

## 喉癌组织中 HPV16 及其早期区基因 E6、E7 蛋白的表达及意义

叶青<sup>1,2</sup>, 赵舒薇<sup>1\*</sup>, 何金<sup>3</sup>, 强笔<sup>1</sup>, 英信江<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院耳鼻咽喉科, 上海 200003; 2. 长征医院附属闸北分院耳鼻咽喉科, 上海 200070; 3. 长征医院病理科)

**[摘要]** **目的:**观察喉癌组织中 HPV16 及其早期区基因 E6、E7 蛋白的表达, 并初步分析其与喉癌组织临床分期、病理分级的相关性。**方法:**147 例喉组织标本, 其中喉鳞状细胞癌组织 82 例, 非癌组织 39 例(声带息肉 27 例, 距肿瘤 >1.0 cm 的癌周正常组织 12 例), 癌前病变(声带白斑)26 例。免疫组织化学检测各组标本中 HPV16 及其早期区基因 E6、E7 蛋白的表达。分析喉鳞癌组织中 3 种蛋白表达情况与临床分期、病理分级的相关性。**结果:**喉鳞癌组织中 HPV16 蛋白及 E6、E7 蛋白的阳性率明显高于癌前病变组织( $P < 0.05$  或  $0.01$ ), 后者高于非癌组织( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。非癌组织中 HPV16 蛋白阳性率明显高于 E6、E7 蛋白的表达( $P < 0.05$  或  $0.01$ ), 而喉癌组织及癌前组织中三者间无显著差异。不同临床分期(I~IV 期)及不同病理分级(I~III 级)喉癌组织中 HPV16 的阳性率间有显著差异( $P < 0.05$ ); 而不同临床分期及病理分级间 HPV16 E6、E7 蛋白表达率无显著差异。**结论:**HPV16 感染后其早期区基因 E6、E7 的表达可能是诱发喉癌的因素之一, 应用免疫学方法抑制 E7 蛋白的表达对于喉癌的治疗有积极的意义, 但其预防和治疗作用不应过分夸大。

**[关键词]** 喉肿瘤; 癌, 鳞状细胞; HPV16 蛋白; HPV16 E6 蛋白; HPV16 E7 蛋白

**[中图分类号]** R 739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0064-04

### Protein expression of HPV16 and its early gene E6, E7 in human laryngeal squamous cell carcinoma and its significance

YE Qing<sup>1,2</sup>, ZHAO Shu-wei<sup>1\*</sup>, HE Jin<sup>3</sup>, QIANG Bi<sup>1</sup>, YING Xin-jiang<sup>1</sup> (1. Department of Otolaryngology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Otolaryngology, Zhabei Branch of Changzheng Hospital, Shanghai 200070; 3. Department of Pathology, Changzheng Hospital)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the protein expression of HPV16 and its early gene E6, E7 in human laryngeal squamous cell carcinoma tissues, and to analyze their relationship with the clinical stage and pathological classification of laryngeal squamous cell carcinoma. **Methods:** The expression of HPV16, HPV16 E6, and HPV16 E7 protein was detected in 147 specimens of different laryngeal lesions immunohistochemically. The specimens included 82 laryngeal carcinoma, 39 non-carcinoma tissues (including 27 specimens of vocal cord polyp and 12 specimens of normal laryngeal tissues taken from more than 1.0 cm adjacent to the carcinoma), and 26 precancerous lesions (leukoplakia) of the larynx. The relationship between the protein expression with the clinical stage and histopathological classification of laryngeal squamous cell carcinoma was analyzed.

**Results:** The positive rates of HPV16, HPV16 E6, and HPV16 E7 protein in precancerous tissues (30.77%, 26.92%, and 26.92%, respectively) were significantly lower than those in laryngeal carcinoma lesions (45.12%, 39.02%, and 42.68%, respectively;  $P < 0.05$  or  $0.01$ ), but were significantly higher than those in non-carcinoma tissues (23.08%, 5.13%, and 2.56%, respectively;  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). In non-carcinoma tissues, the positive rate of HPV16 protein was significantly higher than that of E6 or E7 ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ), while there was no difference between their positive rates in laryngeal carcinoma or precancerous lesions. We found that human laryngeal carcinoma tissues with different clinical stages and different pathological classifications also had different positive rate of HPV16 protein ( $P < 0.05$ ), but they had a similar positive rate of HPV16 E6 and E7. **Conclusion:** The expression of HPV16 E6, E7 proteins after the HPV16 infection might be one of the reasons for development of human laryngeal carcinoma. Inhibition of HPV16E7 expression by immunologic strategy may have a potential for treatment of laryngeal carcinoma.

**[KEY WORDS]** laryngeal neoplasms; carcinoma, squamous cell; HPV16 protein; HPV16 E6 protein; HPV16 E7 protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 64-67]

喉癌是耳鼻咽喉科常见的恶性肿瘤, 在头颈部上皮来源的原发恶性肿瘤中排第 2 位, 且近年来其发病率在全世界范围内有上升趋势, 严重威胁人类的健康, 影响生活质量。目前针对喉癌的研究很多, 但其确切的发病机制尚不甚清楚。人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一类感染复层鳞

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30371610); 上海市闸北区自然科学基金(2006 一般 01)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30371610) and Natural Science Foundation of Shanghai Zhabei District(2006 General 01)。

**[作者简介]** 叶青, 博士, 副教授, 副主任医师。

E-mail: boby25@gmail.com

\* Corresponding author. E-mail: zhaoshw@citiz.net

状上皮的小 DNA 肿瘤病毒,目前已发现超过 100 余种基因型。根据此类病毒初始阶段感染部位的不同,将其分为皮肤型或黏膜型,其中的黏膜型 HPV 又可进一步分为高危型、低危型。

目前,有关 HPV 与喉癌相关性的研究已非常深入,已有研究<sup>[1]</sup>证实高危型 HPV 如 HPV 16、18 及其早期编码区基因 E6、E7 表达蛋白与口咽部肿瘤包括喉癌的发生有关。前期研究<sup>[2]</sup>已成功构建 HPV16 E7-HSP70 融合基因,拟将其用于研制喉癌疫苗。但目前免疫治疗相关的基础研究还很薄弱,临床应用的可行性还缺乏重要的理论依据。因此,本研究应用免疫组化方法检测喉癌组织中 HPV16 及其早期编码基因 E6、E7 蛋白的表达,并初步分析它们与喉癌组织临床病理因素的相关程度,为进一步评价肿瘤免疫治疗的可行性及效果奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 选取 1996 年以来在本科因喉部疾患住院手术患者的病理组织标本 147 例,其中喉鳞状细胞癌 82 例,非癌组织 39 例(声带息肉 27 例,距肿瘤 > 1.0 cm 的癌周正常组织 12 例),癌前病变(声带白斑)26 例,均经病理证实。

喉鳞状细胞癌患者 82 例,男 58 例,女 24 例,年龄 44~79 岁,平均(60.44±10.81)岁,按 1997 年国际抗癌联盟(UICC)标准进行临床分期,其中 I 期 13 例,II 期 17 例,III 期 30 例,IV 期 22 例;按肿瘤分化程度将其分为 3 级,其中 I 级(高度分化)22 例,II 级(中度分化)32 例,III 级(低度分化)28 例。所有患者术前未经放疗和化疗。

1.2 试剂 实验用兔抗人 HPV16 单克隆抗体、兔抗人 HPV16 E6 单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司,兔抗人 HPV16 E7 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,所用 EnVision™+

加强型免疫组织化学染色试剂盒(K400011)购自 DAKO 公司。

### 1.3 EnVision 法检测喉组织中 HPV16、E6、E7 蛋白表达

1.3.1 染色方法 石蜡切片脱蜡至水,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 10 min 清除内源性过氧化物酶,蒸馏水漂洗;加入单克隆抗体(兔抗人 HPV16/HPV16 E6/HPV16 E7)4℃ 过夜;EnVision™+ 孵育 30 min,各步骤之间均用 PBS 洗片,常规 DAB 显色 5~10 min,复染,封片。用已知 HPV16、HPV16 E6、HPV16 E7 反应阳性的宫颈癌切片作阳性对照,PBS 替代一抗作阴性对照。

1.3.2 结果判定 HPV16、HPV16 E6、HPV16 E7 蛋白染色阳性均为细胞核染色,以出现棕黄色颗粒为阳性;在高倍镜下(×400)对每张切片随机选择 5 个视野,每个视野计数 200 个肿瘤细胞,共计 1 000 个。阳性细胞数 < 5% 为阴性(-),5%~25% 为弱阳性(+),25%~50% 为中度阳性(++),> 50% 为强阳性(+++)。+、++、+++ 为阳性表达,- 为阴性表达。

1.4 喉癌组织 3 种蛋白表达与疾病分级、分期的相关性分析 统计 82 例喉癌组织不同临床分期(I~IV 期)及不同病理分级(I~III 级)下 HPV16、HPV16 E6、E7 蛋白的表达情况,分析蛋白表达与临床分期和病理分级的相关性。

1.5 统计学处理 根据资料类型采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 不同组别喉黏膜组织 HPV16 及 E6、E7 蛋白的表达

2.1.1 一般染色情况 HPV16、HPV16 E6、HPV16 E7 蛋白阳性均表现为细胞核着色,阳性细胞核呈棕色或棕黄色细网状或粗大颗粒状,色泽深浅不等。喉癌组织中阳性细胞多呈灶状或弥漫性分布,染色深(图 1)。

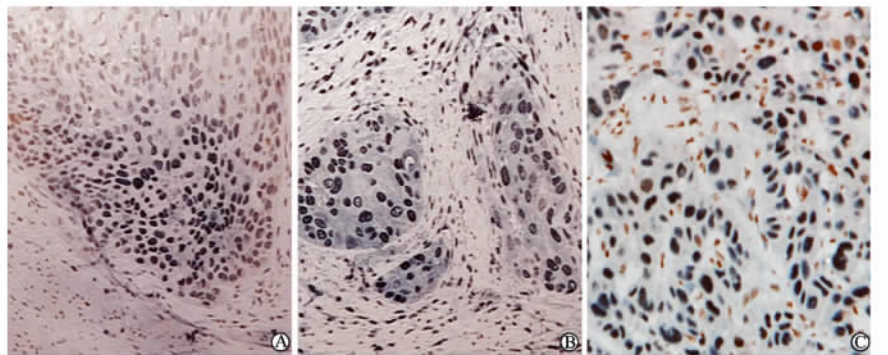


图 1 喉癌组织中 HPV16(A)、E6(B)和 E7(C)蛋白免疫组化染色结果

Fig 1 Expression of HPV16 protein(A), HPV16 E6 protein(B), and HPV16 E7 protein(C) in human laryngeal squamous cell carcinoma tissues (EnVision, ×200)

2.1.2 各组间3种蛋白阳性表达情况 HPV16、HPV16 E6、HPV16 E7蛋白的表达从非癌组织到癌前病变直至鳞癌呈上升趋势。HPV16的阳性率在非癌、癌前病变及喉癌组织中的阳性率分别为23.08%(9/39)、30.77%(8/26)和45.12%(37/82),有显著性差异( $P<0.05$ ); HPV16 E6的阳性率在非癌、癌前病变及喉癌组织中的阳性率分别为5.13%(2/39)、26.92%(7/26)和39.02%(32/82),有非常显著的差异( $P<0.01$ ); HPV16 E7的阳性率在非癌、癌前病变及喉癌组织中的阳性率分别为2.56%(1/39)、26.92%(7/26)和42.68%(35/82),有非常显著的差异( $P<0.01$ )。

值得注意的是,进一步观察各组中 HPV16 的阳性率与 HPV16 E6、HPV16 E7 阳性率的关系,发

现非癌组织中 HPV16 的阳性率明显高于 HPV16 E6( $P<0.05$ )及 HPV16 E7( $P<0.01$ );而喉癌组织及癌前病变组织中三者间无显著差异。这提示喉癌的发生可能与 HPV16 E6、HPV E7 蛋白的表达有关。

2.2 喉鳞癌组织中3种蛋白的表达与临床分期、病理分级的相关性

2.2.1 不同临床分期喉鳞癌组织中3种蛋白的表达 I~IV期喉癌组织 HPV16、HPV16 E6、HPV16 E7蛋白的阳性表达率呈上升趋势,但仅 HPV16 的阳性率在各不同分期中有显著性差异( $P<0.05$ ), HPV16 E6、HPV16 E7 蛋白表达的阳性率在各期间无显著差异。详见表1。

表1 不同临床分期、病理分级喉鳞癌组织中 HPV16 及 E6、E7 蛋白的表达

Tab 1 Expression of HPV16, HPV16 E6, and HPV16 E7 proteins in human laryngeal squamous cell carcinoma of different clinical stages and histopathological grades

Protein	Clinical stage				Histopathological grade		
	I (N=13)	II (N=17)	III (N=30)	IV (N=22)	I (N=22)	II (N=32)	III (N=28)
	Positive expression of HPV16	3(23.08)	8(47.06)	11(36.67)	15(68.18)	6(27.27)	13(40.63)
Positive expression of HPV16 E6	2(15.38)	10(58.82)	10(33.33)	10(45.45)	6(27.27)	12(37.50)	14(50.00)
Positive expression of HPV16 E7	3(23.08)	6(35.29)	12(40.00)	14(63.64)	6(27.27)	14(43.75)	15(53.57)

The expression of HPV16 protein was significantly different in carcinoma of different clinical stages and histopathological grades,  $P<0.05$

2.2.2 不同病理分级喉鳞癌组织中3种蛋白的表达 I~III级喉癌组织 HPV16、HPV16 E6、HPV16 E7蛋白的阳性表达率呈上升趋势,但仅 HPV16 的阳性率在不同分级间有显著性差异( $P<0.05$ ), HPV16 E6、HPV16 E7 蛋白表达的阳性率在各级间无显著差异。详见表1。

3 讨论

HPV 病毒是标准双链 DNA 病毒,约含 8 000 个核苷序列,包含不同种类的基因型。但不同种类 HPV 基因型的构成基本相同,主要含 3 个区域:早期区(E)编码病毒的调整、转换及蛋白复制,晚期区(L)L1 和 L2 编码壳结构蛋白,以及非编码区。其中 E 区编码基因具有多种功能:E1 区为 ATP 酶并提供病毒复制初始化所必需的激活;E2 区调节病毒的转录与复制;E4 区与病毒微粒中蛋白质的成熟及释放有关;E5 区可能具有转换潜力,尚未完全证实;而 E6 和 E7 则为增殖性 HPV 的主要转换蛋白<sup>[3]</sup>。

目前不少研究发现 HPV 感染与人类肿瘤的发生密切相关。Tjalma 等<sup>[4]</sup>发现,几乎所有宫颈鳞癌

及绝大多数腺癌 HPV 检测为阳性。Kim 等<sup>[5]</sup>认为 HPV 感染可能是导致宫颈癌的初始条件,宫颈癌的发生尚与其他因素如致癌 RNA 病毒所处的环境等有关。视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)肿瘤抑制基因是重要的抑癌基因, HPV 结合入基因组将导致 p53 及 Rb 路径的失活。因此,有研究者认为 HPV16 可能通过其早期基因 E7 的表达使 Rb 基因失活,导致肿瘤的发生<sup>[5-6]</sup>。在喉癌的研究中,王斌全等<sup>[7]</sup>发现,喉癌组织中存在 Rb 基因突变,但 Rb 基因突变与喉癌病程无关,认为 Rb 基因突变在喉癌的发生初期可能起一定作用。英信江等<sup>[8]</sup>发现,喉癌组织中 HPV16 E7 与 Rb 的表达呈显著的负相关,分析二者可能有一定的相关性。

本研究结果表明,喉癌组织中 HPV16 蛋白及 HPV16 E6、E7 蛋白的阳性率明显高于癌前病变组织,后者高于非癌组织 ( $P<0.05$  或  $0.01$ )。这说明 HPV16 的感染及其早期区基因 E6、E7 的表达可能是诱发喉癌的重要因素。不同临床分期(I~IV期)及病理分级(I~III级)喉癌组织中 HPV16 的阳性率有显著差异( $P<0.05$ ),而不同临床分期及病理

分级间 HPV16 E6、E7 蛋白表达率无显著差异。这说明 HPV16 感染及 E6、E7 蛋白的激活并非导致喉癌发生、发展的惟一因素,一些其他因素也会导致疾病的进展,有待于进一步的研究观察。本研究结果表明应用免疫学方法抑制 HPV16 E7 蛋白的表达对于喉癌的治疗可能会有一定的意义,但考虑到喉癌患者中 HPV16 E7 的感染率为 42.67%,对其预防和治疗作用应客观评价。

## [参考文献]

- [1] Collins A S, Nakahara T, Do A, et al. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle[J]. J Virol, 2005, 79: 14769-14780.
- [2] 赵舒薇, 邱杰, 英信江, 等. HPV16 E7-HSP70 融合基因原核表达质粒的构建和鉴定[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 13: 67-70.
- [3] Harwood C A, McGregor J M, Proby C M, et al. Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer [J]. J Clin Pathol, 1999, 52: 249-253.
- [4] Tjalma W A, Van Waes T R, Van den Eeden L E, et al. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2005, 19:469-483.
- [5] Kim Y T, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma[J]. Yonsei Med J, 2005, 46: 597-613.
- [6] Salcedo M, Taja L, Utrera D, et al. Changes in retinoblastoma gene expression during cervical cancer progression[J]. Int J Exp Pathol, 2002, 83: 275-286.
- [7] 王斌全, 陈彦球, 温树信, 等. 喉癌组织 RB 基因突变及其与临床分期的关系[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2003, 17: 89-91.
- [8] 英信江, 赵舒薇, 邱杰, 等. HPV16 E7 蛋白和 Rb 蛋白在人喉鳞状细胞癌中的表达及相关性研究[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25:1364-1367.

[收稿日期] 2006-11-15

[修回日期] 2006-12-25

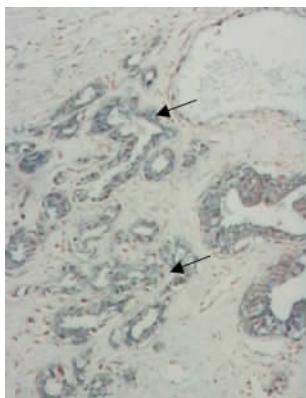
[本文编辑] 贾泽军

## 更正与说明

本人在《第二军医大学学报》2006 年第 27 卷第 11 期(第 1178~1180 页)发表了一篇题为《AMACR、34 $\beta$ E12 双重免疫组化标记在前列腺癌诊断中的应用》的文章,文章刊登后有读者指出文中存在问题,为此本人便对文章内容进行了核查,发现由于当时工作疏忽和粗心大意导致文中确有几处存在纰漏及争议,特更正及说明如下。

1. 第 1179 页中“1.3.2 AMACR/34 $\beta$ E12 双重免疫组化标记”部分:“……加生物素化羊抗鼠 IgG(1:200)……”更正为“……加生物素化羊抗鼠 IgG(1:200)……”;“……核固红衬染 5 min,水洗,常规树脂胶封片。”更正为“……甘油明胶封片。”

2. 第 1179 页图 1B 组织经核查确实来源于前列腺癌组织,但关于图中箭头所指是否为前列腺癌腺体组织仍存在争议,为慎重起见,避免引起读者误解,现选用一张典型的前列腺癌组织 AMACR 单独免疫组化标记图片予以补充说明。



### 前列腺癌组织 AMACR 单独免疫组化标记染色

#### Immunohistochemical staining of prostate cancer specimens with single AMACR (EnVision, $\times 100$ )

图中可见前列腺癌组织 AMACR 染色阳性,胞质内出现棕黄色颗粒(箭头所指);扩张的前列腺体中染色阴性(上方箭头背向部位);而前列腺高级别上皮内瘤变中的瘤变细胞染色弱阳性至阳性,其基底层细胞仍为阴性(下方箭头背向部位)

The prostate cancer tissues were positive of AMACR staining, with brown granules in the cytoplasm (arrows); AMACR staining was negative in the residual dilated benign prostate gland(opposite to the upper arrow); AMACR staining was weak positive or positive for the neoplasm cells of prostatic intraepithelial neoplasm, with negative staining for basal cells in the same glands (opposite to the lower arrow)

在此谨向指出文章问题的读者表示感谢,向广大读者及《第二军医大学学报》编辑部致歉,在以后的学习和工作中我会进一步严格要求自己,避免再发生类似问题。

邢继章

2007-01-05