

头颈部鳞癌人乳头状瘤病毒 16/18 感染状态 与 Ki-67、P53 表达的关系

张洁莉¹, 孙 昭¹, 霍 真², 罗玉凤², 马水清³,
王德田², 曹金伶², 杨 缙², 崔全才², 白春梅¹

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 ¹ 肿瘤内科 ² 病理科 ³ 妇产科, 北京 100730

通信作者: 白春梅 电话: 010-65296879, 电子邮件: baichunmei1964@yahoo.com.cn

摘要: **目的** 通过测定人头颈部鳞状细胞癌组织中人乳头状瘤病毒 (HPV) 16/18 感染和 Ki-67、P53 蛋白的表达, 探讨 HPV 16/18 感染和 Ki-67、P53 蛋白表达的相关性及意义。**方法** 采用荧光定量 PCR 方法测定头颈部鳞癌患者肿瘤组织中 HPV 16/18 DNA 的含量, 同时以免疫组织化学方法测定 Ki-67、P53 蛋白的表达状态。**结果** 62.8% 的患者在头颈部鳞癌组织中检测到 HPV 16/18 DNA, 46.15% 的患者肿瘤组织表达 P53 蛋白为阳性。患者肿瘤组织 Ki-67 的表达在 2% ~ 70%。HPV 16/18 DNA 含量与患者的性别、吸烟、饮酒和临床分期无相关性 ($P > 0.05$), 与病理学分级呈正相关 ($r = 0.350, P = 0.001$), 与 Ki-67 表达无相关性 ($P = 0.179$), 与 P53 表达呈负相关 ($r = -0.197, P = 0.04$)。**结论** 头颈部鳞癌的发生可能和 HPV 16/18 感染有关, 致病机制涉及 P53 蛋白的降低表达。

关键词: 头颈部鳞癌; 人乳头状瘤病毒; Ki-67 蛋白; P53 蛋白

中图分类号: R739.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2010)04-0429-04

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.04.015

Infection of Human Papillomavirus 16/18 DNA in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Its Relationship with Expression of Ki-67 and P53 Protein

ZHANG Jie-li¹, SUN Zhao¹, HUO Zhen², LUO Yu-feng², MA Shui-qing³, WANG De-tian²,
CAO Jin-ling², YANG Ti², CUI Quan-cai², BAI Chun-mei¹

¹Department of Medical Oncology, ²Department of Pathology, ³Department of Gynecology,
PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: BAI Chun-mei Tel: 010-65296879, E-mail: baichunmei1964@yahoo.com.cn

ABSTRACT: Objective To detect the infection of human papillomavirus (HPV) 16/18 in patients with head and neck squamous cell carcinoma and explore the relationship between HPV infection and expressions of Ki-67 and P53 proteins in tumor tissue. **Method** The level of HPV 16/18 DNA was measured by real time polymerase chain reaction, and Ki-67 and P53 proteins were measured by immunohistochemistry in tissues from head and neck squamous cell carcinoma. **Results** HPV 16/18 DNA was detected in 62.8% of our patients. In each cancer tissue sample, Ki-67 protein was expressed between 2% to 70%. P53 protein was expressed in 46.15% of our patients. No significant relation was found between HPV 16/18 DNA level and sex, smoking, drinking, and tumor clinical stages. However, level of HPV 16/18 DNA was found to have positive relation with tumor pathological grades and negative relation with P53 protein expression. No relation with Ki-

67 protein expression was found. **Conclusion** Head and neck squamous cell carcinoma may be initiated by HPV 16/18 infection and the mechanism in carcinogenesis involves abnormal expression in P53 protein.

Key words: head and neck squamous cell carcinoma; human papillomavirus; Ki-67 protein; P53 protein

Acta Acad Med Sin, 2010, 32(4):429-432

全球每年约有 645 000 例新发生的头颈部鳞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 病例。近年来,我国头颈部肿瘤的年发病率为 15.22/10 万,占全身恶性肿瘤的 4.45%。研究显示头颈部肿瘤与长期吸烟、饮酒关系密切,但 20%~25% 的头颈部鳞癌患者不存在吸烟和饮酒的危险因素^[1]。越来越多证据表明,高危型 (16/18 亚型) 人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染与头颈部鳞状细胞癌,尤其是口咽部位的鳞状细胞癌密切相关^[1-3]。本研究采用 RT-PCR 和免疫组织化学的方法,分别检测头颈部鳞状细胞癌组织中的 HPV 16/18 DNA 含量和 Ki-67 蛋白、P53 蛋白表达状态,探讨头颈部鳞状细胞癌 HPV 16/18 感染情况以及与 Ki-67 蛋白、P53 蛋白表达的相关性。

对象和方法

对象 选取 2004 年 1 月至 2009 年 9 月北京协和医院通过病理确诊的新发头颈部鳞状细胞癌患者 78 例,年龄 34~91 岁,平均 (59.1 ± 13.6) 岁;其中男性 52 例;47.4% 患者有吸烟 (史),33.3% 有饮酒史;肿瘤发生部位:唇鳞状细胞癌 6 例、口腔鳞状细胞癌 48 例、口咽鳞状细胞癌 10 例、下咽鳞状细胞癌 14 例;按国际抗癌联盟标准第 6 版进行临床分期:0 期 2 例、I 期 8 例、II 期 25 例、III 期 16 例、IV 期 27 例;按肿瘤分化程度进行分级:I 级 (高分化) 26 例、II 级 (中分化) 18 例、III 级 (低分化) 34 例。

提取肿瘤组织 DNA 从石蜡切片上刮取肿瘤组织样品放入 1.5 ml 离心管中,加入 1.2 ml 二甲苯,漩涡震荡,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清后加入 1.2 ml 无水乙醇,震荡混匀,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,打开管盖在 37℃ 晾干残留乙醇,充分脱蜡。然后应用 FFPE Tissue DNA Extraction Kit 试剂盒,按说明书流程操作,用离心柱法提取组织 DNA。用 Ultraspec 2100pro 紫外分光光度计检测,调整 DNA 浓度为 10 ng/μl。

荧光定量 PCR 检测 HPV 16/18 应用人 HPV

16/18 亚型的核酸扩增荧光检测试剂盒 (中山达安基因公司) 进行 RT-PCR: 按试剂盒操作说明,将 HPV 16/18 PCR 反应液 40 μl, Taq 酶 3 μl 充分混匀后加入 RT-PCR 专用八连管中,每份加入处理后的组织 DNA 2 μl 或试剂盒提供的 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴ 的标准品 2 μl,反应条件为 93℃ 2 min, 93℃ 45 s, 55℃ 60 s, 10 个循环, 93℃ 30 s, 55℃ 45 s, 30 个循环,荧光采集点为 55℃ 45 s。选用 IQ5 型号 RT-PCR 仪。利用 IQ5 的分析软件,计算每份 DNA 标本的拷贝数。

头颈部鳞癌中 P53 蛋白和 Ki-67 蛋白的表达 切片脱蜡至水。用 PBS (pH7.4) 冲洗 3 次,每次 5 min。用 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH6.0) 微波修复 1 min,用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。加过氧化酶阻断溶液 (试剂 A),以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 15 min,用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。加 Ultra V Block (试剂 B),室温孵育 5 min。用 PBS 冲洗 4 次,每次 5 min。加 Rodent Block (试剂 C),室温下孵育 60~70 min。用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。加第一抗体,室温下孵育 60 min。用 PBS 冲洗 4 次,每次 5 min。加生物素标记的二抗 (试剂 D),室温下孵育 10~15 min。用 PBS 冲洗 4 次,每次 5 min。加链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液 (试剂 E),室温下孵育 10~15 min。用 PBS 冲洗 4 次,每次 5 min。加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下观察 3~10 min,阳性显色为棕褐色。DAB 显色液 (迈新公司) 的配方:在 0.85 ml 蒸馏水中,加试剂 A 和 B 各 50 μl,充分混匀,加试剂 C 50 μl,混匀,避光放置,30 min 内有效。染色结束后常规用树脂封片,在显微镜下观察计数阳性细胞 (细胞核内出现棕黄色颗粒的细胞),在每张切片的不同部位观察 1 000 个细胞,计算出阳性率。

P53 的阳性判定标准: P53 免疫组织化学染色阳性细胞数 < 10% 为 “-”, 阳性细胞数在 10%~25% 为 “+”, 阳性细胞数在 26%~50% 为 “++”, 阳性细胞数在 51%~75% 为 “+++”, 阳性细胞数在 76%~100% 为 “++++” (图 1)。定量判断 Ki-67 蛋白的表达:以 Ki-67 蛋白阳性细胞的百分数作为

阳性 (图 1)。

统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差, 组间比较用 t 检验, 计数资料用卡方检验或四格表确切概率检验, 两者相关性用非参数 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

头颈部鳞癌组织 HPV 16/18 的感染率 62.8% 的患者肿瘤组织中可检测到 HPV DNA。口咽部、口唇、口腔、下咽部鳞癌的 HPV 阳性率分别为 70%、33.33%、66.67%、57.14%, 但不同部位鳞癌的 HPV 阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。吸烟者 ($n=37$) 和非吸烟者 ($n=41$) HPV 16/18 DNA 的阳性率分别为 70.27% 和 56.09% ($P=0.199$)。饮酒 ($n=43$) 和非饮酒 ($n=35$) 患者 HPV 阳性率分别为 53.85% 和 67.31% ($P=0.912$)。临床分期 0 期 ($n=2$)、I 期 ($n=8$)、II 期 ($n=25$)、III 期 ($n=16$) 和 IV 期 ($n=27$) 患者的 HPV 阳性率分别为 50%、75%、64%、68.75% 和 59.26% (均 $P > 0.05$)。病理分级 I 级高分化 ($n=38$)、II 级中分化 ($n=27$) 和 III 级低分化 ($n=13$) 患者 HPV 阳性率分别为 34.62%、77.78% 和 76.47%, I/II 级和 I/III 级的 HPV 阳性率差异具有统计学意义 ($P=0.038$, $P=0.011$), II/III 级 HPV 阳性率差异无统计学意义 ($P=0.91$), HPV 16/18 DNA 水平与病理学分级呈正相关 ($r=0.350$, $P=0.001$)。

头颈部鳞癌组织中 Ki-67 蛋白和 P53 蛋白的表达 所有头颈部鳞癌组织中均有 Ki-67 蛋白的表达 (图 1), Ki-67 表达数量在 2%~70%, HPV DNA 水平与 Ki-67 蛋白的表达无相关性 ($P=0.179$), HPV 阴性和阳性组的 Ki-67 蛋白表达差异无统计学意义 ($P=0.435$)。P53 蛋白 (-) 组 ($n=42$)、(+) 组 ($n=16$)、(++) 组 ($n=15$)、(+++) 组 ($n=5$) 的 HPV 阳性率分别为 69.05%、68.75%、53.33% 和 20.00%, 各组与 (+++) 组相比, P 分别为 0.038、0.04 和 0.07。HPV 16/18 DNA 水平和 P53 蛋白的表达呈负相关 ($r=-0.197$, $P=0.04$)。

讨 论

本研究头颈部鳞癌中 HPV 的阳性率为 62.8%,

其中口咽鳞癌的阳性率最高 (70%), 唇鳞癌的阳性率最低 (33.33%), 与国外的研究结果^[1-4] 基本一致, 提示头颈部鳞癌的发生可能和 HPV 感染密切相关。Syrjänen 等^[2] 在 1985 年首先提出, HPV 感染可能和头颈部鳞癌发生有关。此后, 很多研究应用多种检测手段在头颈部鳞癌肿瘤组织中检测到 HPV DNA 和 HPV 肿瘤蛋白^[1-4]。人 HPV 是一种 DNA 病毒, 主要通过感染宿主的上皮/黏膜细胞, 导致细胞发生恶性转化。某些 HPV 的病毒亚型, 如 HPV 16、HPV 18、HPV 31、HPV 33、HPV 35、HPV 39, 致细胞恶性转化能力较强, 被称为“高危 HPV 病毒亚型”。已有的研究显示, HPV 16 和 HPV 18 能引起上呼吸道上皮细胞发生恶性转化, 同时 96% 的 HPV 阳性头颈部鳞癌肿瘤组织中可检测到这两种亚型, 因此认为他们是诱发头颈部鳞状细胞癌的主要类型^[4]。Miller 和 Johnstone^[5] 对 4 680 个肿瘤标本的综述性分析显示, 口腔鳞状细胞癌中 HPV 阳性率为 46.5%, HPV 基因型主要为 HPV 16 和 HPV 18, 其他高危型 HPV 阳性率 $< 1\%$ 。

本研究 HPV 16/18 DNA 的水平与病理学分级呈正相关, 即分化差的头颈鳞癌组织 HPV 感染阳性率高, 和 Poetsch 等^[6] 的研究结果一致。但有研究显示, HPV 感染的头颈部鳞癌和预后更好有关^[7]。两者之间的不一致性有待更多的证据。

本研究未提示头颈部肿瘤中 HPV 16/18 DNA 水平与吸烟、饮酒有明确的相关性。但 Lindel 等^[7] 研究提示非饮酒和非吸烟的肿瘤人群 HPV 阳性率增加, 其原因可能与种族差异和样本量大小有关。

本研究 HPV 16/18 DNA 水平和 P53 蛋白表达呈负相关, 这和 HPV 表达 E6 蛋白有关^[4]。E6 蛋白是 HPV 的重要组成蛋白之一, 含有锌结合序列, 能结合宿主细胞内的 P53 蛋白 (肿瘤抑制蛋白) 形成复合物, 从而诱导 P53 蛋白降解^[8]。P53 蛋白具有抑制细胞生长和促进凋亡的功能, 所以 P53 蛋白降解增多, 可导致细胞周期异常和凋亡障碍, 从而使宿主细胞发生恶性转化的机会增加^[9]。这也是 HPV 感染导致肿瘤发生的重要机制之一。

本研究并未显示 Ki-67 表达与 HPV 16/18 DNA 水平之间的相关性。Ki-67 是一种与细胞周期相关的细胞核非组蛋白, 是目前应用最广泛的评价肿瘤细胞增殖活性的可靠指标。多种实体恶性肿瘤中 Ki-67 表达远高于正常组织, 并与恶性肿瘤的发展、转移及预后有关^[10]。Rittà 等^[8] 研究显示, HPV 阳性的

头颈部鳞癌 Ki-67 蛋白表达较少,提示 HPV 阳性的口咽和口腔鳞癌的预后较好。而赵秋良等^[11]在 14 例喉鳞癌研究中显示, HPV 16/E7 与 Ki-67 表达呈正相关 ($r=0.854$)。本研究未显示类似的统计学结果,可能与肿瘤部位不同和种族差异及样本量大小有关。

本研究表明 HPV 感染和头颈部鳞癌发生密切相关, HPV 可能通过增加 P53 蛋白(抑癌基因蛋白)的降解,导致细胞发生恶性转化。目前,针对宫颈癌的 HPV 预防性疫苗已应用于临床,并具有一定疗效,而针对宫颈癌的治疗性疫苗则处于临床试验阶段。随着研究不断深入, HPV 疫苗有可能成为预防和治理 HPV 阳性的头颈部鳞癌的重要手段之一。

(本文图 1 见插图第 3 页)

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Syrjänen S. Human papillomavirus in head and neck cancer [J]. *J Clin Virol*, 2005, 32(Suppl 1):S59-S66.
- [3] Gillison ML, D'Souza G, Westra W, *et al.* Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(6):407-420.
- [4] De Petrini M, Rittà M, Schena M, *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma: role of the human papillomavirus in tumour progression [J]. *New Microbiol*, 2006, 29(1):25-33.
- [5] Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997 [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2001, 91(6):622-635.
- [6] Poetsch M, Lorenz G, Bankau A, *et al.* Basaloid in contrast to nonbasaloid head and neck squamous cell carcinomas display aberrations especially in cell cycle control genes [J]. *Head Neck*, 2003, 25(11):904-910.
- [7] Lindel K, Beer K, Laissue J, *et al.* Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma [J]. *Cancer*, 2001, 92(4):805-813.
- [8] Rittà M, De Andrea M, Mondini M, *et al.* Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression [J]. *Head Neck*, 2009, 31(3):318-327.
- [9] Westra WH, Taube JM, Poeta ML, *et al.* Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2):366-369.
- [10] Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, *et al.* Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas [J]. *Laryngoscope*, 2009, 119(8):1542-1549.
- [11] 赵秋良, 李海燕. 成人喉乳头瘤组织中 HPV/E7、Ki-67 表达与微血管密度的相关性[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2007, 45(10):1030-1033.

(收稿日期: 2010-03-22)