

人乳头瘤病毒与结直肠癌关系的研究进展

靳大川 周 涛 郭宝强 路德荣

〔作者简介〕 靳大川,主任医师。山东大学内科学消化系病专业医学博士(1998 年毕业),英国贝尔法斯特女王大学(The Queen's University of Belfast)分子医学专业 Ph. D. (2006 年毕业),美国德克萨斯大学博士后(2006 ~ 2013 年)。全国肝胆病咨询专家、河南省预防医学会流行病学循证预防医学专业委员会第一届委员会委员。作为河南省循证医学领域和国际医疗实践行业的先行者,曾获得《河南日报》、《河南工人报》、《医药卫生报》等多家报刊媒体报道,3 次接受大河健康网(河南省健康门户网站)视频专访。2011 年留美期间高分通过全部三步美国医师资格考试(USMLE STEP1、STEP2 CK、STEP2 CS、STEP3),获得 ECFMG 证书,并在美国 Methodist hospital 等多家知名医院临床轮转学习多年。现为河南省传染病医院(即郑州市第六人民医院)国际医疗部主任,消化内二科主任。还担任《医学研究杂志》、《实用肿瘤学杂志》审稿专家,《现代生物医学进展》英文编辑。已在国内外学术期刊发表论文 40 余篇,包括《Cancer Research》、《Oncogene》等国际知名期刊。目前主要研究方向是人乳头瘤病毒与恶性肿瘤的关系。

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.001

结直肠癌是世界上排名第 3 位的恶性肿瘤,在癌症相关病死率中排第 4 位,占有所有癌症的 9.4%^[1,2]。据估算全球每年的新发病例超过 120 万例,并且每年有大约 60 万人死于结直肠癌^[1]。一般认为西方发达国家是结直肠癌的高发区,而我国的发生率则相对较低。但是随着我国人民生活水平的不断提高,结直肠癌的发生率也在升高,并有年轻化的趋势。有报道,我国青年人结直肠癌所占比例比欧美国家高 10 倍,发病的高峰年龄比欧美国家年轻 10 ~ 15 岁。目前发现的与结直肠癌发生有关的危险因素很多,例如年龄、饮食习惯、吸烟、肥胖、家族遗传因素等^[3]。需要注意的是,近年来感染因素在结直肠癌发生中的作用逐渐引起了人们重视,尤其是人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染,吸引了越来越多的研究者,但是目前仍有争议。本文现对 HPV 和结直肠癌发生之间的关系做如下综述。

一、HPV 病毒的分子结构与分型

HPV 是最常见的性传播感染的病毒。它属于乳多空病毒科,是一类容易感染表皮和黏膜鳞状上皮的

无包膜双链环状小 DNA 病毒,但是蛋白编码序列只位于其中一条链。其基因组一般有大约 8000 个碱基对,含有 8 ~ 9 个开放读码框架(open reading frame, ORF)。病毒颗粒直径约 55nm,有 72 个五聚体壳微粒构成的二十面体的衣壳^[4,5]。

HPV 病毒基因组与组蛋白结合在一起,形成类似染色质样的结构,周围有蛋白衣壳保护。其基因组的 8 个 ORF 包含 3 个功能成分,即早期区(early region, E 区)、晚期区(late region, L 区)和一个长控制区(long control region, LCR)。E 区占病毒基因组的 45% 左右,编码 6 ~ 7 个早期蛋白(E1、E2、E4、E5、E6、E7、E8),L 区占病毒基因组的 40% 左右,编码 2 个晚期蛋白(L1、L2)。其中 L1 区编码病毒的主要衣壳蛋白,形成 HPV 的五聚体衣壳;L2 区编码次要衣壳蛋白,与病毒基因组衣壳化有关系,并与 L1 衣壳蛋白相互作用以稳定衣壳结构。它还与 HPV 病毒基因组进入宿主细胞的细胞核有关。E1、E2 蛋白对病毒的复制和翻译是必须的。E1 蛋白是病毒 DNA 螺旋酶,E2 区编码病毒转录因子,与病毒游离基因锚定在宿主细胞基因组上有关,并且调节 E6 区、E7 区基因的表达。E4、E5 蛋白对病毒的组装和生长刺激起作用。E6、E7 蛋白是 HPV 主要的病毒癌蛋白,可以驱动细胞进入活跃增殖状态,从而允许病毒基因组复制,并抑制自然免疫。E8 可能与病毒的复制有关^[6,7]。LCR 区是一个非编码上游调节区,位于 E6 和 L1 取之间。它含有启动子和转录因子结合部位,

基金项目:河南省新乡市科技发展计划项目(15SF30)

作者单位:450015 郑州,河南省传染病医院国际医疗部(靳大川);250012 济南,山东大学齐鲁医院消化内科(周涛);Manchester, Institute of Cancer Sciences, The University of Manchester(郭宝强);453000 新乡医学院第三附属医院消化内科(路德荣)

通讯作者:靳大川,主任医师,内科消化专业医学博士,分子生物学博士(英国),博士后(美国),电子信箱:1452359342@qq.com

包含增强子和沉默子序列,对病毒 DNA 的复制和转录起重要的调节作用^[8]。尽管 HPV 病毒的基因组在不同亚型变异较大,但是其核心区保守性很强,主要包括 E1、E2、L1、L2 区^[9]。

目前已经发现和完成测序的 HPV 有 200 多种亚型^[7]。按照它们 DNA 序列的差异,HPV 被分为 5 个属,即 α 、 β 、 γ 、 μ 、 ν ,而每个属分别包括若干不同的亚型。HPV 的属和亚型的区分主要是根据病毒基因组 L1 区序列的差别^[5]。在 HPV 病毒的 5 个属中, α 、 β 和 γ 属包括了大部分的亚型。引起持续性感染和人体明显病变的主要是 α 属的 HPV,而其他属的 HPV 病毒很少引起明显的病变^[9]。按照引起持续性感染和导致细胞恶性转化的可能性, α 属 HPV 分为致癌的高危亚型和通常不致癌的低危亚型。目前世界卫生组织(World Health Organization, WHO)下属的国际癌症研究会(International Agency for Research on Cancer, IARC)认定的 HPV 高危亚型 HPV(High-risk HPV, HR-HPV)共有 12 种,分别是 HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 亚型;另外还有 13 种亚型被认定为可能致癌的亚型,包括 HPV26、30、34、53、66、67、68、69、70、73、82、85、97 亚型;其他 α 属 HPV 为低危亚型(low-risk HPV, LR-HPV)^[7]。HPV16 亚型是世界范围内最常见的 HR-HPV,其次为 HPV18 亚型^[6]。最常见的 LR-HPV 是 HPV6 和 11 亚型,主要引起生殖器软疣^[5]。

二、HPV 的致癌作用和分子机制

HPV 是公认的 4 种致癌微生物之一(其他还包括幽门螺杆菌、乙肝病毒、丙肝病毒)^[10]。按照美国疾病控制和预防中心于 2016 年的最新报道,在美国平均每年有 38793 例 HPV 引起的新发癌症病例,其中包括 23000 例女性患者和 15738 例男性患者^[11]。意大利内科医生 Rigoni-Stern 于 1842 发现 HPV 感染和宫颈癌有关,这是世界上首个关于 HPV 致癌的报道。目前发现 HPV 不仅是引起女性宫颈癌的首要病因,还和其他许多恶性肿瘤相关,例如:口咽部恶性肿瘤、阴道癌、外阴癌、阴茎癌、直肠癌等,并可能与部分食管癌、结直肠癌的发生相关^[11-14]。

如前所述,引起恶性肿瘤的 HPV 主要是各种 HR-HPV 亚型。HR-HPV 感染上皮细胞后,可以诱导细胞的恶性转化,这个恶性转化的过程经历的时间从数月至数年不等^[15]。Priggle 等将 HR-HPV 引起上皮细胞恶性转化的全过程分为 3 个阶段:潜伏期、增殖期、转化期。在潜伏期,HPV 虽然进入了细

胞,但是在细胞内以游离基因的形式存在,复制活跃,也基本不引起临床症状。当在某些情况下,人体免疫力下降时,HPV 开始大量快速复制增殖,进入增殖期。其后,少数 HPV 感染可以从增殖期进入转化期,其特征为 E6 和 E7 蛋白的表达明显上调^[15]。E6 和 E7 蛋白是 HPV 诱导细胞恶性转化的关键性因素。E6 蛋白能和 E6 相关蛋白及 E3 泛素连接酶作用,通过泛素-蛋白酶体途径诱导 p53 的快速降解。E7 蛋白能够和 E2F 转录因子竞争与 pRb 基因的结合,从而灭活 pRb。而 pRb 是 p16 的负调节因子,从而引起 p16 的上调。此外,HPV 还能通过 E6、E7 蛋白和生长因子受体、notch 受体、Ras、PI₃KCA 基因等上游信号途径相互作用,激活 PI₃K/Akt/mTOR 信号途径导致恶性转化的发生^[16]。病毒 DNA 也可能整合进宿主基因组,导致宿主基因组的不稳定^[17]。还可能引起多发性 CpG 岛甲基化,导致 BRAF 和 KRAS 癌基因的异常^[18]。

三、HPV 与结肠癌发生的关系

和其他恶性肿瘤相同,结肠癌的发生也是多种可能因素导致的。目前已经确定大约 5%~10% 的结肠癌的发生是遗传性因素导致的,例如家族性腺瘤样息肉病、遗传性非息肉病性结直肠癌综合征;但是其他 90% 以上的结肠癌是其他各种可能的原因导致的散发性病例^[19]。通过流行病学等研究,确定与结直肠癌发生有关的生活因素包括红肉类、吸烟等。关于感染因素与结肠癌发生的关系,因为正常的结直肠肠腔本身存在有大量微生物,确认工作比较困难,目前仍在研究中。

美国内华达大学外科医生 Kirgan 于 1991 年首次报道了 HPV 感染与结肠癌发生之间的潜在的关系。他们采用免疫组化方法检测了结肠癌、结肠腺瘤和正常结肠组织中 HPV 的感染情况,发现结肠癌组织中 HPV 的感染率高达 97%,而正常结肠黏膜组织中没有检出。由此他们认为 HPV 感染结肠黏膜柱状上皮可能是某些结肠癌发生的原因。在 2001 年以后,随着聚合酶链反应技术(PCR)的广泛应用,进一步推动了更多 HPV 与结直肠癌关系的研究。大部分研究发现结直肠癌组织中有着明显更高的 HPV 感染率,远远超过正常黏膜组织^[18, 20]。但是也有些研究没有发现 HPV 感染与结直肠癌发生之间有明显的关系^[2, 4]。因此,关于这一因果关系,目前仍有很多争议。造成以往研究结果不一致的可能的原因很多。由于每一个致病因子被确认之前,往往要经历一个肯

定、否定、再肯定的反复的过程,出现争议也并不奇怪。但是重要的是,需要认真分析出现这种巨大研究结果差异的种种可能的原因。

Lorenzon 等^[19]对既往检测结直肠癌标本中 HPV 的研究进行了系统的评价,发现在不同研究中,有相当大的方法学上的差异。早期的研究中,多采用原位杂交法、Southern 印迹法、免疫组化法,而最近的研究多采用 PCR 及衍生技术。他们发现以往没有检测出结肠癌组织中 HPV 的 4 个研究中,有两个采用的是敏感度较差的原位杂交法和 Southern 印迹法。另外,尽管目前认为 PCR 是检测 HCV 的金标准,在同样采用 PCR 检测方法的研究中,也存在引物选择上的不同和取材上的差异。有的研究采用的是广谱的 PCR 引物,有的研究选择 HPV 亚型特异性的引物。而特异性的 PCR 引物比广谱引物在检测结直肠癌组织中的 HCV 要更加高效、敏感。此外,有些研究采用的 PCR 引物对应的是 L1 区,有些采用的引物则是对应的 E6/E7 区,这可能也会明显影响检测的结果。因为 L1 区的序列在 HPV 病毒 DNA 整合进宿主 DNA 的过程中会丢失,导致假阴性的检测结果;而 E6/E7 区的基因序列不但不会被丢失,相反,E6/E7 基因是导致细胞恶性转化的最重要的因素。因此更可靠的结果应该是采用 E6/E7 基因序列的引物进行 PCR 检测。另外,采用石蜡包埋的组织检测 HPV 的研究,其阳性率大大低于采用新鲜组织进行检测者。这是因为在石蜡包埋处理的过程中,DNA 常常会降解掉。在这种情况下,如果再采用对应 L1 区序列的引物,敏感度会更低。因为 L1 区序列引物扩增的 DNA 序列往往比较长,在 450 碱基对左右。导致检测的敏感度降低^[21]。

结直肠癌的发生是一个多步骤、多因素的过程。由于 HPV 的流行病学特征在不同地区和不同人群变异很大,这也可能是导致研究结果不一致的重要原因。例如:有研究表明男同性恋人群的肛管 HPV 感染率可以高达 57%,明显高于普通人群的 12%。而诱发结直肠癌的 HPV 感染除了可能通过血液、淋巴播散,更可能是通过肛门生殖器官上行感染而累及^[22]。在地区差异上,亚洲和南美洲有更高的 HPV 检出率。拉丁美洲的 HPV 感染率也明显高于欧美发达国家。在亚型分布上,HPV18 亚型在亚洲和欧洲的结肠癌最常见,分别占 HPV 阳性例数的 73.34% (44.92% ~ 90.26%) 和 47.28% (34.55% ~ 60.37%)。而 HPV16 亚型是南美洲结肠癌患者中最常见的亚型,

占 HPV 阳性病例的 58.24% (45.49% ~ 69.99%)。美国 Bodaghi 等进行的研究发现 HPV16 也是美国 HPV 阳性的结直肠癌中最常见的亚型,其次是 HPV18。关于结直肠癌患者中 HPV 阳性率的巨大变异性,环境因素和遗传学异质性也是可能影响因素^[2]。在 HPV 流行性低的地区,HPV 感染以外的其他因素所致结肠所占比率可能更高,样本数不够多的情况下很可能得出阴性的结果。此外,特殊人群的易感性因素也不能排除,某些人群可能比其他人群更容易发生 HPV 相关的结直肠癌^[22]。以上种种因素均会影响结直肠癌患者中 HPV 检测的阳性率^[2]。

四、结直肠癌标本中 HPV 的检测方法

选择合适的 HPV 检测技术是得出可靠研究结果的前提,也是做出准确、可靠的判断的先决条件。临床取到的结肠癌标本只有采用分子诊断技术才能进行准确的诊断和分型。早期多采用 Southern 印迹法、斑点印记、原位杂交法等经典的核酸杂交技术。这些方法需要用放射性标记的探针,操作繁琐,敏感度欠佳,近来简单、高效的信号放大技术和核酸扩增等检测技术应用越来越受欢迎^[23]。信号放大技术是美国食品和药品管理局批准的 HPV 检测技术,例如 Cervista HPV HR 检测试剂盒和 Hybrid Capture 2 检测试剂盒。这种技术假阳性率低,可以区分 HR-HPV 和 LR-HPV,但是不能具体分出何种亚型。

核酸扩增技术是高敏感度、高特异性的技术,目前应用最广泛,例如基因芯片技术、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、荧光定量 PCR 等。扩增核酸之后,对 HPV 亚型的分析可以采用限制性片段长度多态性 (restriction - fragment length polymorphism, RFLP)、线性探针检测、直接测序法或者用特异性引物进行分型^[24]。目前 PCR 检测试剂盒所用的引物大部分是对应 HPV L1 区的部分序列,也有 PCR 药盒采用对应 E6/E7 区序列的引物,例如挪威的 Prelect HPV - Proofer assay 试剂盒和美国的 APTIMA HPV Assay 试剂盒^[25]。鉴于 E6 和 E7 基因是 HPV 引起细胞恶性转化的主要因素,因此 E6、E7 序列是对于 HR-HPV 特异性更好的检测标志物。基因芯片技术可以对大量 DNA 标本进行批量平行检测,比普通的凝胶电泳分析有更高的敏感度和特异性。HPV DNA 整合进宿主基因组 DNA 是导致细胞恶性转化的重要一环。用于检测病毒 DNA 整合进宿主细胞基因组的技术主要是 PCR、荧光原位杂交、实时荧光 PCR 技术等。

五、展 望

虽然有很多研究证实 HPV 与结肠癌的发生有关,但是也有若干不一致的研究结论。此外,大部分研究中的样本量不够大,不同的研究中对于 HPV 的检测方法也很不一致。这种情况下,即便采用循证医学方法进行分析也难以得到非常理想的结果。此外,关于结直肠癌发生过程中 HR - HPV 具体引起恶性转化的机制还很不清楚。由于结直肠癌的发生本身往往是多个因素造成的,HPV 很可能也只是在部分人群结直肠癌的发生中起到重要的作用。因此要明确 HPV 与结直肠癌发生的关系,今后需要选择标准化的 HPV 检测方法对结直肠癌患者进行大样本的研究,并且对具体的 HR - HPV 在结直肠癌中的作用机制,进行更深入地探索。

参考文献

- Mármol I, Sánchez de Diego C, Pradilla Dieste A, *et al.* Colorectal carcinoma; a general overview and future perspectives in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(197): 1 - 39
- Aghakhani A, Hamkar R, Ramezani A, *et al.* Lack of human papillomavirus DNA in colon adenocarcinoma and adenoma [J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(3): 531 - 534
- Kolligs FT. Diagnostics and epidemiology of colorectal cancer [J]. *Visc Med*, 2016, 32(3): 158 - 164
- Meshkat M, Tayyebi MN, Sepahi S, *et al.* The frequency of human papillomaviruses in colorectal cancer samples in Mashhad, northeastern Iran [J]. *Turkish J Med Sci*, 2014, 44(3): 501 - 503
- Choi YJ, Park JS. Clinical significance of human papillomavirus genotyping [J]. *J Gynecol Oncol*, 2016, 27(2): e21 - e32
- Bansal A, Singh MP, Rai B. Human papillomavirus - associated cancers: A growing global problem [J]. *Int J Appl Basic Med Res*, 2016, 6(2): 84 - 89
- Burd EM, Dean CL. Human papillomavirus [J]. *Microbiol Spectrum*, 2016, 4(4): 1 - 17
- Ajila V, Shetty H, Babu S, *et al.* Human papilloma virus associated squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *J Sex Transm Dis*, 2015, 2015(791024): 1 - 5
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, *et al.* Human papillomavirus molecular biology and disease association [J]. *Rev Med Virol*, 2015, 25(S1): 2 - 23
- Giuliano AR, Kreimer AR, De SS. The beginning of the end: vaccine prevention of HPV - driven cancers [J]. *J Cancer I*, 2015, 107(6): djv128 - djv129
- Viens LJ, Henley SJ, Watson M, *et al.* Human papillomavirus - Associated Cancers - United States, 2008 - 2012 [J]. *MMWR - Mor-*

bidity Mortal W, 2016, 65(26): 661 - 666

- Radecki CB, Finney LR, Findley V, *et al.* Awareness and knowledge of human papillomavirus (HPV), HPV - related cancers, and HPV vaccines in an uninsured adult clinic population [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(11): 3346 - 3352
- Berber U, Tanoglu A, Balta AZ. Human papillomavirus: a potential risk factor for colorectal carcinoma? [J]. *Turkish J Me Sci*, 2015, 45(2): 462 - 463
- Guo L, Liu S, Zhang S, *et al.* Human papillomavirus - related esophageal cancer survival [J]. *Medicine*, 2016, 95(46): e5318 - 5323
- Prigge ES, Doeberitz MVK, Reuschenbach M. Clinical relevance and implications of HPV - induced neoplasia in different anatomical locations [J]. *Muta Res - Rew Mutat*, 2017, 772(17): 51 - 66
- Zhang L, Wu J, Ling MT, *et al.* The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses [J]. *Mole Cancer*, 2015, 14(1): 1 - 13
- Liu CY, Li F, Zeng Y, *et al.* Infection and integration of high - risk human papillomavirus in HPV - associated cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(4): 1 - 8
- Laskar RS, Talukdar FR, Choudhury JH, *et al.* Association of HPV with genetic and epigenetic alterations in colorectal adenocarcinoma from Indian population [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4661 - 4670
- Lorenzon L, Ferri M, Pillozzi E, *et al.* Human papillomavirus and colorectal cancer: evidences and pitfalls of published literature [J]. *Int Jo Colorect Dis*, 2011, 26(2): 135 - 142
- Tanzi E, Bianchi S, Frati ER, *et al.* Human papillomavirus detection in paraffin - embedded colorectal cancer tissues [J]. *J General Virol*, 2015, 96(Pt 1): 206 - 209
- Damin DC, Ziegelmann PK, Damin AP. Human papillomavirus infection and colorectal cancer risk: a meta - analysis [J]. *Colorectal Dis*, 15(8): 420 - 428
- Dania Bucchini, Fabrizio Stracci, Nicola Buonora, *et al.* Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: A review [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(33): 7415 - 7430
- Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, *et al.* A review of methods for detect human papillomavirus infection [J]. *Virol J*, 2012, 9(1): 262 - 270
- Prakrankamanant P, Wongsena M. Overview: detection of human papillomavirus in clinical samples [J]. *J Med Assoc Thai*, 2016, 99(S1): S89 - S96
- Poljak M, Kocjan BJ, Oštrbenk A, *et al.* Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update [J]. *J Clin Virol*, 2016, 76(Suppl 1): S3 - S12

(收稿日期:2017 - 11 - 06)

(修回日期:2017 - 11 - 15)