

口咽部鳞癌中人乳头瘤病毒感染的检测

黄 辉¹, 张 彬¹, 陈 汶², 邹双梅³, 张永侠¹, 乔友林²

中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤医院 & 肿瘤研究所 ¹ 头颈外科

² 流行病学研究室 ³ 病理科, 北京 100021

通信作者: 张 彬 电话: 010-87787180, 传真: 010-67759100, 电子邮件: docbinzhang@hotmail.com

摘要: **目的** 检测口咽鳞癌组织标本人乳头瘤病毒 (HPV) 感染情况, 获得其型别分布及肿瘤临床病理特点。**方法** 选择 1999 年 1 月至 2009 年 12 月在中国医学科学院肿瘤医院病理科存档的满足条件的口咽鳞癌活检或手术标本共 66 例, 采用 SPF10-DNA LiPA 分型方法进行检测。**结果** 66 例标本中, 11 例 (16.7%) 检测出 HPV, 其中 HPV-16 型 7 例, HPV-16/11 型 1 例, HPV-35、PV-58/52 和 HPV-33/52/54 型各 1 例, HPV-16 型占所有感染者的比例为 72.7% (8/11)。HPV 阳性标本中, 女性 (36.4% 比 1.8%, $P=0.002$)、非吸烟 (36.4% 比 0, $P=0.001$) 及非饮酒者 (45.5% 比 1.8%, $P=0.001$) 所占的比例均明显高于 HPV 阴性标本; 低分化所占为 81.8%, 与 HPV 阴性标本的 63.7% 比较, 差异无统计学意义 ($P=0.409$); HPV 阳性和阴性标本在 T 分级、N 分级及临床分期方面差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。**结论** 口咽鳞癌患者 HPV 感染率为 16.7%, HPV 相关口咽鳞癌具有独特的流行病学和临床病理特点。

关键词: 口咽癌; 鳞状细胞癌; 人乳头瘤病毒; 感染率

中图分类号: R739.63; R739.64 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2012)06-0545-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2012.06.002

Detection of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma

HUANG Hui¹, ZHANG Bin¹, CHEN Wen², ZOU Shuang-mei³,
ZHANG Yong-xia¹, QIAO You-lin²

¹Department of Head and Neck Surgery, ²Department of Cancer Epidemiology, ³Department of Pathology,
Cancer Hospital & Cancer Institute, CAMS and PUMC, Beijing 100021, China

Corresponding author: ZHANG Bin Tel: 010-87787180, Fax: 010-67759100, E-mail: docbinzhang@hotmail.com

ABSTRACT: Objective To investigate the infection rate and subtypes of human papilloma virus (HPV) in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) and analyze the clinicopathologic features of patients with or without HPV infection. **Methods** A total of 66 biopsy or surgical specimens of OSCC archived in the Pathology Department of Chinese Academy of Medical Sciences were analyzed by polymerase chain reaction (PCR), and the generic amplification products were detected by DNA enzyme immunoassay (DEIA) and typed by reverse hybridization line probe assay. **Results** HPV-DNA was detected in 11 (16.7%) of all specimens. Among them, 7 were infected with HPV-16, and the remaining 4 patients were infected with HPV-16/11, HPV-35, HPV-58/52, and HPV-33/52/54, respectively. HPV-16 was detected in

72.7% of all positive specimens. There were more females in HPV-positive group than HPV-negative group (36.4% vs. 1.8%, $P=0.002$). Patients with HPV-positive tumors were more likely to be non-smokers (36.4% vs. 0, $P=0.001$) and non-drinkers (45.5% vs. 1.8%, $P=0.001$) than those with HPV-negative tumors. The proportion of moderately or poorly differentiated tumors was higher in HPV-positive patients than HPV-negative patients (81.8% vs. 63.7%), although without statistical significance ($P=0.409$). No difference was observed in T classification, N classification, and overall tumor stage. **Conclusions** HPV infection rate was 16.7% in this cohort. HPV-positive OSCC has its unique etiologic and clinicopathological characteristics.

Key words: oropharyngeal cancer; squamous cell carcinoma; human papillomavirus; infection rate

Acta Acad Med Sin, 2012, 34(6):545-549

口咽癌是指发生于腭扁桃体、软腭、舌根及咽侧后壁等部位的恶性肿瘤，大多数是鳞状细胞癌。近10年来关于人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与口咽鳞癌关系的研究表明, HPV感染, 尤其是高危型HPV的感染与口咽部鳞癌发病明显相关, 并且有重要预后相关性^[1-7], 但中国大陆罕见相关的专门研究资料。本研究检测了中国医学科学院肿瘤医院诊治的口咽部鳞癌组织标本HPV感染情况, 总结了其型别分布及临床病理特点。

材料和方法

标本来源 选择1999年1月至2009年12月在中国医学科学院肿瘤医院病理科存档的口咽鳞癌活检或手术标本共81例, 对其中满足以下条件的66例进行分析: (1) 发病部位包括腭扁桃体、软腭、舌根或咽后壁; (2) 均为初治患者未经过放疗, 有完整的临床和病理学资料; (3) 无同期其他原发癌及远处转移; (4) 具有可供切片分析的足够质量和数量的组织标本。鳞状细胞癌及其分化程度诊断依据世界卫生组织相关标准并经两位具有主治医师以上水平病理科医师进行判读确定。

标本制备 活检组织标本或手术标本均经10%甲醛溶液固定、石蜡包埋保存于病理科。采用“三明治”技术对组织标本进行切片, 第一卷和最后一卷进行HE染色, 中间6个蜡卷均分为2份分别放入两个1.5 ml螺旋管内, 用于DNA提取。第一卷和最后一卷经HE染色后需由病理科医师再次确认为鳞癌, 并且两张玻片均见癌组织。随机选取相同年限我院病理科存档的初治宫颈鳞癌石蜡组织块8例, 作为阳性对照组, 以空白蜡卷作为阴性对照。

HPV-DNA检测 采用SPF10-DNA线性平行杂

交(line probe assay, LiPA)分型方法, 具体为: 将样品中加入250 μ l 1 mg/ml蛋白酶K(瑞士ROCHE公司)溶液中, (70 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 孵育20~29 h, 95 $^{\circ}$ C加热块中孵育10 min使蛋白酶灭活, 取稀释后样本10 μ l (DEPC水90 μ l + 10 μ l 样本)至加有40 μ l ENZ和AMP混合液的PCR管(比利时Innogenetics Ins公司)。试剂空白对照为蛋白酶K, PCR阴性对照为10 μ l DEPC-水, PCR阳性对照为10 μ l (比利时Innogenetics Ins公司)。PCR程序设定为: 94 $^{\circ}$ C 9 min 激活AmpliTaq Gold, 40个循环扩增(94 $^{\circ}$ C 30 s, 25 $^{\circ}$ C 52 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s)。将SPF10扩增产物加入放有固定28种寡核苷酸探针的试纸条反应槽中, 使扩增产物与探针特异性结合, 通过一系列洗液清除未结合的扩增产物, 使用酶促反应方法使结合有产物区域显色, 并与参比卡对照, 肉眼读取结果。

质量控制 本研究采取严格的措施对PCR污染情况和扩增效率进行质控; (1) 在洁净切片室内完成操作; (2) 操作人员着一次性防护服, 戴帽子、口罩、手套; (3) 在两个标本处理之间, 更换手套、刀片、毛笔、金属切片镊子, 使用二甲苯、酒精擦洗蜡块组织托盘、工作台及任何可能污染的部位; (4) 每10个蜡块切1个阴性对照(空白蜡块), 每10个蜡块切1个阳性对照(相同年限中国医学科学院肿瘤医院未治疗的宫颈鳞癌病理组织标本)。

统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件, 计数资料之间的比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

临床资料 66例标本中, 男61例, 女性5例, 平均年龄(59.2 \pm 11.3)岁38~92岁; 发病部位:

腭扁桃体 27 例, 舌根 26 例, 软腭 11 例, 咽后壁 2 例。根据 UICC/AJCC2002 年肿瘤临床分期标准: T1 5 例, T2 23 例, T3 14 例, T4 24 例; N0 23 例, N1 10 例, N2 27 例, N3 6 例; I 期 2 例, II 期 7 例, III 期 11 例, IV 期 46 例。病理高分化 22 例, 中分化 32 例, 低分化 12 例。

HPV 感染率及型别分布 66 例标本中, 11 例 (16.7%) 检测出 HPV 感染, 其中, HPV-16 7 例, HPV-16/11、HPV-35、HPV-58/52、HPV-33/52/54 各 1 例, HPV-16 型感染率为 72.7% (8/11)。阳性对照组 HPV 阳性率为 87.5% (7/8), 阴性对照组均未检出 HPV。

流行病学及临床病理特点 HPV 阳性标本中, 女性 (36.4% 比 1.8%, $P=0.002$)、非吸烟 (36.4% 比 0, $P=0.001$) 及非饮酒者 (45.5% 比 1.8%, $P=0.001$) 所占的比例均明显高于 HPV 阴性标本; 低分化所占为 81.8%, 与 HPV 阴性标本的 63.7% 比较, 差异无统计学意义 ($P=0.409$); HPV 阳性和阴性标本在 T 分级、N 分级及临床分期方面差异均无统计学意义 (P 均 >0.05) (表 1)。

HPV 不同型别与肿瘤发病部位、病理分化及分期分布的关系 11 例 HPV 阳性样本中, 7 例为腭扁桃体, 4 例为舌根, 腭扁桃体 HPV-DNA 检出率为 25.9% (7/27), 舌根为 15.4% (4/26), 软腭及咽后壁均为 0 (0/11 和 0/2)。肿瘤原发灶分期 T1/T2 与 T3/T4 分布均匀 (5 比 6), 而 N 分级则 N2/N3 占绝大多数 (8/11), 临床分期 III/IV 期占绝大多数 (10/11) (表 2)。

讨 论

吸烟和饮酒是上呼吸道黏膜恶性肿瘤极为重要的致癌危险因素, 然而近年研究发现, 近 20% 的口咽部鳞癌患者并不具备这些因素^[1], 一些流行病学和分子生物学证据证实这些患者的发病与 HPV 感染有关。近年来国外大量研究显示, 年轻人中患腭扁桃体/舌根癌的发生率明显上升^[2], HPV 相关的口咽鳞癌发病率在 1970 年至 2007 期间以每 10 年翻 1 番速度迅速增加, 而非 HPV 相关的口咽鳞癌则呈下降趋势^[3], 高危 HPV 感染是其重要的危险因素,

表 1 口咽癌 HPV 阳性和阴性患者一般资料的比较

Table 1 Comparison of HPV Status in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma

项目 Items	HPV 状态 HPV status [n (%)]		χ^2	P
	阳性 Positive (n=11)	阴性 Negative (n=55)		
年龄 (岁) Age (years)	57 (46~92)	60 (38~81)	-0.319 ^a	0.751
性别 Sex	男 Male	7 (63.6)	-	0.002 ^b
	女 Female	4 (36.4)		
吸烟 Smoking	是 Yes	6 (54.5)	-	0.001 ^b
	否 No	4 (36.4)		
	不明 Unknown	1 (9.1)		
饮酒 Alcohol use	是 Yes	5 (45.5)	-	0.001 ^b
	否 No	5 (45.5)		
	不明 Unknown	1 (9.1)		
分化 Differentiation	高 Well	2 (18.2)	-	0.409 ^b
	中 Moderately	6 (54.5)		
	低 Poor	3 (27.3)		
分期 Overall stage	I、II	1 (9.1)	-	0.336 ^b
	III、IV	10 (90.9)		
T 分级 Tumor stage	1、2	6 (54.5)	0.310 ^c	0.578
	3、4	5 (45.5)		
N 分级 Nodal stage	0、1	3 (27.3)	1.745 ^c	0.186
	2、3	8 (72.7)		
发病部位 Tumor subsite	扁桃体 Tonsil	7 (63.6)	-	0.240 ^b
	舌根 Tongue base	4 (36.4)		
	软腭 Soft palate	0 (0)		
	咽后壁 Posterior pharyngeal wall	0 (0)		

^a: T 值 (T 检验); ^b: Fisher's 精确概率法; ^c: Yate's 连续性校正

^a: T value (T test); ^b: Fisher's exact test; ^c: Yate's continuity correction

表 2 HPV 不同型别与发病部位、病理分化及分期的分布关系

Table 2 Distribution of HPV subtypes in different tumor sites, differentiation, and stages

HPV 类型 Subtype	感染 例数 Cases	部位 Tumor sites				分化 Differentiation			T 分期 Tumor stages				N 分级 Nodal stages				临床分期 Overall stages			
		扁桃 体 Tonsil	舌根 Tongue base	软腭 Soft palate	咽后壁 Posterior wall	G1	G2	G3	T1	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3	I	II	III	IV
16	7	3	4	0	0	2	3	2	2	2	1	2	2	0	4	1	1	0	0	6
16/11	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
33/52/54	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
35	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
58/52	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
总计 Total	11	7	4	0	0	2	6	3	3	3	3	2	3	0	6	2	1	0	1	9

G1: 高分化; G2: 中分化; G3: 低分化

G1: well differentiated; G2: moderately differentiated; G3: poorly differentiated

其在口咽部位鳞癌的总感染率达 19% ~ 75% [4-8]。本组资料 HPV 总感染率为 16.7%，与文献报道相比处于较低水平。推测其原因可能是，口腔口咽部 HPV 的感染目前认为与性生活方式有直接相关性 [9]，而国内性生活方式不同于西方国家。根据荷兰 1995 年关于口咽癌的报告，各亚区中，扁桃体癌占 58%，舌根、会厌谷癌占 28%，软腭、悬雍垂癌占 10%，咽后壁癌占 4% [10]。本组例数较少，而且扁桃体所占比例较低 40.9% (27/66)，明显低于发病率比例，其他部位如舌根、软腭等部位占较大比例，病例入组存在选择偏倚，使得总体感染率较低。当然本组资料腭扁桃体 HPV 感染率为 25.9%，为所有口咽部位各亚区中感染率最高的，其次是舌根。Gillison 等 [5] 研究结果也显示，腭扁桃体 HPV 感染率最高达 25.2%，而舌根为 4.5%，其他口咽部位少有检出。

根据病毒致病力的大小，国际癌症研究协会将 HPV 分为高危型和低危型 [11]，高危型主要为 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73 和 82 等，低危型主要包括 HPV6、11、40、42、43、44、54、61、70、72 和 81 等。目前口咽鳞癌检测出的 HPV 类型包括 6、11、16、18、31、33、35、45、56、58、66 等 [9,12]。本组资料未检出 HPV-18 型，其在宫颈癌尤其是腺癌中是极为重要的高危致癌病毒，而在头颈鳞癌尤其是口咽鳞癌中的检出率较低，文献报道仅为 2.9%，低于喉癌和口腔癌 [6]。文献显示 HPV-16 型是最主要的高危类型，可占所有感染型别的 85% ~ 95% [6-8,12]，亚洲（印度和日本）占 76%，北美和欧洲分别为 89.6% 和 84.2% [6]，中国台湾地区为 84.1% [12]。本组资料中

HPV-16 型所占比例为 72.73%，低于文献，尤其是西方发达国家的报道，其原因可能在于病例入组存在选择偏倚，当然，也有可能本组病例所在人群 HPV 感染率及型别分布确实不同于文献资料，无论是何种原因，都有待于大样本研究。

国外研究显示，年轻患者及非吸烟、非饮酒患者更易感染 HPV，高危 HPV 感染口咽癌患者肿瘤多为晚期（III ~ IV 期），而且更易于区域淋巴结和远处转移，肿瘤病理分化级别更低 [9,13]。本研究结果显示，HPV 阳性标本中女性占绝大多数，非吸烟、非饮酒者所占比例明显高于 HPV 阴性标本，与文献报道符合。本组 HPV 阳性患者病理中低分化比例偏高（81.8% 比 63.6%），N2/3 比例偏高（72.7% 比 45.5%），但均未达到统计学差异，但趋势较明显，与文献基本一致。

本研究采用 SPF10-LiPA 分型方法检测 HPV-DNA，该方法通用引物使用短 PCR 片段，扩增靶区为 HPV L1 区，扩增产物长度为 65 bp，扩增效率高。扩增产物的检测采用 LiPA 反向杂交技术，用样量少、灵敏度高，可能识别 27 种不同型别的 HPV-DNA 片段 [14-15]。结果进一步证实 HPV 相关口咽鳞癌是一类具有独特的病因和临床病理特点的疾病。当然也存在一些缺憾，例如病例数较少，就口咽部各亚区所占比例来说，扁桃体癌仅仅 40.9% (27/66)，低于多数文献报道的 54% ~ 60% [8,10,16]，存在入组偏倚，原因在于本组研究选择的病例具有较严格的入组标准，并非同一时期治疗的全部口咽鳞癌患者。

总之，口咽部鳞癌 HPV 感染及其预后相关性的研究是全球研究的热点课题之一。与国外文献报道相比，本组口咽鳞癌 HPV 感染率处于较低水平，但

HPV 型别分布、HPV 阳性患者的流行病学及临床病理特征基本一致, 鉴于本组样本量较小, 中国大陆人群 HPV 感染状况还需要多中心的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Lingen M, Sturgis EM, Kies MS. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management [J]. *Curr Opin Oncol*, 2001, 13(3):176-182.
- [2] Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U. S. population ages 20-44 years [J]. *Cancer*, 2005, 103(9):1843-1849.
- [3] Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(2):362-366.
- [4] Tachezy R, Klozar J, Rubenstein L, et al. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors [J]. *J Med Virol*, 2009, 81(5):878-887.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(23):1772-1783.
- [8] St Guily JL, Jacquard AC, Prétet JL, et al. Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France-The EDiTH VI study [J]. *J Clin Virol*, 2011, 51(2):100-104.
- [9] 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.
- [10] Mak Krogar S, Hilgers FS, Levendag PC, et al. A nationwide study of the epidemiology, treatment and survival of oropharyngeal carcinoma in the Netherlands [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1995, 252(3):133-138.
- [11] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(6):518-527.
- [12] Kuo KT, Hsiao CH, Lin CH, et al. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(4):376-386.
- [13] 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.
- [14] Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(8):2508-2517.
- [15] Chen W, Zhang X, Molijn A, et al. Human papillomavirus type-distribution in cervical cancer in China: the importance of HPV 16 and 18 [J]. *Cancer Causes Control*, 2009, 20(9):1705-1713.
- [16] D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(19):1944-1956.

(收稿日期: 2011-12-19)