

高危型 HPV DNA 整合导致宫颈癌的作用机制和临床检测进展

黄莎莎^{1,2}, 郝登再², 张岩², 刘厚明³, 单万水³

1. 广东医科大学, 湛江 524023;
2. 博奥生物集团有限公司转化医学研究院, 北京 102206;
3. 深圳市第三人民医院检验科, 深圳 518112

摘要: 高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈癌发生发展的必要因素之一。病毒 DNA 整合到宿主基因组中被认为是导致宫颈癌最重要的病因。高危型 HPV DNA 整合往往导致其 E1 和 E2 区大部分缺失或中断, E6 和 E7 致癌基因过表达, 宿主致癌基因激活和抑癌基因失活。目前研究表明高危型 HPV 整合可作为优质宫颈病变筛查的预测生物标志物, 且其检测的有效方法大都基于荧光原位杂交、实时荧光定量 PCR 和杂交捕获技术结合 Sanger 测序法等。本文重点阐述了高危型 HPV 整合导致宫颈癌的主要机制, 描述了宫颈病变筛查标志物以及预防性 HPV 疫苗研发和推广的研究进展, 并综述了高危型 HPV DNA 整合状态的检测方法。

关键词: 宫颈癌; 人乳头瘤病毒; 基因整合; HPV 疫苗

Progress in studies of the mechanisms and clinical diagnosis of cervical carcinoma associated with genomic integration of high-risk human papillomavirus DNA

Shasha Huang^{1,2}, Dengzai Hao², Yan Zhang², Houming Liu³, Wanshui Shan³

1. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China;
2. Capital Corporation Clinical & Translational Science Institute, Beijing 102206, China;
3. Laboratory of Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen 518112, China

Abstract: High-risk human papillomavirus (hrHPV) has been identified as a key factor in the development of cervical cancer. Integration of viral DNA into the host genome has been postulated as an important etiological event during cervical carcinogenesis. High-risk HPV DNA integration frequently results in either the deletion or interruption of the large fragment of E1 and E2 region and the overexpression of oncogenes E6 and E7 in the viral genome, and the activation of oncogenes and the inactivation of tumor suppressors in host genome. Recent studies have

收稿日期: 2017-04-24; 修回日期: 2017-07-17

基金项目: 深圳市科技研发资金项目、深圳市生物芯片研究重点实验室项目资助(编号: ZDSYS201504301534057)和深圳市三名工程专项基金项目资助[Supported by Shenzhen Key Laboratory of Biochip(No. ZDSYS201504301534057)and Special Support Funds of Shenzhen for Introduced High-Level Medical Team]

作者简介: 黄莎莎, 硕士研究生, 专业方向: 临床检验诊断学(病原微生物)。E-mail: 570214476@qq.com

通讯作者: 单万水, 主任技师, 研究生导师, 研究方向: 病原微生物。电话: 0755-61238978; E-mail: 13923478156@qq.com

DOI: 10.16288/j.ycz.17-151

网络出版时间: 2017/8/29 14:55:01

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170829.1455.004.html>

showed that hrHPV integration can be used as a predictive biomarker in high-quality cervical lesion screening. Most effective diagnostic approaches are based on fluorescence in situ hybridization, real-time quantitative PCR and Sanger sequencing of hybrid captured viral DNA. This review highlights the primary mechanisms of hrHPV DNA integration associated with cervical carcinogenesis, illustrates recent advances in predictive biomarkers in cervical lesion screening and the development and popularization of prophylactic HPV vaccines, and summarizes the various methods of detecting hrHPV DNA integration.

Keywords: cervical carcinomas; human papillomavirus; virus integration; HPV vaccines

宫颈癌是指发生于子宫颈阴道和宫颈部的恶性肿瘤,是最常见的妇科恶性肿瘤之一,仅次于乳腺癌。近 30 年来,宫颈癌的发病率每年上升 0.6%,全球每年大约有 20 万人死于宫颈癌,其中我国每年死于宫颈癌的病例为 5 万左右^[1,2]。宫颈癌按照病理学描述性诊断法(the Bethesda system, TBS)可将宫颈癌前病变分为低度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)和高度鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL),即宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasias, CIN)、宫颈原位癌(carcinoma in situ of cervix)、浸润性宫颈癌(invasive cervical cancer, ICC)等。宫颈癌的病因有人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染、沙眼衣原体感染、个人行为因素如初次性生活过早、多产、性生活频乱、性伴侣多、性伴侣包皮过长、吸烟等^[3,4],其中以 HPV 感染为主。女性的一生有 90%的可能性感染 HPV,10%的女性发展成 HPV 持续性感染,仅 1%转变为宫颈癌。

1 HPV 的发现及结构特点

1.1 HPV 的发现

HPV 感染作为导致宫颈癌发生的重要病毒因素是 HPV 乃至病毒学领域的一个重要事件,德国科学家哈拉尔德·楚尔·豪森因此获得 2008 年度诺贝尔医学奖。据国外研究报告指出,约有 99.7%宫颈癌患者感染 HPV。到目前为止,HPV 被证实有 180 多种抗原型(即亚型),根据病变部位和致病力强弱分为皮肤低危型、皮肤高危型、黏膜低危型和黏膜高危型。高危型 HPV(High-risk human papillomavirus, hrHPV)有 10 多个型别,包括 16、18、58、52、31、33、45 型等,与 hrHPV 感染高度相关的恶性肿瘤有宫颈

原位癌、肛门癌、阴道癌、宫颈癌、口咽癌、阴茎癌、喉癌等,其中 HPV16 和 18 型与宫颈癌的关系最为密切。HPV6、11、13 等与寻常疣、扁平疣、跖疣等有关,很少导致癌症,为低危型 HPV。针对 HPV 病毒感染研发的 HPV 疫苗,保护免疫注射人群免于 HPV 病毒感染,从而达到预防控制宫颈癌的发生。

1.2 HPV 基因组结构与功能

HPV 的基因组是由约 7900 bp 组成的全封闭双链环状 DNA 分子,以共价结合的超螺旋结构、开放的环状结构以及线性分子存在于细胞内,按功能分为早期编码区、晚期编码区和非编码区,早期编码区即 E 区(early region)(图 1A),E 区分为 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7,具有编码病毒复制、转录控制和细胞转化等功能。E1 参与病毒 DNA 复制,在病毒复制中起关键作用,E2 是一种反式激活蛋白,反式调节病毒 mRNA 转录和 DNA 复制,E1 和 E2 区通常为病毒整合位点。E4 与病毒成熟胞浆蛋白有关,在病毒复制和突变中起重要作用。E5 调节细胞转化,诱导细胞 DNA 合成。大多数 HPV 亚型的转录起始点起源于 E6 和 E7 区,与病毒细胞转化功能及致癌作用关系密切。晚期编码区又称为 L 区(late region),编码衣壳蛋白 L1 和次衣壳蛋白 L2 及病毒结构蛋白质,对于病毒传播和能否在宿主细胞内持续存在起结构性的作用。在这两段编码序列之间有一段非编码区,即病毒上游调节区域(upstream regulate region, URR),也叫做长控制区域(long control region, LCR),包括病毒转录启动子和 TATA 盒及 SP1 结合位点,控制病毒转录和翻译。病毒在宿主细胞内由一过性感染变成持续感染致宫颈癌的过程,可能是病毒 DNA 整合到宿主基因组中,破坏自身基因组和宿主染色体结构,致癌基因激活引起。

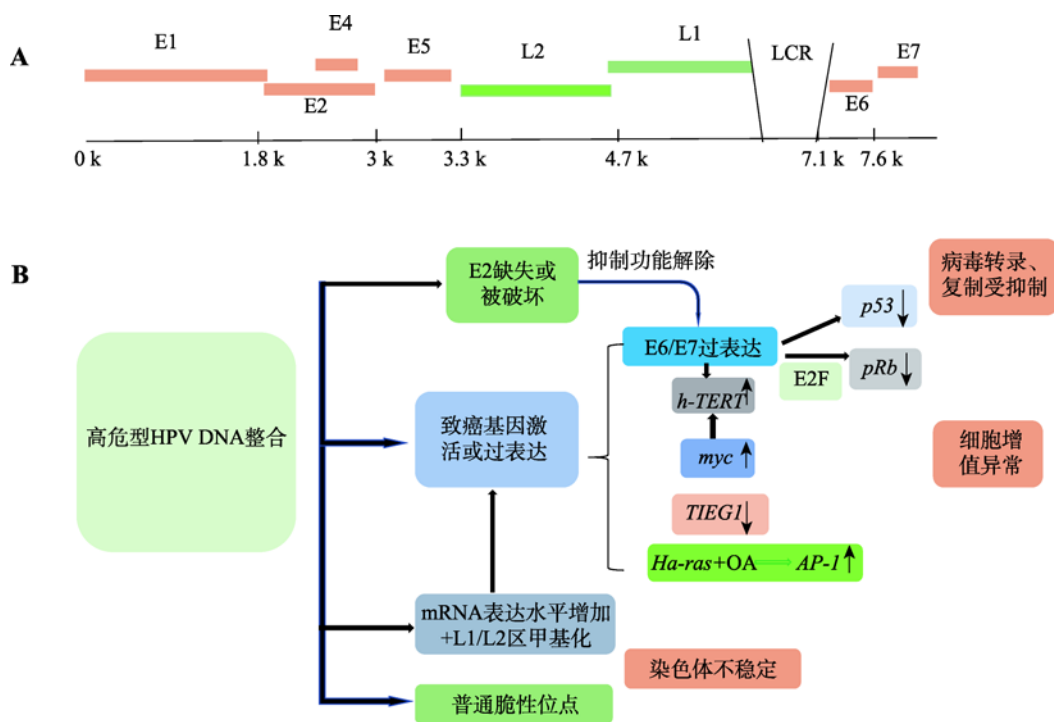


图1 高危型 HPV 整合导致宫颈癌作用机制

Fig. 1 The mechanism of hrHPV Integration resulting in cervical carcinomas

A: HPV 16 亚型基因组结构图。B: 高危型 HPV 整合到宿主基因组导致癌症的作用机制。病毒整合往往导致 E2 基因缺失或被破坏, E2 蛋白质表达受阻, 丧失对 E6、E7 基因转录抑制功能, 引起 E6、E7 致癌基因过度表达, 细胞增殖异常, 同时病毒转录、复制功能受抑制。抑癌基因 p53 和 pRb、TIEG1 分别与 E6、E7 蛋白质结合失活, 端粒酶对维持基因组稳定和细胞增值能力起重要作用, h-TERT 被激活, 使角质细胞永生。病毒整合易发于普通脆性位点, E6/E7 致癌基因过表达也可引起 mRNA 表达增加, L1/L2 区甲基化, 破坏染色体稳定性。h-TERT、myc、AP-1 代表致癌基因激活, OA 为冈田酸, pRb、p53、TIEG1 代表抑癌基因失活。

2 HPV 整合位点

病毒整合位置往往是随机产生的, 主要倾向于 E1、E2、E4、E5 区, 这些区域被侧翼宿主细胞内 DNA 所中断。张瑞阳等^[5]通过收集 14 个国内外研究报告, 发现总共有 499 次整合事件。刘英等^[6]在 49 个宫颈癌样本中发现 117 个独立整合位点, 横跨整个病毒基因组。病毒整合常发生于人类基因组的内含子和编码基因密集区域, 如致癌基因、普通脆性位点(common fragile sites, CFSs)附近及转录活性区。高危型 HPV DNA 主要整合到染色体中, 少部分整合到线粒体上, 除 9、18、22 号染色体外其余均有整合位点。一般认为 8q24, 17q23.1, 1p36, 3q28, 13q22, 14q32 为主要的整合热点位置。常见的整合基因有 FRA3B、FRA6C 基因、FRA17B 基因脆性位点和 c-myc、N-myc、TNF AIP2 致癌基因等, 基因整合热点位置常与肿瘤相关基因位置重合, 可能是

肿瘤相关基因及其附近位点容易断裂, 或其他基因融合所致。

3 HPV 整合可能的致癌机制

3.1 HPV 整合导致整合部位基因组缺失、破坏

HPV 整合到宿主基因组中往往导致整合部位基因组缺失或被破坏, 主要为 E1、E2 和 E2~E4 区^[7]。有学者认为病毒整合可导致 E1 区缺失^[8], Matsukura 等^[9]指出在 E1 区 1138 核苷酸位置插入一个鸟嘌呤, 原腺嘌呤到鸟嘌呤的变化没有改变 E1 区阅读框, E1 区未被中断。整合导致 HPV 最大缺失片段为 E2 基因“铰链区”(指位于免疫球蛋白重链 CH1 和 CH2 的一种结构域, 富含脯氨酸, 容易伸展和弯曲, 有利于抗原抗体结合), 位于 3132~3384 核苷酸位置的 E2~E4 区是病毒整合破坏最严重的区域, 影响细胞转录和复制功能, 干扰病毒转录调节路径。E6、E7 区常保持完整, 其表达产物可诱导角质层细胞永生

化, E2 基因负性调节 E6、E7 基因表达, 表达缺失时可能消除 E6、E7 转录抑制活性, 致使 E6、E7 致癌基因过表达, mRNA 表达水平随之增加, 基因突变消除 E6、E7 基因诱导细胞变异-耐受转变能力, 阻止细胞凋亡, 诱使细胞无限增值和恶性转化, 引起癌症的发生^[10,11]。病毒整合导致 HPV 自身基因组序列改变, 病毒转录调节和复制功能破坏在癌症进展过程中起重要作用。

3.2 致癌基因激活和抑癌基因失活

癌症的产生和发展是各种遗传学结构或功能的改变导致原癌基因激活和抑癌基因缺失或失活引起(图 1B)。p53 和 pRb 抑癌基因可调节细胞周期, pRb 在 E2F 转录因子作用下激活, 调节细胞凋亡。HPV16 的 E6 和 E7 基因产物分别与 p53、pRb 结合生成复合体, E2F 从 pRb-E2F 复合体解离成游离态, p53 和 pRb 被降解, 细胞周期调节失控, 使细胞停滞于 G1 期进入无限增殖^[12]。HPV16 中的 E6 致癌基因激活人体逆转录端粒酶活性基因(human telomerase reverse transcriptase, hTERT), hTERT 属于端粒酶亚单位仅在人体肿瘤细胞中有活性, E6 癌蛋白亦调节 *c-myc* 基因表达, *myc* 基因过表达和富含 GC 区的 SP1 结合位点 cis 元素联合诱导 *hTERT* 基因表达上调, 破坏染色体稳定性和细胞增殖能力, 诱使角质细胞永生, 故端粒酶不仅是筛选癌症的标志物之一, 也作为癌症治疗靶点^[13,14]。*c-myc* 基因位于染色体 8q24.1 位置, 通过识别并结合靶序列中的 CACGTG 核心序列(E 盒, 能够与 *myc/max/usf* 等基因的蛋白质结合位点结合, 在基因转录调节中起重要作用), 使靶基因激活或转录增强, 通过顺式作用解除生长抑制基因对细胞无限增殖能力的抑制, 使细胞永生, 且在 HPV16/18 中高度表达, 基因整合导致 *myc* 基因重排、扩增和过表达, 可作为宫颈癌诊断和预后治疗的评价指标^[15]。*Ha-ras* 致癌基因和蛋白质磷酸酶活性抑制剂冈田酸(okadaic acid, OA)通过活化 AP-1 转录因子, 增加 E6、E7 致癌基因表达水平, 反式调节病毒启动子转录活性诱导细胞癌变, H-ras 基因突变与宫颈恶性肿瘤及盆腔淋巴结转移有关, 可作为早期癌症筛查和复发的检测依据^[16]。转化生长因子(TGF)- β 诱导早期基因 1(TIEG1) 表达, 其羧基端含有 3 个锌指结构与 E7 蛋白 C 端

结合, 使 TIEG1 泛素化, 抑制 TIEG1 诱导细胞凋亡, TIEG1 介导的信号受抑制可能产生与 HPV 相关的致癌作用^[17]。致癌基因 *jun-B*(转录因子 AP-1 亚单位) 在肿瘤细胞内通过调节金属基质蛋白酶 MMP2、MMP-9 和趋化因子配体 CCL-2 基因活性促使肿瘤细胞转移^[18], 由于基因整合导致染色体易位出现表达失控而产生肿瘤作用。Einstein 等^[19]在 14q32 染色体上发现 TNF AIP2 致癌基因的 2 个外显子被破坏, 对病毒转录调节控制下降, E2 基因重组到细胞中, 破坏细胞复制和转录, 加快宫颈癌进展。

3.3 宿主染色体异位、重排

病毒基因整合导致宿主染色体发生变化, 包括染色体易位、缺失、非染色质损害, 直至染色体重排, Peter 等^[20]研究发现有 33% 的整合位点发生基因重排, 基因组重排和 HPV DNA 病毒整合之间存在高度相关性。宫颈癌细胞系中的 HPV DNA 整合于细胞核内染色体上, E6、E7 基因过度表达, 诱导中心体异常扩增, 破坏细胞周期有丝分裂的保真度, 增加染色体分离异常和非整倍体的风险, 是 DNA 破坏和结构染色体不稳定的源头^[21]。染色体易位时迫使基因断裂, 原癌基因与其他基因重新结合成为融合基因或过表达, 影响抑癌基因功能, 是癌症病变过程的重要作用机制。

3.4 病毒整合调节 mRNA 表达水平和 DNA 甲基化水平

MicroRNA(miRNA)为约 18~25 bp 的非编码 RNA 片段, 具有调节细胞分化、自我更新、免疫、增值等功能, 与 mRNA 靶基因的 3' 未编码区(untranslated region, UTR)互补序列结合, 对 mRNA 的转录和降解起负性调节作用。病毒整合破坏 HPV DNA 3' 端 UTR, 其上游不稳定元素 cis 基因通过降低 mRNA 半衰期, 使外源 mRNA 表达水平增加。mRNA 编码 E6、E7 致癌基因的表达产物, 增加 E6、E7 致癌基因的表达水平和细胞选择生长优势, 影响细胞内其他基因的表达^[22]。Martinez 等^[23]发现 miRNA 在 HPV 阳性、宫颈癌和正常细胞系中存在差异表达, 其中 miR-218 及其 miR-218 靶基因 SLIT2 在这些细胞系中均低表达, 高危型 HPV E6 致癌基因的激活降低 miRNA 表达水平, 同时 SLIT2 基因表达水平减少,

影响细胞分化能力。某些导致人类癌症的双链 DNA 病毒中均存在 DNA 甲基化, DNA 甲基化可作为癌症的潜在生物学标记^[24]。从无症状病毒携带者到癌前病变分化程度高的恶性肿瘤, DNA 甲基化程度随病理变化逐渐增加^[25]。Bryant 等^[26]研究发现 HPV L1/L2 区和 E2 区甲基化与病毒整合到宿主基因组有关, L1/L2 区甲基化不能诱导 E6、E7 基因表达增加, 但能够引起病毒整合。HPV DNA E2 区结合位点的甲基化水平增加阻止 E2 基因表达产物结合, 减少或消除完整的 E2 区 DNA 的转录, 造成 E2 区功能缺失, 诱使 E6、E7 表达水平增加, 与宫颈癌前病变和宫颈癌程度有关。HPV16 E6 增加活化氧自由基水平, 引起慢性氧化应激诱导 DNA 损伤, 增加 HPV 整合到宿主基因中的频率^[27]。MiRNA 和 DNA 甲基化表达水平控制细胞内癌基因的表达, 影响细胞转录和复制, 癌基因的激活反过来增加 miRNA 和 DNA 甲基化表达水平。

3.5 病毒整合发生在脆性位点

脆性位点(fragile cite, 指染色体上比较容易断裂的地方)分为罕见脆性位点和普通脆性位点, 罕见脆性位点在人体基因组中约 87 个, 占基因组数量仅 5%, 以 CFSs 为主。Matovina 等^[28]发现近 54.5% 的宫颈样本组织位于 CFSs 或在 CFSs 附近, 整合相关的普通脆性位点在染色体上的位置主要有 13q22(FRA13C), 17q23(FRA17B), 3p14.2(FRA3B)。病毒整合位置往往是随机产生的, 由于脆性位点极其不稳定, 在基因组中为高度重组区域, 在宫颈癌中病毒整合倾向于普通脆性位点, 故 CFSs 作为病毒整合靶向位点。

4 HPV 整合状态的检测方法

传统临床早期宫颈癌筛查方法如宫颈细胞学检查包括巴氏涂片和液基薄层细胞技术, 前者自开展以来提高宫颈癌筛查率, 使发病率下降近 70%, 但是其假阴性率高和敏感性低的缺陷限制其发展。液基薄层细胞技术是目前应用最为广泛, 最常规的宫颈癌筛查手段, 但特异性较低, 大量流行病学资料显示持续性 HPV 感染是宫颈癌发生发展的最重要病因, 病毒整合与宫颈癌的关系尤为密切, 因此 HPV DNA 检测及病毒在宿主体内生理状态作为一项辅

助性检查成为目前研究的热点。

4.1 传统检测方法

HPV DNA 在宿主体内的存在状态分 3 种: 游离型、整合型以及游离与整合共同存在混合型。大多数 HPV DNA 为游离状态, 高危型 HPV DNA 在宫颈癌病例中以整合或混合型存在为主, 低危型 HPV 不发生整合^[29]。检测 HPV DNA 在细胞内存在状态的传统检测方法主要有荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)和 Southern 印迹杂交。FISH 技术能定位病毒整合在染色体上的具体位置, 根据杂交信号在细胞核内的分布鉴定病毒 DNA 在宿主细胞内的生理状态^[30]。当杂交信号在细胞核内弥散分布时为游离型, 核内信号为点状密集时为整合型, 点状信号和弥散状信号共同存在时为混合型。Southern 印迹杂交法通过酶切电泳图谱分析酶切条带, 条带约 7.9 kb 为环状 DNA 分子长度时考虑病毒游离状态, 大于 15 kb 时考虑病毒整合。FISH 技术和 Southern 印迹杂交法灵敏度低、所需模板量大、操作繁琐, 难以满足临床需求, 不符合现代分子诊断技术快速、高效的原则。

4.2 现代分子诊断学方法

4.2.1 多重实时荧光 PCR 技术

病毒整合导致 E2 区严重破坏, 缺失程度和宫颈病变程度成正相关性, 提示 E2 区破坏是 HPV 整合导致宫颈病变进行性发展的重要事件。HPV DNA 的 E6、E7 基因保持完整。E2 区负性调节 E6 基因表达, E2 基因缺失负性调节功能消除, 导致 E6 基因过表达发挥致癌作用。因此, 国内外研究者通过计算 E2/E6 比值, 来了解宫颈病变的程度和病毒整合情况^[31]。两者比值大于 1 时提示以游离状态为主, 小于 1 时以混合型为主, 小于 0.004 时提示以整合为主。多重荧光定量 PCR 技术运用两种不同的荧光基团分别标记 E2 和 E6 基因的 Taqman 探针, 通过收集反应管内不同荧光强度对 E2/E6 基因拷贝数进行定量, 达到在同一反应管内同时定量同一样本不同基因的拷贝数, 具有高灵敏度、高通量的优点, 消除了不同反应体系的干扰因素对 E2/E6 扩增产物效率的影响, 避免重复加样出现的误差, 而且同管检

测比分管检测的准确率高,目前运用较为广泛^[32]。

4.2.2 DIPS-PCR 技术

连接-介导(ligation-mediated)PCR 技术检测整合的乳头瘤病毒序列(detection of integrated papillomavirus sequences, DIPS-PCR),用于扩增 HPV 相关的宫颈癌细胞系和 HPV 永生化角质细胞系的基因组病毒-细胞内连接体,结合测序法检测整合至染色体上具体位置^[33],达到在分子水平分析病毒整合特点,可作为早期检测病毒整合状态的手段。但是 DIPS-PCR 技术不能精确定量整合拷贝数和整合的 DNA 是否有转录活性。

4.2.3 MLPA 技术

多重连接依赖式探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)技术是一种基于杂交、连接、PCR 扩增于一体,在单一反应管内同时检测 40 个不同核苷酸靶序列拷贝数变化,对待测核苷酸进行定位定量分析的新技术。具有高通量、高灵敏度、高特异性,重复性好,操作简单,可用于检测染色体数目异常,基因片段缺失或重排及甲基化检测,Theelen 等^[34]运用 MLPA 技术同时检测 HPV16/18 及其生理状态、病毒载量,结果显示 MLPA 技术敏感性更高;但是由于其扩增的是待测探针,而不是靶序列,所以不能用于单个细胞核苷酸和染色体易位检测。

4.2.4 APOT 法

乳头瘤病毒致癌基因转录子扩增法(amplification of papillomavirus oncogene transcripts, APOT)法是以分析 mRNA 转录体为基础,能够识别游离体起源的病毒转录体和整合起源的融合转录体,对 RNA 行逆转录、PCR 扩增及测序以分析 HPV 中的游离转录体来鉴定病毒生理状态的技术^[35]。APOT 技术不仅能够鉴定病毒生理状态,还能进一步研究 E6、E7 致癌基因的表达水平及病毒整合具体位点,且敏感度高于实时定量 PCR 技术^[36],但该技术只能检测短的 RNA 转录体,细胞内必须有游离转录体才能扩增,应用范围相对较窄。

4.2.5 杂交捕获法和测序技术

杂交捕获法(hybrid capture, HC)根据高危型

DNA 全基因组文库设计捕获探针,捕获探针和 DNA 文库杂交后由生物素和链霉素亲和素磁珠吸附,未捕获的 DNA 被洗脱,洗脱的 DNA 内若含有潜在整合位点将继续进行 PCR 扩增及测序,得到病毒整合染色体图谱。HC 是唯一获得 FDA 批准分型检测 HPV 的方法,可检测 13 种高危型 HPV,和测序法结合能同时对 HPV 进行分型和整合位点的检测,是目前对 HPV 整合检测较好的手段。刘英等^[11]运用该技术发现 117 个整合位点,敏感度高于 DIPS-PCR 和 APOT 技术,还可用于 CIN1、CIN2 及正常宫颈上皮组织检测^[37]。由于技术所需设备要求较高,花费昂贵,难以在基层普及。

5 高危型 HPV DNA 整合与宫颈癌的关系

HPV 整合导致宫颈癌的因素有改变病毒基因表达功能或破坏细胞内的转录体,宿主染色体的易位、点突变及致癌基因的激活。低危型 HPV 很少导致宫颈癌,与在宿主体内的病毒载量无关,很少发生病毒整合^[38]。高危型 HPV 分别在 HSIL 和鳞状细胞癌中的发生率分别为 76.2%和 88.2%,在 LSIL 中仅 37%^[39]。HPV 以非游离状态存在于侵入性宫颈癌中(约 60.9%),较原位癌高出 20%。HPV16 阳性宫颈癌病例中近 90%整合,纯游离形式存在的病例仅 16%,说明病毒整合发生率与宫颈癌发病率成正相关,病毒整合状态与宫颈癌病情程度成正相关。病毒整合导致 E1、E2 区的 5'末端被中断,E2 基因的所有片段或 5'末端或 3'末端的部分片段被中断,E1/E2 区分布破坏比没有被破坏者生存期差,E2 区与患者 4 年无病生存期有关,整合的 HPV16 患者的无病生存率为 38.4%,而非整合的 HPV16 患者的无病生存率为 80%,可见病毒整合对 E2 区的破坏也影响癌症存活率^[40]。

6 结语与展望

HPV 疫苗主要有预防性疫苗和治疗性疫苗。预防性 HPV 疫苗以 L1 和 L2 作为靶抗原,在细胞表面自我组装形成病毒样颗粒(virus like particles, VLPs),与天然病毒颗粒结构相似,具高度免疫原性,能诱发机体产生特异中和抗体和局部免疫反应,防止机体被 HPV 感染或再感染。目前获 FDA 批准上市的

疫苗有 3 种: 2006 年 9 月由美国默沙东公司针对 HPV6/11/16/18 亚型四价疫苗; 2008 年 1 月, 由 Med Immune 公司推出的针对 HPV16/18 型二价疫苗; 美国默沙东公司于 2014 年推出的九价疫苗针对的亚型有 HPV6、11、16、18、31、33、45、52、58, 可预防 90% 以上的宫颈癌、85% 的阴道癌、宫颈癌病变及低度宫颈病变、尖锐湿疣等。理想的治疗性疫苗以 E6、E7 蛋白作为靶抗原, 刺激机体产生特异性毒性 T 细胞, 目前正在探索中。随着研究的深入, HPV 疫苗已成为研究热点。

病毒整合在宫颈恶性肿瘤形成过程中至关重要, 但是高危型 HPV 整合不仅发生在宫颈癌细胞系中, 正常组织中也存在, 病毒整合只是宫颈癌发生的先决条件, 提高宫颈癌发病机率。多重实时荧光定量 PCR 技术是目前检测病毒整合的有效手段之一, 原位杂交技术与 PCR 技术结合不仅可以定位单个细胞病毒整合位点, 而且可以检测低病毒载量细胞, 但是能否在疾病早期检测病毒存在, 切断病毒整合到宿主基因组的路径, 干预癌症的发展, 达到对宫颈癌早发现早治疗的目的, 是目前亟需解决的问题之一。

参考文献(References):

- [1] Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*, 2011, 378(9801): 1461–1484. [DOI]
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893–2917. [DOI]
- [3] Wang H, Xu FZ, Zhao QY. Application of three-stage diagnosis and treatment process in screening of cervical precancerous lesion. *Mater Child Health Care China*, 2011, 26(5): 769–770.
王红, 徐福智, 赵秋艳. 三阶梯诊疗程序筛查宫颈癌前病变. *中国妇幼保健*, 2011, 26(5): 769–770. [DOI]
- [4] Datta SD, Saraiya M. Cervical cancer screening among women who attend sexually transmitted diseases (STD) clinics: background paper for 2010 STD Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(Suppl. 3): S153–S159. [DOI]
- [5] Zhang RY, Shen C, Zhao LJ, Wang JL, McCrae M, Chen XM, Lu FM. Dysregulation of host cellular genes targeted by human papillomavirus (HPV) integration contributes to HPV-related cervical carcinogenesis. *Int J Cancer*, 2016, 138(5): 1163–1174. [DOI]
- [6] Liu Y, Lu ZM, Xu RP, Ke Y. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5852–5864. [DOI]
- [7] Schmitz M, Driesch C, Beer-Grondke K, Jansen L, Runnebaum IB, Dürst M. Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration. *Int J Cancer*, 2012, 131(5): E593–E602. [DOI]
- [8] Seedorf K, Krämer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 1985, 145(1): 181–185. [DOI]
- [9] Matsukura T, Kanda T, Furuno A, Yoshikawa H, Kawana T, Yoshiike K. Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J Virol*, 1986, 58(3): 979–982. [DOI]
- [10] Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 2009, 384(2): 324–334. [DOI]
- [11] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 2009, 384(2): 335–344. [DOI]
- [12] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(8): 550–560. [DOI]
- [13] Zhao YJ, Cheng D, Wang SW, Zhu JY. Dual roles of c-Myc in the regulation of *hTERT* gene. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(16): 10385–10398. [DOI]
- [14] Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol*, 2001, 75(12): 5559–5566. [DOI]
- [15] He ZL, Yu LQ. Expression of C-myc and HPV16/18 in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia and their relationship. *Cancer Res Prev Treat*, 2010, 37(12): 1413–1415.
何志连, 余立群. C-myc、HPV16/18DNA 在宫颈癌及癌前病变中的表达及其相关性. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(12): 1413–1415. [DOI]
- [16] Landro ME, Dalbert D, Picconi MA, Cúneo N, González J, Vornetti S, Bazán G, Mural J, Basiletti J, Teyssié AR, Alonio LV. Human papillomavirus and mutated H-ras on-

- cogene in cervical carcinomas and pathological negative pelvic lymph nodes: a retrospective follow-up. *J Med Virol*, 2008, 80(4): 694–701. [DOI]
- [17] Chang HS, Lin CH, Yang CH, Liang YJ, Yu WCY. The human papillomavirus-16 (HPV-16) oncoprotein E7 conjugates with and mediates the role of the transforming growth factor-beta inducible early gene 1 (TIEG1) in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(11): 1831–1839. [DOI]
- [18] Hyakusoku H, Sano D, Takahashi H, Hatano T, Isono Y, Shimada S, Ito Y, Myers JN, Oridate N. JunB promotes cell invasion, migration and distant metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 6. [DOI]
- [19] Einstein MH, Cruz Y, El-Awady MK, Popescu NC, DiPaolo JA, van Ranst M, Kadish AS, Romney S, Runowicz CD, Burk RD. Utilization of the human genome sequence localizes human papillomavirus type 16 DNA integrated into the TNFAIP2 gene in a fatal cervical cancer from a 39-year-old woman. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(2): 549–554. [DOI]
- [20] Peter M, Stransky N, Couturier J, Hupé P, Barillot E, de Cremoux P, Cottu P, Radvanyi F, Sastre-Garau X. Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. *J Pathol*, 2010, 221(3): 320–330. [DOI]
- [21] Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett*, 2011, 305(2): 113–122. [DOI]
- [22] Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(5): 1654–1658. [DOI]
- [23] Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, 2008, 27(18): 2575–2582. [DOI]
- [24] Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L, Ghosh A, Wacholder S, Harari A, Lorincz A, Schiffman M, Burk RD. Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21(12): 2125–2137. [DOI]
- [25] Kalantari M, Osann K, Calleja-Macias IE, Kim S, Yan B, Jordan S, Chase DM, Tewari KS, Bernard HU. Methylation of human papillomavirus 16, 18, 31, and 45 L2 and L1 genes and the cellular DAPK gene: Considerations for use as biomarkers of the progression of cervical neoplasia. *Virology*, 2014, 448: 314–321. [DOI]
- [26] Bryant D, Onions T, Raybould R, Jones S, Tristram A, Hibbitts S, Fiander A, Powell N. Increased methylation of Human Papillomavirus type 16 DNA correlates with viral integration in Vulval Intraepithelial Neoplasia. *J Clin Virol*, 2014, 61(3): 393–399. [DOI]
- [27] Wongworawat YC, Filippova M, Williams VM, Filippov V, Duerksen-Hughes PJ. Chronic oxidative stress increases the integration frequency of foreign DNA and human papillomavirus 16 in human keratinocytes. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(4): 764–780. [DOI]
- [28] Matovina M, Sabol I, Grubišić G, Gašperov NM, Grce M. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol*, 2009, 113(1): 120–127. [DOI]
- [29] Coutlée F, Trottier H, Gagnon S, Koushik A, Richardson H, Roger M, Ferenczy AS, Franco EL. Low-risk human papillomavirus type 6 DNA load and integration in cervical samples from women with squamous intraepithelial lesions. *J Clin Virol*, 2009, 45(2): 96–99. [DOI]
- [30] Gimenes F, Souza RP, de Abreu ALP, Pereira MW, Consolaro MEL, da Silva VRS. Simultaneous detection of human papillomavirus integration and c-MYC gene amplification in cervical lesions: an emerging marker for the risk to progression. *Arch Gynecol Obstet*, 2016, 293(4): 857–863. [DOI]
- [31] Liu X. Correlation study of human papillomavirus types and integration status with cervical carcinogenesis[D]. Shenyang: Chinese Medical Sciences University, 2010: 17–19. 刘霞. 人乳头瘤病毒感染型别及整合状态与宫颈癌发生的相关性研究[学位论文]. 沈阳: 中国医科大学, 2010: 17–19. [DOI]
- [32] Wang LM, Shen H, Feng B, Zhu D, Yu L, Tian X, Ren C, Gao C, Li XM, Ma D, Hu Z, Wang H. Reduction in the copy number and expression level of the recurrent human papillomavirus integration gene fragile histidine triad (FHIT) predicts the transition of cervical lesions. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175520. [DOI]
- [33] De Marco L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J Clin Virol*, 2007, 38(1): 7–13. [DOI]

- [34] Theelen W, Litjens RJNTM, Vinokurova S, Haesevoets A, Reijans M, Simons G, Smedts F, Herrington CS, Ramaekers FCS, von Knebel Doeberitz M, Speel EJM, Hopman AHN. Human papillomavirus multiplex ligation-dependent probe amplification assay for the assessment of viral load, integration, and gain of telomerase-related genes in cervical malignancies. *Hum Pathol*, 2013, 44(11): 2410–2418. [DOI]
- [35] Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, Vinokurova S, Kongyingyoes B, Chumworathayi B, Patarapadungkit N, Siriaunkgul S, von Knebel Doeberitz M. Detection of the human papillomavirus 58 physical state using the amplification of papillomavirus oncogene transcripts assay. *J Virol Methods*, 2013, 189(2): 290–298. [DOI]
- [36] Das P, Thomas A, Mahantshetty U, Shrivastava SK, Deodhar K, Mulherkar R. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41012. [DOI]
- [37] Liu Y, Zhang C, Gao W, Wang L, Pan Y, Gao Y, Lu Z, Ke Y. Genome-wide profiling of the human papillomavirus DNA integration in cervical intraepithelial neoplasia and normal cervical epithelium by HPV capture technology. *Sci Rep*, 2016, 6: 35427. [DOI]
- [38] Cheah PL, Koh CC, Nazarina AR, Teoh KH, Looi LM. Correlation of p16INK4a immunoexpression and human papillomavirus (HPV) detected by in-situ hybridization in cervical squamous neoplasia. *Malays J Pathol*, 2016, 38(1): 33–38. [DOI]
- [39] Sun C, Reimers LL, Burk RD. Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol*, 2011, 121(1): 59–63. [DOI]
- [40] Holm R, Kraus I, Skomedal H, Langerød A, Kristensen GB, Lyng H. Human papillomavirus DNA and e6/e7 mRNA status in relation to survival of patients treated for cervical squamous cell carcinoma. *Open Virol J*, 2008, 2: 74–81. [DOI]

(责任编辑: 岑山)