基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0515-04

# HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 在喉癌组织中的表达及意义

吕彩凤,江黎珠,陈鸿雁
(重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus,HPV)16/18E(HPV16/18E6),周期素 D1(CyclinD1)、端粒酶逆转录酶(Human telomerase transcriptase,hTERT)在喉癌组织中的表达水平,探讨 HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 与喉癌的关系。方法:收集手术标本的石蜡切片 42 例,用免疫组织化学法检测喉癌组织中 HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 的表达情况。结果:(1)在喉癌组织中,HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 阳性表达率分别为 42.9%(18/42)、50.0%(21/42)、83.3%(35/42),明显高于对照组。(2)在喉癌组织中,HPV16/18E6 和 cyclinD1 阳性表达率随 T 分期的增加及淋巴结转移而升高。hTERT 阳性表达率随 T 分期增加而升高,而与淋巴结转移无关。三者都与年龄及性别无关。(3)HPV16/18E 与 cyclinD1,HPV16/18E 与 hTERT 两者相互间都呈正相关。结论:(1)HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 的高表达可能与喉癌的发生及发展相关。(2)喉癌中 HPV16/18E6 与 cyclinD1,HPV16/18E6 与 hTERT 之间可能存在相互作用,这种相互作用可能导致喉癌的发生,这可能为 HPV16/18 与喉癌发生之间的关系研究提供重要信息。

【关键词】喉癌;HPV16/18E6;CyclinD1;hTERT;免疫组织化学
【中国图书分类法分类号】R739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-30

作者介绍:吕彩凤(1979- ),女,硕士,
研究方向:头颈部肿瘤。
通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cchhyy787@sohu.com。

AQP8 免疫荧光染色后行激光共聚焦成像发现,AQP8 在绒癌 JAR 细胞株中呈绿色阳性表达,同时以相同的条件及强度激发正常滋养细胞未见绿光,但当加强激发强度时,仍可探及 AQP8 在正常滋养细胞上的表达。该补充实验明确地说明我们免疫组化实验结果的正确性,证明了 AQP8 在正常组及绒癌组的差异表达。应用 RT-PCR 技术,在正常组与绒癌组中均检测到 AQP8 mRNA 的表达,且绒癌组 AQP8 的 OD 值明显高于正常组,与免疫组化、免疫荧光激光共聚焦的实验结果相符。故推测,在正常情况下,少量的 AQP8 能维持滋养细胞内外水分子的交换。而当受到某些刺激后,AQP8 表达异常上调,滋养细胞内、外水、电解质平衡将被破坏,导致细胞内外渗透压及酸碱度的变化,细胞生长行为将随之发生改变,滋养细胞将过度增殖,处于抗凋亡状态,最终导致绒癌发生。但上述推测还需进一步实验证实。

## 参 考 文 献

[1] Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(24): 11110-11114.

[2] Wang S,Kallichanda N,Song W,et al.Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes:evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption[J].Am J Obstet Gynecol,2001,185(5):1226-1231.

[3] Liu H,Koukoulas I,Ross MC,et al.Quantitative comparison of placental expression of three aquaporin genes[J].Placenta,2004,25(6):475-478.

[4] Lee KR,Drury,Vitarbo E,et al.Seizures induced by intracerebral injection of thrombin:a model of intracerebral hemorrhage[J].J Neurosurg,1997,87(1):73.

[5] 丰有吉,沈 铿,主编. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.346-351.

[6] 岳天孚,顾美皎,范郎娣.滋养细胞疾病病理特征[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2005,18(8):452-454.

[7] Lang F,Busch GL,Ritter M,et al.Functional significance of cell volume regulatory mechanisms[J].Physiol Rev,1998,78(1):247-306.

[8] Okada Y,Maeno E,Shimizu T,et al.Receptor-mediated control of regulatory volume decrease(RVD) and apoptotic volume decrease(AVD)[J].J Physiol,2001,532(Pt 1):3-16.

[9] Anbari K,Schultz RM.Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rats of protein synthesis in preimplantation mouse embryos in vitro[J].Mol Reprod Dev,1993,35(1):24-28.

[10] Burg MB.Response of renal inner medullary epithelial cells to osmotic stress[J].Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol,2002,133(3):661-666.

[11] Jablonski EM,Webb AN,McConnell NA,et al.Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis but is inhibited after apoptotic volume decrease[J].Am J Physiol Cell Physiol,2004,286(4):C975-985.

[12] Pappas CA,Ullrich N,Sontheimer H.Reduction of glial proliferation by $K^+$ channel blockers is mediated by changes in PHi[J].Neuroreport,1994,6(1):193-196.

(责任编辑:关蕴良)

# Correlation between expression of HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT and development of laryngeal carcinoma

*LV Cai-feng, et al*

(*Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the role of human papillomavirus (HPV) 16/18E6, cyclin D1, and human telomerase transcriptase (hTERT) in the development of laryngeal carcinoma by detecting the expression of these three genes. *Methods*: Immunohistochemistry was used to detect the levels of HPV16/18E6, cyclin D1, and hTERT in 42 cases of paraffin-embedded tissues. *Results*: (1) The positive expression ratios of HPV16/18E6, cyclinD1, and hTERT in the laryngeal carcinoma group were 42.9%(18/42), 50%(21/42), and 83.3% (35/42), respectively. These values were significantly higher than that in the control group. (2) The increase in the expression of *HPV16/18E6 and cyclinD1 was associated with T stage advance and lymph node metastases.* The expression of hTERT increased along with T stage advance, but not with lymph nodes metastases. The changes in the expression of HPV16/18E6, cyclinD1, and hTERT were not associated with gender and age. (3) Positive correlation was observed between HPV16/18E6 and cyclinD1 as well as between HPV16/18E6 and hTERT in laryngeal carcinoma. *Conclusion*: (1) The expression of HPV16/18E6, cyclin D1, and hTERT may be associated with the development of laryngeal carcinoma. (2) There may be interactions between HPV16/18E6 and cyclinD1, between HPV16/18E6 and hTERT. These interactions may induce the development of laryngeal carcinoma. The information provided by this study may be important for further investigation into the relationship between HPV16/18 and laryngeal carcinoma.

【Key words】Laryngeal carcinoma; HPV16/18E6; CyclinD1; hTERT; Immunohistochemistry

人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)可以诱导包括人在内的高等脊椎动物上皮及粘膜的过度增生损害。大量研究表明 HPV 感染与喉癌的发生相关,特别是高危型 HPV16 和 HPV18[1-3]。E6 是 HPV16/18 早期编码区编码的蛋白,文献报道其与喉癌的发生密切相关[4,5]。细胞周期素 $D_1$(CyclinD$_1$)是细胞周期 $G_1$ 进入 S 期的重要调控因子,其过度表达可造成细胞增殖失控而促进肿瘤的发生[6]。cyclinD$_1$ 在许多恶性肿瘤中表达增加,其中包括喉鳞状细胞癌[7],并且可能与 E6 作用促进喉癌的发生[8]。hTERT 即端粒酶逆转录酶(Human telomerase transcrip tase, hTERT),研究发现喉癌中 hTERT 有显著表达[9]。E6 能激活 hTERT 表达,其表达的再激活导致端粒酶活性恢复,从而延长宿主细胞的生命期限,让细胞逃避衰老过程中的增殖限制而永生化[10]。

目前缺乏同时检测 HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 三者在喉癌组织中的表达水平,以及探讨三者之间以及与喉癌发生、发展之间的关系。故本研究采用免疫组织化学方法检测 HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 在喉癌组织和癌旁非肿瘤组织中的表达情况,并做进一步的关系分析,以期为 HPV16/18 与喉癌发生之间关系的研究提供重要信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选自 2000~2005 年在重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科就诊的喉癌患者的石蜡包埋存档组织标本 42 例,所有患者术前均未经放疗和化疗。按国际抗癌协会 1997 年公布的 TNM 分类分期方案, $T_1$~$T_2$ 期 13 例, $T_3$~$T_4$ 期 29 例,有颈淋巴结转移者 15 例。其中男 40 例,女 2 例,年龄 43~91 岁,平均 62 岁。同时取手术中所取癌组织切缘 42 例作为对照,均经病理证实为非肿瘤组织。

### 1.2 方法

1.2.1 试剂与方法 浓缩型鼠抗人 HPV16/18E6 蛋白为美国 Santa Cruz 公司进口,购于北京中杉金桥生物公司;兔抗人端粒酶单克隆抗体冻干粉购自北京博奥森生物公司;兔抗人周期素 $D_1$ 单克隆抗体(工作液)、通用型 SP Kit 、6 孔培养板等均购于北京中杉金桥生物公司。*方法*:石蜡切片常规脱蜡、水化,PBS 漂洗;3%$H_2O_2$ 去离子水室温孵育约 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性;PBS 冲洗,5 min × 3 次;微波法修复抗原,冷却至室温;滴加封闭血清,室温孵育 10 min,倾去血清, 不洗; 滴加相应的一抗,4℃冰箱过夜;PBS 冲洗,5 min × 3 次;滴加辣根酶标记链霉素卵蛋白,室温孵育 15 min;PBS 冲洗,5 min × 3 次;滴加 DAB 显色剂,显微镜下观察显色情况,据观察结果适时予以蒸馏水终止显色;苏木素轻度复染,蒸馏水冲洗干净;脱水、透明、干燥后中性树胶封片;以 PBS 取代一抗为阴性对照,重复以上步骤,光镜下观察结果。

1.2.2 结果判断 HPV16/18E6 与 cyclinD$_1$ 的阳性判断标准相同:核染色,以细胞核出现核棕黄色染色为阳性。任选 10 个高倍视野观察阳性细胞数和显色程度:阳性细胞数≥5%、染色较强者为阳性;阳性细胞数 <5%为阴性。

hTERT 为细胞膜与细胞浆染色,无着色细胞或着色细胞数 <10%为阴性,阳性细胞数≥10%为阳性表达。

### 1.3 统计学处理

本实验为计数资料的比较,各组之间率的比较采用 $\chi^2$ 检验及四格表的费歇尔精确概率检验法 (Fisher's exact test), HPV16/18E6、cyclinD$_1$ 及 hTERT 表达之间的相关性采用 Spearman 等级相关分析,利用 SAS 统计软件 8.0 进行统计分析,$P$<0.05 时认为差异有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 HPV16/18E6 表达

HPV16/18E 阳性细胞在喉癌细胞中主要呈散在分布(图1)。在 42 例喉癌中,HPV16/18E 蛋白阳性表达率为 42.9%(18/42),而对照的癌旁组织中无表达,二者相比,差异有显著性($P<0.001$)。

### 2.2 cyclinD$_1$ 表达

cyclinD$_1$ 阳性信号定位于细胞核(图 2)。在 42 例喉癌中,cyclinD$_1$ 阳性表达率为 50.0%(21/42),对照的癌旁组织中无表达,差异有显著性($P<0.001$)。

### 2.3 hTERT 表达

hTERT 阳性信号定位于细胞膜与细胞浆(图 3)。在 42例喉癌中,hTERT 阳性表达率为 83.3%(35/42),对照癌旁组织中表达率为 9.52%(4/42),差异有显著性($P<0.001$)。

### 2.4 HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 表达与喉癌临床病理参数的关系

在喉癌组织中,HPV16/18E6、cyclinD$_1$、hTERT 的表达与年龄、性别,T 分期及淋巴结转移的关系(见表 1)。

### 2.5 HPV16/18E6、cyclinD$_1$ 和 hTERT 在喉癌组织中表达的关联性分析(见表 2.1~2.3)

HPV16/18E6 表达水平分别与 cyclinD$_1$ 和 hTERT 呈正相关,当 HPV16/18E6 表达水平较高时,cyclinD$_1$ 或 hTERT 的表达水平也增高($r=0.577$,$P<0.001$;$r=0.387$,$P=0.011$)。而 cyclinD$_1$ 与 hTERT 表达之间无相关性($r=0.064$,$P=0.688$)。

## 3 讨 论

高危型 HPV16/18 与多种肿瘤的发生相关,特别是宫颈癌和喉癌。高危型 HPV 致癌的主要决定因素在于癌基因蛋白 E6 和 E7,二者通过使 p53 和 Rb 肿瘤抑制基因表达产物失活来干扰细胞周期的调节,抵抗细胞凋亡,从而使细胞永生化,导致肿瘤的发生[1]。后续研究发现 E6 表达的增加与喉癌的发生相关,E6 能抑制细胞凋亡,导致细胞存活期延长,对喉癌的发生起到重要作用[4,5]。在本实验 42 例喉癌组织中,HPV16/18E6 阳性表达率为 42.9%(18/42),而对照的癌旁非肿瘤组织中无表达($P<0.001$),这一结果与前面报道一致,再次证明 HPV16/18 感染,HPV16/18E6 蛋白表达增加是影响喉

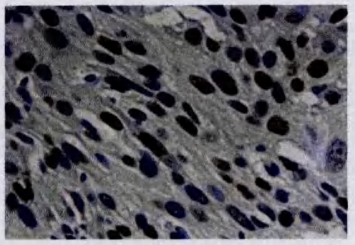


图 1 HPV16/18E6 在喉癌中的表达(SP×200)

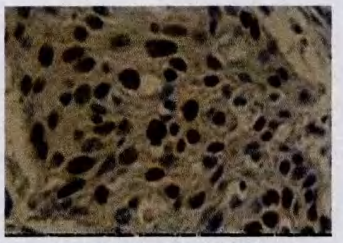


图 2 cyclinD$_1$ 在喉癌中的表达(SP×200)

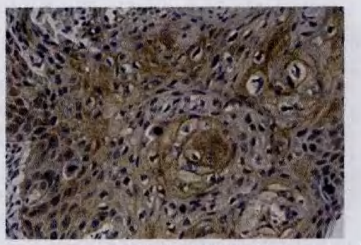


图 3 hTERT 在喉癌中的表达(SP×200)

表 1 HPV16/18E6、cyclinD$_1$、hTERT 表达与喉癌临床参数间的关系

| 临床病理特征 | $n$ | HPV16/18E6 | | | | cyclinD1 | | | | hTERT | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | − | +(%) | $\chi^2$ | $P$ | − | +(%) | $\chi^2$ | $P$ | − | +(%) | $\chi^2$ | $P$ |
| 性别 | | | | | | | | | | | | | |
| 男 | 40 | 23 | 17(42.5) | | 1.000* | 21 | 19(47.5) | 0.525 | 0.469 | 7 | 33(82.5) | | 1.000* |
| 女 | 2 | 1 | 1(50.0) | | | 0 | 2(100) | | | 0 | 2(100) | | |
| 年龄(岁) | | | | | | | | | | | | | |
| >60 | 22 | 13 | 9(40.9) | 0.072 | 0.789 | 13 | 9(40.9) | 1.527 | 0.217 | 4 | 18(81.8) | 0.000 | 1.000 |
| ≤60 | 20 | 11 | 9(45.0) | | | 8 | 12(60.0) | | | 3 | 17(85.0) | | |
| 分期 | | | | | | | | | | | | | |
| $T_1$~$T_2$ | 13 | 12 | 1(7.69) | 9.507 | 0.002 | 12 | 1(7.69) | 13.480 | <0.001 | 7 | 6(46.2) | 15.062 | <0.001 |
| $T_3$~$T_4$ | 29 | 12 | 17(58.6) | | | 9 | 20(68.97) | | | 0 | 29(100) | | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | | | | | | | |
| 有 | 15 | 0 | 15(100) | 31.111 | <0.001 | 0 | 15(100) | 23.333 | <0.001 | 0 | 15(100) | 2.987 | 0.084 |
| 无 | 27 | 24 | 3(11.1) | | | 21 | 6(22.2) | | | 7 | 2(74.1) | | |

注:* 采用费歇尔精确概率法进行计算。

表 2.1 喉癌组织中 HPV16/18E 与 cyclinD$_1$ 表达的相关性

| HPV16/18E | $n$ | cyclinD$_1$ | | $r$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 阳性(%) | 阴性(%) | | |
| 阳性 | 18 | 15 (83.3) | 3(16.7) | 0.577 | <0.001 |
| 阴性 | 24 | 6(25.0) | 18(75.0) | | |

表 2.2 喉癌组织中 HPV16/18E 与 hTERT 表达的相关性

| HPV16/18E | $n$ | hTERT | | $r$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 阳性(%) | 阴性(%) | | |
| 阳性 | 18 | 18(100) | 0(0) | 0.387 | 0.011 |
| 阴性 | 24 | 17(70.8) | 7(29.2) | | |

表 2.3 喉癌组织中 cyclinD1 与 hTERT 表达的相关性

| $cyclinD_1$ | $n$ | hTERT | | $r$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 阳性(%) | 阴性(%) | | |
| 阳性 | 21 | 18(85.7) | 3(14.3) | 0.064 | 0.688 |
| 阴性 | 21 | 17(81.0) | 4(19.0) | | |

癌发生的重要因素。同时我们发现 HPV16/18E6 随 T 分期的增加而表达增加,差异具有显著性($P$=0.002)。并且还发现其表达与淋巴结转移有关,在所有淋巴结转移组中都有表达($P$<0.001),表达率 100%(15/15)。我们推测 HPV16/18 感染,HPV16/18E6 蛋白表达增加并且可能对喉癌的进展也起着重要影响。

在喉鳞癌中,$cyclinD_1$ 基因的扩增与喉癌的不良预后相关[12],Cattani P 等[8]发现在喉癌中 $cyclinD_1$ 基因扩增与 HPV 感染相关,cyclinD1 可能与 HPVE6、E7 作用而干扰细胞周期调节,导致喉癌的发生。在本实验中,$cyclinD_1$ 阳性表达率 50.0%(21/42),对照癌旁组织中无表达($P$<0.001),并且 HPV16/18E6 与 $cyclinD_1$ 之间呈正相关,所以我们推测 HPV16/18E6 可能与 $cyclinD_1$ 相互作用,导致 $G_1$ 期缩短,使细胞过度增殖,最终造成细胞增殖失控而促进喉癌的发生。实验中我们还发现,$cyclinD_1$ 的表达也随 T 分期增加及淋巴结的转移而表达增加($P$<0.001;$P$<0.001),推测其可能对喉癌的进展有影响。

端粒酶是一种以自身为模板逆转录一段 DNA 补充染色体 DNA 在复制中由于末端 RNA 引物水解后其缺口不能被 DNA 聚合酶修复而缺失的端粒末端 DNA 核糖核蛋白复合物。端粒酶激活在细胞增殖、永生化,以及使细胞获得无限增殖能力即恶性变中起关键作用。hTERT 是端粒酶激活的限速因素,其表达与端粒酶活性相一致[13]。Luzar B 等[9]发现 77%(23/30)的喉癌组织中 hTERT 有表达。Li YR 等[14]发现 hTERT mRNA 水平的表达增加在喉癌的发生发展中起着重要作用,并且检测其在血浆中水平有助与喉癌的诊断和疗效的判断。在本实验中,42 例喉癌有 35 例(83.3%)hTERT 表达呈阳性,而对照组阳性表达率仅为 9.52%($P$<0.001),与前面研究一致。并且 HPV16 E6 与 hTERT 表达呈正相关,而 HPV16 E6 为第一个被发现的可以激活端粒酶的癌基因[15]。我们推测 hTERT 在癌基因 E6 的间接作用作用下表达增加,从而激活端粒酶,使细胞无限增值而导致喉癌的发生。在本实验中还发现,hTERT 表达随 T 分期增加而表达增加($P$<0.001),与 Li YR 等[14]关于 hTERT 表达与喉癌临床病理分级分期无关的结果相悖,推测这可能是 E6 与 hTERT 综合作用导致。

综上所述,HPV16/18E6、$cyclinD_1$、hTERT 三者的表达增加以及 HPV16/18E6 与 cyclinD1、HPV16/18E6 与 hTERT 之间可能存在的作用关系可能与喉癌的发生有关。并且以上 3 种指标表达与临床分期和淋巴结转移有关,表明 HPV16/18E6、$cyclinD_1$、hTERT 在喉癌的发展中可能也起着重要的作用。但因本研究样本量较小,还需进一步的研究证实。

## 参 考 文 献


[1] Pérez-Ayala M, Ruiz-Cabello F, Esteban F, et al. Presence of HPV 16 sequences in laryngeal carcinomas[J]. Int J Cancer, 1990, 46(1): 8-11.

[2] Morshed K, Stenzel A, Szymajski M, et al. Detection of human papillomavirus typ 16 and 18 in laryngeal cancer using PCR methods[J]. Otolaryngol Pol, 2001, 55(1): 29-33.

[3] Morshed K, Korobowicz E, Szymański M, et al. Immunohistochemical demonstration of multiple HPV types in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2005, 262(11): 917-920.

[4] Morshed K, Polz-Dacewicz M, Rajtar B, et al. The prevalence of E6/E7 HPV type 16 in laryngeal cancer and in normal mucosa[J]. Pol Merkur Lekarski, 2005, 19(111): 291-293.

[5] Liu H C, Chen G G, Vlantis A C, et al. Inhibition of apoptosis in human laryngeal cancer cells by E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus16[J]. J Cell Biochem, 2008, 103(4): 1125-1143.

[6] Hortwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266(5192): 1821.

[7] Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, et al. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue[J]. J Laryngol Otol, 2004, 118(9): 676-680.

[8] Cattani P, Hohaus S, Bellacosa A, et al. Association between Cyclin $D_1$ (CCND1) Gene Amplification and Human Papillomavirus Infection in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(11): 2585-2589.

[9] Luzar B, Poljak M, Marin I J, et al. Quantitative measurement of telomerase catalytic subunit (hTERT) mRNA in laryngeal squamous cell carcinomas[J]. Anticancer Res, 2001, 21(6A): 4011-4015.

[10] Horikawa I, Barrett J C. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(7): 1167-1176.

[11] Münger K, Baldwin A, Edwards K M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis[J]. J Virol, 2004, 78(21): 11451-11460.

[12] Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, et al. Cyclin $D_1$ gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications[J]. Clin Cancer Res, 1996, 2(1): 175-180.

[13] Kim N W, Piatysezk M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193): 2011-2015.

[14] Li Y R, Wu J M, Wang L, et al. Human telomerase reverse transcriptase expression and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Acta Otolaryngol, 2005, 125(4): 409-414.

[15] Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, et al. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein[J]. J Viml, 2001, 75(9): 4467-4472.


(责任编辑:关蕴良)