

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.057.html>

人乳头瘤病毒与 NSCLC 相关性探讨

曹晓玉^{1,2}, 操乐杰¹, 李传应³, 王晓秋³

摘要 目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)感染与非小细胞肺癌(NSCLC)发病相关性;分析 HPV 感染与 NSCLC 临床病理特征和多种基因突变之间的关系。方法 收集 NSCLC 264 例原发灶和 65 例转移灶的石蜡包埋组织标本。选择 264 例原发灶邻近的上皮组织(癌旁对照组)和 12 例肺良性组织分别作为对照。采用免疫组化 EnVision 二步法检测 HPV L1 蛋白。选择 109 例 NSCLC 标本采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测 HPV16/18 L1 基因序列;90 例肺腺癌组织同时行 EGFR、ALK、KRAS、BRAF 基因状态 RT-PCR 法检测。结果 NSCLC 原发灶与转移灶 HPV L1 蛋白检测阳性率相近。NSCLC 原发灶 HPV L1 蛋白阳性率显著高于癌旁对照组和肺良性对照组。不同组织类型原发灶中 HPV L1 蛋白检测阳性率存在明显差别,肺腺癌 HPV L1 蛋白检测阳性率显著高于肺鳞癌。109 例 NSCLC 标本 HPV16/18 L1 基因序列 11 例阳性。HPV L1 蛋白阳性肺腺癌患者 KRAS 基因突变率显著高于阴性,而 EGFR、ALK、BRAF 基因状态与 HPV L1 蛋白阳性无明显相关。结论 HPV 感染与 NSCLC 发生可能有密切关系,尤其以肺腺癌关系更为密切;KRAS 突变可能是 HPV 相关肺腺癌发病的驱动基因类型,为开展肺癌精准治疗指明方向。

关键词 人乳头瘤病毒;非小细胞肺癌;免疫组化;基因突变
中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0256-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.024

肺癌是威胁人类健康最严重的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均居恶性肿瘤首位。吸烟是肺癌已明确的病因,但是约有 25% 肺癌患者既往没有吸烟史^[1]。除吸烟外,肺癌病因还包括被动吸烟、遗传因素、氡暴露、厨房油烟和室内燃煤、空气污染、感染因素等^[2]。人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与非小细胞肺癌(non small cell lung cancer,

NSCLC)之间的关系在近 30 余年受到学者们重视并逐渐成为研究热点^[3],其致癌机制目前仍不清楚。该研究以 NSCLC 原发灶和转移灶为研究对象,运用免疫组化法和实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法分别在蛋白及基因水平探讨 HPV 与 NSCLC 之间的关系;分析 HPV 感染与 NSCLC 患者各临床病理特征和多种基因突变之间的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 按照 2011 年由国际肺癌研究会、美国胸科学会及欧洲呼吸学会联合在《胸部肿瘤学杂志》公布的肺癌的国际多学科分类标准进行分类。根据国际抗癌联盟对癌症的定义标准鉴别肿瘤分期,选择富集肿瘤细胞组织(肿瘤细胞 > 50%)为合格标本,所有标本由两位资深病理科医师审核标本是否合格和确定组织学类型及分化程度。收集 264 例原发灶和 65 例 NSCLC 转移灶作为研究对象。12 例肺良性组织(机化性肺炎和肺大疱各 6 例)和 264 例原发灶邻近的正常肺上皮组织作为对照组。264 例 NSCLC 患者年龄 20~86(60.9 ± 10.0)岁;其中肺鳞癌 100 例,肺腺癌 145 例,其他类型 19 例。

1.2 主要试剂 鼠抗广谱人乳头瘤状病毒(HPV1、6、11、16、18、31)单克隆抗体、酶标抗小鼠/兔 IgG 聚合物(美国 Biocare 公司);DAB 染色液(聚合法)(美国 Golden Bridge International 公司);兔单克隆抗体 ALK(D5F3)(美国 Cell Signaling Technology 公司);HPV16、18 型核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒(广州中山大学达安公司);FFPE QIAamp DNA 提取试剂盒和 RNA/DNA 共分离试剂盒、人类 EML4-ALK 融合基因检测试剂盒、人类 EGFR 基因 21 种突变检测试剂盒、人类 KRAS 基因 7 种突变检测试剂盒(RT-PCR)、人类 BRAF 基因 V600E 突变检测试剂盒(RT-PCR)(德国 Qiagen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 HPV L1 免疫组化(EnVision 二步法)检测

操作步骤:①所有标本切 3 μm 厚组织切片,捞于阳离子防脱玻片;②置 60℃ 恒温培养箱中烤片 > 2 h;③二甲苯脱蜡 3 次,每次 5 min,无水乙醇脱苯 3

2016-09-09 接收

基金项目:安徽省卫生厅医学科研基金(编号:13zc001);安徽省科技厅攻关计划项目(编号:1301042216)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹ 呼吸内科、³ 病理科,合肥 230001;

² 阜阳市第二人民医院结核科 阜阳 236015

作者简介:曹晓玉,女,硕士研究生;

操乐杰,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:sycaolejie@163.com

次,每次 5 min,后水化;④ pH 6.0 柠檬酸修复液进行高压修复;⑤ 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶;⑥ 加一抗后放置于 4 °C 冰箱孵育过夜;⑦ 加二抗室温孵育 30 min;⑧ DAB 显色,光镜下观察适时终止显色;⑨ 苏木精复染,盐酸酒精分化, pH 7.2 磷酸缓冲盐溶液(PBS)蓝化,梯度酒精脱水干燥,苯酚+二甲苯混合液(1:2)5 min,二甲苯(2次,每次 5 min)透明,中性树胶封片、读片。阳性对照为已知 HPV16/18 PCR 检测阳性的宫颈癌组织,空白对照用 PBS 代替一抗。结果判定标准^[4]:光镜下观察染色结果,阳性信号位于细胞核,呈颗粒状、丝状或弥漫性褐色反应(图 1)。每张切片随机选取 5 个高倍($\times 400$)视野,每个视野计数 100 个细胞,肿瘤组织着色肿瘤细胞数大于 10% 判定为阳性;肺良性组织和癌旁组织着色肺上皮细胞数大于 10% 判定为阳性。

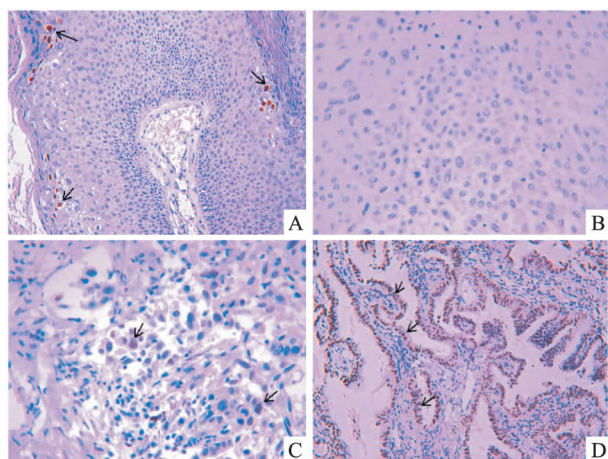


图 1 免疫组化检测 HPV L1 蛋白在肺癌和宫颈癌阳性对照组织表达
A:宫颈癌阳性对照 $\times 200$; B:肺癌空白对照 $\times 400$; C:肺鳞癌 $\times 400$; D:肺腺癌 $\times 100$;箭头:着色的肿瘤细胞

1.3.2 HPV16/18 RT-PCR 检测 DNA 提取:以 HPV 免疫组化阳性为主选取 109 例标本(98 例原发灶和 11 例转移淋巴结)分别提取 DNA。每例标本切片 7 μm 5 张,二甲苯脱蜡,无水乙醇置换二甲苯,金属浴锅蒸干无水乙醇。应用 QIAamp 试剂盒严格按照操作说明书提取 DNA。应用 SMA4000 微量紫外分光光度计(AmoyDx 北京仪器有限公司)检测所提取 DNA 浓度和纯度(浓度介于 70~300 g/L,纯度 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 介于 1.81~2.14)。提取 DNA 置于 -20 °C 冰箱保存。HPV16/18 L1 基因检测:原理:选用 HPV16/18 基因组中编码主要衣壳蛋白 L1 基因的编码区为扩增区域,设计特异性引物及荧光

探针,扩增片段长度为 294 bp。利用 RT-PCR 法检测 HPV16、18 型 DNA。步骤:取 PCR 反应管若干,分别加入已提取的待测标本 DNA、阴性质控品和阳性质控品 5 μl 8 000 r/min 离心 5 s,放入 Applied Biosystems 7500 仪器样品槽。严格按照操作说明书编辑操作。PCR 扩增顺序:93 °C 2 min;93 °C、45 s 55 °C、60 s,10 个循环;93 °C、30 s 55 °C、45 s 30 个循环进行扩增。结果判定:如果增长曲线不呈 S 型曲线或 Ct 值 = 30 则为阴性;若增长曲线呈 S 型曲线或 Ct 值 < 30 则为阳性(图 2)。

1.3.3 EGFR、ALK、KRAS、BRAF 基因突变检测

90 例肺腺癌分别进行 ALK、HPV L1 免疫组化及突变扩增阻滞系统(ARMS)定量 EGFR、KRAS、BRAF 基因突变状态检测。ALK 采用免疫组化(EnVision 二步法)(同 1.3.1)检测 ALK 蛋白表达,阳性信号位于胞质,所有免疫组化着色的标本无论强弱采用 ARMS RT-PCR 法进行 ALK 基因验证。所有操作严格按照说明书执行。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 21.0 软件进行分析。数据比较运用 χ^2 检验或 Fisher 确切检验法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测患者的临床及病理特点 264 例 NSCLC 患者 I~II 期 191 例(72.3%),III~IV 期 73 例(27.7%)。65 例 NSCLC 转移灶包括淋巴结转移 53 例,胸壁转移 2 例,恶性胸腔积液 1 例,脑转移 9 例。10 例锁骨上淋巴结转移灶和 2 例胸壁转移灶为活检标本,其余除胸腔积液外为手术标本。其中 42 例原发灶患者的转移淋巴结入组转移灶,所有患者未进行放化疗,患者的临床及病理特点见表 1。

2.2 HPV L1 蛋白表达 264 例 NSCLC 原发灶共检出 HPV 阳性显著高于癌旁组织($P < 0.001$)和肺良性组织($P = 0.041$)。6 例 HPV 阳性的癌旁组织相应原发灶 4 例阳性 2 例阴性。根据组织学类型分类,肺腺癌 HPV 感染率 33.1% (48/145) 显著高于肺鳞癌 16.0% (16/100) ($P = 0.003$)。除组织学类型外,性别、年龄、吸烟史、原发灶分期、TNM 分期、分化程度不同 HPV 感染差异无统计学意义。65 例 NSCLC 转移灶共检出 35.4% (23/65) HPV 阳性标本,与原发灶 HPV 阳性率比较差异无统计学意义。23 例转移灶 HPV 阳性包括淋巴结转移 37.7% (20/53),脑转移 22.2% (2/9)。另外,胸水细胞沉淀 1 例检测阳性,胸壁转移包块 2 例均为阴性。42

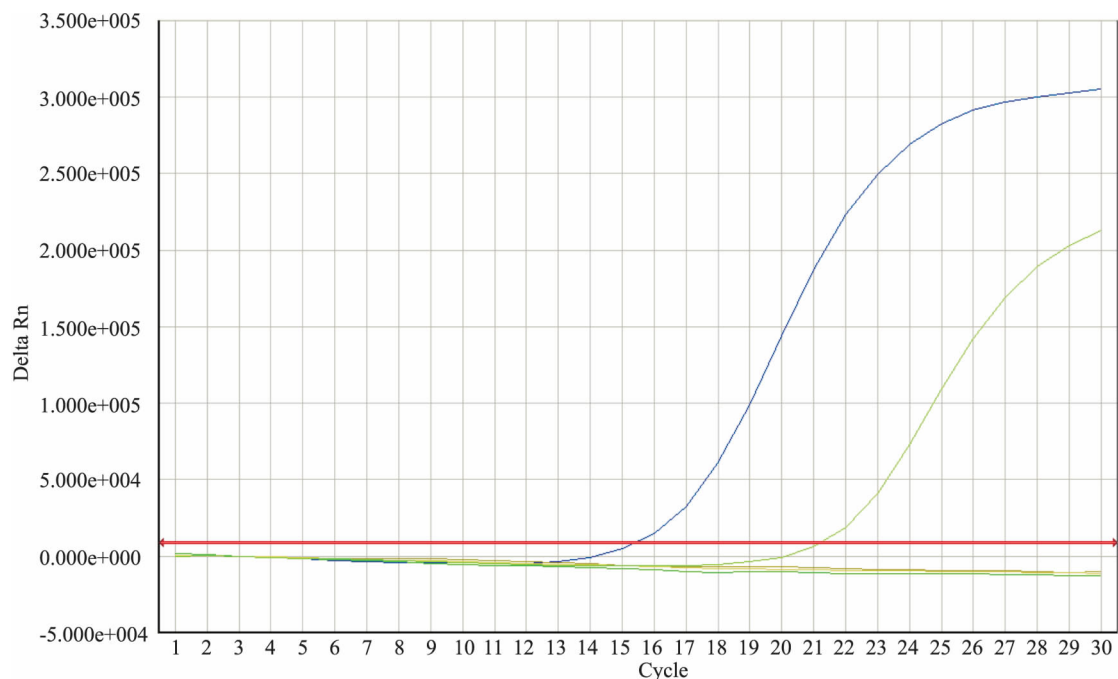


图2 HPV L1 DNA RT-PCR 扩增曲线

表1 HPV 感染与 NSCLC 临床病理特征关系(n)

项目	n	HPV L1 蛋白表达		阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			
原发灶	264	70	194	26.5		
癌旁对照	264	6	258	2.3	-	<0.001
良性对照	12	0	12	0	-	0.041*
转移灶	65	23	42	35.4	0.024	0.155
组织学类型						
肺鳞癌	100	16	84	16.0	8.971	0.003
肺腺癌	145	48	97	33.1		
性别						
男	190	54	136	28.4	0.201	0.654
女	74	19	55	25.7		
年龄(岁)						
≥60	151	40	111	26.5	0.000	0.991
<60	113	30	83	26.5		
吸烟史						
有	146	38	108	26.0	0.040	0.842
无	118	32	86	27.1		
原发灶分期						
T1/T2	203	51	152	25.1	0.874	0.350
T3/T4	61	19	42	31.1		
TNM 分期						
I/II	191	52	139	27.2	0.179	0.672
III/IV	73	18	55	24.7		
分化程度						
高	30	5	25	16.7	1.695	0.429
中	138	38	100	27.5		
低	96	27	69	28.1		

* Fisher 确切检验法

原发灶和转移灶 HPV 检测均阳性, HPV L1 蛋白表达结果见表 1。

2.3 HPV16/18 DNA RT-PCR 法检测 109 例 HPV L1 蛋白表达阳性标本 HPV16/18 L1 基因序列, 共 11 例阳性和 1 例可疑阳性。其中 98 例原发灶检出 9 例阳性: 肺鳞癌 5 例, 腺癌 4 例; 1 例腺癌可疑阳性; 11 例淋巴结转移组织中 2 例阳性。

2.4 多基因检测结果 (EGFR、ALK、KRAS、BRAF) 90 例肺腺癌患者 EGFR、KRAS、ALK、BRAF 驱动基因阳性率分别是 44.4%、20.0%、2.2% 及 1.1%。90 例肺腺癌 HPV L1 蛋白阳性率为 33.3%。分别比较 HPV L1 蛋白阳性及阴性标本中多基因状态, 结果显示: EGFR 在 HPV L1 蛋白阳性标本中突变率低于 HPV L1 蛋白阴性标本, 但差异无统计学意义; KRAS 突变在 HPV 阳性患者中发生率显著高于 HPV 阴性患者 ($P=0.001$)。另外 2 例 ALK 阳性患者均检出 HPV L1 蛋白阳性, 而 ALK 阴性患者检出 31.8% (28/88) HPV L1 蛋白阳性。1 例 BRAF 突变患者未检出 HPV L1 蛋白阳性, 而 89 例阴性患者检出 33.7% (30/89) HPV L1 蛋白阳性。见表 2。

3 讨论

1979 年 Syrjänen^[5] 首次提出 HPV 感染可能与

例患者同时入组原发灶和转移灶的 HPV 感染率分别是 31.0% (13/42) 和 26.2% (11/42), 其中 3 例

表2 HPV L1 蛋白感染状态与肺腺癌的
EGFR、ALK、KRAS、BRAF 突变状态之间关系 [n(%)]

项目	n 90	HPV L1 蛋白表达		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
EGFR					
阳性	40	9(22.5)	31(77.5)	3.803	0.051
阴性	50	21(42.0)	29(58.0)		
ALK					
阳性	2	2(100.0)	0(0.0)	-	0.109*
阴性	88	28(31.8)	60(68.2)		
KRAS					
阳性	18	12(66.7)	6(33.3)	11.250	0.001
阴性	72	18(25.0)	54(75.0)		
BRAF					
阳性	1	0(0.0)	1(100.0)	-	1.000*
阴性	89	30(33.7)	59(66.3)		

* Fisher 确切检验法

肺癌发生相关;目前,在全球范围内运用不同方法检测出肺癌中 HPV 感染率呈现不均一性(0 ~ 78.3%)^[6]。亚洲的研究以 HPV 在 NSCLC 中的高感染率多见^[7]。本研究以安徽地区患者为研究对象,NSCLC 原发灶 HPV 的感染率 26.5% (70/264) 显著高于癌旁对照组的 2.3% (6/264) 和肺良性对照组 0 (0/12),表明 HPV 感染可能是另一肺癌发生重要病因。

HPV 感染与肺癌组织学类型的关系争议较大。Syrjänen^[5]首次提出 HPV 可能与肺癌发生相关,得益于观察到支气管鳞癌邻近支气管上皮与生殖道疣形态改变相似。Yu et al^[8]研究指出 HPV 在肺鳞癌中的感染率显著高于肺腺癌。一项以亚洲研究^[9]为主要研究对象的 meta 分析显示 HPV 感染与肺鳞癌密切相关。Baba et al^[10]报道 HPV 感染与肺腺癌关系更为密切。本研究显示相较于肺鳞癌,肺腺癌与 HPV 感染关系更为密切。除组织学类型外,HPV 感染与 NSCLC 临床病理特征相关性仍在探索中。Muñoz et al^[11]利用 HPV16 E6/E7 蛋白转染的 A549 (肺腺癌)和 BEAS-2B (正常支气管组织)细胞系暴露在不同浓度的烟冷凝物 48 h (相当于真正吸烟的烟草暴露)进行分析,结果表明吸烟可能与 HPV16 E6/E7 蛋白相互作用,促进肺泡上皮细胞恶性转化过程。Wang et al^[4]用免疫组化法检测 210 例肺腺癌 HPV 状态并分析其与临床病理特征之间关系,结果显示原发灶和 T1/T2 期的肺腺癌较转移灶和 T3/T4 期与 HPV 感染关系密切,其他特征包括年龄、组织学类型等则无相关性。本研究结果显示除组织学类型外,中、低分化和 T3/T4 期的肿瘤组织较高分化和 T1/T2 更易感染 HPV,但差异无统计学意义,

而性别、年龄、吸烟史、TNM 分期则显示无相关性。

迄今为止,HPV 已被公认的亚型至少有 130 种,其中,HPV16/18 与肿瘤关系最密切。Ragin et al^[12]对全球 3 249 例肺癌标本的 HPV 检测进行 meta 分析,提示 HPV16/18 是与肺癌关系最密切的两种亚型。本研究的 109 例 NSCLC 标本中有 11 例检出 HPV16/18 L1 基因序列,包括 9 例原发灶肺肿瘤组织和 2 例转移淋巴结。本研究 RT-PCR 法检测是以 HPV L1 蛋白表达阳性标本为主要研究对象,该结果不能准确评价 NSCLC 中 HPV16/18 感染率。

目前,关于 HPV 相关肺癌转移灶鲜有报道。本研究显示原发灶和转移灶与 HPV 感染关系差异无统计学意义。65 例转移灶运用免疫组化法检出 23 例 HPV 阳性(35.4%),其中 3 例淋巴结转移灶和相应肺原发灶均呈现阳性反应,是 HPV 参与肺癌发生的依据之一。肺癌脑转移灶 HPV 感染既往尚无研究报道。本研究 6 例 NSCLC 脑转移灶中 2 例 HPV L1 蛋白检测阳性。遗憾的是,该研究系回顾性调查研究,脑转移病例缺少相应 NSCLC 原发灶标本以验证原发灶与转移灶的 HPV 感染状态一致性。

学者们认为人类肿瘤相关病毒致癌机制多为病毒基因组整合到宿主基因^[13]。基因整合理论亦可能是 HPV 诱导肿瘤发生的重要致癌机制之一^[14],但不同部位的整合位点和机制可能存在差异。较宫颈癌,肺癌中检测到的 HPV DNA 病毒载量较低^[10,15]。推测 HPV 在肺组织中的整合有其特异性,其 DNA 检测则需要特异性引物。本研究采用传统的 HPV 检测方法和试剂可能给结果带来一定误差。关于 HPV 感染致癌机制与基因突变亦有学者提出假说并进行研究^[14,18,15],但仍未成定论。本研究中 KRAS 基因突变与 HPV 感染显著相关,表明 KRAS 基因突变可能与 HPV 致癌机制有关,有待进一步研究证实。

综上所述,HPV 感染可能与 NSCLC 的发生有关,肺腺癌与 HPV 感染关系更为密切,HPV16/18 是 NSCLC 中 HPV 感染的两种亚型。本研究同时运用了免疫组化和 RT-PCR 法分别在蛋白和分子水平对 HPV 进行检测,不仅证实肺癌中 HPV 存在,而且表明在 NSCLC 发生过程中发挥到功能性作用。另外,KRAS 突变可能是 HPV 相关肺腺癌发病的驱动基因类型,为开展肺癌精准治疗指明了方向。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin H R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of

- cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer* ,2010 ,127 (12):2893–917.
- [2] Pallis A G ,Syrigos K N. Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors [J]. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013 , 88(3):494–503.
- [3] Sarchianaki E ,Derdas S P ,Ntaoukakis M ,et al. Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients [J]. *Tumour Biol* 2014 ,35(4):3203–9.
- [4] Wang J L ,Fang C L ,Wang M ,et al. Human papillomavirus infections as a marker to predict overall survival in lung adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer* 2014 ,134(1):65–71.
- [5] Syrjänen K J. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report of a case [J]. *Respiration* ,1979 ,38(5):229–304.
- [6] Srinivasan M ,Taioli E ,Ragin C C. Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers—a meta-analysis [J]. *Carcinogenesis* 2009 ,30(10):1722–8.
- [7] Hasegawa Y ,Ando M ,Kubo A ,et al. Human papilloma virus in non-small cell lung cancer in never smokers: a systematic review of the literature [J]. *Lung Cancer* 2014 ,83(1):8–13.
- [8] Yu Y ,Yang A ,Hu S ,et al. Significance of human papillomavirus 16/18 infection in association with p53 mutation in lung carcinomas [J]. *Clin Respir J* 2013 ,7(1):27–33.
- [9] Zhai K ,Ding J ,Shi H Z. HPV and lung cancer risk: a meta-analysis [J]. *J Clin Virol* 2015 ,63:84–90.
- [10] Baba M ,Castillo A ,Koriyama C ,et al. Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinomas [J]. *Oncol Rep* 2010 ,23(4):1085–92.
- [11] Muñoz J P ,González C ,Parra B ,et al. Functional interaction between human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins and cigarette smoke components in lung epithelial cells [J]. *PLoS One* 2012 ,7(5):e38178.
- [12] Ragin C ,Obikoya-Malomo M ,Kim S ,et al. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis [J]. *Carcinogenesis* , 2014 ,35(6):1267–75.
- [13] Thomas L K ,Bermejo J L ,Vinokurova S ,et al. Chromosomal gains and losses in human papillomavirus-associated neoplasia of the lower genital tract—a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Cancer* 2014 ,50(1):85–98.
- [14] Bosch F X ,de Sanjosé S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer [J]. *Dis Markers* ,2007 ,23(4):213–27.
- [15] Kato T ,Koriyama C ,Khan N ,et al. EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer [J]. *Lung Cancer* 2012 ,78(2):144–7.

Investigation on the relevance between human papillomavirus infections and NSCLC

Cao Xiaoyu^{1 2} ,Cao Lejie¹ ,Li Chuanying³ ,et al

(¹*Dept of Respiratory Medicine* ,³*Dept of Pathology Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001* ;²*Dept of Tuberculosis ,The Second People's Hospital of Fuyang ,Fuyang 236015*)

Abstract Objective To investigate the relevance of human papillomavirus (HPV) and non small cell lung cancer (NSCLC) , and analyse the relation between the clinical pathological characteristics or a variety of genetic mutations of NSCLC patients and HPV infection. **Methods** Totally 264 cases of paraffin embedded specimens of NSCLC patients tissues were detected by immunohistochemical for HPV L1 protein , and then ,109 NSCLC specimens were chosen by RT-PCR method to detect the gene sequence of HPV16/18 L1. The adjacent epithelial tissues of primary tumor tissues and 12 cases of benign lung tissues were selected to the control group. 90 lung adenocarcinoma (AC) specimens were tested for the genes status of EGFR ,ALK ,KRAS ,BRAF. **Results** Positive rate of HPV L1 protein in NSCLC primary group was similar to that of metastases group. But the primary group positive rate was significantly higher than that in adjacent to cancer group and pulmonary benign control group. The positive rate of AC group was significantly higher than that of lung squamous cell carcinoma (SCC) group. In all 109 NSCLC carcinoma , HPV 16/18 L1 gene sequences were detected in 11 NSCLC specimens. HPV L1 protein positive patients with KRAS mutation rate was significantly higher than the HPV negative. **Conclusion** HPV infection may be closely related with NSCLC , especially with AC. KRAS mutations could be the driver gene type in HPV related-AC. It points out the direction of the precise treatment for lung cancer.

Key words human papillomavirus ; non small cell lung cancer ; immunohistochemical ; gene mutation