的喉癌提供强有力的理论指导。

## 参考文献:

- [1] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121 (3): 621 - 632.
- [2] Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer [J]. *Head Neck*, 2011, 33 (4): 581 - 586.
- [3] 郜晶,李慧军,刘江涛. 国内喉癌中人乳头状瘤病毒阳性率的 Meta 分析 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2013, 20 (3): 113 - 116.
- [4] Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis [J]. *J Virol*, 2004, 78 (21): 11451 - 11460.
- [5] Kusumoto-Matsuo R, Kanda T, Kukimoto I. Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts [J]. *Genes Cells*, 2011, 16 (1): 23 - 33.
- [6] Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004, 15 (3): 188 - 196.
- [7] Conger KL, Liu JS, Kuo SR, et al. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (5): 2696 - 2705.
- [8] Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21 (25): 5817 - 5823.
- [9] Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, et al. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis [J]. *EMBO J*, 1987, 6 (12): 3745 - 3753.
- [10] Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein [J]. *J Virol*, 1997, 71 (1): 50 - 58.
- [11] Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, et al. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes [J]. *EMBO J*, 1989, 8 (2): 3905 - 3910.
- [12] Hummel M, Hudson JB, Laimins LA. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes [J]. *J Virol*, 1992, 66 (10): 6070 - 6080.
- [13] Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, et al. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (8): 1225 - 1237.
- [14] Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, et al. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines [J]. *J Virol*, 1987, 61 (4): 962 - 971.
- [15] Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells [J]. *J Virol*, 1995, 69 (5): 2989 - 2997.
- [16] Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes [J]. *J Virol*, 1992, 66 (10): 6237 - 6241.
- [17] Edmonds C, Vousden KH. A point mutational analysis of hu-

- man papillomavirus type 16 E7 protein [J]. J Virol, 1989, 63(6): 2650 - 2656.
- [18] Kiyono T, Foster SA, Koop JI, et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells [J]. Nature, 1998, 396(6706): 84 - 88.
- [19] Qu W, Jiang G, Cruz Y, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5 + /GP6 + primer systems [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(6): 1304 - 1310.
- [20] Depuydt CE, Boulet GA, Horvath CA, et al. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(4): 881 - 891.
- [21] 陈卫刚, 杨春梅, 徐丽红, 等. 通用引物巢式 PCR 法对哈萨克族食管鳞癌 HPV 感染的检测 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(12): 1049 - 1053.
- [22] Syrjänen K, Syrjänen S, Pyrhönen S. Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas [J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 1982, 44(6): 323 - 334.
- [23] Abramson AL, Brandsma J, Steinberg B, et al. Verrucous carcinoma of the larynx. Possible human papillomavirus etiology [J]. Arch Otolaryngol, 1985, 111(11): 709 - 715.
- [24] Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H, et al. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas by polymerase chain reaction [J]. Laryngoscope, 1990, 100(6): 647 - 650.
- [25] Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(2): 467 - 475.
- [26] Lindeberg H, Krogdahl A. Laryngeal cancer and human papillomavirus: HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas [J]. Cancer Lett, 1999, 146(1): 9 - 13.
- [27] 吴俊福, 周佳青. 喉癌及喉良性病变中 HPV 不同亚型的检测 [J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(9): 1813 - 1816.
- [28] 蔡萍, 吴展元, 李金荣. 表达 HPV16-E6/E7 基因的人喉鳞癌细胞系的建立 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2006, 12(6): 418 - 421.

(修回日期: 2013 - 06 - 03)

(上接第 563 页)

前, 对学生进行提问, 并给予再次讲解。耳鼻咽喉头颈外科学解剖结构难以观察和理解, 从而使学生产生畏难情绪, 如何调动学生的积极性和求知欲, 帮助学生学好耳鼻咽喉头颈外科学解剖知识, 熟练掌握这些解剖知识, 对于学好耳鼻咽喉头颈外科学是非常重要的。耳鼻咽喉头颈外科学教材更新快, 重大的新进展多, 老师有必要把讲解的新内容精简地穿插在相关章节内讲述。如“鼻内镜鼻窦外科学”结合到“慢性鼻窦炎”章节中“治疗”内容讲, “人工耳蜗植入术”涉及感音神经性耳聋的治疗, 这一内容结合在“耳聋及其防治”中讲。以充实教学内容。

教学改革是一项长期的系统工程, 需要我们在长期的教学实践中逐步摸索。通过几年来的教改尝试, 该课程教学深受学生的欢迎, 学生成绩及临床思维能力明显提高, 学生不仅具备一定的专业知识和较强的临床能力, 而且学习兴趣明显增强。学生的独立思考能力、动手能力及进行科学研究的能力都普遍得到提高。我们要顺应学科发展的需要, 把创新思想融入到临床教学和实践当中, 积极探索新思

路、新方法, 用新理念规划课程, 摒弃一些传统的、过时的内容, 并结合网络信息技术的发展, 建立信息化教学平台, 同时对传统的教学管理模式进行大胆改革, 最终建立起现代耳鼻咽喉头颈外科学课程教学新体系。同时要求我们老师也要不断学习, 以适用不断变化的教育发展需要, 形成自己独特的教学风格和特色。

#### 参考文献:

- [1] 孔维佳, 乐建新, 陈建军, 等. 高等医学院校耳鼻咽喉科学课程体系及教学内容改革与通材型医学人才培养 [J]. 西北医学教育, 2004, 18(9): 571 - 573.
- [2] 陈平, 谷华丽. 耳鼻咽喉临床教学实践与探索 [J]. 卫生职业教育, 2007, 25(13): 100 - 101.
- [3] 王承龙, 黄东海, 冯永, 等. PBL 教学法在耳鼻咽喉科临床教学中的应用 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2011, 17(6): 469 - 471.
- [4] 王承龙, 邱元正, 冯永, 等. 精品课程建设中耳鼻咽喉头颈外科学教学方法的探讨与体会 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2012, 18(6): 512 - 514.

(修回日期: 2013 - 10 - 26)