

· 论 著 ·

# HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 蛋白在人喉鳞癌中的表达及相关性研究

强 笔<sup>1</sup>, 马纪清<sup>2</sup>, 邱 杰<sup>1</sup>, 何 金<sup>3</sup>, 赵舒薇<sup>1\*</sup>, 郎军添<sup>1</sup>, 叶 青<sup>1</sup>, 王海青<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院耳鼻咽喉科, 上海 200003; 2. 解放军第 454 医院耳鼻咽喉科, 南京 210002; 3. 长征医院病理科)

**[摘要]** **目的:**探讨 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 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 EnVision 免疫组织化学法检测 72 例喉鳞癌、24 例喉癌前病变、15 例声带息肉和 8 例癌周正常喉组织标本中 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 蛋白的表达并比较,对喉鳞癌与临床病理因素进行相关性分析。**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 HPV16/18-E6 蛋白的阳性表达率分别为 0(0/8)、6.7%(1/15)、12.5%(3/24)和 37.5%(27/72),p53 蛋白的阳性表达率分别为 0(0/8)、13.3%(2/15)、25.0%(6/24)和 52.8%(38/72),MDM2 蛋白的阳性表达率分别为 0(0/8)、6.7%(1/15)、37.5%(9/24)和 70.8%(51/72),HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 蛋白的阳性表达在声带息肉、喉癌前病变与喉鳞癌组之间均有显著性差异( $P < 0.05$ )。HPV16/18-E6 蛋白和 MDM2 蛋白的阳性表达在病理 I ~ III 级肿瘤之间呈明显升高趋势,有显著性差异( $P < 0.05$ )。HPV16/18-E6 蛋白的阳性表达与临床分期和淋巴结转移明显相关( $P < 0.05$ )。p53 蛋白阳性表达与 HPV16/18-E6 蛋白、MDM2 蛋白阳性表达有显著正相关性( $P < 0.05$ )。**结论:**HPV16/18-E6、MDM2 蛋白的过表达和 p53 的失活与人喉鳞癌的发生发展密切相关。

**[关键词]** 喉肿瘤;癌,鳞状细胞;乳头状瘤病毒,人;E6 蛋白;p53 蛋白;MDM2 蛋白

**[中图分类号]** R 739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1320-04

## Expressions of HPV16/18-E6, p53 and MDM2 proteins in human laryngeal squamous cell carcinoma and their relationship with development and progression of laryngeal squamous cell carcinoma

QIANG Bi<sup>1</sup>, MA Ji-qing<sup>2</sup>, QIU Jie<sup>1</sup>, HE Jin<sup>3</sup>, ZHAO Shu-wei<sup>1\*</sup>, LANG Jun-tian<sup>1</sup>, YE Qing<sup>1</sup>, WANG Hai-qing<sup>1</sup> (1. Department of Otolaryngology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Otolaryngology, No. 454 Hospital of PLA, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002; 3. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the expressions of human papillomavirus type 16/18-E6 (HPV16/18-E6), p53, and murine double minute-2 (MDM2) proteins in patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and their relationship with the development/progression of LSCC. **Methods:** The expressions of HPV16/18-E6, p53, and MDM2 proteins were detected by immunohistochemical method in 72 LSCC specimens, 24 specimens of precancerous larynx, 15 specimens of vocal cord polyp, and 8 normal laryngeal specimens, and their relations with clinicopathological factors of LSCC were statistically analyzed. **Results:** The positive rates of HPV16/18-E6 protein in the normal laryngeal, vocal cord polyp, precancerous larynx, and LSCC specimens were 0(0/8), 6.7%(1/15), 12.5%(3/24), and 37.5%(27/72); of p53 protein were 0(0/8), 13.3%(2/15), 25.0%(6/24), and 52.8%(38/72); and of MDM2 protein were 0(0/8), 6.7%(1/15), 37.5%(9/24), and 70.8%(51/72), respectively. The expressions of HPV16/18-E6, p53, and MDM2 were significantly different between the vocal cord polyp, the precancerous larynx, and the LSCC ( $P < 0.05$ ). The positive rates of HPV16/18-E6 and MDM2 protein in LSCC specimens increased significantly with the increase of histopathological grades (I-III) ( $P < 0.05$ ). The positive rates of HPV16/18-E6 protein were positively correlated with the clinical staging and lymph nodes metastasis of LSCC ( $P < 0.05$ ). The expression of p53 was positively correlated with the expression of HPV16/18-E6 and MDM2 in LSCC patients ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Inactivation of the p53 pathway and overexpression of HPV16/18-E6 and MDM2 may contribute to the genesis of human laryngeal cell carcinoma.

**[KEY WORDS]** laryngeal neoplasms; carcinoma, squamous cell; papillomavirus, human; E6 protein; p53 protein; MDM2 protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1320-1323]

人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染可引起某些上皮组织发生肿瘤, 目前已发现 120 余种类型与人类肿瘤密切相关<sup>[1]</sup>。在恶性肿瘤组织中检测到的主要是高危性 HPV16、18 型等。HPV E6 癌基因编码合成的 E6 蛋白与 p53 蛋白结合, 可以导致 p53 蛋白失活和降解<sup>[2]</sup>。鼠双微

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30371610)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30371610)。

**[作者简介]** 强 笔, 硕士, 副主任医师。

E-mail: qbmy1999@sina.com

\* Corresponding author. E-mail: zhaoshw1@yahoo.com.cn

体 2 (Murine double minute-2, MDM2) 表达过强可以抑制 p53 的活性<sup>[3]</sup>, 导致细胞增殖失控和肿瘤形成。目前, 有关 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 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 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 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 1998 年 1 月至 2003 年 6 月手术切除的喉不同病变组织标本共 119 例, 均经病理证实, 其中喉鳞癌 72 例, 喉癌前病变 24 例 (慢性肥厚性喉炎非典型增生 10 例, 声带白斑 10 例, 成人型喉乳头状瘤 4 例), 声带息肉 15 例, 癌周正常喉组织 (距肿瘤 > 1.0 cm) 8 例。喉鳞癌患者 72 例中, 男 68 例, 女 4 例; 年龄 38~85 岁, 平均 (61.1 ± 10.8) 岁; 按 2002 年国际抗癌联盟 (UICC) 标准进行临床分期, 其中 I 期 9 例, II 期 12 例, III 期 23 例, IV 期 28 例; 按肿瘤分化程度将其分为 3 级, 其中 I 级 24 例, II 级 27 例, III 级 21 例, 所有患者术前未经放疗和化疗。

1.2 试剂 实验用鼠抗人 HPV16/18-E6 单克隆抗体、鼠抗人 p53 单克隆抗体、鼠抗人 MDM2 单克隆抗体均购自福州迈新生物技术开发有限公司, 所用 EnVision™ + 加强型免疫组织化学染色试剂盒 (K400011) 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; 根据所用一抗的不同, 采用不同的抗原修复方法预处理 (HPV16/18-E6 抗原用抗原修复液

修复; p53 抗原用柠檬酸液微波修复; MDM2 抗原用柠檬酸液高压加热修复); 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 (鼠抗人 HPV16/18-E6、鼠抗人 p53 或鼠抗人 MDM2) 4℃ 过夜; EnVision™ + 孵育 30 min, 各步骤之间均用 PBS 洗片, DAB 显色 5~10 min, 苏木精复染, 封片。染色时, 用已知 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 反应阳性切片作阳性对照, 用 PBS 替代一抗作阴性对照。

1.4 阳性细胞判定标准 HPV16/18-E6 蛋白和 p53 蛋白为细胞核染色, MDM2 蛋白为细胞核和细胞质染色, 以出现棕黄色颗粒为阳性。确定阳性标准: 在高倍镜下对每张切片随机选择 5 个视野, 每个视野计数 200 个肿瘤细胞, 共计 1 000 个。阳性细胞数 < 5% 为阴性 (-), 5%~25% 为弱阳性 (+), 25%~50% 为中度阳性 (++) , > 50% 为强阳性 (+++)。 (+) 以上统称阳性表达, 余为阴性表达。

1.5 统计学处理 应用 SAS9.0 统计软件分析。采用  $\chi^2$  检验和 CMH (Cochran-Mantel-Haenszel) 统计量分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 蛋白的染色结果 HPV16/18-E6 蛋白和 p53 蛋白阳性表现为细胞核着色 (图 1A、1B), MDM2 蛋白阳性表现为细胞核和细胞质着色 (图 1C)。阳性细胞核呈棕黄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。

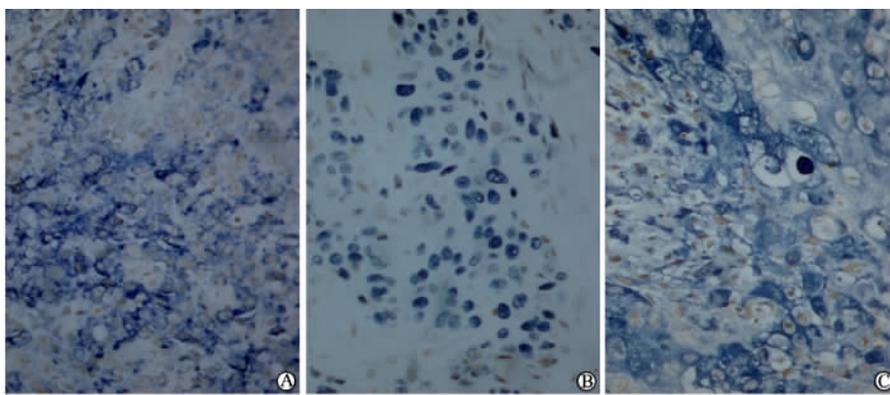


图 1 人喉癌组织中 HPV16/18-E6 (A)、p53 (B) 和 MDM2 (C) 蛋白表达情况

Fig 1 Expression of HPV16/18-E6 (A), p53 (B), and MDM2 (C) proteins in human laryngeal carcinoma specimens (×400)

2.2 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 蛋白在不同喉黏膜病变中的表达 结果见表 1。由表 1 可知, 三者

在癌周正常喉组织中无表达, 在声带息肉、喉癌前病变与喉鳞癌之间均有显著性差异 (P < 0.05 或 P < 0.01)。在癌周正常喉组织、声带息肉、喉癌前病变和喉鳞癌中的阳性表达率呈明显升高趋势。

表 1 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 蛋白在不同喉粘膜病变组织标本中表达结果

Tab 1 Expression of HPV16/18-E6, p53, and MDM2 proteins in different human laryngeal lesions [n(%)]

Type of lesions	N	HPV16/18-E6(+)	p53(+)	MDM2(+)
Normal tissues	8	0(0)	0(0)	0(0)
Vocal cord polypus	15	1(6.7)*	2(13.3)**	1(6.7)**
Precarcinoma lesions	24	3(12.5)*	6(25.0)*	9(37.5)**
Laryngeal carcinoma	72	27(37.5)	38(52.8)	51(70.8)

\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs laryngeal carcinoma

2.3 喉鳞癌组织 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 蛋白阳性表达与临床病理分级之间的关系 结果见表 2。

表 2 HPV16/18-E6、p53 和 MDM2 蛋白阳性表达与喉鳞癌的临床病理关系

Tab 2 Relationship between clinicopathology of human laryngeal squamous cell carcinoma and expression of HPV16/18-E6, p53 and MDM2 proteins [n(%)]

Variable	N	HPV16/18-E6(+)	p53(+)	MDM2(+)
Histopathological grade				
I	21	3(14.3)	10(47.6)	11(52.4)
II	28	11(39.3)	14(50.0)	21(75.0)
III	23	13(56.5)**	14(60.9)	19(82.6)*
Clinical stage				
I	10	2(20.0)	4(40.0)	6(60.0)
II	15	4(26.7)	7(46.7)	10(66.7)
III	20	7(35.0)	11(55.0)	14(70.0)
IV	27	14(51.9)△	16(59.3)	21(77.8)
Metastasis				
Without	50	15(30.0)	24(48.0)	34(68.0)
With	22	12(54.6)▲	14(63.6)	17(77.3)

\*  $\chi^2_{CHM} = 4.71, P < 0.05$ ; \*\*  $\chi^2_{CHM} = 8.19, P < 0.01$ ; △  $\chi^2_{CHM} = 4.20, P < 0.05$ ; ▲  $P < 0.05$

由表 2 可知, HPV16/18-E6 蛋白和 MDM2 蛋白阳性表达在病理 I ~ III 级肿瘤之间呈明显升高趋势, 用 CMH 统计量分析有显著相关性 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ), 而 p53 蛋白的阳性表达与病理分级无显著相关性。随着临床分期 I ~ IV 期的上升, 三者的表达呈明显升高趋势, 但用 CMH 统计量分析只有 HPV16/18-E6 蛋白在统计学上有显著相关性 ( $P < 0.05$ )。伴淋巴结转移者 HPV16/18-E6 蛋白阳性表达率显著高于无淋巴结转移者 ( $P < 0.05$ ), 而 p53 和 MDM2 蛋白阳性表达率无显著性差异。

2.4 HPV16/18-E6、MDM2 蛋白与 p53 蛋白阳性表达在喉鳞癌中的相关分析 结果见表 3。由表 3 可

知, p53 蛋白阳性表达与 HPV16/18-E6 蛋白、MDM2 蛋白阳性表达有显著正相关性 ( $P < 0.05$ )。p53 和 HPV16/18-E6 蛋白联合表达 20 例, p53 和 MDM2 蛋白联合表达 32 例。另外, 三者均为阳性共 17 例, HPV16/18-E6 和 MDM2 蛋白之间无明显相关性。

表 3 HPV16/18-E6、MDM2 蛋白与 p53 蛋白阳性表达在喉鳞癌中的相关分析

Tab 3 Correlation between expression of HPV16/18-E6, MDM2 proteins and expression of p53 protein in human laryngeal squamous cell carcinoma samples [n(%)]

p53	N	HPV16/18-E6				MDM2			
		+++	++	+	-	+++	++	+	-
+++	12	1	3	6	2	2	5	4	1
++	10	0	1	2	7	2	5	1	2
+	16	1	2	4	9	4	4	5	3
-	34	2	2	3	27*	4	9	6	15△

\*  $\chi^2_{CHM} = 5.94, P < 0.05$ ; △  $\chi^2_{CHM} = 4.12, P < 0.05$

### 3 讨论

喉癌的发生、发展是一个多因素、多步骤的复杂过程, 高危性 HPV16、18 型感染是其重要因素之一。HPV 感染宿主细胞后, 其 DNA 整合入宿主细胞基因组中, 表达产生 E6 蛋白与细胞中的 p53 蛋白结合, 导致 p53 蛋白失活和降解。不同型的 HPV E6 蛋白的共同特征是具有 2 个结构域, 每个结构域含 2 个 cys-x-x-cys 组成的锌指结构, 而这些锌指结构具有与 DNA、RNA 结合和介导蛋白-蛋白相互作用的功能, 从而实现 E6 蛋白的细胞转化作用。在头颈鳞癌中研究显示, 含野生型 p53 的癌细胞不能检测到 p53 蛋白, 但抑制 E6 RNA 的活性后则能检测到, 表明 E6 能降解 p53 蛋白<sup>[4]</sup>; E6 介导的调节机制可导致抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的过表达和促进凋亡蛋白 Bak 的下调而抑制细胞凋亡<sup>[5]</sup>, 证实 HPV E6 基因是与细胞转化密切相关的病毒癌基因。本研究结果表明, HPV16/18-E6 蛋白在喉鳞癌组中的阳性表达率为 37.5%, 明显高于声带息肉和喉癌前病变组中的 12.5% 和 6.7% ( $P < 0.05$ ); 随肿瘤分级和临床分期的上升, HPV16/18-E6 蛋白的表达呈升高趋势, 用 CMH 统计量分析有显著相关性 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ); 有淋巴结转移组的表达明显高于无淋巴结转移组 ( $P < 0.05$ ), 提示 HPV16/18-E6 蛋白的过表达与喉鳞癌的发生、发展密切相关。

p53 主要调控细胞周期的 G<sub>1</sub> 停滞和诱导细胞发生细胞凋亡, 通常与一系列相关基因组成“p53 网

络”而共同作用。p53 基因的突变、蛋白的降解和结构的改变等导致 p53 功能失活很可能是肿瘤发生的主要致病因素<sup>[6,7]</sup>。在 p53 蛋白上有 2 个 E6 蛋白结合位点,分别在核心区的 66~326 氨基酸残基处和 p53 的 C 末端。E6 蛋白与 p53 蛋白核心区的结合依赖 E6AP(E6 associated protein),通过泛素依赖途径降解 p53 蛋白;E6 蛋白与 p53 蛋白的 C 末端结合,不降解 p53 蛋白,而主要起转录抑制功能或影响 p53 蛋白的核定位,使 p53 蛋白无法发挥作用而失活<sup>[8]</sup>。E6 蛋白通过泛素依赖途径降解 p53 是解释 E6 蛋白转化功能的经典途径,但这一现象并不能完全解释 E6 基因的转化作用。正常细胞中的 p53 半衰期短,不易被检测到,以往认为免疫组织化学方法检测到的 p53 蛋白主要为突变型,但研究表明 HPV 阳性肿瘤中 p53 基因的突变率比 HPV 阴性肿瘤中低<sup>[9]</sup>。本研究结果表明,HPV16/18-E6 表达与 p53 累积明显相关( $P < 0.05$ )。我们认为,检测到的 p53 蛋白可能其本身结构已发生某种变化,或与其他细胞蛋白如 Hsp70<sup>[10]</sup>、病毒蛋白如 E6 蛋白<sup>[8]</sup>结合,稳定性增加,不易被降解且功能失活。p53 蛋白 72 位点具有多态性,可编码精氨酸和脯氨酸,也影响 E6 和 p53 之间的复杂关系<sup>[2]</sup>。

正常细胞中,野生型 p53 和 MDM2 之间形成一自我反馈环,若两者间的平衡被打破,野生型 p53 持续表达可导致细胞生长的永久性抑制或凋亡,MDM2 表达过强则可抑制 p53 作用使其功能丧失,导致细胞增殖,参与肿瘤的形成<sup>[3]</sup>。本研究结果表明,MDM2 蛋白在喉鳞癌组中的阳性表达率显著高于声带息肉和喉癌前病变组( $P < 0.01$ ),随肿瘤分级而表达明显上升( $P < 0.05$ ),提示 MDM2 蛋白的过表达与喉鳞癌的发生、发展密切相关。MDM2 可与 p53 蛋白结合后从细胞核运输至胞质中,在胞质中 p53 通过泛素-蛋白酶体降解<sup>[11]</sup>;MDM2 还具有 p53 特异性泛素蛋白连接酶 E3 的作用,可使 p53 发生泛素化并促进 p53 降解;另外,MDM2 也可直接作用于靶 DNA 而促进肿瘤生长<sup>[12]</sup>。

MDM2 与 p53 蛋白的相关性文献报道不一,Osman 等<sup>[13]</sup>报道喉鳞癌中 MDM2 表达与 p53 累积无相关性,Skomedal 等<sup>[14]</sup>报道宫颈癌中则呈正相关。本研究结果表明,MDM2 表达与 p53 累积明显相关( $P < 0.05$ )。MDM2 蛋白同 p53 蛋白结合时,会使细胞内 p53 蛋白更加稳定,而不被 HPV16/18-E6 蛋白所降解<sup>[14]</sup>。在 HPV 阳性的癌细胞中,p53

的降解完全依赖 E6 途径,同时 MDM2 途径失活。HPV 阴性细胞中 p53 的活性被 MDM2 抑制<sup>[3]</sup>。目前,HPV E6、p53 和 MDM2 蛋白三者之间的关系尚未完全明了,有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis[J]. J Natl Cancer Inst,2000,92: 690-698.
- [2] Storey A, Thomas M, Kalita A, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer[J]. Nature,1998,393:229-234.
- [3] Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, et al. Complete switch from MDM2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98:1218-1223.
- [4] Ferris RL, Martinez I, Sirianni N, et al. Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): a natural disease model provides insights into viral carcinogenesis[J]. Eur J Cancer 2005,41: 807-815.
- [5] Du J, Chen GG, Vlantisa AC, et al. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression[J]. Cancer Lett, 2004,205:81-88.
- [6] Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops[J]. Oncogene,2005,24:2899-2908.
- [7] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network [J]. Nature,2000,408:307-310.
- [8] Mantovani F, Banks L. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumor derived cell lines[J]. Oncogene,1999,18: 3309-3315.
- [9] Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus[J]. J Natl Cancer Inst, 2004,96: 998-1006.
- [10] Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death [J]. J Natl Cancer Inst,2000,92:1564-1572.
- [11] Freedman DA, Levine AJ. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6[J]. Mol Cell Biol,1998,18: 7288-7293.
- [12] Peng YH, Chen LH, Li CG, et al. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by mutant p53 [J]. J Biol Chem,2001,276:6874-6878.
- [13] Osman I, Sherman E, Singh B, et al. Alteration of p53 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck: impact on treatment outcome in patients treated with larynx preservation intent[J]. J Clin Oncol,2002,20:2980-2987.
- [14] Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, et al. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, Cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas [J]. Gynecol Oncol,1999,73: 223-228.

[收稿日期] 2006-04-08

[修回日期] 2006-11-14

[本文编辑] 孙 岩