

## • 论 著 •

## HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白在人喉鳞状细胞癌中的表达及相关性研究

英信江, 赵舒薇\*, 邱 杰, 叶 青, 孙爱华

(第二军医大学长征医院耳鼻喉科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**探讨 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白在人喉鳞状细胞癌(鳞癌)组织中的表达及其在喉鳞癌发生和发展过程中的相互关系。**方法:**用免疫组织化学方法检测 78 例喉鳞癌、26 例喉癌前病变、24 例声带息肉和 10 例癌周正常喉组织标本中 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白的表达。**结果:**癌周正常喉组织、声带息肉、喉癌前病变和喉鳞癌组织中 HPV16E7 蛋白的阳性表达率分别为 0 (0/10)、4.1% (1/24)、27.0% (7/26) 和 43.6% (34/78), Rb 蛋白的阳性表达率分别为 80.0% (8/10)、79.2% (19/24)、61.5% (16/26) 和 50.0% (39/78); HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白的阳性表达率在癌周正常喉组织、声带息肉与喉鳞癌组之间均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), HPV16E7 蛋白表达呈明显升高趋势, 而 Rb 蛋白表达呈明显下降趋势。HPV16E7 蛋白的阳性表达率, 喉鳞癌病理Ⅲ级明显高于Ⅰ级或Ⅱ级 ( $P < 0.05$ ), 临床Ⅲ~Ⅳ期明显高于Ⅰ~Ⅱ期 ( $P < 0.05$ ); 而 Rb 蛋白的表达正相反, 肿瘤病理Ⅲ级明显低于Ⅰ级或Ⅱ级 ( $P < 0.05$ ), 临床Ⅲ~Ⅳ期明显低于Ⅰ~Ⅱ期 ( $P < 0.05$ )。**结论:**HPV16E7 蛋白的表达升高和 Rb 蛋白的表达下降可能会导致人喉鳞癌的发生和发展; 检测 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白的表达可用于喉鳞癌恶性程度的评定。

**[关键词]** 喉肿瘤; 癌, 鳞状细胞; HPV16E7 蛋白; Rb 蛋白

**[中图分类号]** R 739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1364-04

## Expression of human papillomavirus type 16 E7 and retinoblastoma proteins in human laryngeal squamous cell carcinoma and their relationship

YING Xin-Jiang, ZHAO Shu-Wei\*, QIU Jie, YE Qing, SUN Ai-Hua (Department of Otolaryngology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the expression of human papillomavirus type 16 E7 (HPV16E7) and retinoblastoma (Rb) proteins in human laryngeal squamous cell carcinoma and their relationship during the genesis of human laryngeal squamous cell carcinoma. **Methods:** The expression of HPV16E7 and Rb proteins were detected by the immunohistochemical method in 78 specimens with laryngeal squamous cell carcinoma, 26 specimens with precarcinoma of larynx, 24 specimens with vocal cord polyps and 10 specimens of normal laryngeal tissues. **Results:** In normal laryngeal tissues, vocal cord polyps, precarcinoma of larynx and human laryngeal squamous cell carcinoma, the positive rates of HPV16E7 protein were 0 (0/10), 4.1% (1/24), 27.0% (7/26) and 43.6% (34/78), respectively, and of Rb protein were 80.0% (8/10), 79.2% (19/24), 61.5% (16/26) and 50.0% (39/78), respectively. There were significant differences between HPV16E7 protein and Rb protein between the laryngeal squamous cell carcinoma and the vocal cord polyps ( $P < 0.05$ ). The expression of HPV16E7 protein increased gradually, while that of Rb protein decreased gradually. In laryngeal squamous cell carcinoma the positive rate of HPV16E7 protein in histopathological grade Ⅲ was significantly higher than those in grade Ⅰ or grade Ⅱ ( $P < 0.05$ ), and those in clinical stage Ⅲ-Ⅳ was significantly higher than those in clinical stage Ⅰ-Ⅱ ( $P < 0.05$ ). On the contrary, the positive expression rate of Rb protein in histopathological grade Ⅲ was significantly lower than that in histopathological grade Ⅰ or grade Ⅱ ( $P < 0.05$ ), and that in clinical stage Ⅲ-Ⅳ were significantly lower than those in clinical stage Ⅰ-Ⅱ ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Overexpression of HPV16E7 protein and loss of Rb protein expression may contribute to the genesis of human laryngeal squamous cell carcinoma. Detection of HPV16E7 and Rb proteins expression may be useful in evaluation of the aggressiveness of human laryngeal squamous cell carcinoma.

**[KEY WORDS]** laryngeal neoplasms; carcinoma, squamous cell; HPV16E7 protein; Rb protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1364-1367]

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染可引起某些上皮组织发生肿瘤, 目前已发现 100 余种类型与人类肿瘤密切相关, 其中高危性 HPV (16、18 型等)可致恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。HPV 早期编码区 E7 基因表达产物 E7 蛋白与视网膜母细胞瘤

(retinoblastoma, Rb)蛋白相互作用是其重要机制之一<sup>[2]</sup>。人喉鳞状细胞癌(鳞癌)中 HPV 的表达以

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30371610)。

**[作者简介]** 英信江(1976-), 男(汉族), 硕士。

\*Corresponding author. E-mail: zhaoshw@citiz.net

16 型为主<sup>[3]</sup>。目前,有关 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白在喉鳞癌发生中的关系鲜有报道。本研究采用免疫组织化学方法对人喉组织不同病理阶段、喉鳞癌不同病理分级和临床分期的组织标本进行检测,以探讨 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白在人喉鳞癌发生、发展中的相互关系。

## 1 材料和方法

1.1 组织标本 取自我科 1996 年 1 月至 2003 年 6 月手术切除的喉不同病变组织标本共 138 例,均经病理证实,其中喉鳞癌 78 例,喉癌前病变 26 例(慢性肥厚性喉炎非典型增生 15 例,声带白斑 11 例),声带息肉 24 例,癌周正常喉组织(距肿瘤>1.0 cm)10 例。喉鳞癌患者 78 例中,男 55 例,女 23 例;年龄 44~79 岁,平均(61.5±10.9)岁;按 1987 年国际抗癌联盟(UICC)标准进行临床分期,其中 I 期 14 例,II 期 13 例,III 期 25 例,IV 期 26 例;按肿瘤分化程度将其分为 3 级,其中 I 级(高度分化)21 例,II 级(中度分化)30 例,III 级(低度分化)27 例,所有患者术前未经放疗和化疗。

1.2 试剂 实验用兔抗人 HPV16E7 单克隆抗体、兔抗人 Rb 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,所用 EnVision™+(K4006)免疫组织化学染色试剂盒购自 DAKO 公司。

1.3 免疫组织化学方法(EnVision 法) 将石蜡切片脱蜡至水;3%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)孵育 10 min,用以清除内源性过氧化物酶,蒸馏水漂洗;加入单克隆抗体(兔抗人 HPV16E7 或兔抗人 Rb)4℃过夜;EnVision™+ 孵育 30 min,各步骤之间均用 PBS 洗片,常规 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色。染色时,用已知阳性的宫颈腺癌病例作阳性对照,用 PBS 替代一抗作阴性对照。阳性细胞判定标准:HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白均为核染色,以细胞核出现棕色颗粒为阳性。确定阳性标准:任选 5 个阳性区的高倍视野,按阳性细胞所占肿瘤细胞百分比的平均数划分,比例>25%且染色深确定为阳性,≤25%且染色浅确定为阴性。

1.4 统计学处理 根据资料类型采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白的染色结果 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白阳性均表现为细胞核着色,阳性细胞核呈棕色细网状或粗大颗粒状,色泽深浅不等;阳性细胞多呈灶状或弥漫性分布,染色深;

阴性细胞多呈散在分布,染色浅(图 1)。

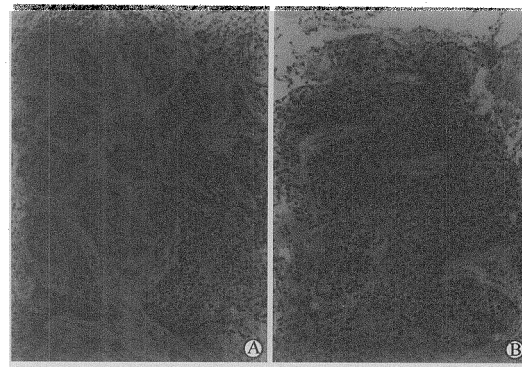


图 1 人喉鳞癌组织中 HPV16E7 蛋白(A)和 Rb 蛋白(B)的阳性表达

Fig 1 Positive expression of HPV16E7 protein(A) and Rb protein(B) in human laryngeal squamous cell carcinoma tissue(EnVision, ×100)

2.2 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白在不同喉黏膜病变中的表达 结果见表 1。由表 1 可知,HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白的表达在喉鳞癌和声带息肉、癌周正常喉组织之间均有显著性差异( $P<0.05$ )。在癌周正常喉组织、声带息肉、喉癌前病变和喉鳞癌中 HPV16E7 蛋白的表达呈明显升高趋势,而 Rb 蛋白的表达呈下降趋势。

表 1 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白在喉黏膜不同病变中表达结果

Tab 1 Expression of HPV16E7 and Rb proteins in different human laryngeal lesions

| Type of lesions      | N  | HPV16E7(+) | Rb(+)     |
|----------------------|----|------------|-----------|
| Normal tissues       | 10 | 0(0)*      | 8(80.0)*  |
| Vocal cord polyps    | 24 | 1(4.1)*    | 19(79.2)* |
| Precarcinoma lesions | 26 | 7(27.0)    | 16(61.5)  |
| Laryngeal carcinoma  | 78 | 34(43.6)   | 39(50.0)  |

\*  $P<0.05$  vs laryngeal carcinoma

2.3 喉鳞癌组织 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白阳性表达与肿瘤病理分级之间的关系 结果见表 2。由表 2 可知,HPV16E7 蛋白及 Rb 蛋白阳性表达率在 I、II 级肿瘤之间无显著性差异,HPV16E7 蛋白的阳性表达在 III 级明显高于 I 级和 II 级( $P<0.05$ ),Rb 蛋白的阳性表达在 III 级明显低于 I 级和 II 级( $P<0.05$ )。

2.4 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白阳性表达与喉鳞癌临床特征之间的关系 结果见表 3。由表 3 可知,HPV16E7 蛋白的阳性表达在 III~IV 期明显高于

I ~ II 期( $P < 0.05$ ), Rb 蛋白的阳性表达在 III ~ IV 期明显低于 I ~ II 期( $P < 0.05$ )。HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白的表达在  $\geq 50$  岁和  $< 50$  岁患者以及男性、女性之间均无显著性差异。

表 2 喉鳞癌组织 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白阳性表达与肿瘤病理分级之间的关系

Tab 2 Relationship between histopathological grade and positive expression of HPV16E7 and Rb proteins in human laryngeal squamous cell carcinoma

| Histopathological grade | N  | HPV16E7(+) | Rb(+)     |
|-------------------------|----|------------|-----------|
| I                       | 21 | 6(28.6)*   | 15(71.4)* |
| II                      | 30 | 11(36.7)*  | 17(56.7)* |
| III                     | 27 | 17(63.0)   | 7(25.9)   |

\*  $P < 0.05$  vs histopathological grade III

表 3 HPV16E7 和 Rb 蛋白阳性表达与人喉鳞癌的临床关系

Tab 3 Relationship between clinical index of human laryngeal squamous cell carcinoma and expression of HPV16E7 and Rb proteins

| Classification | N  | HPV16E7(+) | Rb(+)     |
|----------------|----|------------|-----------|
| Age(year)      |    |            |           |
| $\geq 50$      | 48 | 19(39.6)   | 27(56.3)  |
| $< 50$         | 30 | 15(50.0)   | 12(40.0)  |
| Sex            |    |            |           |
| Male           | 55 | 25(45.5)   | 27(49.1)  |
| Female         | 23 | 9(39.1)    | 12(52.2)  |
| Clinical stage |    |            |           |
| I - II         | 27 | 7(26.0)    | 20(74.1)  |
| III - IV       | 51 | 27(52.9)*  | 19(37.3)* |

\*  $P < 0.05$  vs clinical stage I - II

### 3 讨论

HPV16 的基因组是双链闭环 DNA, 其长度 8 000 bp 左右, 按功能可分为早期区(E 区)、晚期区(L 区)和非编码区(NCR)3 个区域。主要的基因开放读码框(ORF)位于同一条 DNA 链上, 排列顺序为 3'-URR-E6-E7-E1-E2-E4(E3)-E5-L2-L1-5'<sup>[4]</sup>。HPV16E7 是致癌的重要转化基因, 其 ORF 有 297 个核苷酸, 编码一个多功能的由 98 个氨基酸组成的核磷酸蛋白。HPV16E7 蛋白全序列可分为 3 个功能区: I 区 1~15 氨基酸, II 区 16~38 氨基酸, III 区 39~98 氨基酸, 锌指及 C 端区。II 区有一位点 LX-CXE(22~26 个氨基酸), 是结合 Rb 的关键位点<sup>[5]</sup>。

Rb 蛋白 C 端区存在一个“Rb”口袋结构, 亦称

为“Pocket”域区, 能与 E2F、细胞周期调控蛋白如细胞周期蛋白以及某些病毒癌蛋白如猴肉瘤病毒 SV40 大 T 抗原、腺病毒 E1A 蛋白、HPV16E7 蛋白等结合, 通过其相互作用而发挥多种功能<sup>[6]</sup>。

在宫颈癌中研究发现, HPV16E7 蛋白能和 Rb 蛋白结合, 促使 E2F1 游离, 影响 P16-细胞周期蛋白 D1-CDK4-PRb-E2F 细胞周期调节链, 促进细胞周期进展和细胞增殖基因的转录, 从而促进细胞转化。王平等<sup>[7]</sup>采用聚合酶链反应和蛋白印迹方法研究宫颈癌组织时证实, 正常宫颈组织中存在 Rb-E2F1 蛋白复合物, 而 HPV16 阳性的宫颈癌组织中 HPV16E7 蛋白与 Rb 蛋白结合, 并发现部分游离状态的 E2F1 因子。

本研究结果表明, HPV16E7 蛋白在喉鳞癌中的表达明显高于声带息肉中的表达, III 级鳞癌中的表达明显高于 I、II 级, III、IV 期癌细胞中的表达明显高于 I、II 期, 随着喉黏膜癌变的加重, HPV16E7 蛋白的表达呈上升趋势, 提示高危 HPV16E7 蛋白与喉鳞癌的发生、发展密切相关。然而, Rb 蛋白的表达随着喉黏膜癌变的加重呈下降趋势, 在 III 级鳞癌中的表达明显低于 I、II 级, III、IV 期癌细胞明显低于 I、II 期。本实验结果提示, 在人喉鳞癌的发生过程中, HPV16E7 蛋白与 Rb 蛋白可能相互作用, 促进肿瘤发生发展。其具体机制如何有待深入研究, 推测可能是两种蛋白促使 E2F1 游离, 影响了细胞周期的正常调控, 促进细胞周期进展和细胞增殖基因的转录, 从而促进喉正常黏膜细胞转化为癌细胞。实验结果还表明, HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白的阳性表达与喉癌的肿瘤分级及临床分期有关( $P < 0.05$ ), 提示检测 HPV16E7 蛋白和 Rb 蛋白的表达也可用于喉鳞癌恶性程度的评定。

对于随着 HPV16E7 蛋白表达的升高 Rb 蛋白的表达呈下降趋势这一现象, 我们认为, 并不意味着不存在功能性 Rb 蛋白, 只是尚未达到检出的水平。鉴于在人喉鳞癌的发生过程中, HPV16E7 蛋白是与 Rb 蛋白相互结合成复合物, 还是使 Rb 蛋白降解失活, 有待于进一步研究证实。

### [参考文献]

- [1] Studentsov YY, Ho GY, Marks MA, et al. Polymer-based enzyme-linked immunosorbent assay using human papilloma virus type 16 (HPV16) virus-like particles detects HPV16 clade-specific serologic responses[J]. *Clin Microbiol*, 2003, 41(7):2827-2834.
- [2] Balsitis SJ, Sage J, Duensing S, et al. Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on

- mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 *in vivo* [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 (24):9094-9103.
- [3] Du J, Chen GG, Vantis AC, *et al*. The nuclear localization of NF $\kappa$ B and p53 is positively correlated with HPV16E7 level in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *J Histochem Cytochem*, 2003, 51(4):533-539.
- [4] Almadori G, Galli J, Cadoni G, *et al*. Human papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma; biologic function and clinical signification [J]. *Head Neck*, 2002, 24(6):597-604.
- [5] Imai Y, Matsushima G, Sugimura T, *et al*. Purification and characterization of human papillomavirus type 16 E7 protein with preferential binding capacity to the underphosphorylated form of retinoblastoma gene product [J]. *Virology*, 1999, 65 (9):4966-4972.
- [6] Helt AM, Galloway DA. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(2):159-169.
- [7] 王平, 彭芝兰, 王和, 等. 宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型 E7 蛋白致癌机理初探 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2000, 14(2):117-120.
- Wang P, Peng ZL, Wang H, *et al*. Study on the carcinogenic mechanism of human papillomavirus type 16 E7 protein in cervical carcinoma [J]. *Zhonghua Shiyen He Linchuang Bingduxue Zazhi* (Chin J Exp Clin Virol), 2000, 14(2):117-120.
- [收稿日期] 2004-07-06 [修回日期] 2004-08-17
- [本文编辑] 邓晓群

(上接第 1363 页)

患者中 1 例为角化过度, 2 例为不典型增生, 1 例恶变者为重度不典型增生。27 例患者术前、术后嗓音声学参数变化见表 1。从表 1 中可见, 声带白斑组术后的 Jitter, Shimmer 明显小于术前, HNR 则明显大于术前, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ); 声带白斑组术后嗓音参数与对照组比较虽然略差, 但无统计学意义。

表 1 声带白斑组及对照组嗓音声学参数比较

( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别               | Jitter (%)       | Shimmer (%)      | HNR ( $L_1$ /dB)  |
|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 声带白斑组 ( $n=27$ ) |                  |                  |                   |
| 术前               | 0.59 $\pm$ 0.48  | 3.34 $\pm$ 1.81  | 20.39 $\pm$ 4.85  |
| 术后               | 0.32 $\pm$ 0.24* | 1.41 $\pm$ 0.85* | 27.19 $\pm$ 5.25* |
| 对照组 ( $n=25$ )   | 0.22 $\pm$ 0.09* | 1.26 $\pm$ 0.45* | 27.69 $\pm$ 3.76* |

\*  $P < 0.05$  与声带白斑组术前比较

### 3 讨论

喉白斑病是指喉黏膜上皮片状角化增生的病变, 也称喉角化病, 常多见于声带上, 也可发生于喉其他黏膜上, 可能与吸烟、用声不当、慢性喉炎、空气中有有害物质的刺激、维生素 A 缺乏有关<sup>[4]</sup>。病理分为两种类型<sup>[5]</sup>: (1) 单纯角化型; (2) 角化病伴不典型增生。本组 27 例声带白斑患者在显微喉镜下手术治疗术前、术后嗓音声学参数经过统计学处理, 具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 术后组与对照组比较, 在基频微扰、振幅微扰和谐噪比参数方面虽然稍差一些, 但无统计学意义, 从而客观定量地说明了显微喉镜下手术治疗声带白斑术前、术后嗓音声学参数的变化, 表明声带白斑患者经过显微喉镜下手术后, 嗓音质量能明显提高。

对喉白斑病的疗效, 各家报道不一。Putney 等 (1953) 报道 68 例中, 经 6 年半随访, 27 例演变成浸润癌, 癌变率高达 39.7%。McGavran (1960) 报道 87 例, 其中仅 6 例发展为浸润癌, 癌变率为 6.9%。孙济治 (1987) 报道 20 例, 其中 5 例癌变, 癌变率为 25.0%。李惠萍等 (1995) 报道 41 例, 有 8 例癌变, 癌变率为 19.5%。国内外临床医生均将喉黏膜白斑病视

为“癌前期病变”, 由于该疾病非必然发展成癌, 在治疗仍采用一般的消炎抗感染处理, 消极反复活检, 密切观察病情变化以至患者失去根治的良机。有人认为喉白斑的疗效与手术方式无关, 而与病变本身性质有关<sup>[6,7]</sup>。单纯白斑可以治愈, 白斑伴轻、中、重度不典型增生者都有较高的癌变率, 因此都要引起高度重视, 给予积极的随访观察, 一旦发现问题, 给予及时的处理。目前认为支撑喉镜显微镜下手术剥离角化灶, 效果肯定<sup>[5,6]</sup>。显微喉镜手术具有术野明亮清晰、有立体感、操作精细彻底等优点, 在病灶的摘除或清理方面取得较为肯定的效果, 已得到广泛的开展。本组治疗 27 例患者仅 3 例复发, 治愈率达 89.0%。同样在直接喉镜下治疗声带白斑 30 例其中 16 例治愈, 治愈率为 53.33% (未发表资料), 故显微喉镜下治疗声带白斑可以明显减少复发率。由于喉白斑侵及深度一般局限于黏膜上皮, 不突破上皮基底膜, 故 Kambic (1978) 主张采取声带剥皮术进行治疗。目前因缺乏可靠检测指标来判断评估病变的预后, 所以在病变早期进行积极的喉显微喉镜下手术治疗声带白斑极其重要, 既可提高治愈率, 又同时保留了声音功能<sup>[2]</sup>。

### [参考文献]

- [1] 李晓平. 金嗓散结丸对声带息肉术后复发的预防效果 [J]. 实用医药杂志, 2003, 20(11):853.
- [2] 魏春生, 王薇. 三种声带疾病在喉显微手术前后的声学评估 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2001, 9(3):168-169.
- [3] 孙广滨, 周水森, 温武, 等. 半导体激光治疗声带白斑 30 例临床分析 [J]. 中国临床杂志, 2004, 18(3):141-142.
- [4] 黄鹤年. 喉角化症及喉白斑病 [A]. 见: 黄选兆 主编. 耳鼻咽喉学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 153.
- [5] 郑福蓉, 蒋灵芝, 黎万荣. 喉黏膜白斑病的内镜诊断 [J]. 中国临床杂志, 2003, 3(2):28-29.
- [6] 张浩, 陈学明, 李朝晖. 声带黏膜白斑 32 例临床分析 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2000, 14(1):22-23.
- [7] 亓放, 张宝泉, 张连山. 喉白斑病 14 例临床分析 [J]. 海南医学, 2001, 12(8):11-12.
- [收稿日期] 2004-09-02 [修回日期] 2004-10-16
- [本文编辑] 邓晓群