高危型人乳头瘤病毒的研究进展*

杨俊东^{1,2}, 邢志芳³综述, 曹国君^{1,4△}审校

1. 复旦大学附属华山医院北院检验科, 上海 201907; 2. 上海健康医学院医学技术学院, 上海 201318; 3. 复旦大学附属华山医院检验医学科, 上海 200040;
4. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏苏州 215163

关键词: 宫颈癌; 人乳头状瘤病毒; 致病机制**中图法分类号:** R737.33**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2020)23-3406-04

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一,而宫颈癌组织中人乳头瘤病毒(HPV)检出率高达 99%,因此 HPV 感染被认为是宫颈癌和宫颈上皮内瘤变(CIN)的必要条件。HPV 具有多种不同亚型,其中高危型 HPV 感染致病的概率显著高于低危型 HPV,高危型 HPV 的具体致病机制十分复杂。近年来发现了多种新的致病机制和影响因素,为 HPV 相关宫颈疾病的早期筛查、预防和新药研发提供了新思路,本文就高危型 HPV 的致病机制、检测方法、预防与治疗等方面研究进展作一综述。

1 HPV 概述

HPV 是一类小型、无包膜、环状、双链 DNA 病毒,是宫颈癌和 CIN 的重要致病因素。HPV 亚型较多,根据致病力的高低分为高危型和低危型,低危型包括 HPV-1、2、3、4、6、7、10、11、13、32、34、40、42、43 等,高危型包括 HPV-16、18、31、33、35、39、52、58、59 等^[1]。HPV 感染可导致患者宫颈病变,多表现为阴道分泌物增多、阴道不规则出血、宫颈糜烂和下腹部疼痛等临床症状^[2]。HPV 主要通过性传播^[3],男性患者生殖器感染率虽高于女性,但病毒持续存在的可能性小,因此通常不会致癌,而女性患者因宫颈和阴道的结构有利于病毒的生存,是主要受害者,宫颈癌在妇科癌症中排名第四;超过 2/3 的患者来自于南非和拉丁美洲等欠发达地区,并成为该地区癌症死亡的主要原因^[4]。高危型 HPV-16、18 在宫颈病变患者中检出率最高^[5],约占 HPV 所有亚型的 71%,研究高危型 HPV 的致病机制、检测方法和预防方法等对于宫颈癌的早期筛查和治疗具有重要意义。

2 HPV 引发宫颈癌的致病机制

HPV 有 3 个基因功能区:早期区、晚期区和上游调控区,其中早期区编码早期蛋白 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7,参与调节病毒的生命周期、调控 DNA 复制、转

录和病毒蛋白的翻译等^[6];晚期区编码晚期蛋白 L1 和 L2,即病毒的衣壳蛋白,主要参与细胞表面吸附、病毒颗粒包装及病毒进入细胞质过程;上游调控区含有顺式调控单元及病毒复制的起点,负责调控病毒基因的复制和转录。

2.1 E2 参与调节 HPV 的转录 E2 蛋白在 HPV 的转录过程中发挥着不同的调节作用,主要体现在病毒感染的时期。在与宿主基因组整合前,病毒仅处于潜伏期,E2 蛋白可与靶位点 E2BSs 结合,通过特异性蛋白 1(Sp1)和 TATA 结合蛋白(TBP)的移位抑制病毒转录。有研究表明,在导入了 E2 基因的宫颈癌细胞 SiHa 中,癌细胞的增殖明显下降,凋亡率明显上升^[7];而在与宿主基因组整合后,病毒进入了活跃期,E2 基因被甲基化促进了 HPV 的转录、增殖^[8]。

2.2 E5 维持 HPV 持续感染并介导免疫逃逸 在 高危型 HPV 基因组与宿主整合后,宫颈复层鳞状上皮基底细胞内的 E5 蛋白会上调受体酪氨酸激酶(Met)的表达,以维持病毒的生命周期、复制和转录过程^[9]。面对外源 DNA 的入侵,宫颈上皮细胞可在基底层分裂后凋亡、脱离,这种方式有利于机体降低病毒 DNA 的数量^[10],然而 E5 蛋白可通过激活表皮生长因子受体(EGFR),一方面延缓基底细胞的分裂和分化进程,另一方面上调环氧合酶-2 的表达,刺激促凋亡相关基因 Bax 的降解作用,从而达到持续感染上皮细胞的目的^[11]。此外,E5 蛋白还可与 V-型 ATP 酶质子泵的亚基相互作用,延缓了 EGFR 的降解,也有助于维持细胞内病毒的持续感染^[12]。在宫颈癌发病初期,宿主会产生大量 CD8⁺T 细胞,CD8⁺T 细胞通过识别肿瘤细胞表面主要的组织相容性复合体 I 类分子(MHC-I)直接杀死肿瘤细胞,而 E5 蛋白的疏水区能与 MHC-I 类分子重链相互作用,抑制 MHC-I 的抗原提呈作用,尽量减少免疫应答发生的可能,维持被

* 基金项目:上海市科学技术委员会“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项(20S31902700);中国博士后科学基金项目(2020T130091ZX,2020M681733)。

△ 通信作者,E-mail:gjcao@foxmail.com。

HPV 感染肿瘤细胞的持续存在^[13]。肿瘤细胞这种逃避免疫应答的机制使 HPV 更容易在体内定植,使宿主的抗病毒能力下降,从而有助于 HPV 持续感染状态的维持。

2.3 HPV E6、E7 是关键的致癌基因 低危型和高危型 HPV 的致病力差异主要体现在 HPV E6、E7 蛋白,低危型 HPV E6、E7 蛋白仅存在于被感染细胞的胞质,并不能诱导恶性转化^[14]。而高危型 HPV E6、E7 蛋白可以进入宿主细胞核,是维持 HPV 阳性癌细胞恶性表型的关键因素,与细胞转化和永生密切相关。研究表明 HPV E6 基因表达产物可结合并诱导 p53 基因降解,以阻止肿瘤细胞凋亡,此外,高危型 HPV E6 蛋白的羧基端存在 PDZ 结合模序(PBM),其与 PDZ 蛋白的相互作用,促进病毒 DNA 进入细胞内,继而引发感染^[15];HPV E7 的基因表达产物以肿瘤抑制基因 pRb 为靶点并与之结合,能促进肿瘤细胞进入 S 期,从而得以永生。HPV E6、E7 蛋白促进宫颈癌发生的其他机制如下。(1) HPV E6、E7 蛋白通过内源性调控分子 miRNA 参与肿瘤的发病进程,例如,HPV E6、E7 蛋白能特异性上调 miR-146b-3p,从而抑制 15 羟基-前列腺素脱氢酶的作用,发挥了促进宫颈癌细胞增殖和迁移的作用,从而导致癌变的发生^[16];HPV E6 蛋白可以使 miRNA-20a 的表达增加,从而使细胞程序性死亡蛋白 6 上调,促进宫颈癌细胞的增殖^[17];HPV E7 蛋白能与 pRB 结合,导致宫颈上皮 miR-182 表达上调^[18],导致被感染细胞癌变。(2) HPV E6、E7 蛋白通过长链非编码 RNA(lncRNA)参与肿瘤的发病进程,HPV E6、E7 蛋白通过转录因子 c-Myc 增加 lncRNA SNHG12 的水平,促进 E-钙黏着蛋白转录抑制因子 Slug 的表达,从而降低组织内细胞黏附强度,促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭和上皮间质转化(EMT)能力^[19],而 lncRNA TMPOP2 的异位表达也可上调 HPV E6、E7 基因,维持宿主体内宫颈癌细胞的存在^[20]。另有研究发现了一类新的 lncRNA——lnc-CCDST,具有抑制宫颈癌细胞运动和血管生成的功能,而 HPV E6、E7 蛋白能降低 lnc-CCDST 的表达,促进宫颈癌的进一步发展^[21]。(3) HPV E6、E7 蛋白通过影响信号通路参与肿瘤的发病进程,Toll 样受体(TLR)是参与人类非特异性免疫的识别受体,广泛表达于人类恶性肿瘤组织中,HPV E6 蛋白能与 TLR-2、3、7、8、9 等相互作用,破坏免疫反应,从而促进 HPV 致癌^[22]。研究表明,高危型 HPV E6、E6* 蛋白能介导 T 细胞因子 4(TCF-4)的转录因子与 β -catenin 结合,促进癌细胞增殖,并诱导 TCF-4 的稳定化,上调 Wnt/ β -catenin 信号通路,有助于维持癌细胞的转化和永生^[23]。此外,HPV E6 蛋白可通过促进 calcineurin-NFAT2 信号通路的表达,从而促

进宫颈癌的进展^[24]。(4) HPV E6、E7 蛋白通过其他途径影响肿瘤的发病进程,例如 HPV E6、E7 基因可增加白细胞介素-6 在宫颈癌细胞中的表达,造成长时间持续的炎症和高度增殖的微环境,从而有利于肿瘤发生^[25]。同时,HPV E6、E7 蛋白还可上调 pirin 基因表达以促进 EMT,对宫颈癌的发展起着重要作用^[26]。

3 高危型 HPV 的实验室检测方法

3.1 传统检测方法 高危型 HPV 的检测对于宫颈癌的筛查、预防和治疗具有重要意义,其传统检测方法主要基于细胞学,如宫颈涂片和液基细胞学等,传统检测方法的特异度较高,但灵敏度不够高;使用针对病毒 L1 蛋白的单克隆抗体也可检测子宫脱落细胞中的 HPV,方法简便、经济、易操作,但仅能判断患者是否感染 HPV,适用于普查^[27]。

3.2 基于 DNA 的检测方法 HPV DNA 检测的基本原理是针对 HPV 基因组特定序列设计引物和/或探针,对病毒进行定性或定量检测,相对于传统检测方法,其灵敏度和特异度较高,可实现 HPV 分型,但检出 HPV DNA 仅能说明病毒存在,并不代表发生了宫颈病变。近年来,新的检测方法不断出现,且取得了明显进展,但仍各有利弊,例如芯片杂交技术通过酶标 HPV 靶基因序列,与固相支持物上的探针分子进行杂交、显色,具有通量高、速度快的特点,一次性可实现多种 HPV 亚型分析,但该方法操作复杂,且容易造成交叉污染。AdvanSure 和双巢式 PCR 是基于 PCR 进行改良方法,通过多重引物的设计实现了多重 HPV 亚型的检测^[28-29],该方法具有较高的灵敏度,但检测过程中易发生污染。第二代杂交捕获技术(HC2)通过放大抗体捕获的信号实现靶标检测,此方法无需经过 PCR 扩增就能实现 13 种高危型 HPV 的半定量检测,操作简便、特异度高,有效避免了分子扩增过程中可能出现的污染,但该方法检测灵敏度较低,且不能区分多重感染。酶切信号放大技术利用特异性酶识别并切割病毒 DNA 分子,通过分子杂交和化学信号放大直接检测特定 DNA 序列,此方法不会造成扩增时可能引起的交叉污染,对样本体积需求小,可避免因样本量不足引起的假阴性,但能够检测的 HPV 亚型有限。数字 PCR 技术也被称为“第三代 PCR”,无需标准曲线就能实现分子靶标的绝对定量检测,检测灵敏度高,定量准确,但其检测通量低,检测成本高,操作复杂,目前难以在临床广泛应用。尽管 HPV DNA 的检测技术在不断更新优化,但仍难以区分 HPV 的一过性感染和癌前病变,因此阳性检测结果可能会导致不必要的临床治疗。

3.3 基于 RNA 的检测方法 在病毒感染的过程中 HPV E6、E7 基因会大量表达 mRNA,从而产生大量致癌蛋白,使宫颈细胞逐渐发生癌变,因此病毒 mRNA

NA 检测是一种新的方式。Aptima 逆转录扩增法利用转录介导的扩增技术 (TMA) 检测 HPV E6、E7 mRNA^[30], 是目前唯一一个被美国食品及药物管理局 (FDA) 批准用于检测 HPV mRNA 的技术, HPV E6、E7 mRNA 的检出意味着病毒处于活跃期, 与宫颈癌的关系更为密切, 能有效减少对一过性 HPV 的检出, 从而减少受检妇女不必要的阴道镜转诊和不必要的心理压力。最新的研究表明, 采用荧光原位杂交技术检测宫颈脱落细胞中 Survivin mRNA 的表达同样可用于宫颈病变筛查, 提高了高度 CIN 和宫颈癌诊断的准确性和可预测性^[31]。宫颈癌筛查的最佳策略是实现益处最大化和危害最小化, 发现那些有可能发展为癌症的宫颈癌前病变, 同时避免对一过性 HPV 感染导致的良性病变的检测和过度治疗, 因此与传统 DNA 检测相比, 检测 HPV E6、E7 mRNA 不但灵敏度高, 而且特异度更高, 但因 mRNA 易发生降解, 对样本质量的要求也更高。

4 高危型 HPV 的预防与治疗

控制宫颈癌的发病率可通过两种方式实现, 一是预防癌前病变, 二是尽早发现并治疗癌前病变, 以遏止其发展为癌症。预防性疫苗是预防宫颈癌最有效的方法^[32]。基本原理是将 HPV 的衣壳蛋白和病毒样颗粒注入人体, 通过抗原表位的特异性刺激机体产生相应的抗体以预防病毒侵袭, 目前有 3 种 HPV 疫苗, 根据可预防的亚型种类分为二价苗、四价苗和九价苗, 其中以二价苗的免疫效价最高^[33], 青少年因性器官发育尚未成熟, 免疫功能低下, 所以是重点接种人群, 及早接种预防性 HPV 疫苗能有效防治 HPV 的持续性感染并降低宫颈癌的发病率。治疗性疫苗针对的靶抗原是 HPV E6、E7 蛋白, 通过重新激发特异性 T 细胞介导的免疫反应, 以清除被病毒感染或已变异的细胞, 根据载体不同, HPV 治疗性疫苗分为 DNA 疫苗、亚单位疫苗、活载体疫苗、树突状细胞疫苗等^[34]。除病毒载量和病毒类型之外, 衣原体感染、长期吸烟、多胎生育和长期使用激素类避孕药也是增加宫颈癌风险的相关因素。加强生活习惯方面的认知, 早期筛查、疫苗和药物的介入有助于降低宫颈癌的发病率和病死率。

保妇康栓是一类中药制剂, 其中含有冰片与莪术油, 不仅具有抗单纯分离病毒的感染作用, 而且能够抑制宿主细胞染色体上的病毒基因片段并促进巨噬细胞吞噬病毒的能力。重组人干扰素 α -2a 是一类广谱抗病毒药物, 与病灶细胞表面的受体相结合后可抑制病毒蛋白的合成并促进淋巴细胞、吞噬细胞和自然杀伤细胞吞噬被病毒感染的细胞。理解了 HPV 基因组致病蛋白有助于研制出有效的治疗药物, 为临床治疗宫颈癌提供新的思路, 例如 miR-221 可通过

SOCS1/Type I IFN 信号通路抑制 HPV DNA 的复制^[35]。EGFR 抑制剂可控制癌前病变中的 E5 活性^[10]; 抑制靶向致癌 lncRNA SNHG12 和 TMPOP2 的表达或促进 lnc-CCDST 的表达可改变 HPV E6、E7 蛋白的活性^[19-21], 这些成果都有可能成为潜在的治疗靶点。

5 展 望

HPV 对于宫颈癌及 CIN 的高致病性严重影响了女性的健康生活, 并带来了严重后果, 养成良好的生活习惯, 提前预防、早发现、早治疗是改善预后的有效措施。虽然近些年来人们对于 HPV 致病机制的研究已经有了诸多的突破, 但仍有许多机制有待于去探索, 任重而道远。

(志谢: 上海市“医苑新星”青年医学人才培养计划的支持。)

参考文献

- [1] 龙驰, 张漾. 宫颈癌与人乳头状瘤病毒研究综述[J]. 中国疗养医学, 2016, 25(11): 1131-1134.
- [2] 黄晓梅. 宫颈癌的早期症状及影响因素研究[J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(7): 79-80.
- [3] SERRANO B, BROTONS M, BOSCH F X, et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018, 47(1): 14-26.
- [4] DE MARTEL C, PLUMMER M, VIGNAT J, et al. World wide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type [J]. Int J Cancer, 2017, 141(4): 664-670.
- [5] BASSAL R, GUILBURD Y, SHAPIRA H, et al. The clinical significance of human papillomavirus type in women with recurrent cytological atypia [J]. Isr Med Assoc J, 2018, 20(3): 172-175.
- [6] 陈一凡, 戚欣, 李静, 等. 宫颈癌的发病机制、药物治疗及新治疗策略 [J]. 食品与药品, 2019, 21(3): 242-246.
- [7] 李雪琨, 程波, 刘珊, 等. HPV16 E2 基因促进宫颈癌 SiHa 细胞的凋亡 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(10): 4832-4836.
- [8] ZHANG X A, ZHI Y F, LI Y, et al. Study on the relationship between methylation status of HPV 16 E2 binding sites and cervical lesions [J]. Clin Chim Acta, 2019, 493(1): 98-103.
- [9] SCOTT L M, COLEMAN T D, KELLY C K, et al. Human papillomavirus type 16 E5-mediated upregulation of Met in human keratinocytes [J]. Virology, 2018, 519(1): 1-11.
- [10] ILAHI NE, BHATTI A. Impact of HPV E5 on viral life cycle via EGFR signaling [J]. Microb Pathog, 2020, 139(1): 103923.
- [11] HEMMAT N, BAGHI B H. Human papillomavirus E5 protein, the undercover culprit of tumorigenesis [J]. Infect Agent Cancer, 2018, 13(1): 31.
- [12] 简洁, 杨嘉洁, 李婉宜, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 E5 蛋白在

- 宫颈癌中表达及其作用的研究进展[J]. 现代预防医学, 2017, 44(5):950-953.
- [13] STEINBACN A, RIEMER A B. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: an update[J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(2):224-229.
- [14] SUN L N, ZHAO L, LI D, et al. Low risk HPV-6E6 induces apoptosis in bone marrow-derived dendritic cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1):1157-1162.
- [15] DREWS C M, CASE S, VANDE POL S B. E6 proteins from high-risk HPV, low-risk HPV, and animal papillomaviruses activate the Wnt/ β -catenin pathway through E6AP-dependent degradation of NHERF1 [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(4):e1007575.
- [16] YAO S H, XU J Y, ZHAO K X, et al. Down-regulation of HPGD by miR-146b-3p promotes cervical cancer cell proliferation, migration and anchorage-independent growth through activation of STAT3 and AKT pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11):1055.
- [17] LIU X. Up-regulation of miR-20a by HPV16 E6 exerts growth-promoting effects by targeting PDCD6 in cervical carcinoma cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102(1):996-1002.
- [18] CHEN J, DENG Y, AO L F, et al. The high-risk HPV oncogene E7 upregulates miR-182 expression through the TGF- β /Smad pathway in cervical cancer[J]. *Cancer Lett*, 2019, 460(1):75-85.
- [19] LAI S Y, GUAN H M, LIU J. Long noncoding RNA SNHG12 modulated by human papillomavirus 16 E6/E7 promotes cervical cancer progression via ERK/Slug pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11):7911-7922.
- [20] HE H P, LIU X, LIU Y, et al. Human papillomavirus E6/E7 and long noncoding RNA TMPOP2 mutually up-regulated gene expression in cervical cancer cells[J]. *J Virol*, 2019, 93(8):e01808-e01818.
- [21] DING X Y, JIA X M, WANG C, et al. A DHX9-lncRNA-MDM2 interaction regulates cell invasion and angiogenesis of cervical cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(9):1750-1765.
- [22] OLIVEIRA L B, HAGA I R, VILLA L L. Human papillomavirus(HPV) 16 E6 oncoprotein targets the Toll-like receptor pathway[J]. *J Gen Virol*, 2018, 99(5):667-675.
- [23] OMAR M B, LESLIE O N, LEONARDO J C M, et al. HPV-18 E6 oncoprotein and its spliced isoform E6 * I regulate the Wnt/ β -catenin cell signaling pathway through the TCF-4 transcriptional factor[J]. *J Mol Sci*, 2018, 19(10):3153.
- [24] RAM B M, DOLPADY J, KULKARNI R, et al. Human papillomavirus (HPV) oncoprotein E6 facilitates calcineurin nuclear factor for activated T cells 2 (NFAT2) signaling to promote cellular proliferation in cervical cell carcinoma[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(1):132-141.
- [25] CRISTINA A I, ANDREA M P, ADRIANA A L, et al. E6/E7 and E6 * from HPV16 and HPV18 upregulate IL-6 expression independently of p53 in keratinocytes[J]. *Front Immunol*, 2019, 10(1):1676.
- [26] GARRILLO D, MUNOZ J P, HUERTA H, et al. Upregulation of PIR gene expression induced by human papillomavirus E6 and E7 in epithelial oral and cervical cells[J]. *Open Biol*, 2017, 7(11):170111.
- [27] WANG L, HU Y C, XIAO C Y, et al. Comparative testing of HPV L1 protein monoclonal antibody panel for the detection of HPV in cervical exfoliated cells[J]. *J Virol Methods*, 2018, 257(1):33-41.
- [28] KO K, YU S, KWON M J, et al. Comparison of advanced HPV genoblot and hybrid capture 2 assays for detection of HPV infection[J]. *J Clin Lab Anal*, 2018, 32(1):e22161.
- [29] TAWE L, GROVER S, NARASIMHAMURTHY M, et al. Molecular detection of human papillomavirus (HPV) in highly fragmented dna from cervical cancer biopsies using double-nested PCR[J]. *MethodsX*, 2018, 5(1):569-578.
- [30] TEWARI P, WHITE C, KELLY L, et al. Clinical performance of the Cobas 4800 HPV test and the Aptima HPV assay in the management of women referred to colposcopy with minor cytological abnormalitie[J]. *Diagn Cytopathol*, 2018, 46(12):987-992.
- [31] FAN Y B, SHEN Z J. The clinical value of HPV E6/E7 and STAT3 mRNA detection in cervical cancer screening [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(5):767-775.
- [32] KESSLER T A. Cervical cancer: prevention and early detection[J]. *Semin Oncol Nurs*, 2017, 33(2):172-183.
- [33] DE OLIVEIRA C M, FREGNANI J, VILLA L L. HPV vaccine: updates and highlights [J]. *Acta Cytologica*, 2019, 63(2):159-168.
- [34] 黄诗雯, 宋硕, 王致萍, 等. 人乳头瘤病毒治疗性疫苗的研究进展[J]. *病毒学报*, 2020, 35(2):314-321.
- [35] LU H K, GU X. MicroRNA-221 inhibits human papillomavirus 16 E1-E2 mediated DNA replication through activating SOCS1/Type I IFN signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(5):1518-1528.