

口咽鳞状细胞癌中人乳头状瘤病毒精准检测研究进展

李志鹏^{1,2} 范志伟^{2,3} 王文龙¹ 卜祥斌¹ 张凌楠⁴ 马向瑞¹
(滨州医学院,山东 滨州 256603 1 附属医院口腔颌面外科; 2 口腔医学院; 3 附属医院口腔内科; 4 附属医院口腔正畸科)

[摘要] 不同于其他头颈部鳞状细胞癌,人乳头状瘤病毒(HPV)相关口咽鳞状细胞癌(OPSCC)是一类具有不同分子生物学发病机制、危险因素、临床病理特征的特殊疾病。HPV 阳性 OPSCC 患者的预后明显优于 HPV 阴性患者,因此 HPV 的检测对 OPSCC 的诊断和治疗尤为重要。目前,国内外针对 OPSCC 中 HPV 生物分子标志物的检测方法多种多样,但仍然缺乏一个在该领域达成共识的规范化检测标准。本文围绕 OPSCC 中 HPV 生物分子标志物的研究现状做一总结,旨在为实验室以及临床上选择适合的生物分子标志物进行 OPSCC 诊断提供借鉴。

[关键词] 头颈部鳞状细胞癌;口咽肿瘤;乳头状瘤病毒科;乳头状瘤病毒感染;诊断;敏感性与特异性;综述

[中图分类号] R739.63;R512.99 **[文献标志码]** A

口咽部位于软腭和会厌上缘平面之间,借咽峡通向口腔,主要解剖结构包括软腭、舌根(界沟后 1/3)、咽侧壁、咽后壁以及扁桃体等^[1]。2017 年第 8 版美国癌症联合委员会(AJCC)^[2]中 TNM 分期将口咽鳞状细胞癌(OPSCC)按照有无乳头状瘤病毒(HPV)感染分为 HPV 相关性鳞状细胞癌(OPSCC-HPV)和非 OPSCC-HPV。近年来 OPSCC 发病率呈现上升趋势,主要归因于高危型 HPV 的感染,尤其是 HPV16^[3]。2018 年,美国病理学家协会(CAP)建议把 HPV 检测作为诊断 OPSCC 的一项辅助检查^[4]。由于人种差异以及文化背景和生活方式不同,各个国家 OPSCC 患者 HPV 的感染率不同,我国 OPSCC 患者 HPV 的感染率低于 20%,而北美地区约为 56%,欧洲地区为 17%~39%^[5]。不同地区人群 HPV 感染率不同,推荐的检测方法也不相同。如果完全按照国外相关指南或者共识标准化我国检测方案,将会使我国 OPSCC-HPV 的检出率出现较大差异。因此本文就 HPV 的分子特性及其独特生物分子标志物检测现状做一总结,以求进一步探索 OPSCC-HPV 更加特异和灵敏的检测方法。以供实验室或临床借鉴。

1 HPV

HPV 在头颈部的研究始于 1901 年,当时描述了疣状病变通过口交进入口腔并进行传播^[6]。随后大量的研究结果证明 HPV 与头颈部鳞状细胞癌(HNSCC),尤其是与 OPSCC 的发生密切相关。国际癌症研究机构(IARC)分别在 2007 年和 2012 年

正式调查并分析了 HPV 对人类的相关影响,并得到了足够的证据表明口咽部确实存在 HPV16 感染后的致癌性^[7]。

HPV 是一种无包膜双链 DNA 病毒,大约有 8 000 个碱基对,包括 200 多种亚型,广泛感染人类上皮细胞并引起寻常疣、尖锐湿疣、宫颈癌、肛门癌和口咽癌等疾病^[8]。根据与宫颈癌的关系,HPV 类型被分为高风险(HPV 16、18、31、33 和 35 型等)和低风险(HPV 26、30、34 以及 53 型等)两种类型^[9]。高风险 HPV(尤其是 16、18 型)可极大地促进相关肿瘤的发生,特别是宫颈鳞状细胞癌以及一些其他的生殖器恶性肿瘤等^[9]。HPV 可以分为 3 个部分:①早期区包含 7 个开放阅读框(E1~E7),于病毒感染早期表达,并在病毒的复制、免疫逃逸和细胞转化中发挥重要作用;②晚期区(L)编码衣壳蛋白 L1 和 L2,该类蛋白参与病毒的包装和释放;③长控制区(LCR)作为调控元件参与病毒转录和复制^[10]。当人体感染 HPV 后,E6 与肿瘤抑制蛋白 P53 结合,并通过蛋白酶介导途径抑制 P53 的表达,进而抑制其促凋亡功能;E7 与成视网膜细胞瘤蛋白(PRb)结合,下调 PRb 进而促进 P16 的表达,使相关的细胞周期调节因子无法控制细胞分裂,从而使细胞增殖失控,最终导致肿瘤的发生^[11-12]。当然,HPV 的致癌机制远非经典途径如此简单。GILLISON 等^[12]最近研究发现,HPV 促癌蛋白会引起宿主基因(凋亡基因、细胞增殖基因和免疫基因等)的不稳定性,形成区别于非 OPSCC-HPV 的独特基因组,从而促进肿瘤的发生。

2 HPV 生物标志物

目前 HPV 生物标志物主要包括在组织中直接检测病毒的 DNA、P16 和 E6/E7 mRNA,在血清、

[收稿日期] 2021-06-16; [修订日期] 2021-07-20
[基金项目] 山东省自然科学基金博士基金资助项目(ZR2018-BH026);山东省医药卫生科技发展计划面上项目(2017WS231);滨州医学院科研计划与科研启动基金项目(BY2015KYQD24)
[通讯作者] 马向瑞,Email:wxy851225@163.com

血浆及唾液中检测抗体、病毒的 DNA 和 *E6/E7* mRNA。大多数学者认为应用 RT-PCR 检测新鲜肿瘤组织中 HPV *E6/E7* mRNA 是诊断转录活跃的高危 HPV 的“金标准”,其他检测方法灵敏度和特异度的判断也大多与该方法进行比较。但由于新鲜肿瘤组织的获取不适用于所有人群,且 RT-PCR 技术检测病毒 RNA 本身也存在一定的局限性,在国内外临床中的应用尚没有普及。因此临床上应对不同检测目的和样本来源选择适合的 HPV 生物标志物进行研究,以提高病毒的检出率。

2.1 肿瘤组织中 DNA 水平

对 HPV DNA 的检测可以直接反应肿瘤组织中是否存在病毒。针对 L1 序列设计的引物(例如 GP5/GP6 引物对)能够扩增多种 HPV 类型,常被用于检测多种 HPV 亚型。最新的一项 Meta 分析结果显示,PCR 技术检测肿瘤组织中 HPV DNA 的灵敏度和特异度分别为 98% 和 84%^[13]。但还有一种情况是,病毒整合到宿主基因组后,L1 区域可能被删除,从而降低了 HPV 检测的灵敏度。另外在石蜡包埋组织(FFPE)中,PCR 技术也可能无法检测到 HPV,因为样本中的基因组序列很可能在甲醛固定、储存过程中被破坏了。同时由于 PCR 技术本身检测的特点,结果的灵敏度较高,也可能会检测到具有可疑致癌意义的极低拷贝数的病毒,从而增加了假阳性的风险。

DNA 原位杂交(ISH)技术是一种利用标记 DNA 探针与 HPV DNA 序列互补技术对所有已知类型 HPV 进行检测的方法。高达 10% 的 OPSCC-HPV 是由 HPV16 以外的亚型引起的,因此鸡尾酒探针对于多种高风险亚型的检测有重要意义。该方法在高倍显微镜下不仅能够直接观测到是否有 HPV DNA,还有助于确定 HPV DNA 在组织和细胞中的位置,进而显示病毒的状态(扩散信号表明存在游离型 HPV,点状信号表明存在整合型 HPV),从而提高了检测的特异度。然而,由于缺乏清晰的染色信号,检测人员主观判断所导致结果的差异可能高达 10%。总的来说,应用 PCR 或 ISH 技术检测组织或者细胞中的 HPV DNA 都不能确定 HPV 是否具有活性^[5]。

2.2 肿瘤组织中 RNA 水平

相对于 HPV DNA,HPV *E6/E7* mRNA 的检测结果更加准确,RT-PCR 针对不同 HPV 的 *E6/E7* 设计合适的引物,进而分析病毒的亚型和评估病毒的毒性。然而,该技术操作难度较大,对结果的解

释也可能存在主观判断,故不适用于常规的病理实验室^[13]。类似于 DNA ISH,*E6/E7* mRNA ISH 也是采用鸡尾酒探针的方法,从各种 HPV 亚型中对 *E6/E7* mRNA 进行检测。目前常用的 RNA-scope 方法可以直接显示常规处理组织中的病毒 mRNA,并且能识别 HPV 在细胞中的位置,从而提高了检测的特异度^[14]。UKPO 等^[14]通过免疫组织化学(IHC)方法检测肿瘤组织中的 P16,结果与 *E6/E7* mRNA ISH 的一致性达到了 96.4%,与 DNA ISH 的一致性仅为 79.3%,这也进一步说明 *E6/E7* mRNA ISH 的灵敏度是优于 DNA ISH 的。

无论哪种方法检测 RNA 都要考虑到:①FFPE 样本中 RNA 可能受到污染或破坏。②生物体液样本中含量较低的 RNA 可能会影响检测结果。

2.3 肿瘤组织中蛋白水平

P16 是一种肿瘤抑制蛋白,通过抑制 CDK4 和 CDK6 的磷酸化来调节细胞周期,从而阻止 PRb 的磷酸化。在 HPV 的生命周期中,*E7* 可使 PRb 失活,从而导致 P16 等细胞周期相关蛋白的上调且达到 IHC 容易检测的水平,因此 P16 的上调可以作为活跃的 HPV 感染的标志。由于低成本、易获取、高灵敏度以及较高的观察一致性,国外很多学者倾向于把 P16 作为 OPSCC 中 HPV 感染的替代标志物。ABDELHAKAM 等^[15]针对 104 例 OPSCC 患者进行回顾性研究,发现肿瘤组织中 P16 阳性率达到了 89.4%。然而也有一些研究指出,P16 的高表达并不能反映 HPV 的转录活性,因为其升高还受到其他非致癌机制的调控,如与 HPV 无关的神经干细胞以及良性鳞状细胞也可以过度表达 P16。TRIBIUS 等^[16]研究显示采用 IHC 方法检测肿瘤组织中 P16 大约有 5% 假阳性风险。P16 作为 HPV 感染的替代指标是否可靠在国内外一直备受关注,但因我国 HPV 感染率较低,特异度较低的诊断标志物作为独立检测指标是不可靠的。故在不同地区需重新评估 P16 IHC 的诊断能力^[5]。

2015 年,CHI 等^[17]推荐以下方案来评估 HPV 的状态:①对于完全或大部分非角质化的肿瘤,P16 高度且弥漫(即 70% 以上细胞质和细胞核)表达时,足以指示 HPV 阳性,不需要再进行 HPV DNA 检测;若 P16 阴性或者局部阳性表达时,则需要进行 HPV DNA 检测;②对于角质化肿瘤,P16 高度且弥漫表达时,需要进行 HPV DNA 检测;若 P16 阴性或局部阳性表达时,足以指示 HPV 的阴性状态,不需要 HPV DNA 检测。

2020 年我国《口腔癌及口咽癌病理诊断规范》中对于 OPSCC 患者提出了具体的推荐诊断方案。Ⅰ级推荐:所有病例均应行 P16 IHC 检测,当 P16 阳性细胞数 $\geq 70\%$ 、阳性表达定位于细胞核和细胞质且为中等至强阳性,且组织学形态为非角化型鳞状细胞癌时,应报告“HPV 相关性(P16+)鳞状细胞癌”;Ⅱ级推荐:除行 P16 IHC 检测外,可行 HPV DNA 或 RNA 检测,对于 HPV DNA 或 RNA 检测阳性者,应报告“OPSCC-HPV”。

2.4 体液中的生物标记物

血清、血浆和唾液中生物标记物在可获得性、低侵入性、低成本性等方面具有优势,对其检测有助于疾病早期和术后复发的预测。一种基于 PCR 的检测唾液中 HPV E6/E7 mRNA 的方法,检测结果与 P16 IHC 具有高度一致性。RETTIG 等^[18]收集了 OPSCC-HPV 患者治疗前后几个时间点的唾液样本,54% 的患者在诊断时被检测到 HPV DNA,而经治疗后仅约 5% 患者唾液中可检测到 HPV DNA。重要的是,所有治疗后复发 OPSCC-HPV 患者均与 HPV 持续感染相关^[18]。

研究发现 HPV E6/E7 血清抗体与 OPSCC 风险之间具有显著相关性。KREIMER 等^[19]研究发现,有 34.8% OPSCC 患者血清中被检测到 HPV E6 抗体,而在健康对照组中仅占 0.7%,值得关注的是部分诊断为 OPSCC 患者在 10 年前血清中就已检测出存在 HPV E6 抗体。这可能意味着血清中 HPV16 E6 抗体阳性人群患 OPSCC 风险较高。

AHN 等^[20]应用 PCR 方法检测了 81 例 OPSCC-HPV 患者的血浆,约有 67% 的样本在治疗前就检测到了 HPV DNA。CHERA 等^[21]利用相同技术对 115 例患者的 1 006 份血浆样本进行了检测,87 例患者在治疗后监测期间内未检测到 HPV DNA,并且均未出现复发;28 例患者在治疗后监测期间检测到 HPV DNA,其中 15 例患者经活检证实复发;16 例患者连续 2 次 HPV DNA 血浆检测阳性,其中 15 例经活检证实复发。这些数据对于早期发现肿瘤复发和开展进一步治疗非常有帮助。

3 结语

生物标志物是指可以提示系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能的改变或可能发生改变的生化指标,具有非常广泛的用途。检测一种疾病特异性的生物标志物,对于疾病的鉴定、早期诊断、预防和治疗有着至关重要的作用。因为具有成本更低、

样本更易获取和大众更易接受的特点。针对唾液、血浆中 HPV DNA 和血清中 HPV 抗体的检测,比较适用于临床大规模的筛查和复发预测,然而其检测结果灵敏度偏低,这可能与液态样本中病毒含量较低或者检测技术不成熟等有关。目前针对组织样本的检测主要有 PCR、ISH 和 IHC 等技术。检测方法各有利弊,也没有足够的证据证明仅采用一种检测方法就可以确诊。这里需要注意的是,要将一种检测方法应用于临床实践,需要的不是灵敏度高到可以检测到少量 HPV(可能来自无关的感染或污染),而是要证明病毒的转录活性是否已经可以导致癌症,同时要结合 OPSCC-HPV 临床表现。因此,当前较多学者提出了多模态检测,其原理是利用单个检测的优势来优化 HPV 检测结果整体可靠性。

总而言之,未来 OPSCC-HPV 的检测应该满足非侵入性、低成本及易操作的特点,从而做到早诊断、早治疗,以提高患者的总体生存率。

[参考文献]

- [1] TIMBANG M R, SIM M W, BEWLEY A F, et al. HPV-related oropharyngeal cancer: A review on burden of the disease and opportunities for prevention and early detection[J]. Hum Vaccin Immunother, 2019,15(7-8):1920-1928.
- [2] AMIN M B, GREENE F L, EDGE S B, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging[J]. CA Cancer J Clin, 2017,67(2): 93-99.
- [3] MASHIANA S S, NAVALE P, KHANDAKAR B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in head and neck cancer: Informing developing strategies for cancer prevention, diagnosis, treatment and surveillance[J]. Oral Oncol, 2021, 113:105109.
- [4] FAKHRY C, LACCHETTI C, ROOPER L M, et al. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: ASCO clinical practice guideline endorsement of the college of American pathologists guideline[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(31): 3152-3161.
- [5] XU S M, SUN B, ZHOU R, et al. Evaluation of p16 as a surrogate marker for transcriptionally active human papillomavirus status of oropharyngeal squamous cell carcinoma in an eastern Chinese population[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2020,129(3):236-245.e2.
- [6] SYRJÄNEN S, RAUTAVA J, SYRJÄNEN K. HPV in head and neck cancer-30 years of history[J]. Recent Results Cancer Res, 2017,206:3-25.
- [7] GILLISON M L, CASTELLSAGUÉ X, CHATURVEDI A, et al. Eurogin Roadmap: Comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix

- [J]. Int J Cancer, 2014,134(3):497-507.
- [8] GRAHAM S V, FAIZO AAA. Control of human papilloma-virus gene expression by alternative splicing[J]. Virus Res, 2017,231:83-95.
- [9] 崔广学,高晓磊,梁新华. 人乳头瘤状病毒在头颈部鳞状细胞癌中的研究进展[J]. 华西口腔医学杂志, 2017,35(2):187-191.
- [10] SABU A, MOULI NVR, TEJASWINI N, et al. Human pa-pillomavirus detection in oropharyngeal squamous cell carcino-ma using p16 immunohistochemistry[J]. Int J Appl Basic Med Res, 2019,9(4):212-216.
- [11] 王岳,季一鸣,王晓毅,等. 人乳头状瘤病毒 16 相关口咽鳞状细胞癌独特生物学行为及治疗的研究现状[J]. 国际口腔医学杂志,2021,48(4):450-458.
- [12] GILLISON M L, AKAGI K, XIAO W H, et al. Human pa-pillomavirus and the landscape of secondary genetic alterations in oral cancers[J]. Genome Res, 2019,29(1):1-17.
- [13] PRIGGE E S, ARBYN M, VON KNEBEL DOEBERTZ M, et al. Diagnostic accuracy of p16^{INK4a} immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis[J]. Int J Cancer, 2017,140(5):1186-1198.
- [14] UKPO O C, FLANAGAN J J, MA X J, et al. High-risk hu-man papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel *in situ* hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma [J]. Am J Surg Pathol, 2011,35(9):1343-1350.
- [15] ABDELHAKAM D A, HUENERBERG K A, NASSAR A. Utility of p16 and HPV testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: An institutional review [J]. Diagn Cytopathol, 2021,49(1):54-59.
- [16] TRIBIUS S, WÜRDEMAN N, LABAN S, et al. Update zu HPV-assozierten Kopf-Hals-Karzinomen——Highlights der ASCO-Jahrestagung 2018[J]. HNO, 2018,66(12):888-895.
- [17] CHI A C, DAY T A, NEVILLE B W. Oral cavity and oropha-ryngeal squamous cell carcinoma: An update[J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(5):401-421.
- [18] RETTIG E M, WENTZ A, POSNER M R, et al. Prognostic implication of persistent human papillomavirus type 16 DNA detection in oral rinses for human papillomavirus-related oro-pharyngeal carcinoma[J]. JAMA Oncol, 2015,1(7):907-915.
- [19] KREIMER A R, JOHANSSON M, WATERBOER T, et al. Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of sub-sequent head and neck cancer[J]. J Clin Oncol, 2013,31(21):2708-2715.
- [20] AHN S M, CHAN J Y, ZHANG Z, et al. Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and sur-veillance of human papillomavirus-related head and neck cancer [J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2014,140(9):846-854.
- [21] CHERA B S, KUMAR S, SHEN C, et al. Plasma circulating tumor HPV DNA for the surveillance of cancer recurrence in HPV-Associated oropharyngeal cancer [J]. J Clin Oncol, 2020,38(10):1050-1058.
- (本文编辑 耿波 厉建强)
-
- (上接第 372 页)
- [7] 曾替伦,吕铮,崔久嵬. 乳腺癌免疫治疗研究进展[J]. 中国肿 瘤生物治疗杂志, 2019,26(1):96-102.
- [8] ZOU W P, WOLCHOK J D, CHEN L P. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, re-sponse biomarkers, and combinations[J]. Sci Transl Med, 2016,8(328):328rv4.
- [9] FRANCISCO L M, SAGE P T, SHARPE A H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity[J]. Immunol Rev, 2010,236:219-242.
- [10] WU P, WU D, LI L, et al. PD-L1 and survival in solid tumors: A meta-analysis [J]. PLoS One, 2015, 10 (6): e0131403.
- [11] PARDOLL D M. The blockade of immune checkpoints in can-cer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2012,12(4):252-264.
- [12] RECH A J, VONDERHEIDE R H. Dynamic interplay of on-cogenes and T cells induces PD-L1 in the tumor microenviron-ment[J]. Cancer Discov, 2013,3(12):1330-1332.
- [13] STEINERT G, SCHÖLCH S, NIEMIETZ T, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2014,74(6):1694-1704.
- [14] MITTENDORF E A, PHILIPS A V, MERIC-BERNSTAM F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer[J]. Cancer Immunol Res, 2014,2(4):361-370.
- [15] MUENST S, SCHAEERLI A R, GAO F, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2014,146(1):15-24.
- [16] ALI H R, GLONT S E, BLOWS F M, et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes[J]. Ann Oncol, 2015,26(7):1488-1493.
- [17] NANDA, CHOW L Q, DEES E C, et al. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 study[J]. J Clin Oncol, 2016,34(21):2460-2467.
- [18] 苗贤媛,郭秋生,王稼晓. 乳腺癌非特异性免疫治疗研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020,27(6):685-690.
- [19] GRADISHAR W J, ANDERSON B O, ABRAHAM J, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Breast Carcino-ma-V.1.2019 [EB/OL]. [2020-11-12]. <http://www.NCCN.org>.
- [20] SCHMID P, CORTES J, PUSZTAI L, et al. Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer [J]. N Engl J Med, 2020,382(9):810-821.
- (本文编辑 耿波 厉建强)