

不同方法检测口咽鳞癌中高危型 HPV 的感染情况分析

李 武¹, 赵九洲², 王志中², 张媛媛¹, 冯晓波¹, 刘红霞², 张松涛²

(1. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450002;

2. 郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450008)

摘要: [目的] 分析不同方法检测口咽鳞癌中高危型 HPV 在河南地区人群中的感染情况。 [方法] 采用二代杂交捕获、p16 免疫组化、bDNA 三种方法对 89 例口咽鳞癌石蜡包埋标本进行检测, 并分析其 HPV 阳性率与患者临床病理参数的相关性及其临床意义。 [结果] 二代杂交捕获、p16 免疫组化、bDNA 三种检测方法结果具有较好的一致性, HPV 阳性率分别为 27.0%, 22.5%, 16.9%。三种方法检出的 HPV 阳性结果与患者性别、年龄、原发灶部位、肿瘤分化程度、T 分期等临床病理参数均无关 ($P>0.05$)。经 p16 免疫组化法检测的结果与患者淋巴结转移 ($P=0.049$)、TNM 分期 ($P=0.026$) 存在相关性, 而二代杂交捕获、bDNA 结果与患者淋巴结转移、TNM 分期 ($P>0.05$) 均无关。 [结论] 在充分考虑临床实用性及可靠性的前提下, p16 蛋白免疫组化法是最简单实用的 HPV 感染检测方法。

关键词: 口咽鳞癌; HPV; p16 免疫组化; 二代杂交捕获; E6/E7

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)06-0568-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.06.B008

Detection of High-risk HPV Infection in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma with Various Methods

LI Wu¹, ZHAO Jiu-zhou², WANG Zhi-zhong², et al.

(1. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Zhengzhou 450002; 2. The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Zhengzhou 450008)

Abstract: [Objective] To investigate the infection of high-risk HPV in oropharyngeal squamous cell carcinoma by a variety of methods. [Methods] The hybrid capture- II, p16 immunohistochemistry and bDNA methods were used to detect paraffin- embedded specimens from 89 patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. The correlation between the positive rate of HPV and clinicopathological parameters and its clinical significance were analyzed. [Results] The three detection methods showed a good consistency, and the positive rates of detection were 27%, 22.5% and 16.9% respectively. The HPV results obtained from the three detection methods were not related to the gender, age, primary tumor location, tumor differentiation and T staging ($P>0.05$). The results of p16 immunohistochemistry were correlated with lymph node metastasis ($P=0.049$) and TNM staging ($P=0.026$), while the results of hybrid capture- II and bDNA were not related to the lymph node metastasis and TNM staging ($P>0.05$). [Conclusion] Compared to other methods, p16 protein immunohistochemistry is the simplest and most effective method for high-risk HPV infection detection in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma.

Subject words: oropharyngeal squamous cell carcinoma; HPV; p16; hybrid capture- II; E6/E7

口咽癌是指发生于软腭、扁桃体、会厌、舌根及咽侧壁等部位的恶性肿瘤, 其中 90% 为鳞状细胞癌^[1]。大量研究认为, 除了公认的烟草及酒精之外, HPV 感染也是引起口咽癌发生的重要原因之一^[2], HPV

相关口咽癌与非 HPV 相关口咽癌的治疗及预后也存在明显差异^[3]。因此检测 HPV 的感染情况对临床工作有重大指导意义。目前对于 HPV 常用的检测方法包括 HPV DNA 原位杂交法、p16 蛋白免疫组化法 (p16 immunohistochemistry, IHC)、二代杂交捕获法 (Hybrid Capture II, HC-II)、RT-PCR 法等。虽然各种检测方法均能在不同水平上检测出 HPV 感染的

通讯作者: 张松涛, 副主任医师, 博士; 郑州大学附属肿瘤医院甲状腺头颈外科, 河南省郑州市金水区东明路 127 号 (450001); E-mail: 491321458@qq.com

收稿日期: 2017-12-29; **修回日期:** 2018-02-28

情况,但国内外报道的检出率不尽相同,从7%~80%不等^[4,5]。为探究河南地区口咽鳞癌 HPV 感染率以及不同检测方法之间的差异,我们选择 HC- II、p16 IHC、HPV E6/E7 mRNA 3.0 assay^[6](即:分支链 DNA 信号放大技术 branched DNA, bDNA) 三种检测方法来进行研究,并比较各种方法与患者临床病理特征的关系,以期寻找一种适用于临床应用的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

选择 2015 年 1 月至 2017 年 5 月在郑州大学附属肿瘤医院就诊的 89 例口咽鳞癌患者的手术或活检石蜡包埋标本。所有患者均为首次就诊,未经过放射治疗或化学治疗,同时没有其他部位癌变和远处转移情况。其中男性患者 80 例,女性 9 例,男女比例 8.9:1,平均年龄 60.2±11.5 岁(31~83 岁)。病变部位位于软腭者 13 例、扁桃体 11 例、会厌 27 例、舌根 23 例、咽侧壁 15 例。接受手术治疗患者 48 例,因病情及患者意愿选择非手术治疗 41 例。统计 TNM 分期临床资料时仅对手术患者进行分析,TNM 分期按 AJCC 第 7 版进行分类^[7]。

1.2 实验方法

1.2.1 核酸提取

使用 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(Qiagen, 德国)试剂盒,按标准操作步骤提取基因组 DNA。50~100 μl 超纯水洗脱。质量控制 OD 值在 1.80~2.00 之间。使用 Invitrogen Qubit[®] 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher, 美国)荧光计定量提取的 DNA。核酸提取为

二代杂交捕获检测做准备。

1.2.2 二代杂交捕获

利用 PCR、膜杂交法检测(凯普人乳头状瘤病毒分型检测试剂盒),经 DNA 分离提取、PCR 扩增、杂交、显色、结果判定,根据显色与否及膜条 HPV 分布图,可在显色板上判定 21 种 HPV 阳性或阴性及所属亚型。

1.2.3 HPV E6/E7 mRNA 3.0 assay(bDNA)

使用 HPV E6/E7 mRNA 检测试剂盒检测(科蒂亚,新乡)。将脱蜡后的标本加入裂解剂 65℃水浴 30 min,得到裂解液。事先混合好探针溶液、HPV 阳性质控溶液。将阳性质控溶液(2μl)及处理后的标本裂解液(50μl)分别与检测探针溶液混合至检测板中,每孔总容积为 100μl,不足部分用缓冲液补足,并进行空白对照。加样完毕后,孵育 3.5h。经过信号放大、加入标记荧光物质,检测荧光光子数,使用科蒂亚公司软件判定 E6/E7 mRNA 的含量,当检测拷贝值大于 1.3 时为 HPV E6/E7 mRNA 阳性。

1.2.4 p16 免疫组织化学

I 抗:抑癌基因 p16 单克隆抗体(产品编号:BA23440,武汉默沙克生物有限公司),II 抗:HRP 标记兔抗小鼠 IgG(产品编号:BC70001,武汉默沙克生物有限公司),DAB 显色试剂盒(产品编号:ZLI9108,北京中杉金桥生物技术公司)。每个口咽鳞癌石蜡标本取 2~4μm 厚连续切片 5 张。所有切片常规免疫组织化学染色检测 p16 蛋白表达,采用 0.01mol/L 柠檬酸钠缓冲液高压锅抗原修复,PBS 代替 I 抗进行空白对照。结果判读使用美国病理学家协会标准^[8],即当细胞质及细胞核中 p16 的表达大于 70%时认为是 HPV 阳性,其他为阴性。如 Figure 1,2 所示。

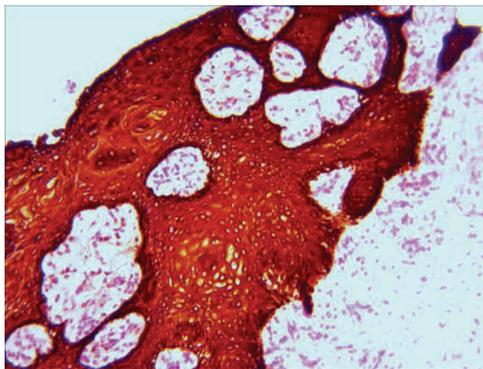


Figure 1 Positive expression of p16 in oropharyngeal carcinoma(IHC×200)

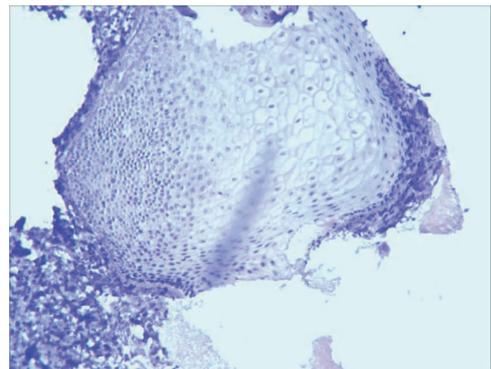


Figure 2 Negative expression of p16 in oropharyngeal carcinoma(IHC×200)

1.3 统计学处理

采用 SPSS 24.0 版本进行统计学分析, 三种实验方法的一致性用 Kappa 检验, 计量资料用卡方检验及 Fisher 确切法计算, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 口咽鳞癌中 HPV 感染情况

结果显示, HC-II 法检测 HPV DNA 阳性率为 27.0%(24/89), 其中 HPV 16 型 22 例, HPV18 型 2 例; p16 IHC 法检测 p16 蛋白阳性表达率为 22.5%(20/89); bDNA 法检测 HPV 致癌基因 E6/E7 mRNA 阳性率为 16.9%(15/89)。

2.2 三种检测方法一致性情况

将 p16 IHC 与 bDNA、HC-II 与 bDNA、p16 IHC 与 HC-II 的检验结果进行一致性分析, 一致率分别为 92.1% (82/89)、89.9% (80/89)、88.8% (79/89)。

Kappa 值分别为 0.752、0.709、0.699 ($P<0.01$), 表明三种检测方法结果具有较好的一致性。

2.3 检测结果与患者临床病理资料关系情况

结果显示, 三种方法的 HPV 检测结果与患者的性别、年龄、原发灶部位、肿瘤分化程度、T 分期等临床参数均无明显相关性 ($P>0.05$)。p16 IHC 法测得的 HPV 阳性结果在淋巴结转移组与非转移组中分别为 40.0%(12/30) 和 11.1%(2/18), 差异有统计学意义 ($P=0.049$); 在 TNM 分期 I~II 期组与 III~IV 期组中分别为 10.5%(2/19) 和 41.5%(12/29), 差异有统计学意义 ($P=0.026$)。而 HC-II 与 bDNA 两种方法的结果与淋巴结转移及 TNM 分期均无关 ($P>0.05$)。详见 Table 1。

3 讨论

一般认为, 高危型 HPV 入侵机体后主要依赖

Table 1 The relationship between three experimental methods and clinicopathological features in oropharyngeal carcinoma

Clinical indicators	n	bDNA				p16 IHC				HC-II*			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
Gender													
Male	80	13	67	0.206	0.644	18	62	0	1	21	59	0.206	0.698
Female	9	2	7			2	7			3	6		
Age(years)													
≥60	46	8	38	0.020	0.889	11	35	0.113	0.803	13	33	0.081	0.815
<60	43	7	36			9	34			11	32		
Primary focus													
Soft palate	13	0	13			0	13			2	11		
Tonsil	11	2	9			3	8			3	8		
Epiglottis	27	8	19	5.750	0.195	10	17	8.015	0.078	12	15	6.162	0.181
Base of tongue	23	3	20			5	18			5	18		
Lateral wall of pharynx	15	2	13			2	13			2	13		
Tumor differentiation													
Poor	11	2	9			3	8			3	8		
Moderate	47	7	40	0.475	0.923	9	38	0.840	0.716	13	34	0.118	1.000
Well	31	6	25			8	23			8	23		
T stage													
T ₁ ~T ₂	38	8	30	0.635	0.611	12	26	0.514	0.701	14	24	1.011	0.460
T ₃ ~T ₄	10	1	9			2	8			2	8		
N stage													
N ₀	18	3	15	0.082	1.000	2	16	4.545	0.049	4	14	1.600	0.343
N+	30	6	24			12	18			12	18		
TNM stage													
I~II	19	2	17	1.396	0.286	2	17	5.289	0.026	3	16	4.356	0.060
III~IV	29	7	22			12	17			13	16		

Note:*.The relationship between HPV 18 and clinicopathological parameters is no significance,due to the small sample size that 2 cases of HPV 18 were detected.The HPV16 and HPV18 are combined into HPV positive.

E6、E7 蛋白的表达导致 p53 降解和 p16 过表达,从而引起宿主细胞周期失控使其癌变^[5]。因此,目前对 HPV 的检测均是从以上 HPV 感染、整合及表达的不同阶段进行。其中 HC-Ⅱ 和 p16 IHC 是经美国 FDA 认证可以在临床应用的 HPV 检测技术,已广泛应用于临床^[9]。而 HPV E6/E7 mRNA 含量能反映致癌基因 E6/E7 的活动度,因此检测 E6/E7 mRNA 也可说明 HPV 在口咽癌中的感染情况。检测 E6/E7 基因最准确的方法是 HPV E6/E7 mRNA 原位杂交^[10],但因其实验技术条件要求高,实验步骤繁琐复杂,难以在临床实际工作中推广。因此我们选择了更为简单方便的 bDNA 技术,该方法无需抽提纯化 RNA、反转录和 PCR 扩增,只要将样本用特定裂解液裂解后,经探针杂交与信号放大,检测荧光光子值的大小来判断 E6/E7 的表达情况。

本研究通过 HC-Ⅱ、p16 IHC、bDNA 三种方法对同一批口咽鳞癌患者 HPV 感染情况进行检测。结果显示,三种方法 HPV 阳性检出率分别为 27.0%、22.5%、16.9%。虽然检测结果不尽相同,但也可表明在河南地区口咽鳞癌患者中 HPV 的感染率在 20%左右,与 Ralli 等^[11]报道的 24%基本一致,但同国内刘琰等^[4]研究的 12.1%有差异。分析原因可能由于样本取材部位、肿瘤原发部位、人群的地区差异以及样本量较少,可能存在选择偏倚等原因有关。当然,由于 HPV 自身无法合成 DNA 聚合酶,需要借助宿主细胞周期进行蛋白增殖,HPV DNA 在整合到宿主基因组过程中 E6、E7 基因可被随机整合到宿主 DNA 中,而整合位点的不同预示着 E6、E7 表达情况也有所差异^[12]。因此,造成了三种方法检测结果不尽相同。此外,不同检测方法本身的敏感性及其特异性差异也是造成结果不同的可能因素。

本研究采取的三种方法分别从 HPV 进入宿主细胞时的 DNA、HPV DNA 整合到宿主基因组后转录的 mRNA、以及 mRNA 翻译的调控蛋白三个阶段进行检测,检测标志物之间势必存在潜在的上下游关系。尽管三种方法检测的结果不尽相同,但一致性检验的 Kappa 值为分别 0.752、0.709、0.699($P < 0.01$),证实三种检测方法结果具有较好的一致性,均可以较好地检测口咽鳞癌中 HPV 的感染情况。

关于 HPV 感染与患者临床病理资料之间的关系,各研究结果不同。Ang 等^[3]通过 p16 IHC 和

HPV 原位杂交两种方法检测了 325 例口咽癌患者的 HPV 感染情况,结果发现 HPV 感染与患者的性别、年龄、原发灶部位、分化程度、T 分期等均无明显相关性,与本研究结果相似。而日本的一项多中心研究^[13]结果显示,用 HC-Ⅱ 和 p16 IHC 检测的 HPV 结果与原发灶部位、分化程度、淋巴结转移情况和 TNM 临床分期相关。Blitzer 等^[14]通过 meta 分析也发现 HPV 阳性口咽癌患者 T 分期较早,但更容易发生淋巴结转移和远处转移,TNM 分期多为Ⅲ~Ⅳ期。相似的,在本研究中,我们发现 p16 IHC 法测得的 HPV 阳性结果与 N 分期($P=0.049$)和 TNM 临床分期($P=0.021$)明显相关,患者多为 N+期和Ⅲ~Ⅳ期。但值得注意的是,虽然本研究中三种方法具有较好的一致性,但 HC-Ⅱ 与 bDNA 两种方法测得的结果在统计学上与 N 分期、TNM 分期并不相关,初步考虑可能与样本量有关。与我们的结果相似,D'Souza 等^[15]通过 p16 IHC、HPV DNA 原位杂交、HPV E6/E7 mRNA 原位杂交三种方法研究了 240 例口咽鳞癌患者的 HPV 感染情况,发现 p16 IHC 方法特异性及敏感性最高,操作简单,更适合口咽鳞癌患者的临床检测。

由此我们认为,在临床工作中 p16 IHC 法是最简单实用的口咽鳞癌 HPV 感染检测方法。当然,在本研究中,HC-Ⅱ 与 bDNA 两种方法测得的结果并没有显示与患者临床病理资料的相关性,但最新的二代测序技术在检测 HPV 基因分型及 HPV 转染宿主细胞内 DNA 融合位点方面有绝对的优势^[16],更有利于深入探究 HPV 致癌的分子病理机制。在后期的研究中,我们也会进一步扩大样本量,根据实际的临床及科研需求选择合适的检测方法。

参考文献:

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2] Syrjanen K,Syrjanen S,Lamberg M,et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Oral Surg,1983,12(6):418-424.
- [3] 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.
- [4] Liu Y,Cao MX,Wu JS,et al. Analysis of the current sta-

- tus of research on human papillomavirus-associated head and neck cancers based on recent Chinese literature[J]. West China Journal of Stomatology,2017,35(3):301-310.
- [刘琰,曹鸣芯,吴家顺,等.人乳头瘤病毒相关头颈肿瘤的中文文献研究现状分析[J].华西口腔医学杂志,2017,35(3):301-310.]
- [5] Tanaka TI,Alawi F. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer[J]. Dent Clin North Am,2018,62(1):111-120.
- [6] Shen Y,Gong J,He Y,et al. Quantivirus (R) HPV E6/E7 RNA 3.0 assay (bDNA) is as sensitive,but less specific than Hybrid Capture 2 test[J]. J Virol Methods,2013,187(2):288-293.
- [7] Compton CC. AJCC cancer staging atlas:a companion to the seventh editions of the AJCC cancer staging manual and handbook[M]. Second edition. FCAP,Tucson:Critical Path Institute,2012.637.
- [8] Chi AC,Day TA,Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update[J]. CA Cancer J Clin,2015,65(5):401-421.
- [9] Mirghani H,Amen F,Moreau F,et al. Human papilloma virus testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know [J]. Oral Oncol,2014,50(1):1-9.
- [10] Volpi CC,Ciniselli CM,Gualeni AV,et al. In situ hybridization detection methods for HPV16 E6/E7 mRNA in identifying transcriptionally active HPV infection of oropharyngeal carcinoma:an updating [J]. Hum Pathol,2017,pii:S0046-8177(17)30356-30358.
- [11] Ralli M,Singh S,Yadav SP,et al. Assessment and clinicopathological correlation of p16 expression in head and neck squamous cell carcinoma [J]. J Cancer Res Ther,2016,12(1):232-237.
- [12] Faraji F,Zaidi M,Fakhry C,et al. Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer[J]. Microbes Infect,2017,19(9-10):464-475.
- [13] Hama T,Tokumaru Y,Fujii M,et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer:a multicenter study in Japan[J]. Oncology,2014,87(3):173-182.
- [14] Blitzer GC,Smith MA,Harris SL,et al. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2014,88(4):761-770.
- [15] D'Souza G,Westra WH,Wang SJ,et al. Differences in the prevalence of human papillomavirus (HPV) in head and neck squamous cell cancers by sex,race,anatomic tumor site,and HPV detection method[J]. JAMA Oncol,2017,3(2):169-177.
- [16] Tuna M,Amos CI. Next generation sequencing and its applications in HPV-associated cancers [J]. Oncotarget,2017,8(5):8877-8889.

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。
2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。
3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。
4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。
5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。
6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。
7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。