

· 综述：头颈肿瘤 ·

头颈鳞状细胞癌人乳头状瘤病毒检测进展

冯守昊 徐伟

250021 济南, 山东大学附属省立医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者: 徐伟, Email: xuwhns@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4106.2018.01.002

【摘要】 不同部位的头颈鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN)病因学并不完全相同,但由于均起源于消化道、呼吸道的鳞状上皮黏膜,仍然有一些共同的风险因素。目前公认的SCCHN的风险因素是吸烟和饮酒。除此之外,人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的某些高风险亚型,已证实在SCCHN的发生、发展过程中起始和促进作用。而且HPV阳性的SCCHN患者,对于放化疗的反应效果更好,预后也好于HPV阴性的患者。HPV感染与SCCHN的发病密切相关,不同的检测方法、肿瘤不同的解剖位置起源、研究人群的地缘差异、样本来源年代的不同导致了SCCHN患者HPV感染率的差别很大。因此,如何有效、快速、经济、简单地检测SCCHN组织样本的HPV感染状态,越来越受到人们的重视。

【关键词】 乳头状瘤病毒科; 头颈部肿瘤

Progress in the detection of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck Feng Shouhao, Xu Wei

Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China

Corresponding author: XU Wei, Email: xuwhns@126.com

【Abstract】 Squamous cell carcinomas of the head and neck (SCCHN), which comprise a heterogeneous group of malignancies derived from the squamous epithelial mucosa of the upper aerodigestive tract, share some similar but not all the same risk factors. Heavy consumption of alcohol and/or tobacco use is the main risk factor. However, infection with oncogenic human papillomavirus (HPV) has been demonstrated to play an important role in the carcinogenesis in a subset of SCCHN, especially in oropharyngeal carcinoma. And HPV+ SCCHN has a better response to chemotherapy/radiotherapy and a better prognosis. The HPV prevalence differs in literatures, due to different detection methods, anatomic sites of tumors, geographical locations and time of study populations. Therefore there is an increasing demand for effective, rapid, economic and simple methods to evaluate the status of HPV infection in tumor tissues of SCCHN.

【Key words】 Papillomaviridae; Head and Neck Neoplasms

据世界卫生组织(WHO)统计,全世界每年有500多万人死于各种癌症,每年各种癌症患者多达2200万人。而头颈鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN),根据其原发解剖位置主要包括口腔癌、口咽癌、下咽癌和喉癌,是世界范围内第六常见肿瘤,每年有超过60 000例新患者被诊断为该疾病^[1]。目前对SCCHN患者主要采用传统的手术治疗和(或)放化疗等综合治疗。而以西妥昔单抗为代表的靶向药物的使用,是SCCHN治疗领域方面的重大进展^[2]。另外,免疫治疗在SCCHN的治疗研究领域也逐渐开展起来^[3]。

SCCHN起源于上呼吸消化道的鳞状上皮黏膜,主要包括口腔、口咽、下咽和喉(而不包括鼻咽),并且有着一些共同的风险因素。目前公认最主要的SCCHN的风险因素是吸烟和饮酒^[4-5]。而越来越多的研究证实高危亚型的人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染与SCCHN(特别是口咽癌)的发病风险存在相关性^[6-7]。其中最常见的高危亚型是HPV16,大约占有HPV阳性的SCCHN中的90%,另外一些常见的亚型包括HPV18、HPV31、HPV33等^[8]。

【临床研究中HPV检测的意义】 越来越多的研究

证实, HPV阳性的SCCHN患者比HPV阴性的患者对放疗的反应更有效, 其生存率也更高^[9-11]。因此有人认为, 对于HPV阳性的SCCHN患者的治疗, 应该有别于HPV阴性的患者, 例如HPV疫苗的使用、低强度的放疗^[12]。目前美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)的官方指南并未推荐医师检测SCCHN患者HPV感染状态来指导临床治疗策略。但是北美一项面向耳鼻咽喉头颈外科医师、肿瘤放疗医师及病理科医师的调查研究发现, 58.3%的美国和加拿大医师已经开始通过检测HPV感染状态来指导口咽癌的临床治疗^[13]。

【HPV的检测方法】 肿瘤抑制因子p16, 位于染色体9p21, 是细胞周期抑制因子INK4家族的一员。在Rb信号通路中, p16结合细胞周期蛋白依赖激酶CDK4和CDK6, 维持了Rb基因与转录因子E2F结合的低磷酸化状态, 阻止了细胞周期的进展^[14]。在非HPV相关的SCCHN中, 各种遗传和非遗传的改变往往导致p16基因的失活, 从而使p16处于一个低表达状态^[15]。而对于高危亚型HPV整合入宿主基因组的SCCHN, 其p16往往是高表达的。HPV DNA的整合, 导致了病毒E2启动子的删除, 进而启动了病毒E6和E7蛋白的转录^[16]。E6蛋白结合野生型p53, 使之失活而不再具备“分子警察”的作用, 导致了DNA突变的积累并最终增加了细胞的遗传不稳定性^[17]。E7蛋白结合Rb基因, 使Rb基因释放E2F; 或者E7结合CDK的抑制因子, 增加了磷酸化Rb的水平, 促使了细胞周期的进展。p16作为CDK的抑制因子, 在HPV阳性的SCCHN细胞中反馈性地过表达。所以在SCCHN中(特别是口咽癌), p16过表达可以间接地反映HPV在肿瘤中为感染阳性且转录激活的状态。但是需要注意的是, p16也可以通过其他机制增强表达, 而不是仅仅只依靠Rb通路^[18]。这可以解释一些SCCHN患者p16过表达而HPV阴性的情况。

基于此, 可以通过检测以下验证HPV的感染情况: HPV的DNA; HPV整合入宿主基因组后转录的mRNA E6、E7; E6、E7原癌蛋白; 宿主中表达改变的细胞蛋白, 例如p16; 血清中存在的针对HPV原癌蛋白的特异性抗体。

评价一种HPV检测方法的值取决于该方法识别HPV感染以及HPV是否在肿瘤发生、发展过程中起作用的能力。使用PCR技术检测HPV的DNA, 是评价样本是否存在HPV感染的“金标准”。但该方法仅能评价样本的感染情况, 而不能区分HPV是否存在转录活性, 也就是说不能评价HPV是否在肿瘤的发生、发展中起作用。

例如, HPV污染样本, 或者HPV仅仅是一种“过客病毒(passenger virus)”, 并不在肿瘤发生的过程中起作用。如果样本中能检测出E6和E7蛋白, 表明该样本中的HPV是有转录活性的, 这是被公认为HPV在肿瘤发生、发展过程中起作用的“金标准”。然而由于缺乏可靠的E6和E7蛋白的免疫组化探针, 所以在实际的试验检测中, 检测E6/E7的mRNA是特异性和敏感性都很高的实验方法。但使用反转录PCR检测mRNA, 对样本的要求很高, 往往需要新鲜冰冻组织提取的RNA。尽管目前已有技术可以从福尔马林固定石蜡包埋的组织(formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE)提取RNA并进行检测, 但仍需大样本量的研究进一步证实^[19]。有研究以反转录PCR检测冰冻组织中的E6/E7 mRNA作为“金标准”参照, 检验了p16免疫组化技术的特异性和敏感性, 认为p16免疫组化可以作为检测HPV感染状况的替代技术^[20]。而且p16免疫组化具有花费少、检测样本要求低(以FFPE为研究对象)等优点。但之前已经提到, p16可能通过其他机制表达增强, 因此部分肿瘤存在p16过表达而实际的HPV感染却为阴性, 导致了该技术检测HPV有一定的假阳性, 而且这种情况更多地发生在非口咽癌的SCCHN中^[21]。采用原位杂交方法检测HPV的DNA, 特异性很高, 但敏感性较低, 且不能判断HPV是否处于转录激活状态。

杂交捕获二代技术是以细胞学样本为研究材料, 检测样本中的13种高危亚型HPV的感染情况(包括16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59和68)。作为一种已经商业化的检测技术, 已经被美国食品与药品管理委员会(FDA)批准应用于宫颈癌中HPV的检测^[22]。目前有少量研究采用该方法检测SCCHN中的HPV感染情况^[23-24]。与传统的检测方法相比, 该试验方法具有以下优点: 检测样本为细胞学组织, 可以更加容易地收集而不需要经过肿瘤组织微解剖、福尔马林固定或者其他样本处理步骤; 收集到的样本保存于液态介质里, 保存和运输更加方便, 并且有效地减少了样本中遗传物质的降解; 检测的操作步骤自动化程度高, 使检测方法具有很高的可重复性; 检测耗时短, 可在检测当日得到结果, 有助于临床医师根据HPV感染结果决定治疗策略和临床研究分组; 花费少。但该检测方法能否作为在SCCHN中检测HPV的有效可行的手段, 仍需进一步的研究来认证。

在临床研究中, 最理想的检测HPV方法不仅要保证较高的敏感性和特异性, 还需要具备有效、经济、简单、可重复性高等条件。而目前来看, 还没有哪一种特定的技术手段能完全符合上述条件, 都有各自的优缺点(表1);

表1 HPV检测方法的优劣性比较

检测方法	优点	缺点
DNA PCR	高敏感性和高特异性	不能评价HPV是否有转录活性, 组织需要特殊处理 (DNA提取)
DNA原位杂交	高特异性, 可应用于经过固定的组织, 可区分病毒的分	低敏感性
mRNA RT-PCR	高敏感性和特异性, 可评估病毒的转录活性	对实验材料要求高 (新鲜冰冻组织), 组织需要特殊处理 (RNA提取)
p16免疫组化	高敏感性, 能较好地反应病毒的转录活性, 可应用于经过固定的组织, 可区分病毒的分	特异性有争议
病毒蛋白ELISA	对实验材料要求低 (血清或其他细胞学组织)	低敏感性和特异性, 不能评价病毒是否在肿瘤发生发展中是否起作用
杂交捕获二代	对实验材料要求低 (细胞学组织)	特异性和敏感性需进一步的研究验证

往往需要几种技术手段联合起来应用。Smeets等^[19]提出了一种经济、准确的技术手段组合, 即使用免疫组化检测FFPE样本中p16的感染情况, 如果p16为阳性, 再使用PCR方法检测样本中HPV DNA。两种检测方法均为阳性, 即认为HPV在该样本的癌灶发生、发展中起初始作用。

【SCCHN的HPV感染率】不同的文献对SCCHN的HPV感染率的报道结果相差很大(0~100%)^[8, 25]。导致研究结果差异的原因, 主要有以下几点: ①不同的人群, 其人文风俗、生活习惯 (特别是性观念和性交方式) 存在的差异导致了不同地区的SCCHN患者中HPV感染率的不同; ②由于时代的发展, 吸烟饮酒人群比例降低, 而性观念逐渐开放, 导致了不同病因致癌的比例随年代变化而有所不同; ③HPV检测过程的各种差异, 包括检测方法技术和试剂的不同、检测样本的多样性、HPV检测谱的限制和HPV诊断标准的差异; ④部分研究者对于肿瘤原发解剖位置的错误分类, 也可以部分解释不同文献对于SCCHN的HPV感染率报道的差异; ⑤非常重要的一点, 是不同解剖位置来源的SCCHN, 其HPV感染率不同, 口咽癌 (特别是原发于腭扁桃体和舌根的癌灶) 的感染率远高于其他部位的肿瘤^[26]。

不同解剖位置来源的SCCHN, 其病因、肿瘤组织病理形态、对治疗的反应以及预后有着相当大的区别, 但人们长期将该点忽视, 往往将口腔癌、口咽癌、下咽癌和喉癌归为一大类, 统称为SCCHN。但HPV在不同解剖位置来源的SCCHN中, 其感染率相差很大 (特别是非口咽癌的SCCHN)。一篇包含了1990年7月~2012年2月发表的共148篇文献的荟萃分析提出, HPV DNA在口咽癌、喉癌 (该文献将下咽癌归入喉癌组中一起分析)、口腔癌的阳性率分别为45.8% (95%CI 38.9~52.9)、22.1% (95%CI 16.4~28.3)、24.2% (95%CI 18.7~30.2)^[25]。而最近一项包括了欧洲、美洲、亚洲、非洲共29个国家44个医疗中心的研究, 报道的HPV DNA阳性率在口咽癌、喉癌、下咽癌、口腔癌中分别为24.9%、5.7%、3.9%、7.4%。如果考虑到DNA阳性样本中p16或E6 mRNA阴性的情况, 其HPV感

染率更低^[27]。国内一项研究检测了256例SCCHN (下咽癌20例、喉癌159例、鼻咽癌77例) 的HPV, 阳性率仅为3.5%^[28]。该团队在另一篇文献中报道了674例喉癌患者的HPV阳性率为4.9%^[29]。

总而言之, 由HPV感染致癌的比例在口咽癌中较高, 但在其他解剖部位起源的SCCHN中, HPV的感染率总体来说是比较低的, 且不同文献报道的差异较大, 仍需进一步的研究提供大样本量的数据。

基于HPV在SCCHN中的重要意义, 在未来的临床研究中对患者进行HPV感染状态的检测是十分必要的。目前HPV的检测方法, 主要有DNA PCR技术、DNA原位杂交技术、mRNA RT-PCR技术、p16蛋白免疫组化技术、血清病毒蛋白ELISA技术以及杂交捕获二代技术。检测方法的选择及研究人群、研究年代、肿瘤起源的解剖位置差异, 都是导致SCCHN的HPV检测率相差很大的原因。采用何种检测方法能更加有效、简捷、经济地评估SCCHN的HPV感染状态, 仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000[J]. Int J Cancer, 2001, 94(2): 153-156.
- [2] Bonner JA, Ang K. More on severe cutaneous reaction with radiotherapy and cetuximab[J]. N Engl J Med, 2007, 357(18): 1872-1873; author reply 1873. DOI: 10.1056/NEJMc076359.
- [3] Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(29): 3293-3304. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.1509.
- [4] Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(2): 127-135. DOI: 10.1038/nrc1549.
- [5] Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(1): 9-22. DOI: 10.1038/nrc2982.
- [6] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4): 321-322.
- [7] Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers[J]. Int J Cancer, 2004, 108(5): 766-772.

- DOI: 10.1002/ijc.11633.
- [8] 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. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.
- [9] 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.
- [10] Richards L. Human papillomavirus-a powerful predictor of survival in patients with oropharyngeal cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(9): 481. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.123.
- [11] Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(1): 24-35. DOI: 10.1056/NEJMoa0912217.
- [12] Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges[J]. *Oncologist*, 2005, 10(7): 528-538. DOI: 10.1634/theoncologist.10-7-528.
- [13] Maniakas A, Moubayed SP, Ayad T, et al. North-American survey on HPV-DNA and p16 testing for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2014, 50(10): 942-946. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.07.004.
- [14] Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging[J]. *Cell*, 2006, 127(2): 265-275. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.003.
- [15] Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, et al. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9381-9390. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0801.
- [16] Strati K, Lambert PF. Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11585-11593. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3007.
- [17] Münger K, Basile JR, Duensing S, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein[J]. *Oncogene*, 2001, 20(54): 7888-7898. DOI: 10.1038/sj.onc.1204860.
- [18] Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, et al. Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(24): 6200-6209.
- [19] Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(11): 2465-2472. DOI: 10.1002/ijc.22980.
- [20] Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer[J]. *Mod Pathol*, 2011, 24(10): 1295-1305. DOI: 10.1038/modpathol.2011.91.
- [21] Dalianis T, Grün N, Koch J, et al. Human papillomavirus DNA and p16(INK4a) expression in hypopharyngeal cancer and in relation to clinical outcome, in Stockholm, Sweden[J]. *Oral Oncol*, 2015, 51(9): 857-861. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2015.06.002.
- [22] Carozzi FM, Del MA, Confortini M, et al. Reproducibility of HPV DNA Testing by Hybrid Capture 2 in a Screening Setting[J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 124(5): 716-721. DOI: 10.1309/84E5-WHJQ-HK83-BGQD.
- [23] Bishop JA, Maleki Z, Valsamakis A, et al. Application of the hybrid capture 2 assay to squamous cell carcinomas of the head and neck: a convenient liquid-phase approach for the reliable determination of human papillomavirus status[J]. *Cancer Cytopathol*, 2012, 120(1): 18-25. DOI: 10.1002/cncy.20175.
- [24] Smith DF, Maleki Z, Coughlan D, et al. Human papillomavirus status of head and neck cancer as determined in cytologic specimens using the hybrid-capture 2 assay[J]. *Oral Oncol*, 2014, 50(6): 600-604. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.02.011.
- [25] Ndiaye C, Mena M, Alemany L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(12): 1319-1331. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70471-1.
- [26] Westra WH. Detection of human papillomavirus in clinical samples[J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2012, 45(4): 765-777. DOI: 10.1016/j.otc.2012.04.001.
- [27] Castellsagué X, Alemany L, Quer M, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(6): djv403. DOI: 10.1093/jnci/djv403.
- [28] Xu Y, Liu S, Yi H, et al. Low prevalence of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Chinese patients[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(2): 281-286. DOI: 10.1002/jmv.24052.
- [29] Xu Y, Liu S, Yi H, et al. Human papillomavirus infection in 674 Chinese patients with laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115914. DOI: 10.1371/journal.pone.0115914.
- (收稿日期: 2016-09-25)