

人乳头瘤病毒感染及 p53、P16、Cdc2 表达与喉癌预后的关系*

韩凤艳, 刘宏侠, 孙玉满

(唐山市协和医院病理科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 研究人乳头瘤病毒(HPV)感染及 p53、P16、Cdc2 表达与喉癌预后的关系。方法 选择 2012 年 6 月至 2013 年 5 月在该院保留完整随访资料的喉癌手术切除标本 62 例, 分析 HPV 感染和 p53、P16、Cdc2 表达在喉癌组织中的阳性表达情况和预后关系, 肿瘤分化程度及分期和喉癌患者复发的关系。结果 HPV 感染在喉癌组织中以高危型 HPV-16 为主, 通过 2 年随访, 发现喉癌患者中有 50 例未复发, 12 例出现复发。喉癌组织中 HPV 感染率为 19.35%(12/62), 在喉癌组织中 p53 阳性表达率为 59.68%(37/62), P16 阳性表达率为 58.06%(36/62), Cdc2 阳性表达率为 64.52%(40/62)。HPV 感染和 p53、P16、Cdc2 表达和喉癌的分化程度及临床分期无明显相关性($P>0.05$), HPV 阳性喉癌患者术后复发率[0.00%(0/12)]显著低于无复发患者[24.00%(12/50)], 差异有统计学意义($P<0.05$)。复发组喉癌患者的 p53 阳性表达率[58.33%(7/12)]和未复发组[60.00%(30/50)], 差异无统计学意义($P>0.05$)。复发组喉癌患者的 P16 阳性表达率[83.33%(10/12)]显著高于未复发组[52.00%(26/50)], 差异有统计学意义($P<0.05$)。复发组喉癌患者的 Cdc2 阳性表达率[100.00%(12/12)]显著高于未复发组[56.00%(28/50)], 差异也有统计学意义($P<0.05$)。经 Spearman 等级相关分析得知, 肿瘤分化程度及分期和喉癌患者的复发无明显相关性($P>0.05$)。结论 HPV 感染、p53、P16、Cdc2 表达和喉癌的预后存在一定关联性。

关键词:人乳头瘤病毒; p53; P16; Cdc2; 喉癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.017

中图法分类号:R739.65

文章编号:1673-4130(2018)16-1997-04

文献标识码:A

Relationship between human papillomavirus infection, p53, P16, Cdc2 expressions and laryngeal cancer prognosis*

HAN Fengyan, LIU Hongxia, SUN Yuman

(Department of Pathology, Tangshan Concorde Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between human papillomavirus infection (HPV), p53, P16, Cdc2 expressions and prognosis of laryngeal carcinoma. **Methods** 62 cases of laryngeal carcinoma resection were retrospectively analyzed from June 2012 to May 2013. The positive expression and prognosis of HPV infection and p53, P16 and Cdc2 expressions in laryngeal squamous cell carcinoma, and the degree of tumor differentiation and staging and the recurrence of and laryngeal cancer were analyzed. **Results** HPV-16 was the main type of HPV infection in laryngeal squamous cell carcinoma. By two-year follow up, 50 patients with laryngeal cancer were found to have no recurrence and recurrence occurred in 12 cases. The positive rate of HPV infection in laryngeal squamous cell carcinoma was 19.35% (12/62). The positive rate of p53 expression in laryngeal squamous cell carcinoma was 59.68% (37/62), the positive expression rate of P16 was 58.06% (36/62), and the positive rate of Cdc2 was 64.52% (40/62). There was no significant correlation between HPV infection and p53, P16 and Cdc2 expressions and differentiation and clinical stage of laryngeal carcinoma ($P>0.05$). The recurrence rate of HPV-positive laryngeal cancer patients was significantly lower than that of patients without recurrence [0.00% (0/12) vs. 24.00% (12/50)], and the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant correlation between the positive rate of p53 expression in patients with recurrent laryngeal cancer and without recurrence [58.33% (7/12) vs. 60.00% (30/50)] ($P>0.05$). The positive rate of P16 in patients with recurrent laryngeal carcinoma was significantly higher than that in patients without recurrence [83.33% (10/12) vs. 52.00% (26/50)] and the differences were statistically sig-

* 基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(201113AII1B12)。

作者简介: 韩凤艳, 女, 副主任医师, 主要从事病理检验研究。

本文引用格式: 韩凤艳, 刘宏侠, 孙玉满. 人乳头瘤病毒感染及 p53、P16、Cdc2 表达与喉癌预后的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39

nificant ($P<0.05$). The positive expression rate of Cdc2 was significantly higher than that in patients without recurrence [100.00% (12/12) vs. 56.00% (28/50)], and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that there was no significant correlation between tumor differentiation and the stage and recurrence of laryngeal carcinoma ($P>0.05$). **Conclusion** The expressions of p53, P16 and Cdc2 in HPV infection and the prognosis of laryngeal carcinoma are related.

Key words: human papillomavirus infection; p53; P16; Cdc2; laryngeal cancer

在头颈部恶性肿瘤中喉鳞状细胞癌属于较为常见的一种病理类型,此病的发生、发展和众多因素、阶段存在着密切关联性^[1]。鳞状上皮肿瘤的发生和人乳头瘤病毒(HPV)感染存在着密切关联性,尤其是 HPV-16、18 等高危型病毒^[2]。HPV 属于 DNA 肿瘤病毒的一种, E6 蛋白相结合于 p53 蛋白,以至于细胞周期调节蛋白表达异常, p53 基因抑癌作用失活,导致细胞发生恶性转化及异常增殖^[3]。细胞周期调节蛋白主要是在细胞周期蛋白依赖性激酶的相继活化作用下而得以精确控制的。细胞周期蛋白依赖性激酶 Cdc2 能促进细胞从 G₂ 期到 M 期。目前就 HPV 感染、p53、P16、Cdc2 表达和喉癌的发生过程缺乏相关报道^[4]。本文就 HPV 感染及 p53、P16、Cdc2 表达与喉癌预后的关系予以分析,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 6 月至 2013 年 5 月在本院保留完整随访资料的喉癌手术切除标本 62 例,其中男 54 例,女 8 例;年龄 46~76 岁,平均(57.32±2.33)岁。TNM 分期:42 例 T1~T2 期,20 例 T3~T4 期。病理分级:17 例低分化,24 例中分化,21 例高分化。所有患者在术前均未开展放化疗,同时未合并其他原发肿瘤,无远处转移。

1.2 仪器与试剂 由亚能生物技术有限公司提供 HPV 基因分型检测试剂盒和 PCR-DNA 反向点杂交检测仪器;由福州迈新生物技术开发公司提供 SP 免疫组织化学试剂盒;美国 Santa Cruz 公司提供鼠抗人 p53 单克隆抗体克隆号 DO-7,滴度为 1:100;美国 Santa Cruz 公司提供鼠抗人 Cdc2 单克隆抗体克隆号 C-9,滴度为 1:200。

1.3 方法

1.3.1 PCR-DNA 反向点杂交 喉癌组织标本用石蜡进行包埋,根据试剂盒操作说明开展 PCR 扩增、杂交、洗膜、显色及 HPV-DNA 提取。判定结果标准:阴性质控品杂交膜条在 IC 位点伴有显色信号,其他位点不显色;阳性质控品杂交膜条在 IC 位点伴有显色信号(蓝色斑点)和相应的 HPV 基因型(23 型)位点,其他位点不显色。根据膜条上探针排列顺序,结果的判定依据显色信号有无予以判定, HPV 基因型根据显色信号的位置予以判定。

1.3.2 免疫组化检测 用 10%中性甲醛固定所有标本,包埋石蜡,连续切片厚度为 4 μm,开展免疫组化和 HE 染色, p53、P16、Cdc2 表达用 SP 法进行检测,

均按照说明书开展免疫组化流程。阳性对照用已知 p53、P16、Cdc2 表达阳性标本,一抗用磷酸盐缓冲液代替并作为阴性对照。p53 蛋白定位在细胞核; P16、Cdc2 蛋白阳性部位定位在细胞质和细胞核中,单独胞质不作为阳性。观察染色切片中具有代表性的高倍视野 10 个。阳性细胞以染色为棕黄色而定,阳性细胞数<10%或无着色者为阴性,阳性细胞数≥10%为阳性。

1.4 统计学处理 本研究采用 SPSS11.5 软件包进行统计学分析, HPV 感染情况, p53、P16、Cdc2 表达和临床病理特征之间的关系采取连续校正的 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 HPV 感染和 p53、P16、Cdc2 表达 HPV 感染在喉癌组织中以高危型 HPV-16 为主,通过 2 年随访,发现喉癌患者中有 50 例未复发,12 例出现复发。喉癌组织中 HPV 感染率为 19.35%(12/62),在喉癌组织中 p53 阳性表达率为 59.68%(37/62), P16 阳性表达率为 58.06%(36/62), Cdc2 阳性表达率为 64.52%(40/62),分别见图 1~3。

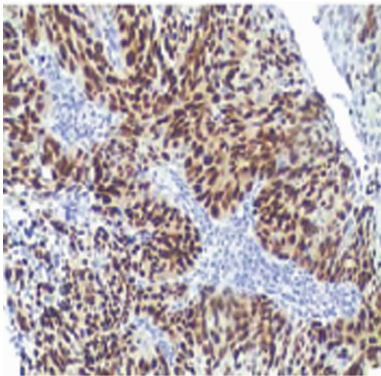


图 1 p53 阳性表达

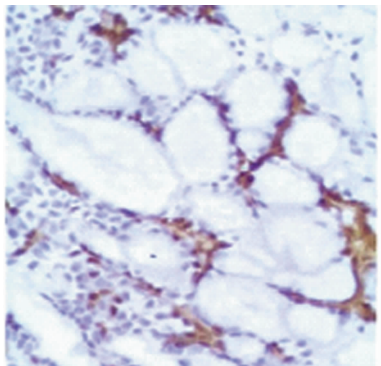


图 2 P16 阳性表达

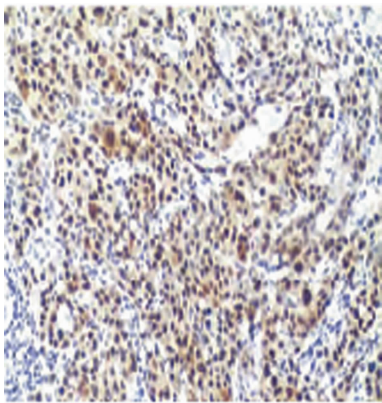


图 3 Cdc2 阳性表达

2.2 HPV 感染和 p53、P16、Cdc2 在喉癌组织中的表

表 1 HPV 感染和 p53、P16、Cdc2 在喉癌组织中的表达和预后情况 (n)

临床特征	n	HPV		χ^2	P	p53		χ^2	P	P16		χ^2	P	Cdc2		χ^2	P
						+	-			+	-			+	-		
总数	62	12	50	/	/	37	25	/	/	36	26	/	/	40	22	/	/
分化程度																	
高-中分化	45	10	35	0.865	0.353	29	16	1.550	0.213	26	19	0.246	0.620	28	17	0.377	0.539
低分化	17	2	15	/	/	8	9	/	/	11	6	/	/	12	5		
TNM 分期																	
T1~T2	42	8	34	0.008	0.929	24	18	0.348	0.556	22	20	1.727	0.189	29	13	1.168	0.280
T3~T4	20	4	16	/	/	13	7	/	/	14	6	/	/	11	9	/	/
预后																	
复发	12	0	12	3.571	0.039	7	5	0.011	0.916	10	2	3.902	0.048	12	0	8.184	0.004
无复发	50	12	38	/	/	30	20	/	/	26	24	/	/	28	22	/	/

注:/表示无数据

2.3 肿瘤分化程度及分期和喉癌患者复发的关系
经 Spearman 等级相关分析得知,肿瘤分化程度及分期和喉癌患者的复发无明显相关性($P>0.05$),见表 3。

表 3 肿瘤分化程度以及分期和喉癌患者复发的关系 (n)

临床病理特征	复发组	未复发组	χ^2	P
分化程度				
高-中分化	8	37	0.262	0.609
低分化	4	13		
TNM 分期				
T1~T2	7	35	0.6023	0.438
T3~T4	5	15		

2.4 肿瘤组织中 P16、p53 蛋白表达和 TNM 分期的关系 见表 4。

表 4 肿瘤组织中 P16、p53 蛋白表达和 TNM 分期的关系 (n/n)

组别	T1~T2(n=42)		T3~T4(n=20)	
	P16	p53	P16	p53
复发组(n=12)	6/7	7/7	4/5	4/5
无复发组(n=50)	15/35	16/35	11/15	10/15

达和预后情况 HPV 感染和 p53、P16、Cdc2 表达和喉癌的分化程度及临床分期无明显相关性($P>0.05$),HPV 阳性喉癌患者术后复发率[0.00%(0/12)]显著低于无复发患者[24.00%(12/50)],差异有统计学意义($P<0.05$),复发组喉癌患者的 p53 阳性表达率[58.33%(7/12)]和未复发组[60.00%(30/50)]差异无统计学意义($P>0.05$),复发组喉癌患者的 P16 阳性表达率[83.33%(10/12)]显著高于未复发组[52.00%(26/50)],差异有统计学意义($P<0.05$),复发组喉癌患者的 Cdc2 阳性表达率[100.00%(12/12)]显著高于未复发组[56.00%(28/50)],差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

3 讨 论

当前治疗喉癌主要以外科手术为主,然而术后依然有部分患者会复发。喉癌复发的因素较为复杂,主要和以下机制有关:首先是患者癌旁组织中可能伴有分子水平变化的癌前病变,进而演变为浸润性癌;其次可能伴有残存灶,主要和目前组织形态学技术难以检测出残余肿瘤细胞有关^[5-6]。因此对于各种分子研究在临床中可使用核酸杂交、RT-PCR、免疫组化等技术,从中鉴定局部复发潜在的分子标志。相关研究显示,高危型 HPV(比如 HPV-16、18 等)感染和喉鳞状细胞癌的发生存在着密切关联性^[7]。HPV 的 E6 蛋白可与 p53 蛋白结合,导致细胞周期调节蛋白表达异常,导致 p53 基因的抑癌作用失活,进而使细胞发生异常增殖和转化^[8]。相关研究者提出,在恶性肿瘤细胞中 HPV 可将基因整合在宿主细胞基因组内,导致宿主细胞染色体发生畸形,比如易位和缺失等^[9]。病毒也会在原癌基因附件进行整合,导致抑癌基因使其丧失正常功能,或者激活细胞原癌基因。本次研究结果显示,在喉癌组织中,HPV 阳性率为 19.35%(12/62),HPV 阳性喉癌患者术后复发率显著低于无复发患者,表明 HPV 感染的喉癌患者有着较好的预后,可能和 HPV 阳性患者对于放化疗的敏感性明显比

HPV 阴性患者高,同时无病生存率和总体生存率也明显比 HPV 阴性患者高有关。

在抑癌基因中,野生型 p53 属于较为常见的一种,可经多种途径发挥抑癌作用^[10]。反之,突变型 p53 基因则具有原癌基因的功能,对肿瘤的发生、发展具有促进作用。在所有人类肿瘤中基本上都能发现 p53 基因。野生型 p53 蛋白以四聚体的形式存在于体内,仅有 6~20 min 的半衰期,经免疫组化难以检测。突变型 p53 蛋白的半衰期较长,经免疫组化方式便能检测出。相关研究显示,在原发喉鳞癌中 p53 蛋白的阳性率达到 50%左右,是目前发现的与喉癌发生最密切的癌基因。同时,p53 基因和喉癌的恶性程度也存在一定关联性,在癌旁组织中也伴有 p53 蛋白,然而 p53 在喉鳞状细胞癌中呈现出强阳性表达^[11-12]。相关研究表明,喉癌术后复发不但和 p53 蛋白表达存在着密切关联性,同时喉癌术后复发率乃至病死率和 p53 蛋白表达都有一定关联性^[13]。本次研究结果显示,在喉癌组织中 p53 阳性表达率为 59.68%(37/62),然而喉癌组织中 p53 表达和喉癌的分化程度、分期、复发无明显关联性,可能和本次研究样本量较小有关。

P16 通过抑制 CDK4/6 的活性来控制细胞的正常增生和分裂。相关研究显示,在消化道黏膜、上呼吸道中,伴随着癌前病变的不断发展,p53 阳性表达率逐渐上升,同时 P16 表达率相继下降^[14]。本次研究结果表明,在喉癌组织中 P16 阳性表达率为 58.06%(36/62),同时复发喉癌患者的 P16 阳性表达率显著高于未复发者。

Cdc2 在调控细胞周期中属于较为重要的一种激酶,Cdc2 的活性不但会受到 CyclinB1 的正向调节,还会受到 CK1 的负向调节。一旦 Cdc2 的调节机制出现差错,极有可能导致细胞周期进程出现紊乱,发生细胞分化障碍,以至于细胞异常转化和恶性增殖,促使肿瘤的发生和进展。在胃癌、乳腺癌、喉癌等众多恶性肿瘤中能检测出 Cdc2 蛋白的过表达^[15]。本次研究结果表明,在喉癌组织中 Cdc2 蛋白的表达率为 64.52%(40/62),复发喉癌患者的 Cdc2 阳性表达率显著高于未复发者,表明 Cdc2 蛋白阳性表达和喉癌复发、转移及不良预后存在着密切关联性。

4 结 论

目前关于 HPV 感染、p53、P16、Cdc2 表达与喉癌的相关性报道较少,本研究证实了 HPV 感染、p53、P16、Cdc2 表达和喉癌的预后存在一定关联性。

参考文献

[1] 郭晓红,谢英华. 人乳头状瘤病毒感染与宫颈癌组织中核转录因子 κB 表达的关系研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015,11(19):4375-4378.

[2] 郭彦蓉,赵广超,李文华,等. 人乳头状瘤病毒感染对宫颈

癌局部免疫功能的影响分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014,24(13):3333-3334.

[3] 程鹏,宋亮,程琳瑛. 人乳头状瘤病毒感染与宫颈癌病变相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015,11(14):3307-3308.

[4] SAKASHITA T, HOMMA A, HATAKEYAMA H, et al. Clinical outcomes of weekly cisplatin chemoradiotherapy for patients with pyriform sinus cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2015,20(6):1081-1085.

[5] 刘宏侠,吴蒙,孙玉满,等. HPV 感染及 p53 与 Cdc2 蛋白表达对喉癌术后复发的预测价值[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015,22(7):519-523.

[6] 卢仲明,李奕莹,许咪咪,等. 高危型人乳头状瘤病毒 16/18 在喉癌中的感染及整合状态[J]. 实用医学杂志, 2016,32(9):1422-1424.

[7] 王海妹,周学军,黄家军,等. 老年喉癌组织中人乳头状瘤病毒 E7 及肿瘤增殖、迁移相关基因 mRNA 表达量的检测及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2017,37(8):1859-1862.

[8] 张玉,陈晓平,李霞,等. 喉癌与 HPV、EBV 感染阳性表达的相关性[J]. 实用医学杂志, 2017,33(13):2117-2122.

[9] 刘现义,李中,王晓春,等. 人乳头状瘤病毒感染与乳腺癌的关系及 P16 蛋白表达的相关性[J]. 中华医院感染学杂志, 2016,26(9):2120-2122.

[10] LUO X N, CHEN L S, ZHANG S Y, et al. Effectiveness of chemotherapy and radiotherapy for laryngeal preservation in advanced laryngeal cancer: a meta-analysis and systematic review[J]. Radiol Med, 2015,120(12):1153-1169.

[11] 杨静,陶琨,杨华,等. P16、P53 蛋白和 HPV 联合检测在宫颈疾病鉴别诊断中的价值[J]. 中国妇幼保健, 2012,27(9):1388-1391.

[12] GHOSH R, DUTTA R, DUBAL P M, et al. Laryngeal neuroendocrine carcinoma: a population-based analysis of incidence and survival[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2015,153(6):966-972.

[13] MISHRA A, AHMED K, FROGHI S, et al. Systematic review of the relationship between artificial sweetener consumption and cancer in humans: analysis of 599 741 participants[J]. Int J Clin Pract, 2015,69(12):1418-1426.

[14] BUSSU F, GALLI J, VALENZA V, et al. Evaluation of swallowing function after supracricoid laryngectomy as a primary or salvage procedure[J]. Dysphagia, 2015,30(6):686-694.

[15] CATA J P, ZAFEREO M, VILLARREAL J, et al. Intraoperative opioids use for laryngeal squamous cell carcinoma surgery and recurrence: a retrospective study[J]. J Clin Anesth, 2015,27(8):672-679.