

# 口腔鳞状细胞癌中人乳头瘤病毒 16 型 转化基因 E<sub>7</sub> 的检测

王建广<sup>1</sup>, 黄洪章<sup>1</sup>, 李金荣<sup>2</sup>

(1. 中山医科大学孙逸仙纪念医院口腔颌面外科, 广东 广州 510120;

2. 湖北医科大学口腔医学院口腔颌面外科, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**【目的】准确检测口腔鳞状细胞癌及正常口腔粘膜中人乳头瘤病毒 16 型(HPV<sub>16</sub>)的感染状况, 探讨人乳头瘤病毒 16 型与人口腔鳞状细胞癌之间的关系。【方法】从 30 例未经治疗的口腔鳞状细胞癌患者肿瘤组织及 30 例健康志愿者正常口腔粘膜切取标本, 液氮冷冻保存; 常规提取组织 DNA, 设计 HPV<sub>16</sub> E<sub>7</sub> 转化基因特异性引物, 进行聚合酶链反应, 对 PCR 结果进行检测, 记录结果。【结果】30 例口腔鳞状细胞癌患者中检测到 11 例 HPV<sub>16</sub> 阳性, 感染率 36.7%; 30 例正常对照组中检测到 4 例 HPV<sub>16</sub> 阳性, 感染率 11.1%。经  $\chi^2$  检验, 两者差别有显著性。【结论】人乳头瘤病毒 16 型与人口腔鳞状细胞癌有一定关系, 但 HPV<sub>16</sub> 在人口腔鳞状细胞癌发生发展过程中所起的作用还有待进一步研究。

关键词: 乳头状瘤病毒, 人; 口腔肿瘤; 癌基因 E<sub>7</sub>

中图分类号: R782.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0105-04

## Detection of the E<sub>7</sub> Transform Gene of Human Papillomavirus Type 16 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma

WANG Jian-guang<sup>1</sup>, HUANG Hong-zhang<sup>1</sup>, LI Jin-rong<sup>2</sup>

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120, China; 2. College of Stomatology, Hubei Medical University, Wuhan, 430070, China)

**Abstract:** 【Objective】To determine the prevalence of human papillomavirus(HPV) 16 in patients with primary oral squamous cell carcinoma(OSCC). 【Methods】DNA was extracted from freshly frozen tumor tissues of 30 patients with primary oral squamous cell carcinoma and from the oral mucosa of 30 healthy controls. A pair of specific primers of the E<sub>7</sub> early gene of HPV<sub>16</sub> were designed. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and the results were photographed. 【Results】HPV<sub>16</sub> was detected in 36.7%(11/30) of oral squamous cell carcinoma patients and 11.1%(4/30) of controls. 【Conclusions】HPV<sub>16</sub> has significant association with oral squamous cell carcinoma. However, the role HPV<sub>16</sub> played in the tumorigenesis of oral cancer and its clinical significance remain to be investigated.

**Key words:** papillomavirus, human; mouth neoplasms; oncogene E<sub>7</sub>

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是最常见的口腔恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。口腔鳞状细胞癌的发病机制及其致病因素尚未完全阐明。最近,越来越多的研究证明人类乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与口腔鳞癌的发生密切

相关。口腔良性病变、癌前病变及恶性肿瘤中已检测到多种人类乳头瘤病毒的存在。然而,由于目前多数研究中检测方法的敏感性及其特异性不同,对 HPV 感染率的报道也大不相同。因而对于 HPV 在人口腔鳞状细胞癌发生发展过程中所起的作用

收稿日期: 2000-03-20

作者简介: 王建广(1969-), 男, 河南汝南人, 医学博士, 讲师; 1998年6月进入中山医科大学博士后流动站工作, 研究方向为口腔鳞癌的凋亡调控及基因治疗

还未完全阐明。

HPV<sub>16</sub>是一种高度危险性的 HPV, 直接用 PCR 检测分析 HPV<sub>16</sub> E7 转化基因的方法可用于进一步研究 HPV<sub>16</sub> E7 基因与人口腔鳞状细胞癌的关系。

## 1 材料与 方法

### 1.1 标 本

30 例口腔鳞状细胞癌标本取自手术切除的口腔鳞癌新鲜肿瘤组织, 均经病理检查证实。患者术前未行放疗、化疗及其它治疗。其中男性 19 例, 女性 11 例, 年龄 34~68 岁, 平均 56.9 岁。舌癌 15 例, 颊癌 6 例, 牙龈癌 5 例, 硬腭癌及口底癌各 2 例。按照组织病理学分级标准, 高度分化鳞癌 10 例, 中度分化鳞癌 18 例, 低度分化鳞癌 2 例。

30 例对照组标本取自正颌外科治疗患者的正常口腔粘膜, 患者无烟酒嗜好。肿瘤组织及正常口腔粘膜切取后立即置 -196 °C 液氮中深冷冻 15 min, 保存于 -70 °C 超低温冰箱备用。

### 1.2 DNA 提取

将冷冻标本剪成 1 mm<sup>3</sup> 小块, STE (10 mmol/L Tris HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA; 0.1 g/L 蛋白酶 K 和 5 g/L SDS) 消化缓冲液中过夜 (16~18 h), 等体积苯酚/氯仿抽提, 酒精沉淀, 空气干燥, TE (10 mmol/L Tris, HCl, 1 mmol/L EDTA pH 8.0) 溶解, 紫外分光光度计及 8 g/L 琼脂糖凝胶测量其纯度及分子量大小。

### 1.3 引物设计

HPV<sub>16</sub> E7 引物根据 HPV<sub>16</sub> 完整的核苷酸顺序自行设计, 分别位于 HPV<sub>16</sub> E7 基因的上、下游, 委托中国科学院上海细胞生物所合成。

Primer 1: 5'-GGGAATTTCATGCATGGAGATACACCTAC-3'

Primer 2: 5'-GGCAAGCTTATGGTTTCTGAGAACAGATGG-3'

### 1.4 PCR 扩增

HPV<sub>16</sub> 克隆株由德国 Zur Hausen 博士赠送, 载体为 pBR322, 含有完整的 HPV<sub>16</sub> 基因, 序列长度 7.8 kb。提取质粒 HPV<sub>16</sub> DNA 作为阳性对照。TaqDNA 聚合酶及 4 种三磷酸脱氧核苷酸由华美生物工程公司生产。

PCR 反应在 0.5 mL Eppendorf 管中进行, 反应体积 50 μL。反应液中各成份浓度如下: 引物 1 及 2 各 1 μmol/L; 模板 DNA 1 μg; 10 mmol/L Tris,

HCl, pH 8.3; 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl; 0.1 g/L 明胶; 100 mmol/L 三磷酸脱氧核苷酸, 2.0 U TaqDNA 聚合酶。其中设一阳性对照, 用等体积无菌水代替模板 DNA。反应液上盖 50 μL 石蜡油, 离心, 置放 DNA 扩增仪上, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环。最后一个循环的条件为 72 °C, 延伸时间为 10 min。PCR 扩增完成后, 取 10 μL 反应产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后置紫外灯下观察, 照相记录结果。

## 2 结 果

我们设计的引物位于 HPV<sub>16</sub> E7 基因的开放阅读框的上下游, 包括起始密码 ATG 和终止密码 TAA, 扩增片段长度为 312 bp。而扩增 HPV<sub>16</sub> E7 基因的电泳带位于 564 bp 之前, 与预期片段大小相等, 表明我们扩增到了 HPV<sub>16</sub> E7 基因的完整片段(图 1)。

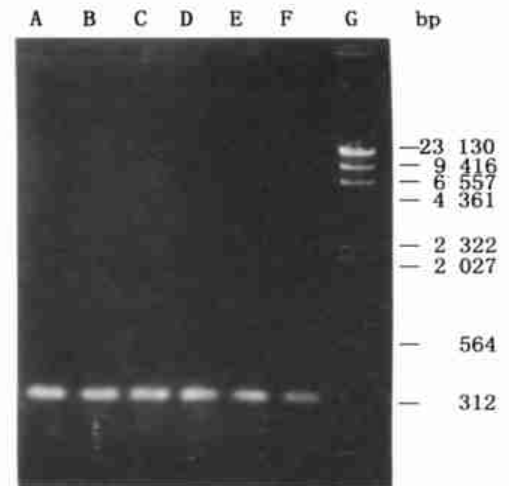


图 1 口腔鳞癌组织 HPV<sub>16</sub> E7 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Analysis of the PCR product of HPV<sub>16</sub> E7

by agarose gel electrophoresis

A: HPV<sub>16</sub> plasmid as positive control; B~F: OSCC tissue; G: Marker Lambda DNA/HindIII

30 例口腔鳞癌标本中 11 例 HPV<sub>16</sub> E7 基因扩增阳性, 阳性率 36.7%; 30 例对照组标本中 4 例 HPV<sub>16</sub> E7 基因扩增阳性, 阳性率 11.1%。 $\chi^2$  检验两者差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

男性口腔鳞癌患者 HPV<sub>16</sub> 感染率 (42.1%, 8/19) 高于女性口腔鳞癌患者感染率 (27.3%, 3/11)。HPV<sub>16</sub> 感染阳性患者与 HPV 感染阴性患者年龄无

明显差异(平均年龄分别为 52.1 岁及 53.3 岁), 最常见原发灶部位分别是口底癌(100%, 2/2), 舌癌(46.7%, 7/15)及颊癌(33.3%, 2/6)。

### 3 讨论

人乳头瘤病毒属乳多空泡病毒科<sup>[2]</sup>, 是小的(55 nm)无包膜嗜上皮性双链环状 DNA 病毒, 幼年时即可以通过母婴传染途径传播。目前, 人们已经克隆和鉴定了人乳头瘤病毒 75 种不同的基因型<sup>[3]</sup>。从人类口腔病变中已分离出 16 种 HPV 基因型(如 HPV 1、2、3、4、6、7、11、13、16、18、30、31、32、33、35 及 57)<sup>[4,5]</sup>, 其中大多数是与口腔良性病变有关的低度危险性 HPV。高度危险性 HPV(如 16、18、31、33、35)具有使正常上皮恶性转化的潜力, 与口腔上皮的不典型增生及口腔鳞状细胞癌有密切关系。

目前研究 HPV 与口腔鳞癌关系的方法包括免疫组织化学技术、分子原位杂交等检测 HPV 的同源序列或者用 PCR 方法检测 HPV 的某一基因片段。应用电镜和免疫学方法, 不仅不敏感, 繁琐, 而且不能分型, 更为重要的是多数致病病毒并不在宿主细胞中完成其全病毒周期, 而是以某种方式与宿主细胞基因组发生关联。DNA 杂交技术克服了上述方法的不足, 已被广泛地应用于检测多种 HPV 感染疾病中的 HPV DNA 序列, 但是 DNA 探针杂交需要高比放的同位素, 对微量 DNA 不易检出, 因此报道结果差异较大, 影响了结果分析。而应用 PCR 体外扩增技术则极为敏感, 可以克服 DNA 杂交的不足, 为进行大规模的 HPV 感染状况的研究提供了一个更先进, 准确的实验方法。PCR 检测结果的敏感性和特异性有很大的提高。

1985 年人们首次在口腔鳞状细胞癌中检测到 HPV 的存在<sup>[6]</sup>。最近, 有许多报道在正常口腔粘膜、口腔良性病变、癌前病变及恶性肿瘤中检测到 HPV 抗原或 HPV-DNA 的存在, 其中包括口腔乳头状瘤、口腔上皮增生、口腔扁平苔藓、口腔白斑、口腔上皮不良增生及口腔鳞状细胞癌等。HPV 可能是口腔良、恶性病变的致病因素之一。人乳头瘤病毒在口腔病变中的感染率, 报道结果差异很大, 自 0~100% 不等。因而, 对于 HPV 在口腔粘膜上皮恶性转化及癌变中所起的作用, 也一直是一个有争议的问题。争论的焦点如下: 研究对象不同, 卫

生习惯、遗传因素的影响及环境因素影响各不相同, 而这些因素对于口腔粘膜的恶变有很大的影响; 用于检测 HPV 感染的各种检验方法的敏感性及其特异性有很大的差别。PCR 等高度敏感性检测方法方法与 Southern 杂交等中度敏感性检测方法以及免疫组织化学、原位杂交技术等低度敏感性检测方法结果有很大的差异; 许多研究未设置适当的对照组, 因而结果缺乏说服力; 而有的研究中标本数量少, 无统计学意义; 另外, 检测结果与标本的保存(新鲜冰冻标本或者石蜡包埋标本)、引物的设计(HPV 早期引物或者晚期引物)也有很大关系。

在人乳头瘤病毒阳性的口腔鳞状细胞癌中, 高度危险性 HPV<sub>s</sub>(16 及 18 型)的检出率(80%)远远高于低度危险性 HPV<sub>s</sub>(6、11 型)的检出率( $P < 0.001$ ), HPV<sub>16</sub>是与口腔鳞癌关系最为密切的一种类型<sup>[7]</sup>。HPV<sub>16</sub>、HPV<sub>18</sub> DNA 的早期基因 E<sub>6</sub>、E<sub>7</sub> 具有使细胞永生化的能力。HPV<sub>16</sub> DNA 的 E<sub>7</sub> 片段可以使动物的成纤维细胞及角化细胞发生转化。在癌变过程中, 病毒与某些癌基因, 如 C-Ha-ras 及 C-myc 之间具有协同作用。显然, HPV DNA 的基因序列可以结合到细胞癌基因附近以发挥作用。

在与 HPV 有关的疾病中, 其它一些因素, 如免疫监控也可能参与其中, 并发挥作用。Zur<sup>[8]</sup> 提出细胞内监控机制出现缺陷可能在癌变过程中发挥重要作用, 因为在一些包含 HPV DNA 的转化型宫颈癌细胞与正常角化细胞融合后可发生抑制现象。病毒或化学致癌因素也可以作用于细胞抑癌基因使之发生突变, 从而产生恶性基因表达。而且 HPV 有可能只是暂时性出现而引起染色体损伤及肿瘤形成, 因为 HPV<sub>16</sub> E<sub>7</sub> 蛋白可以使调控细胞周期的 p53 蛋白及 Rb 蛋白失活<sup>[9,10]</sup>。因而, 确定 HPV 在口腔鳞状细胞癌发生过程中所起的真正作用还有待于更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Parkin D M, Laara E, Muir C S. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980 [J]. *Int J Cancer*, 1988, 41(2): 184.
- [2] Tseng C J, Lin C Y, Wang R L. Possible transplacental transmission of human papillomavirus [J]. *Am Obstet Gynecol* 1992 166(1): 35.
- [3] Koutsky LA, Galloway DA, Holmes K K. Epidemiology of genital human papillomavirus infection [J]. *Epi-*

- demiol Rev, 1988, 10: 122.
- [4] Miller C S. Herpes simplex virus and human papillomavirus infection of the oral cavity[ J]. Semin Dermatol, 1994, 13(2): 108.
- [5] Chang F, Syrjanen S M, Kellokoski J, *et al*. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease[ J]. J Oral Pathol Med, 1991, 20(7): 305.
- [6] Loning T, Ikenberg H, Becker J, *et al*. Analysis of oral papillomas, leukoplakias and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA[ J]. J Invest Dermatol, 1985, 84(4): 417.
- [7] Craig S, Miller K, White D K, *et al*. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions and squamous cell carcinoma[ J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1996, 82(7): 57.
- [8] Zur Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections[ J]. Lancet, 1986, 2(8505): 489.
- [9] Werness B A, Levine A J, Howley P M. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E<sub>6</sub> proteins with p53 [ J]. Science, 1990, 248(April 6): 76.
- [10] Park N H, Min B M, Lis L, *et al*. Immortalization of normal human oral Keratinocytes with type 16 human papillomavirus[ J]. Carcinogenesis 1991, 12(8): 1627.

(编辑 刘清海)

## · 简 讯 ·

## 鼻咽癌防治研究创新绩 ——肿瘤防治中心“九五”攻关课题进入总结阶段

肿瘤防治中心黄腾波教授主持的“九五”攻关课题《鼻咽癌高发现场综合防治研究》提前进入总结阶段,日前召开了终期学术汇报会。鼻咽癌防治研究先后参与了国家“六五”、“七五”、“八五”、“九五”攻关。“八五”攻关“鼻咽癌高危人群筛查优化方案与癌前病变及阻断研究”在国内外首次提出了鼻咽癌高危人群癌前病变诊断标准,为人群筛查奠定科学依据。结题时发表论文 32 篇,取得了卫生部科技成果奖,作为成果一部分现正申报国家奖。“九五”攻关是在“八五”基础上,在高发现场开始防治,研究筛查新的监测手段;高危人群药物干预;探索广东鼻咽癌遗传流行病学特点;探索目前经济体制下农村肿瘤防治等。现该课题结题已发表论文 41 篇,尚有多篇待发表。

《鼻咽癌高发现场综合防治研究》由中山医科大学肿瘤防治中心牵头,四会市肿瘤研究所,中山市肿瘤研究所,黑龙江省肿瘤研究所参与研究,涉及 11 个单位、7 个学科。学术汇报会上各项任务的负责人报告了各自研究工作及结果,与会者对每项报告认真讨论,学术气氛浓厚。从学术汇报会上笔者了解到课题组经过 5 年努力取得不少成绩:通过对鼻咽癌高发区危险因素的家系分析,探讨遗传因素及环境因素与鼻咽癌发生的关系,提出鼻咽癌主要发生在一级亲属中,有癌家族史,吸烟、厨房与居住房无分开是危险因素,生命早期暴露于危险因素的更大;对鼻咽癌高危家族人群特征分析,显示高危家族人群有家族聚集现象,这一特定人群具有高恶性肿瘤检出率、高鼻咽癌检出率、高 EB 病毒 VCA/IgA 阳性率;通过流行病学观察说明 EB 病毒感染在鼻咽癌发病上是“因”不是“果”,提出遗传因素和 EB 病毒在发病上很可能起协同作用;利用 DNA 扩增技术寻找与鼻咽癌相关片段,通过分析提出健康人与鼻咽癌病人片段,健康人、高癌家系 DNA 片段,有显著差异,并显示有遗传相关性,应进一步深入研究用 DNA 相关性片段作为筛查鼻咽癌高危人群可能性;应用 EB 病毒的两条合成肽以 ELISA 法进行高危人群与鼻咽癌早期诊断,研究从唾液中检测 IgA 抗体以代替血清,对高发现场为鼻咽癌早诊与预防提供有意义的模式;研究提出 VCA/IgA、EA/IgG 双阳性判断标准在鼻咽癌筛查中利用“敏感性互补”提高鼻咽癌检出率;通过鼻咽癌高发区 EBV、VCA/IgA 阳性人群前瞻性观察提出鼻咽癌 3 年筛查 1 次较适宜,并对高发现场人群健康教育、社区防治以及集资保健与防病治病相结合途径进行探索,并对鼻咽癌高危人群进行药物干预研究;临床上进一步探讨了鼻咽光纤镜检对鼻咽筛查的意义并应用鼻咽接触内窥镜对鼻咽上皮进行了详细的研究,观察鼻咽上皮从正常至发生癌变阶段过程。黑龙江省肿瘤研究所也详细报告了北方鼻咽癌特征与流行病学调查情况提出南北方鼻咽癌发病率有差异,与环境因素,饮食因素有关,发病率城市大于农村。对照该课题合同书上的任务已基本完成,体现了团队攻关的团结协作精神,目标为高发现场人群有效筛查、综合防治方案实施与推广,提高鼻咽癌患者生存率,降低死亡率。把鼻咽癌这个称“广东癌”的防治研究工作推上更高层次。

(冯世容)