

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.22.022

口腔白斑和鳞状细胞癌中人乳头瘤病毒感染分析

陈亮¹, 黄晓峰², 郭平¹, 吴非非¹

(1. 皖南医学院第一附属医院弋矶山医院口腔科, 安徽芜湖 241001; 2. 南京大学口腔医学院/南京市口腔医院病理科, 江苏南京 210008)

[摘要] **目的** 探讨人乳头瘤病毒(HPV)16/18 感染与口腔鳞状细胞癌(OSCC)临床病理特征间的关系。**方法** 原位杂交(ISH)和免疫组织化学(IHC)分别检测 10 例正常口腔黏膜, 26 例口腔白斑(OLK)和 56 例 OSCC 中的 HPV16/18 水平, 分析不同组间 HPV16/18 阳性率间的差异和 OSCC 中 HPV16/18 感染与性别、年龄、TNM 分期、组织学分化、淋巴结转移、吸烟的关系。**结果** ISH 和 IHC 检测 HPV16/18 阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$); OSCC 和 OLK 患者中 HPV16/18 阳性率高于正常口腔黏膜 ($P<0.05$); OSCC 中吸烟者 HPV16/18 阳性率明显高于非吸烟者 ($P<0.05$)。 **结论** HPV16/18 感染是部分 OSCC 的发病因素, 其与吸烟对 OSCC 发病具有协同作用。

[关键词] 肿瘤, 鳞状细胞; 白斑, 口腔; 口腔肿瘤; 原位杂交; 人乳头瘤病毒

[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)22-3086-03

Human papillomavirus infection in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma

Chen Liang¹, Huang Xiaofeng², Guo Ping¹, Wu Feifei¹

(1. Department of Stomatology, Yijishan Hospital, the First of Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001, China; 2. Department of Pathology, School of Stomatology, Nanjing University/Nanjing Stomatological Hospital, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between HPV16/18 infection and the clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** HPV16/18 was detected by the situ hybridization (ISH) and immunohistochemical (IHC) in 10 cases of normal oral mucosa, 26 cases of oral leukoplakia (OLK) and 56 cases of oral squamous cell carcinoma (OSCC). We analysed the difference of the HPV16/18 positive rate among groups, and explored the correlation between HPV infection and the gender, age, TNM staging, histological grade, lymph node metastasis and smoking in OSCC patients. **Results** There was no significant difference between ISH and IHC in detecting HPV16/18 positive rate ($P>0.05$). The HPV16/18 positive rates in patients of OLK and OSCC were significantly higher than that in normal oral mucosa patients ($P<0.05$). The HPV16/18 positive rate in smokers was significantly higher than that in non-smokers of OSCC ($P<0.05$). **Conclusion** HPV16/18 infection is considered to be a pathogenic factor in OSCC. HPV16/18 infection and smoking have a synergistic effect on the pathogenesis of OSCC.

[Key words] neoplasms, squamous cell; leukoplakia, oral; mouth neoplasms; in situ hybridization; human papillomavirus

口腔白斑(oral leukoplakia, OLK)是目前公认的口腔黏膜癌前病变, 口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是具有不同程度鳞状分化的侵袭性、上皮性的恶性肿瘤, 在口腔颌面部恶性肿瘤中居于首位。人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种特异感染人类上皮黏膜的环状 DNA 病毒, 目前研究发现其感染也是部分口腔癌的致病因素, 其中 HPV16/18 是具有高度致癌潜能的基因型。因此, 本研究采用两种检测方法探讨 OLK、OSCC 中 HPV16/18 表达与临床病理特征间的关系, 为进一步研究提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集南京大学医学院附属南京市口腔医院病理科 56 例患者的病理确诊且临床病理资料完整的 OSCC 标本, 其中男 29 例, 女 27 例; 年龄 30~82 岁, 平均 58 岁, 0~<58 岁 24 例, ≥58 岁 32 例; TNM 分期(2002 年 UICC 标准): I 期 13 例, II 期 14 例, III 期 8 例, IV 期 21 例; 分化程度: 高分化 21 例, 中分化 26 例, 低分化 9 例; 有淋巴结转移 22 例, 无淋巴结转移 34 例; 非吸烟者 36 例, 吸烟者 20 例。同时, 收集同科室 26 份 OLK 标本, 10 份黏液囊肿边缘黏膜组织(检测为正

常口腔黏膜)。

1.2 方法

1.2.1 试验材料 用于原位杂交(ISH)的 HPV16/18 特异性探针和免疫组织化学(IHC)HPV16/18 兔抗人单克隆抗体即用型工作液均购于福州泰普生物科学有限公司。通用型 EnVision IHC 试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒、磷酸盐缓冲液(PBS)、抗原修复液乙二胺四乙酸(EDTA)均为丹麦 Dako 公司产品。

1.2.2 主要操作步骤 10 例正常口腔黏膜, 26 例 OLK, 56 例 OSCC 标本均经 10% 甲醛固定, 然后常规脱水, 石蜡包埋和 4 μm 连续切片, 最后经脱蜡及水化。IHC EnVision 法主要步骤: 标本切片经高温和高压抗原修复, 一抗 4℃ 孵育过夜, 二抗 37℃ 孵育 30 min, 最后经 DAB 法显色。ISH 法主要操作步骤: 标本切片微波杂交预处理, 特异性探针杂交, 信号放大, 最后经组织细胞原位 DAB 法显色。

1.2.3 结果判断 探针和一抗采用 PBS 代替做出的试验结果作为 HPV16/18 阴性对照, 已知 HPV16/18 阳性的尖锐湿疣作为阳性对照。IHC 法检测: 标本细胞核呈棕黄色团块样

或弥漫性颗粒为 HPV 抗原(+)，反之为 HPV 抗原(-)。ISH 法检测时标本细胞核呈棕褐色团块样或弥漫颗粒着色为 HPV-DNA(+)，反之为 HPV-DNA(-)。

1.3 统计学处理 试验数据采用 SPSS17.0 统计软件分析，计数资料用率表示，组间采用 χ^2 检验，检验水准 $\alpha=0.05$ ，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IHC、ISH 法检测各组标本中 HPV16/18 的阳性率 IHC 法阳性细胞核呈棕黄色团块样或弥漫性颗粒着色(图 1、2)，而 ISH 法阳性细胞核呈清晰的棕褐色团块样或弥漫颗粒着色(图 3、4)。两种检测方法相比，ISH 法检测结果镜下观察背景清晰，对比度强，阳性细胞并非都是挖空细胞。IHC、ISH 两种检测方法检测所选标本 HPV16/18 阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$)；HPV16/18 感染率在 OLK 和 OSCC 间比较差异无统计学意义($P>0.05$)，而在 OLK 和 OSCC 中显著高于正常口腔黏膜($P<0.05$)，见表 1、图 5。

表 1 正常口腔黏膜、OLK、OSCC 中 HPV16/18 的阳性表达(n)

| 组织类型 | n | HPV16/18 抗原 | | HPV16/18-DNA | |
|--------|----|-------------|----|--------------|----|
| | | + | - | + | - |
| 正常口腔黏膜 | 10 | 0 | 10 | 1 | 9 |
| OLK | 26 | 14 | 12 | 12 | 14 |
| OSCC | 56 | 28 | 28 | 30 | 26 |

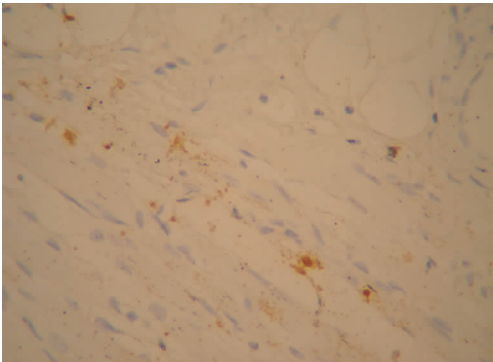


图 1 OLK 中 HPV16/18 抗原(+)表达 (IHC,×400)

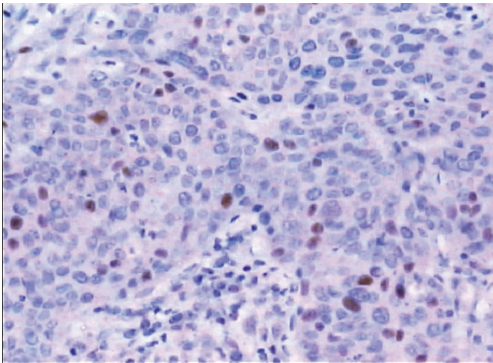


图 2 OSCC 中 HPV16/18 抗原(+)表达 (IHC,×400)

2.2 HPV16/18 阳性率与 OSCC 患者临床病理特征间的相关性 HPV16/18 阳性率与患者的性别、年龄、临床 TNM 分期、组织学分化程度及淋巴结是否转移均无关($P>0.05$)，而在吸

烟患者标本中 HPV16/18 阳性率显著高于非吸烟患者($P<0.05$)，见表 2。

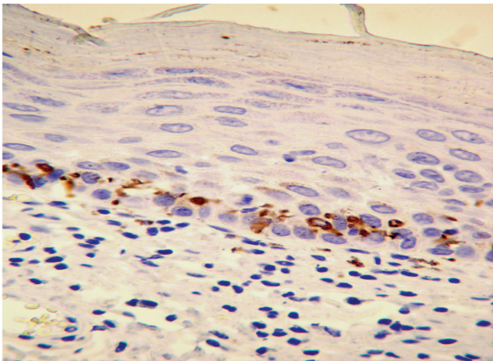


图 3 OLK 中 HPV16/18-DNA(+)表达 (ISH,×400)

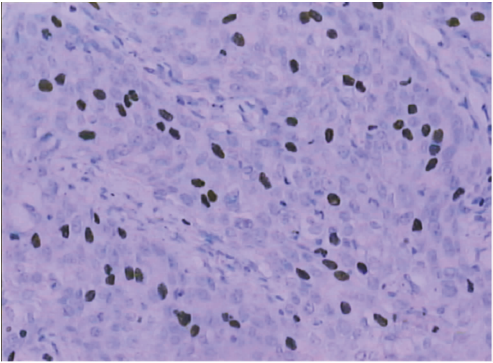


图 4 OSCC 中 HPV16/18-DNA(+)表达 (ISH,×400)

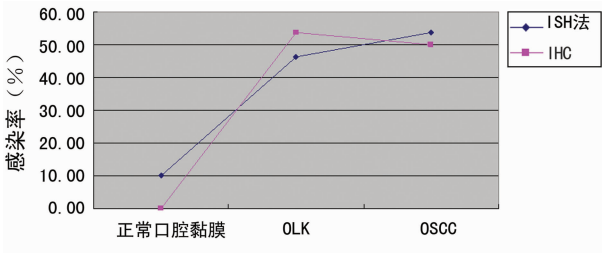


图 5 ISH、免疫组织化学检测 HPV16/18 的阳性率

表 2 HPV16/18 阳性数与口腔鳞癌临床病理特征间的相关性

| 项目 | n | HPV16/18 抗原 | | | HPV16/18-DNA | | |
|-----------|----|-------------|----|---------|--------------|----|---------|
| | | + | - | P | + | - | P |
| 性别 | | | | >0.05 | | | >0.05 |
| 男 | 29 | 16 | 13 | | 17 | 12 | |
| 女 | 27 | 12 | 15 | | 13 | 14 | |
| 年龄(岁) | | | | >0.05 | | | >0.05 |
| <58 | 24 | 12 | 12 | | 14 | 10 | |
| ≥ 58 | 32 | 16 | 16 | | 16 | 16 | |
| TNM 分期 | | | | >0.05 | | | >0.05 |
| I / II | 27 | 13 | 14 | | 13 | 14 | |
| III / IV | 29 | 15 | 14 | | 17 | 12 | |
| 组织学分化 | | | | >0.05 | | | >0.05 |
| 高分化 | 21 | 10 | 11 | | 11 | 10 | |

续表 2 HPV16/18 阳性数与口腔鳞癌临床病理特征间的相关性

| 项目 | n | HPV16/18 抗原 | | | HPV16/18-DNA | | |
|-------|----|-------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | | + | - | P | + | - | P |
| 中分化 | 26 | 16 | 10 | | 16 | 10 | |
| 低分化 | 9 | 2 | 7 | | 3 | 6 | |
| 淋巴结转移 | | | | >0.05 | | | >0.05 |
| 有 | 22 | 12 | 10 | | 12 | 10 | |
| 无 | 34 | 16 | 18 | | 18 | 16 | |
| 吸烟 | | | | <0.05 | | | <0.05 |
| 是 | 20 | 17 | 3 | | 16 | 4 | |
| 否 | 36 | 11 | 25 | | 14 | 22 | |

3 讨 论

OSCC 呈侵袭性生长,是头颈部最常见的恶性肿瘤,约占 90%,全球每年新增口腔癌病例近 3 万例^[1],主要致病因素包括烟酒、咀嚼槟榔、残根残冠及化学和生物刺激等。癌前病变中的 OLK 是以上皮异常增生为主要病理改变的一种黏膜病,癌变率为 3%~5%。高危型 HPV16/18 可引起上皮的恶性肿瘤,最常见的是子宫颈癌,此外还是部分口腔癌^[2-3]和口咽癌的主要致病因素^[4-5]。

目前虽然有多种检测 HPV 感染的方法,但因材料、试验条件、判读标准等差异,同一组标本 HPV 阳性率存在差异。IHC 利用抗体检测标本中 HPV-Ag 的水平,优点是操作简单、能定位,缺点是抗体针对衣壳蛋白常在复制晚期出现,会导致检测的低敏感性和假阴性;ISH 利用特异性探针与标本的 HPV-DNA 进行杂交,具有高灵敏和特异性,是比较理想的检测法,但常受到标本中 HPV-DNA 数量的影响^[6-7]。本研究采用上述两种检测法分别对所选标本行 HPV16/18 检测,结果显示二者检测出的 HPV16/18 阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$),但 ISH 法检测 HPV16/18 阳性的标本显微镜下较清晰。

研究 HPV16/18 感染与口腔鳞癌、癌前病变及正常黏膜的相关性,回顾文献可发现 HPV16/18 感染与口腔黏膜癌、OLK 密切相关。Miller 等^[8]采用了 Meta 分析对 1982~1997 年间发表于 Medline 上有关 HPV 与口腔癌关系的文章进行了研究,结果显示口腔癌感染 HPV 的合并优势比是正常黏膜的 5.37 倍。Mattila 等^[9]在 15.9% 的 OLK 中检测到 HPV,而 Syrjänen 等^[10]在 29% 的 OLK 中检测出 HPV。本研究 OSCC 和 OLK 中 HPV16/18 阳性率明显高于正常黏膜,结果与之前研究相一致^[8-10],提示 HPV16/18 感染可能是 OSCC 或是癌前病变的致病因素之一。但 HPV 感染和口腔黏膜癌变间的因果关系目前仍无法解释,其具体机制有待研究。

长久以来,烟酒被认为是 OSCC 的首要危险因素,但有近 10%~20% 的病例无烟酒史,这类肿瘤发病机制可能与病毒感染有关^[11]。本研究分析 HPV 感染与 OSCC 临床资料(包含年龄、性别、肿瘤临床分期、组织分化程度、淋巴结是否远处转移及吸烟史)间的相关性,结果显示 HPV 感染仅与患者是否吸烟有关,提示吸烟与 HPV 感染对口腔癌的发生具有协同作用,与 Schwartz 等^[12]研究相一致,但也有研究未发现二者有协同作用^[13-14]。因此,二者在 OSCC 中的具体关系还有待进一步研究。

参考文献

[1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.

[2] Herrero R, Castellsagué 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.

[3] 薛万林, 刘春利. 口腔鳞状细胞癌及白斑人乳头瘤病毒 16 型感染的临床研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2012, 28(5): 293-294.

[4] 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.

[5] Chaux A, Cubilla AL. The role of human papillomavirus infection in the pathogenesis of penile squamous cell carcinomas[J]. Semin Diagn Pathol, 2012, 29(2): 67-71.

[6] 耿建祥, 王旭波. 人乳头瘤病毒检测及其临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 152-153.

[7] Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen[J]. Int J Cancer, 2007, 121(11): 2465-2472.

[8] Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001, 91(6): 622-635.

[9] Mattila R, Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus in oral atrophic lichen planus lesions[J]. Oral Oncol, 2012, 48(10): 980-984.

[10] Syrjänen S, Lodi G, Von Bültzingslöwen I, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review[J]. Oral Dis, 2011, 17 Suppl 1: S58-72.

[11] Bertolus C, Goudot P, Gessain A, et al. Clinical relevance of systematic human papillomavirus (HPV) diagnosis in oral squamous cell carcinoma[J]. Infect Agent Cancer, 2011, 7(7): 78-79.

[12] Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection[J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(21): 1626-1636.

[13] 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.

[14] Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(23): 1801-1810.