

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201501016

· 短篇论著 ·

# 人类乳头状瘤病毒 DNA 及其亚型在喉咽癌中的检测

卢国伟<sup>1</sup>,葛瑞锋<sup>2</sup>,孙彦<sup>2</sup>,李薇<sup>2</sup>,华辉<sup>2</sup>

(1. 青岛大学附属烟台毓璜顶医院 耳鼻咽喉头颈外科, 山东 烟台 264000; 2. 青岛大学附属医院 耳鼻咽喉头颈外科, 山东 青岛 266071)

**摘要:** **目的** 通过检测喉咽鳞状细胞癌(喉咽癌)中人乳头状瘤病毒(HPV)的 DNA 及其亚型的表达,探讨 HPV 感染与喉咽癌的关系及在喉咽癌发病中的意义。**方法** 采用聚合酶链式反应(PCR)扩增和 DNA 反向点杂交相结合的 DNA 芯片技术,检测 36 例喉咽鳞状细胞各亚型 HPV DNA 的表达。对照组为 35 例喉咽黏膜细胞,其中取自声带息肉患者 26 例,会厌囊肿患者 9 例。**结果** 喉咽癌组 36 例中 HPV DNA 检出者 6 例,HPV DNA 检出率 16.7% (6/36)与对照组(0%)比较,差异具有统计学意义( $\chi^2=4.40, P=0.036, P<0.05$ )。喉咽癌组高危型 HPV DNA 检出者与对照组比较,差异无统计学意义( $\chi^2=3.323, P=0.068, P>0.05$ )。喉咽癌组低危型 HPV DNA 检出者与对照组比较,差异无统计学意义( $P=1.00, P>0.05$ )。**结论** 本研究观察到 HPV 感染与喉咽鳞癌有关,HPV DNA 检出率为 16.7%; HPV DNA 阳性的喉咽鳞癌患者中以高危型 HPV 为主,占 83.3%。

**关键词:** 喉咽肿瘤; 下咽肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 人乳头状瘤病毒; 聚合酶链反应

中图分类号: R739.65      文献标识码: A      文章编号: 1007-1520(2015)01-0061-04

## Expression of HPV DNA and its different subtypes in laryngopharyngeal carcinoma

LU Guo-wei, GE Rui-feng, SUN Yan, LI Wei, HUA Hui

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao University, Yantai 264000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of human papillomavirus (HPV) in the development of laryngopharyngeal squamous cell carcinoma by detecting the expression of HPV DNA and its different subtypes. **Methods** 36 patients with laryngopharyngeal carcinoma were enrolled. And 35 patients including 26 of vocal cord polyp and 9 of epiglottic cyst were chosen as control group. During operation, laryngopharyngeal mucosal cells were collected in all cases with cotton swabs. Expressions of HPV subtypes were detected in both groups with DNA chip technology combining polymerase chain reaction (PCR) with DNA reverse point hybrid. **Results** Expression of HPV DNA was detected in 6 of the 36 laryngopharyngeal carcinoma specimens (with an expression rate of 16.7%) and none of the control specimens (0%). The difference was significant ( $P<0.05$ ). High-risk HPV DNA was detected in 5 specimens of laryngopharyngeal group, and the difference of detective rate between the laryngopharyngeal group and the control group was statistically insignificant ( $P>0.05$ ). Low-risk HPV DNA was detected in one specimen of laryngopharyngeal group, and the difference was also insignificant ( $P>0.05$ ). **Conclusions** HPV infection may be closely related with laryngopharyngeal squamous cell carcinoma. High-risk HPV makes up 83.3%, the majority, of the HPV-positive laryngopharyngeal carcinoma patients.

**Key words:** Laryngopharyngeal Neoplasm; Hypopharyngeal Neoplasm; Carcinoma, squamous cell; Human papilloma-virus; Polymerase chain reaction

喉咽癌发生和发展的研究近年来受到广泛关注<sup>[1-2]</sup>,人乳头状瘤病毒(human papillo mavirus, HPV)与头颈部鳞癌肿瘤关系认识日益深入。HPV 与口咽鳞癌的发生发展最为密切,尤其是高危型 HPV16<sup>[3-4]</sup> 有较高的检出率,且与口咽癌的预后相关。HPV 与喉癌的关系也已引起重视<sup>[5]</sup>。喉咽癌是一种较为少见的恶性肿瘤,病因不明,可能与过量

作者简介:卢国伟,女,硕士研究生,住院医师。  
通信作者:孙彦,Email:sunyanent@163.com

烟酒及营养因素有关。目前,HPV 与喉咽癌关系研究极少。我们采用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction,PCR) 扩增和 DNA 反向点杂交相结合的 DNA 芯片技术,旨在通过检测 HPV DNA 及其亚型在喉咽癌细胞中的表达,探讨 HPV 及其不同亚型的感染与喉咽癌发病的关系。

1 材料和方法

1.1 一般资料

收集 2011 年 12 月~2013 年 3 月,青岛大学医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科初治喉咽癌患者 36 例,男 35 例,女 1 例,年龄 42~77 岁,平均年龄(57.4±8.2)岁;均经病理检查诊断为喉咽鳞状细胞癌;术前均未放疗或化疗。按 UICC 2002 年 TNM 分类分期方案:T2N1M0 4 例,T2N2M0 5 例,T3N0M0 1 例,T3N1M0 2 例,T3N2M0 15 例,T4N2M0 4 例,T4N3M0 5 例。临床分期:Ⅲ期 7 例,Ⅳ期 29 例。根据病理分化程度,高分化鳞癌 6 例,中分化鳞癌 19 例,低分化鳞癌 11 例。同期选取对照组患者 35 例,男 32 例,女 3 例,年龄 42~75 岁,平均年龄(55.1±8.1)岁;其中取自声带息肉患者 26 例,会厌囊肿患者 9 例。

1.2 取材方法

所取标本由专人进行操作,实验组为术中切除的新鲜病变组织以棉拭子刷取的肿瘤组织细胞,对照组为术中以棉拭子刷取的喉咽黏膜脱落细胞,将两者存放至细胞保存液中。

1.3 检测方法

HPV 分型检测试剂盒由亚能生物技术(深圳)有限公司提供,由专人检测。运用 PCR 扩增和 DNA 反向点杂交相结合的 DNA 芯片技术,检测细胞中 HPV 亚型共 23 种,高危型 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4;低危型 HPV6、11、42、43、44。

1.4 实验步骤

①HPV DNA 的提取将细胞保存液与其内所取

的组织细胞加入 1 ml 洗脱液,并全部转移到 1.5 ml 离心管中,13 000 r/pm 离心 10 min,弃去上清液,保留管底的细胞沉淀。加入 50 μl 裂解液悬浮沉淀,沸水浴加热 10 min。13 000 r/pm 离心 10 min,保留上清液待用。②PCR 扩增取出 PCR 反应管,低速离心数秒,分别加入已提取的待测样本 DNA 5 μl,反应总体积为 25 μl,低速离心数秒。③杂交取 15 ml 塑料离心管,放入标有样本编号的膜条,加入杂交液,预热至 51℃,至少 1.5 h 后洗膜处理。④显色将膜条洗膜后浸泡在新鲜配制的显色液中避光显色至少 30 min,转移至去离子水中即可观察结果,每张膜条均含有以上 23 种亚型的 DNA 探针,并且设立显色质控点,试验中该质控点显色,视为有效,如不显色提示实验不成功。⑤结果判读根据膜条上斑点显现的位置,读取相应位置上标注的基因型信息。

1.5 统计学处理

所得结果应用 SPSS 17.0 统计软件统计学分析。具体方法为:应用  $\chi^2$  检验的连续性校正,比较喉咽癌组与对照组 HPV DNA 检出率有无差异;应用  $\chi^2$  检验的连续性校正,比较喉咽癌组高危型 HPV DNA 检出率与对照组有无差异;应用 Fisher 确切概率法,比较喉咽癌组低危型 HPV DNA 检出率与对照组有无差异,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

两组所有标本质控点均显色。喉咽癌组 36 例中 HPV DNA 检出者 6 例,HPV DNA 检出率 16.7% (6/36);对照组 35 例中 HPV DNA 检出阴性,两组之间差异有显著性意义( $\chi^2 = 4.40, P = 0.036, P < 0.05$ ),见表 1。

喉咽癌组 36 例中 HPV DNA 检出 6 例,其中高危型 HPV DNA 检出 5 例(占 83.3%);5 例中 HPV16 DNA 2 例,HPV18、59、66 DNA 各 1 例。低危型 HPV DNA 检出者仅有 1 例,为 HPV43,喉咽癌组 36 例中低危型 HPV DNA 检出 1 例,对照组 35 例中未检低危型 HPV DNA。

表 1 HPV DNA 在喉咽癌中的检测情况[例(%)]

| 组别   | 例数 | 不同型别 HPV DNA 检出数目 |         |         |         |         |
|------|----|-------------------|---------|---------|---------|---------|
|      |    | HPV16             | HPV18   | HPV59   | HPV66   | HPV43   |
| 喉咽癌组 | 36 | 2(33.3)           | 1(16.7) | 1(16.7) | 1(16.7) | 1(16.7) |
| 对照组  | 35 | 0                 | 0       | 0       | 0       | 0       |

### 3 讨论

HPV 是一类嗜上皮性 DNA 病毒,寄生条件十分严格,有高度的宿主和组织器官特异性,只能感染人类的皮肤和黏膜,导致组织异常增生而产生各种病变<sup>[6]</sup>。根据 HPV 与肿瘤的关系,将其分为高危型和低危型,高危型最常见的为 16、18,研究发现在多种恶性肿瘤如宫颈癌、口腔癌、口咽癌等密切相关,而低危型致癌性相对较小,与良性病变关系较大<sup>[7]</sup>。病毒 E6 和 E7 蛋白在高危型和低危型 HPV 都有表达,但在高危型中的 E6 和 E7 结合抑制因子的能力更强,故致癌能力更强<sup>[8]</sup>。

目前认为,HPV 感染是宫颈癌及癌前病变的主要原因,以 HPV16 亚型最常见,其次 HPV18<sup>[3]</sup>。近年来,HPV 与头颈部肿瘤的关系受到越来越多关注,多项研究中探讨 HPV 在不同部位的头颈部鳞癌中的表达情况,其中 HPV16 为主要的感染亚型,HPV18 次之,其余亚型罕见<sup>[3-4]</sup>。头颈部肿瘤中,发病部位不同 HPV 感染率大不相同<sup>[9]</sup>。

研究报道在头颈部鳞状细胞癌中,口咽鳞癌中 HPV 检出率较高,两者关系密切。2005 年 Kreimer 等<sup>[3]</sup>统计 969 例口咽鳞癌中 HPV 检出率为 35.6%,HPV16 占 86.7%。2010 年 Ang 等<sup>[10]</sup>阐述 HPV 感染是口咽癌患者的一个强而独立的影响因素,而且经放疗 HPV 阳性口咽鳞癌 5 年生存率比 HPV 阴性口咽鳞癌更高。Syrijanen 等<sup>[11]</sup>首次提出 HPV 感染与喉癌有关,目前已分出 200 多个型别的 HPV<sup>[12]</sup>。研究表明喉癌与高危型 HPV 感染有关,尤其是 HPV16/18<sup>[13]</sup>。随着对 HPV 的深入研究,许多学者探讨其在头颈部鳞癌的表达,Lewis 等<sup>[14]</sup>报道口腔癌高危型 HPV 的感染率在 0 ~ 50% 不等,平均为 25% ~ 35%。

HPV 与喉咽癌的关系研究甚少,检测方法不一,检出率变化较大。国内文献罕见,2010 年北京张洁莉等<sup>[15]</sup>采用原位杂交和荧光定量 PCR 的方法检测 78 例头颈肿瘤中 HPV16 DNA 和 HPV18 DNA,结果分别为 47.4%、62.8%,喉咽癌占均占 57.1%。2011 年广西黄岸瑞等<sup>[16]</sup>采用原位杂交技术测得 20 例喉咽鳞癌组织中 HPV16 DNA 和 HPV18 DNA,共检出 10 例,且阳性者均为 IV 期患者。国外研究相对较多,2000 年美国 Gillison 等<sup>[4]</sup>研究 21 例喉咽癌病人仅有 2 例 HPV 阳性。2002 年西班牙 Rodrigo 等<sup>[17]</sup>报道 21 例喉咽癌患者中检出率为 29%。

2011 年比利时 Ernoux-Neufcoeur 等<sup>[18-19]</sup>采用敏感的实时荧光 PCR 研究 61 例喉咽癌患者中检出率为 89%,显示 HPV 与喉咽癌密切相关,但未观察到 HPV 阳性患者的预后与阴性患者存在显著差异。本研究观察到 36 例喉咽癌患者中 6 例 HPV 阳性,阳性率 16.7%,共检出 16、18、43、59、66 亚型,其中高危型占 83.3% (包括 16、18、59、66),提示喉咽癌患者可能与高危型 HPV 感染密切相关。本研究显示 HPV 阳性率较低,可能与本地区居民的生活习惯有关。本文样本量较少,值得进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 曾志梅,梁永辉,杨焱芳,等. RECK 和 MMP-2 在下咽癌中的表达及相关性研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2011,17(2):95-99.
- [2] 沈晨凌,向明亮,聂琛,等. CD44 作为筛选下咽癌肿瘤干细胞分子标志物的价值[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2013,19(5):388-398.
- [3] 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.
- [4] Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(9):709-720.
- [5] 纪旭,李虹. 人乳头瘤病毒与喉癌关系的研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2013,19(6):564-567.
- [6] Karim R, Meyers C, Backendorf C, et al. Human papillomavirus deregulates the response of a cellular network comprising of chemotactic and proinflammatory genes[J]. PLoS One, 2011, 6(3):e17848.
- [7] Luzar B, Gale N, Kambic V, et al. Human papillomavirus infection and expression of p53 and c-erbB-2 protein in laryngeal papillomas[J]. Acta Oto-laryngol Suppl Stockh, 1997, 527:120-124.
- [8] Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5):342-350.
- [9] 卢国伟,王琳,孙彦,等. 山东东部 57 例喉癌人乳头状瘤病毒 DNA 及其亚型的检测[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2012, 26(6):16-19.
- [10] Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer[J]. N Engl J Med, 2010, 363(1):24-35.
- [11] Syrijanen K, Syrijanen S, Pyrhonen S, et al. Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Orl J Ot orh inolaryngol Relat Spec, 1982, 44(6):323-334.
- [12] 卢仲明,张思毅. 人乳头状瘤病毒与喉癌[J]. 国际耳鼻咽喉头

颈外科学杂志,2012,36(4):220-223.

- [13] Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer[J]. *Head and Neck*, 2011, 33(4):581-586.
- [14] Lewis J S Jr, Ukpo O C, Ma X-J, et al. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity an laryngeal / hypopharyngeal squamous cell carcinomas- a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization[J]. *Histopathology*, 2012, 60(6):982-991.
- [15] 张洁莉,白春梅,王毓州,等. HPV感染与头颈部鳞癌的相关性以及抗肿瘤预后的影响[C]. 北京:中国医学科学院北京协和医学院,2010.
- [16] 黄岸瑞,苏纪平. HPV16/18 在下咽鳞癌及其颈淋巴结的表达研究[C]. 南宁:广西医科大学,2011.
- [17] Rodrigo JP, Gonzalez MV, Lazo PS, et al. Genetic alterations in squamous cell carcinomas of the hypopharynx with correlations to clinicopathological features[J]. *Oral Oncol*, 2002, 38(4):357-363.
- [18] Ernoux-Neufcoeur P, Arafa M, Decaestecker C, et al. Combined analysis of HPV DNA, P16, P21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(1):173-181.
- [19] Daly NL, Arvanitis DA, Fairley JA, et al. Deregulation of RNA polymerase III transcription in cervical epithelium in response to high-risk human papillomavirus[J]. *Oncogene*, 2005, 24(5):880-888.

(修回日期:2014-05-04)

(上接第60页)

- vel calcium phosphate/sulphate bone cement[J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61(4):600-607.
- [2] Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2):272-288.
- [3] Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, et al. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90 suppl 1:36-42.
- [4] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities[J]. *Science*, 1988, 242(4885):1528-1534.
- [5] Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(12):1424-1429.
- [6] Edgar cm, chakravarthy V, Barnes G, et al. Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells [J]. *Bone*, 2007, 40(5):1389-1398.
- [7] 杨辉, 黄菲菲. 多孔球形羟基磷灰石的制备及其药物控释性能的研究[J]. *功能材料*, 2012, 4(43):533-536.
- [8] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24):2529-2543.
- [9] Bin Wu, Qixin Zheng, Xiaodong Guo, et al. Preparation of scaffold based on mineralized recombinant human-like collagen loading with synthetic BMP-2-derived peptide and its ectopic osteogenesis in vivo[J]. *Biomed Mater*, 2008, 3(4):044111.
- [10] Pederson AW, Ruberti JW, Messersmith PB. Thermal assembly of a biomimetic mineral/collagen composite [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(26):4881-4890.
- [11] 李小飞, 张涛, 程庆书, 等. 重组人骨形态发生蛋白诱导气管软骨再生的剂量效应[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(3):351-352.

(修回日期:2014-05-14)