

高危型人乳头瘤病毒 16 E5 基因对口腔 肿瘤致病机制的研究进展

杨文字¹, 江彤², 陈传俊¹

(1. 安徽医科大学附属省立医院口腔颌面外科 安徽 合肥 230001;

2. 安徽农业大学植物保护学院植物病理教研室 安徽 合肥 230036)

[摘要] 人乳头瘤病毒的感染是宫颈癌发病的重要危险因素之一, 近些年研究表明其在口腔肿瘤及癌前病变中检出率也较高, 提示其与口腔肿瘤发病有关。现有研究主要集中于其 E6、E7 基因的功能, 其他基因涉及较少, 本文对近年来兴起的对人乳头瘤病毒 E5 基因与口腔肿瘤关系的研究及进展作一简要综述。

[关键词] 人乳头瘤病毒; E5 基因; 口腔黏膜

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.06.020

Research progress on high-risk type human papillomavirus 16 E5 gene in the pathogenesis of oral cancer

YANG Wen-yu¹, JIANG Tong², CHEN Chuan-jun¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China; 2. Dept. of Pathology, College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

[Abstract] Human papillomavirus(HPV) infection is one of the important risky factors leading to cervical cancer. Recent studies show that the rate of its detection in oral tumor and precancerous lesions is also high, suggesting its relationship with the pathogenesis of oral tumor. Present research focuses mainly on its E6, E7 genes, less on other genes. In this paper, we discuss the HPV E5 gene, budding in papers of recent years, and make a brief review on the relationship between E5 gene and oral tumor.

[Keywords] human papillomavirus; E5 gene; oral mucosa

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种嗜上皮组织的小双链 DNA 病毒, 现已发现了 100 多种, 具有严格的种属和组织特异性。人类是其唯一的宿主, 仅感染人的皮肤和黏膜上皮, 引起上皮增生性改变。因 HPV 最早在生殖器病变中发现, 故按其与生殖器肿瘤的关系分为低危型和高危型。低危型引起生殖器乳头状瘤或尖锐湿疣, 如 HPV6、11; 高危型与上皮性肿瘤的发生相关, 如 HPV16、18。依据对人体不同部位皮肤和黏膜的嗜向性, 也可将其分为皮肤型和黏膜型。

1 HPV 病毒的结构及功能

1.1 HPV 病毒颗粒的结构及功能

HPV 最早由 Strauss 于 1949 年在电镜下发现,

具有严格的嗜种属特性。HPV 病毒体为直径 50~55 nm 的对称 20 面体, 由 72 个衣壳微粒组成无包膜衣壳; 基因组为双链闭合环状 DNA, 全长为 7 800~8 000 nt, 按功能区域划分为早期转录、晚期转录和非编码区 3 个功能区。其中, 早期转录区又称为 E 区, 一般含有 6 个开放读码框(Open reading frame, ORF), 编码 E1、E2 等早期蛋白, 参与病毒 DNA 的复制、转录、翻译调控和细胞转化功能; 晚期转录区编码衣壳蛋白; 非编码区也称调节区, 可正性或负性调控病毒癌基因的转录。HPV 主要经上皮的微小破损入侵上皮基底细胞层, 导致急性感染, 进而造成宿主细胞持续性感染, 并大量复制、表达 HPV, 引发宿主细胞的不典型增生, 最终整合到宿主上皮细胞基因组中, 此后癌基因便伴随着宿主细胞基因组的表达而表达, 进一步使细胞发生癌变^[1]。

1.2 E 区蛋白的重要作用及研究成果

HPV 在细胞内的生命活动都依赖于 E 区所表

[收稿日期] 2009-12-10; [修回日期] 2010-07-25

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(070413086)

[作者简介] 杨文字(1983—), 男, 安徽人, 硕士

[通讯作者] 陈传俊, Tel: 0551-2634861

达的蛋白,如病毒核酸复制、翻译、细胞转化等。E 区在病毒基因组中的作用非常重要,研究也最为广泛,尤以 E6、E7 基因的研究最为深入。高危型 HPV 的 E6、E7 基因与病毒的致癌性直接相关,将 HPV16、18 的 E6、E7 基因转染于宫颈上皮细胞、耳廓软骨细胞和食管上皮细胞内均可使其发生永生^[2-3]。张志愿等^[4]利用 HPV16 E6、E7 基因成功建立了人类永生口腔上皮细胞系。作为癌变细胞区别于正常细胞的重要表型,永生细胞被认为可能是细胞癌变的前奏,进一步诱变永生细胞^[5]。高危型 HPV E6、E7 基因的致癌性或致永生,主要通过 E6、E7 基因的表达产物与细胞内肿瘤抑制物 p53 和 pRb 结合,使其失活以及激活端粒酶等机制实现的。随着 E6、E7 基因功能进一步地明确,研究的热点渐渐转移到尚未明确的 E5 基因功能上。

2 HPV 病毒与口腔肿瘤的相关性

早在 1983 年, Syrjänen 等^[6]就在口腔鳞癌组织中检出 HPV。流行病学调查显示, HPV 与口腔肿瘤的发生密切相关。Varnai 等^[7]研究了口腔癌前病变的白斑组织发现,所取的组织中 HPV 检出率高达 78.6%,其中高危型占 60.7%。Smith 等^[8]利用 PCR 检测了 201 位口腔颌面部鳞癌和 333 位对照组发现,高危型 HPV16 与口腔颌面部肿瘤相关,且乙醇可能与高危型 HPV 有协同致癌的作用。HPV 还有可能通过性行为,包括非常规的性行为导致口腔与生殖器癌的交互传染^[9]。

在正常口腔黏膜、口腔癌周组织和口腔癌组织中均可检测到 HPV,但 HPV 在肿瘤组织中的检出率明显高于正常黏膜和癌周组织。Zhang 等^[10]发现在中国人正常口腔黏膜和口腔癌组织中, HPV16 和 HPV18 的感染率分别高达 55% 和 74%。印度颌面部肿瘤患者肿瘤组织中 HPV 检出率也达到了 31%,而同等条件下对照组检出率仅 5%^[11]。由于 HPV 感染可能导致口腔癌,故已经有学者以 HPV 的 L1 基因为靶点,用仓鼠为模型开发了治疗口腔癌的 DNA 疫苗,结果显示接种该疫苗后可以在一定程度上防止口腔癌的发生^[12]。

3 E5 基因功能的研究现状及进展

3.1 对 HPV E5 基因功能研究的起因

人们关注 E5 基因的功能首先源于牛乳头状瘤病毒(bovine papillomavirus, BPV)。BPV-1 型

E5 蛋白不仅是其主要的细胞转化蛋白,还可使人类成纤维细胞和上皮细胞发生转化^[13]。BPV-1 型 E5 蛋白位于宿主细胞内膜系统,是一个高度疏水性小分子蛋白,由 44 个氨基酸组成;而以人类为宿主的 HPV16 E5 蛋白含 83 个氨基酸,和 BPV-1 型 E5 蛋白结构十分相似,细胞内分布也基本一致。由此可推测, HPV16 E5 在人体细胞内可能也具有细胞转化作用。

3.2 可诱发转基因小鼠自发皮肤肿瘤

Stöppler 等^[14]报道, E5 可能与细胞致瘤 E6、E7 的致癌性有协同作用。Genther 等^[15]建立了高危型 HPV16 E5 转基因小鼠的模型,经动物体内研究显示: HPV16 E5 在细胞中以配体依赖方式激活表皮生长因子受体,促进上皮基底层以上的棘层、颗粒层等处细胞 DNA 合成,诱发小鼠上皮的异常分化并引发小鼠自发性皮肤肿瘤的发生。

3.3 维持未分化细胞的表型和 DNA 合成能力

Genther 等^[16]利用 E5 缺陷型 HPV16 全基因组转染人类包皮上皮细胞显示, E5 缺失致基底上细胞层的 DNA 合成量下降,对分化细胞内病毒 DNA 的复制无明显影响。体内、体外原位杂交实验显示, E5 的 mRNA 可以在基底细胞中转录,并大量表达在不典型增生和癌前病变标本中。用特异性抗体检测宫颈标本 HPV16 E5 蛋白发现,轻度不典型增生的病例仅在皮下 1/3 细胞层表达,而重度和浸润癌病例则全层上皮表达 E5 蛋白,并与表皮生长因子受体的表达有明显的相关性。上述有关研究说明, HPV16 E5 蛋白在未分化的基底样细胞中合成,提示 E5 可能与维持未分化细胞的表型和 DNA 的合成能力有关。E5 促进基底上细胞层 DNA 的合成可能是 E5 致病性的关键步骤之一。

3.4 逃避免疫监视和免疫清除

HPV16 E5 可以通过上调 HSP70 蛋白和钙联接蛋白,影响组织相容性抗原的成熟及其向浆膜的转运过程,选择性下调组织表达相容性抗原,干扰膜抗原的呈现和 T 细胞的识别,使感染细胞逃离宿主 T 淋巴细胞和 NK 细胞的免疫监视和免疫清除^[17]。Ashrafi 等^[13]也发现, E5 可下调细胞表面 HLA-I 类分子,以逃避免疫监视和免疫清除。这些提示, E5 可能通过各种途径协助感染 HPV 病毒的细胞逃避免疫监视和免疫清除。

3.5 抑制细胞凋亡

利用生物芯片检测 E5 对细胞蛋白表达的影

响,结果显示 E5 蛋白可以利用多种途径影响细胞黏附性、运动性,进而以促进有丝分裂等方式抑制细胞凋亡并建立持续感染的上皮细胞^[18]。持续性感染的上皮细胞是细胞癌变的初始重要阶段^[8],对 E5 蛋白的研究将有助于了解细胞转化和癌变的关系。

4 问题与展望

综上所述,E5 基因可以诱发转基因小鼠上皮细胞瘤变,维持未分化细胞的表型和 DNA 合成,降低肿瘤组织的组织相容性抗原表达水平以逃避免疫监视和免疫清除,并通过抑制细胞凋亡促进建立持续感染的细胞,但这些研究仍不能明确证明 E5 与 HPV 的致癌性的相关性。

Schiffman 等^[19]在比较了不同型 HPV 全基因组序列后发现:E5 基因总是伴随着高危型 HPV 而存在,而低危型 HPV 的基因组一般都缺乏 E5 ORF,或者虽有 E5 ORF 但缺乏翻译 E5 的起始密码子。提示了 E5 基因在 HPV 致癌过程中可能发挥着重要的作用。

挖空细胞是 HPV 感染后光学显微镜下可见的特异性细胞,Krawczyk 等^[20]的研究显示,在 HPV16 E5、E6、E7 基因中均不能单独诱发挖空细胞。他们测试了 3 种基因的多个组合后发现,仅 E5、E6 共转染可以诱发挖空细胞,而 E7 基因的出现可能还会抑制细胞的异型性。进一步研究发现,E5 突变的 10 个终末氨基酸会降低挖空细胞的出现水平,突变 20 个氨基酸后,E5 的促进效果则消失。HPV16 E6、E7 基因调控细胞的异型性是否必须与 E5 基因协同,E5 基因在这一过程中所起的作用都仍需进一步研究。

目前的研究大多关注的是高危型 HPV,对低危型 HPV 相关基因的研究较少。如果对高危型和低危型 HPV 的不同基因进行功能研究,并对其进行比较,可能会带来新的发现。

笔者分析认为,以高危型 HPV16 E5 基因的致癌性为切入点可通过以下 3 方面来探讨 HPV16 E5 对人类正常口腔上皮细胞的转化作用:1)克隆高危型 HPV16 E5 及其突变体并转染正常口腔上皮细胞,以了解 HPV16 E5 本身能否转化细胞或能否使细胞发生永生;2)克隆低危型 HPV 全序列基因组,将其与高危型 HPV16 E5 基因共转染,研究高危型 HPV16 E5 和低危型 HPV 在功能上是否存在协同性,了解高危型 HPV E5 基因能

否增强低危型 HPV 的致病性;3)克隆高危型 HPV16 E5 及其突变体并转染 E6、E7 诱导人永生细胞系,以了解 HPV16 E5 本身是否与 E6、E7 有协同致癌作用。

5 参考文献

- [1] Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(2): 362-372.
- [2] Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation[J]. *Oncogene*, 2003, 22(33): 5201-5207.
- [3] Chen WH, Lai WF, Deng WP, et al. Tissue engineered cartilage using human articular chondrocytes immortalized by HPV-16 E6 and E7 genes[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 76(3): 512-520.
- [4] 张志愿,帕提曼·司地克,曹俊,等. 16型人乳头状瘤病毒E6、E7诱导的人永生口腔上皮细胞系的建立[J]. *中华口腔医学杂志*, 2002, 37(1): 12-14.
- [5] Reddel RR. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 477-484.
- [6] Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus(HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis[J]. *Int J Oral Surg*, 1983, 12(6): 418-424.
- [7] Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, et al. The prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in oral epithelial hyperplasia: Proposal of a concept[J]. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38(2): 181-187.
- [8] Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Human-papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(6): 449-455.
- [9] D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, et al. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection[J]. *J Infect Dis*, 2009, 199(9): 1263-1269.
- [10] Zhang ZY, Sdek P, Cao J, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2004, 33(1): 71-74.
- [11] Koppikar P, deVilliers EM, Mulherkar R. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(6): 946-950.
- [12] Maeda H, Kubo K, Sugita Y, et al. DNA vaccine against hamster oral papillomavirus-associated oral cancer[J]. *J Int Med Res*, 2005, 33(6): 647-653.
- [13] Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, et al. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively do-

wregulates surface HLA class II[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(2) 276-283.

[14] Stöppler MC, Straight SW, Tsao G, et al. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA[J]. *Virology*, 1996, 223(1) 251-254.

[15] Genter SM, Sterling S, Duensing S, et al. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle[J]. *J Virol*, 2003, 77(5) 2832-2842.

[16] Genter Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, et al. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(15) 6534-6542.

[17] Leykauf K, Salek M, Schlüter H, et al. Identification of membrane proteins differentially expressed in human pa-

pillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 6) 1427-1431.

[18] Kivi N, Greco D, Auvinen P, et al. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression[J]. *Oncogene*, 2008, 27(18) 2532-2541.

[19] Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution[J]. *Virology*, 2005, 337(1) 76-84.

[20] Krawczyk E, Supryniewicz FA, Liu X, et al. Koilocytosis: A cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(3) 682-688.

(本文编辑 李彩)

(上接第690页)

[14] Plotino G, Grand NM, Cordaro M, et al. A review on cyclic fatigue testing of nickel-titanium rotary instruments[J]. *J Endod*, 2009, 35(11) 1469-1476.

[15] Kim HC, Yum J, Hur B, et al. Cyclic fatigue and fracture characteristics of ground and twisted nickel-titanium rotary files[J]. *J Endod*, 2010, 36(1) 147-152.

[16] Koch K, Brave D. The EndoSequence file: A guide to clinical use[J]. *Compend Contin Educ Dent*, 2004, 25(10A) 811-813.

[17] Herold KS, Johnson BR, Wenckus CS. A scanning electron microscopy evaluation of microfractures, deformation and separation in EndoSequence and Profile nickel-titanium rotary files using an extracted molar tooth model[J]. *J Endod*, 2007, 33(6) 712-714.

[18] Yared GM, Bou Dagher FE, Machtou P. Cyclic fatigue of ProFile rotary instruments after simulated clinical use[J]. *Int Endod*, 1999, 32(4) 115-119.

[19] Li U, Lee B, Shih C, et al. Cyclic fatigue of endodontic nickel-titanium rotary instruments: Static and dynamic test[J]. *J Endod*, 2002, 28(6) 448-451.

[20] Lopes HP, Ferreira AA, Elias CN, et al. Influence of rotational speed on the cyclic fatigue of rotary nickel-titanium endodontic instruments[J]. *J Endod*, 2009, 35(7) 1013-1016.

[21] Berutti E, Angelini E, Rigolone M, et al. Influence of sodium hypochlorite on fracture properties and corrosion of ProTaper rotary instruments[J]. *Int Endod J*, 2006, 39(9) 693-699.

[22] O'Hoy PY, Messer HH, Palamara JE. The effect of cleaning procedures on fracture properties and corrosion of NiTi files[J]. *Int Endod J*, 2003, 36(11) 724-732.

[23] Nóvoa XR, Martín-Biedma B, Varela-Patiño P, et al.

The corrosion of nickel-titanium rotary endodontic instruments in sodium hypochlorite[J]. *Int Endod J*, 2007, 40(1) 36-44.

[24] Viana AC, Gonzalez BM, Bueno VT, et al. Influence of sterilization on mechanical properties and fatigue resistance of nickel-titanium rotary endodontic instruments[J]. *Int Endod J*, 2006, 39(9) 709-715.

[25] Hilt BR, Cunningham CJ, Shen C, et al. Torsional properties of stainless-steel and nickel-titanium files after multiple autoclave sterilizations[J]. *J Endod*, 2000, 26(2) 76-80.

[26] Chaves Craveiro de Melo M, Guiomar de Azevedo Bahia M, Lopes Bueno VT. Fatigue resistance of engine-driven rotary nickel-titanium endodontic instruments[J]. *J Endod*, 2002, 28(11) 765-769.

[27] Schafer E. Effect of sterilization on the cutting efficiency of PVD-coated nickel-titanium endodontic instruments[J]. *Int Endod J*, 2002, 35(10) 867-872.

[28] Alexandrou GB, Chrissafis K, Vasiladis LP, et al. SEM observations and differential scanning calorimetric studies of new and sterilized nickel-titanium rotary endodontic instruments[J]. *J Endod*, 2006, 32(7) 675-679.

[29] 付梅, 侯本祥. 根管内折断器械取出的影响因素[J]. *北京口腔医学*, 2008, 16(3) 172-173.

[30] 沈雅, 彭彬, 范兵, 等. 镍钛合金根管器械折断的临床分析[J]. *中华口腔医学杂志*, 2004, 39(1) 38.

[31] 袁理, 岳林, 王嘉德. Hero642镍钛锉断裂损伤的形态研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2006, 22(5) 604-607.

[32] 郭威, 吴友农, 朱庆萍. 根管预备器械折断因素的分析[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2005, 15(11) 645-648.

(本文编辑 李彩)