

李金荣 何荣根 主编

口腔颌面部肿瘤 基础 research 新进展

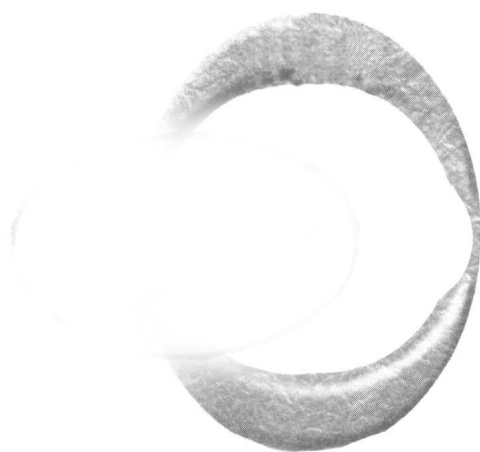
湖北科学技术出版社

KOUQIANGHEMIANBU
ZHONG-LIU
JICHUYANJIU
XINJINGZHAN

KOUQIANGHEMIANBU
ZHONGLIU
JICHUYANJIU
XINJINGZHAN

口腔颌面部肿瘤 基础研究新进展

李金荣 何荣根 主编
湖北科学技术出版社



图书在版编目(CIP)数据

口腔颌面部肿瘤基础研究新进展/李金荣,何荣根主编. —武汉:
湖北科学技术出版社, 2002.7

ISBN 7-5352-2792-9

I. 口… II. ①李…②何… III. 口腔颌面部疾病:肿瘤—研究 IV. R739.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 049735 号

口腔颌面部肿瘤基础研究新进展

© 李金荣 何荣根 主编

责任编辑:熊木忠

封面设计:王 梅

出版发行:湖北科学技术出版社
地 址:武汉市武昌黄鹄路 75 号

电话:86782508
邮编:430077

印 刷:华中理工大学印刷厂
督 印:苏江洪

邮编:430074

787mm × 1092mm 16 开 44.75 印张 5 插页 1130 千字
2002 年 9 月第 1 版 2002 年 9 月第 1 次印刷

印数:0 001 - 2 000

ISBN 7 - 5352 - 2792 - 9/R·619

定价:98.00 元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

《口腔颌面部肿瘤基础研究新进展》编委名单

主 编 李金荣 何荣根

副主编 杨宏宇 王建广 李 江 金辉喜 金晓明

编 委 (以姓氏笔画为序)

王 洁	王建广	王安训	王昌美	王跃平	毛祖彝	孙长伏
孙春晓	李盛琳	李龙江	李金荣	李永生	李 江	闫军峰
刘兴坤	刘树春	何荣根	陈万涛	张志愿	张引成	张庆元
张迎佳	杨宏宇	周国瑜	金晓明	金辉喜	尚政军	林 琦
章魁华	宣 鸣	郭 伟	高 志	徐 骏	陶 谦	黄洪章
黄 丹	曹 俊	温玉明	韩新光	韩 珺	蔡殿才	蔡 圳

高瞻远瞩，重视口腔颌面肿瘤基础研究，
开拓创新，勇攀国际口腔医学科技高峰。

张锡泽

2001. 12. 18

前 言

恶性肿瘤是造成死亡的主要疾病之一。多年来攻克肿瘤、战胜肿瘤一直是人们最美好的愿望。世界各国均投入了大量人力、物力,对肿瘤的防治与研究做了许多颇有成效的工作。

在我国,对口腔颌面肿瘤的基础研究起步较晚,仅在近 10 余年来才引起高度重视。鉴于对口腔癌的病因、发病机制以及各种生物学特性目前尚不甚明了,对晚期肿瘤亦无特效的治疗方法。近 10 年来,在肿瘤分子生物学研究迅速发展的基础上,国内学者从理论和大量实验中针对上述的疑难问题进行了较广泛、深入的细胞分子水平的研究,并取得了许多新进展和可喜的成果,为战胜肿瘤迈出了重要的一步。

鉴于国内目前尚无口腔颌面部肿瘤基础研究方面的专著,为了使从事肿瘤基础研究的研究生和临床医师,以及从事相关研究的科研人员熟悉当前国内外对口腔颌面肿瘤研究的现状,了解研究动态、熟悉和把握选题方向,掌握现代肿瘤的研究方法和手段,为他们提供一本有实用价值的参考书,我们组织了一批从事口腔肿瘤基础研究的精英,编写此书,以供同道参考。

本书共含 65 个专题,分为四篇。第一篇主要是关于口腔癌的病因、发病机理及侵袭和转移的相关研究;第二篇是口腔癌细胞系(株)及动物模型的建立及相关研究;第三篇为口腔癌治疗的应用基础研究,重点介绍口腔癌的生物治疗,如免疫治疗和基因治疗等的研究进展;第四篇为涎腺肿瘤基础研究的新进展。

本书基本涵盖了近几年来国内各主要医学院校对口腔肿瘤基础研究的重要内容及相关研究的国内外动态及成果的综述,尽量做到理论与实际相结合,使读者对各专题有较完整的了解。

鉴于某些研究目标及研究手段、研究方法的相似性,本书除口腔颌面部肿瘤外,也可作为头颈部和其他相关的各种恶性肿瘤研究的参考书。

本书编委均来自国内著名院校,如上海第二医科大学口腔医学院、武汉大学口腔医学院、北京大学口腔医学院、华西口腔医学院及中山医科大学、中国医科大学等有关口腔医学专业院校。各位编委均对其所编写的专题有较深的造诣,公开发表过多篇论文,并在该课题的研究中处于国内领先水平。绝大多数的课题研究是在国家自然科学基金、卫生部基金或省、市科研基金的资助下完成的。

在本书的编写过程中得到了上海第二医科大学终身教授,我国口腔颌面外科主要创始人之一,口腔颌面肿瘤学研究权威张锡泽教授的大力支持和肯定,并热情的给予题词。此外,上述各院校口腔肿瘤基础研究的专家、权威,如章魁华教授等均亲自参加了编写,为本书大大增添了权威性。在此谨对各位表示衷心感谢。

本书仅能反映当前我国对口腔肿瘤基础研究的概况、水平和成果。鉴于医学研究发展的快速性,研究手段及研究方法不断地更新,新的认识、新的概念、观点将不断产生。即使对同一课题的研究也可能会得出新的结论和补充,这是科学发展的规律,不足为奇。另外,在本书中涉及引证外文资料中,因受编写时间的限制,个别地方未能逐一核对,可能有用词不当甚至误译之处,敬请读者原谅和指正。

李金荣 何荣根

2002年4月10日

目 录

第一篇 口腔癌病因、发病机理及侵袭和转移的相关研究

口腔粘膜癌危险因素的研究	李盛琳	章魅华	韩 珺	张迎佳 (3)
人口腔鳞状细胞癌多基因致癌机理的研究	王建广	李金荣 (56)		
人乳头瘤病毒感染与口腔鳞癌关系的研究进展	王建广	李金荣 (88)		
人乳头状瘤病毒致口腔癌机理研究的进展	曹 俊	张志愿 (94)		
口腔鳞癌的分子生物学研究进展	王建广	李金荣 (114)		
口腔癌的侵袭和转移	李金荣 (123)			
肿瘤转移的分子机制	金辉喜	李金荣 (131)		
头颈部癌侵袭转移中粘附分子的作用	金晓明	李金荣 (139)		
基质金属蛋白酶在口腔鳞癌侵袭和转移中的作用	杨宏宇	李金荣 (146)		
表皮生长因子及其受体与口腔鳞癌颈淋巴结转移关系的研究	金晓明	李金荣 (155)		
转化生长因子 β_1 及其受体与口腔鳞癌颈淋巴结转移关系的研究	金晓明	李金荣 (160)		
转化生长因子 β_1 对口腔鳞癌细胞系血管内皮生长因子的影响	金晓明	李金荣 (165)		
外源性 EGF 和 $TGF\beta_1$ 对口腔鳞癌细胞系 PKC 的影响	金晓明	李金荣 (168)		
外源性 EGF 和 $TGF\beta_1$ 对口腔鳞癌细胞系侵袭行为的影响	金晓明	李金荣 (173)		
表皮生长因子受体在头颈部肿瘤发生发展及转移中的作用	金晓明	李金荣 (182)		
口腔鳞癌中 α -PA 系统的表达与颈淋巴结转移关系的研究	金晓明	李金荣 (186)		
口腔鳞癌根治性手术前后血清 $TGF-\beta_1$ 的变化	金晓明	李金荣 (189)		
层粘连蛋白和口腔癌关系的研究进展	李永生	李金荣 (192)		
VEGF 在口腔癌中的表达	张庆元	李金荣 (197)		
蛋白激酶 C 与肿瘤发生发展关系的研究进展	孙长伏	(202)		
肿瘤神经周侵袭机制的研究进展	孙长伏	林 琦 (209)		
端粒、端粒酶在口腔癌变中的意义	高 志	毛祖彝 (216)		
生物芯片及其在肿瘤研究中的应用	徐 驷	黄 丹 (227)		
P-选择素及其配体与肿瘤转移关系的研究	陈万涛	蔡 圳	何荣根 (233)	
一氧化氮——头颈部肿瘤研究领域的明星分子	尚政军	李金荣 (241)		
口腔鳞状细胞癌中内皮型一氧化氮合酶基因表达的体外研究	尚政军	李金荣 (254)		
血管内皮生长因子及其受体和口腔鳞癌关系的研究进展	张庆元	李金荣 (257)		
血管生成与肿瘤生长的关系	李龙江	温玉明 (264)		
淋巴系统研究方法进展	韩新光	李金荣 (281)		
舌淋巴管分布及引流特征的研究	韩新光	李金荣 (292)		

口腔癌淋巴道转移的机制和淋巴化疗	温玉明	王昌美	宣 鸣 (313)
成釉细胞瘤的基础研究进展	陶 谦	黄洪章	(325)
颌面部骨肉瘤的临床病理及非胶原蛋白表达	李 江	何荣根	(337)

第二篇 口腔癌细胞系及动物模型的建立及相关研究

口腔癌细胞系的建立方法及其生物学特征的研究	金辉喜	李金荣 (351)
口腔癌动物诱发模型的建立和癌变细胞分化异常研究	刘兴坤	何荣根 (358)
口腔癌动物模型及其生物学行为研究	李永生	李金荣 (375)
人类恶性肿瘤裸鼠移植模型的建立及现状	杨宏宇	李金荣 (385)
人舌鳞癌裸鼠原位移植模型及其主要生物学特性的研究	杨宏宇	李金荣 (391)

第三篇 口腔癌治疗的应用基础研究

抗肿瘤侵袭、转移药物的研究进展	闫军峰	李金荣 (399)
肿瘤生物治疗	何荣根	(408)
口腔癌的免疫治疗	杨宏宇	李金荣 (438)
肿瘤浸润淋巴细胞研究进展	杨宏宇	李金荣 (449)
口腔鳞癌 TIL 和 TDLNL 的增殖能力及表型特征的比较研究	杨宏宇	李金荣 (453)
口腔鳞癌 TIL 和 TDLNL 杀伤活性的比较研究	杨宏宇	李金荣 (456)
术前放化疗和未治疗口腔鳞癌患者 TIL 增殖及特异性杀伤活性的比较	杨宏宇	李金荣 (460)
FN 对口腔鳞癌肿瘤浸润淋巴细胞杀伤活性的增强作用及机理	杨宏宇	李金荣 (463)
ICAM - 1/LFA - 1 单抗对口腔鳞癌 TIL 细胞毒性的影响	杨宏宇	李金荣 (467)
ICAM - 1 在口腔鳞癌中的表达	杨宏宇	李金荣 (470)
MHC 分子在诱导口腔鳞癌 CTL 中的作用	杨宏宇	李金荣 (473)
口腔鳞癌、切缘组织 DNA 倍性特征及临床意义	杨宏宇	李金荣 (477)
头颈肿瘤的基因治疗	郭 伟	(480)
重组腺病毒介导自杀基因系统治疗口腔鳞癌的研究	王安训	黄洪章 (498)
C - myc/Fas 基因介导口腔鳞癌细胞凋亡机制的研究	王建广	黄洪章 (540)
外源性一氧化氮诱发口腔鳞癌细胞凋亡的实验研究	尚政军	李金荣 (569)
口腔鳞癌诱导分化治疗基础实验研究	陈万涛	何荣根 (573)
细胞毒 T 淋巴细胞的过继免疫疗法	杨宏宇	李金荣 (585)
三氧化二砷与诱导凋亡治疗肿瘤的研究	王跃平	张志愿 (590)
激光光动力疗法在头颈肿瘤外科中的应用进展	周国瑜	(606)
头颈部癌化学预防	蔡殿才	陈万涛 (615)

第四篇 涎腺肿瘤基础研究

癌基因、抑癌基因与涎腺肿瘤	金晓明	张引成 (631)
涎腺腺样囊性癌研究进展	李 江	何荣根 (640)
涎腺腺样囊性癌自杀基因治疗的实验研究	孙春晓	何荣根 (656)
涎腺肌上皮瘤基础研究进展	王 洁	(672)
涎腺多形性腺瘤基础研究进展	王 洁	(683)
nm23 基因在涎腺恶性肿瘤中表达的意义	金辉喜	李金荣 (693)
涎腺肿瘤专题相关文献分析	孙长伏	刘树春 (696)

第一篇

口腔癌病因、发病机理 及侵袭和转移的相关研究

口腔粘膜癌危险因素的研究

头颈部肿瘤在整个世界范围内具有相当高的发病率。由于地域、生活习惯的不同,不同地区的发病率有一定的差异。其占全身恶性肿瘤的比率从3%(瑞典)、5%(美国)到40%(东南亚及印度)不等。我国位于高发区,目前,全国范围内尚无普遍认同的发病率,根据已有的报道,我国口腔癌大约占全身恶性肿瘤的1.45%~9.97%。长江以南高于长江以北。据调查统计,我国每年约有100万人发生恶性肿瘤,死亡率高达70%,若口腔颌面部恶性肿瘤为全身恶性肿瘤的8.2%,则其死亡率为5.74%。

在组织学分类中,口腔颌面部恶性肿瘤则以上皮组织来源最多,尤其是鳞状细胞癌最为常见,约占口腔颌面部恶性肿瘤80%以上。从原发部位上看,恶性肿瘤在我国以舌癌、牙龈癌、颊粘膜癌、腭癌等为常见,唇癌及颜面皮肤癌较少见。

口腔癌的发生与吸烟、饮酒、病毒感染、营养不良和局部饮食习惯均有联系。虽然流行病学已经很好地描述了口腔癌的一些特征,但其分子生物学机制尚未明确。

目前对癌症的病因多半认为是多源性的,即“癌瘤病因的综合作用”。近年来在肿瘤发生的分子生物学机制的研究中发现,抑癌基因功能的改变在肿瘤发生过程中起了重要作用。在众多的抑癌基因中,p53基因是人类癌瘤中最常见的突变基因,在许多恶性肿瘤中出现抑癌基因p53功能的丧失。p53抑癌功能可通过以下几条途径丧失:①基因突变产生构象改变的突变型p53蛋白,或不产生p53蛋白。基因突变在肺癌和食道癌中是造成p53功能丧失的主要原因;②野生型p53蛋白与某些内源性或外源性蛋白相互作用造成抑癌功能丧失。这些蛋白中包括具有潜在致癌性的人类乳头状病毒(HPV)的E6蛋白,它可与野生型p53蛋白结合并使后者降解。

本节将结合我们的研究工作及国际上的研究动态,介绍口腔鳞状细胞癌危险因素的相关研究。文中对国际上的研究进行了回顾,并对我们进行的关于中国人口腔鳞癌的危险因素进行的系列研究给予介绍。本章包括以下6个方面的内容①烟草与口腔粘膜癌;②HPV与口腔鳞状细胞癌;③p53与口腔粘膜癌;④口腔鳞癌中的HPV与p53;⑤HPV和化学致癌剂的联合致癌作用;⑥野生型p53基因对舌癌细胞的抑制作用研究。

本文的部分研究工作是作者在美国UCLA牙科学院Park教授的实验室和他的指导下完成的,部分工作在傅嘉等人的协助下在北京大学口腔医学院合作完成的。对于他们的贡献和辛勤工作表示衷心的感谢!

一、烟草与口腔粘膜癌

烟草的使用,无论是烟卷、烟斗、嚼烟以及现在欧美流行的无烟烟草(含于口内),皆可引起口腔癌的重要癌前病变——口腔粘膜白斑。除了特发性白斑(极罕见)之外,其他各型白斑皆

由烟草引起,已获公认。

吸烟时,所产生的烟气包括焦油、生物碱和水,约占烟气总量的8%左右。烟气成分极为复杂,至1982年,已鉴定的有3875种化学成分,其中1135种与烟叶原有的成分相同,2740种单独存在于烟气中,是燃烧过程中的分解产物。

一支烟烟气中含总粒相物质数为 4.5×10^{12} ,焦油量40mg,尼古丁2.6mg,CO 100mg,CO₂150mg,酚类化合物0.8mg,氨7.5mg,丙酮2.0mg,甲醛1.4mg,甲苯0.7mg,氰氨酸0.4mg,各种多环芳烃6.5mg,低于 $1.0\mu\text{g}$ 的重金属(镉、砷、铜等),低于 $1.0\mu\text{g}$ 的其他气体(氮氧化物、丙烯醛等)。此外,还有放射性物质,为 α 射线。吸烟每日20支者,肺部受到的年放射量相当于胸透200次。支气管的某些部位,每年受500~5500毫雷 α 线(允许量为500/年)。主要为²¹⁰铅和²¹⁰钋,在肺部有蓄积倾向。

烟气中的促癌剂为酚类化合物,如酚、甲酚等。尼古丁本身对口腔粘膜不起致癌作用,但与其他致癌剂协同,则起促癌作用,这在动物实验中已经证明。

烟草中的主要致癌物为烟草特异性亚硝酸胺(Tobacco-specific Nitroamines,简作TSN4)。其中起最大致癌作用者为亚硝基去甲烟碱(N-nitrosornicotine,简作NNN),另一为4-(甲基亚硝酸胺)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(4-(N-methyl-N-nitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone,简作NNK),多在烟吸入瞬间形成,28%~40%从烟草转入烟气。有研究表明,烟草中的PAH(polycyclic aromatic hydrocarbons)和烟草特异性亚硝酸胺可以损伤细胞DNA,使DNA羟基化并使动物产生肿瘤。使用烟草者的DNA损伤高于不使用者。口腔这一特殊器官,有机会长期暴露于这些物质当中。

由于烟草与白斑生成的关系密切,用烟草进行动物实验以制出白斑动物模型的研究开始甚早。1930年Roff用尼龙古丁或烟草提取液涂抹兔的牙龈部,但未诱发白斑,后以香烟烟雾喷于兔的牙龈部,25日后形成白色角化性病变,即白斑样病变。

栾文民将香烟烟雾喷于金黄地鼠颊囊,形成明显的均质性白斑。实际上除烟雾外,还有温度的刺激。

周继林等用创伤加烟酒刺激法。创伤为钢丝束反复刺激,至粘膜泛红充血;再用烟酒刺激。以40支牡丹牌香烟的全部烟丝。放半公斤65度白酒中,浸泡一周。另一组动物用创伤加烟碱刺激(市购烟叶,酒精浸泡,浓缩,使之含烟碱0.876%)。

实验每周涂抹三次,部位为硬腭后部近软腭处,动物为金黄地鼠和大白鼠。烟酒刺激11个月,烟碱刺激7.5个月。

结果产生类似临床的白斑样改变。镜下见粘膜上皮单纯性增生,仅个别动物有局灶性异常增生。烟碱刺激者,全为单纯性增生。

章魁华,张振玉等用烟草提出液。市售石舫牌香烟150支烟丝,浸泡于500ml丙酮液中半个月,过滤,得液体300ml,置通风橱中自然挥发至液体剩一半为止,涂抹金黄地鼠颊囊粘膜。白斑样病变在第六周末形成,3个月后仍维持不变。镜下检查,全部(7周及3个月后)皆无上皮异常增生。

Chen YP等用0.01% NNN,0.01% NNN + 6% 尼古丁,0.01% NNK,0.01% NNK + 6% 尼古丁涂金黄地鼠颊囊粘膜每周3次,共13个月,取颊囊及前胃粘膜检查。结果发现,颊囊粘膜有增生,过角化等,在尼古丁 + NNN组,9只动物中仅1只有中度上皮异常增生。前胃粘膜亦有类似变化。单涂尼古丁者变化不明显,证明尼古丁与弱量NNN及NNK等结合时,起促癌作用。

他们将实验未能在口腔内产生肿瘤归因于所用的TSNA浓度太低(0.01%)。但此浓度已

高于大多数烟草产品(约为 0.001%)。Hecht 等用 NNN 和 NNK, 浓度分别为 0.014% 和 0.003%, 在 30 只大白鼠中有 8 只产生肿瘤。但所用实验时间为 132 周。

他们认为, 欲产生肿瘤需要更高浓度, 更长时间。以及加入助癌剂如病毒或尼古丁等。

以上用烟草的实验所制出的动物模型, 肉眼观均类似临床上的均质性白斑, 在停止实验后, 均消退或减轻, 故皆非真正的癌前病变。

真正的癌前病变应为病理上有上皮异常增生的白斑。

章魁华等鉴于 Chen 等的研究中, NNN 及 NNK 的浓度较低, 亦未设立 NNN + NNK + 尼古丁组, 故在实验中设立此组, 并将 NNN 和 NNK 的浓度增加为 0.02%, 实验时间为 6 个月。

结果表明, 无恶性肿瘤产生, 上皮增生及过角化发生率接近 100%, 上皮异常增生发生率从 25% 至 87.5%, 中度上皮异常增生发生率以 NNN + NNK + 尼古丁组最高, 为 72.7%。应视为已引起真正的癌前病变。如涂药时间及观察时间更长, 发生肿瘤的可能性很大。

Park 等用口含烟草及单纯疱疹病毒实验 6 个月, 产生了浸润性细胞癌。以上叙述说明癌前病变及癌的产生机制是复杂的, 虽然 NNN 和 NNK 为强制癌剂, 但无论单独使用或二者结合, 皆未能产生癌前病变动物模型, 必须加入其他助癌剂和长时间的实验。

近年来, 对癌前病变的研究已进入分子水平, 对抑癌基因 p53 的研究甚多, 发现有上皮异常增生的白斑中, p53 的表达率 83%。认为 p53 蛋白水平增高在癌形成之前即可发生, 与异常增生程度密切相关。人乳头瘤病毒与口腔癌发生的关系密切, 可能通过降解 p53 蛋白而发挥致癌作用。

故烟草, 特别是 TSNA 的致癌作用, 可能影响因素甚多, 欲用 TSNA 致癌, 必须加上其他影响因素。

参 考 文 献

1. 金闻博, 戴亚. 烟草化学. 北京: 清华大学出版社, 1994, 136 ~ 151, 228 ~ 247
2. 张保辰, 李嵩震主编. 中国烟草大辞典. 北京: 中国经济出版社, 1992, 287 ~ 324, 569 ~ 574
3. 章魁华, 岳岷, 宋永生. 烟草特异性亚硝胺对地鼠颊囊粘膜及前胃的作用. 现代口腔医学杂志 2000; 14: 366 ~ 367
4. Chen YP, Johnson GK, Squier CA. Effects of nicotine and tobacco - specific nitrosamines on hamster cheek pouch and gastric mucosa. J Oral Pathology Med 1994; 23: 251 ~ 5
5. Hecht SS, Rivenson A, Braley J, et al. Induction of oral cavity tumors in F344 rats by tobacco - specific nitrosamines and snuff. Cancer Res 1986; 46: 4162 ~ 4166
6. Park NH, Sapp JP, Herbosa EG. Oral cancer induced in hamsters with herpes simplex infection and snuff dipping. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986; 62: 64 ~ 68

二、HPV 与口腔粘膜癌

人类乳头瘤病毒属乳多空泡病毒科, 为小的(直径约 55nm, 对称二十面体, 外壳由 72 个壳粒组成)无包膜嗜上皮性双链环状 DNA 病毒, 其分子量为 5.2KD, 约为 7 900bp。经克隆鉴定有 70 余种不同的基因型。HPV 有显著的宿主与靶细胞特异性, 一般引起皮肤与粘膜的增生性病损。是唯一以人类作为自然宿主的乳头状瘤病毒, 人感染后可引起皮肤上皮、口腔、喉、支气管、食道和泌尿生殖道粘膜上皮良性病变。就其感染的后果来讲, 一般分为高危型(可导致恶

性肿瘤),如 HPV16、18 型;低危型(一般不会演变进展成恶性肿瘤),如 HPV6、11、30、33。HPV 攻击的靶细胞范围极窄,仅侵袭皮肤、粘膜的鳞状上皮细胞。不同型的 HPV 感染特定的解剖学部位,通常嗜皮肤的 HPV 不能在粘膜上皮细胞内建立病毒的原发病灶,反之亦然。并且 HPV 只能在具有一定分化程度的角质细胞内才能繁殖,而在基底细胞内呈隐性状态,推测病毒繁殖需要细胞连续分化所提供的特异因子才能完成。

HPV 基因

HPV 基因组结构分为三个区段:早期区(early region, E 区)、晚期区(late region, L 区)和上游调控区(Upstream regulation region, URR),又称非编码区(noncodon region, NCR)。HPV 感染后,一般 E 区很快有表达, L 区表达则较晚。HPV 主要的开放读框(Open Reading Frames, ORFs),均由同一条 DNA 链编码。E 区代表 45% 的病毒基因组,含 5~8 个 ORFs,顺序依次为: E6、E7、E1、(E8)、E2、E4、(E3)、E5,其功能涉及复制、转录、调节和细胞转化。E6、E7 是已确定的两个转化基因,有使细胞永生化的能力,其中 E6 基因产物,分布在细胞核和膜上,它对细胞转化是必需的;E7 可使细胞转化,并可能与调节基因拷贝数有关。E2、E1 基因对 E6、E7 基因的转录有调控作用,E1 涉及复制;E2 编码在功能上相拮抗的蛋白,调节病毒基因转录。E4 与病毒成熟有关;E5 作为扩增因子可以将生长因子的调节信号扩大,能单独转化小鼠细胞,并能使上皮细胞增殖。L 区代表 40% 的病毒基因组,有 L1、L2 两个 ORFs,其功能是编码 HPV 衣壳蛋白的主要结构和次要结构蛋白。URR 代表 15% 的病毒基因组,位于 L1 终止密码子和 E6 第一个起始密码子 ATG 之间,含有重要的基因调节因子,其调控序列控制大多数的 HPV 基因组的转录活动,是基因组中变异较大的一个区段,而且在病毒感染细胞后往往比较稳定不易丢失。同源性研究结果表明在已知的基因型中 E1 及 L1 区域具有高度的保守性,即各基因型之间该区域的碱基序列相同或相似。对于 HPV 的各亚型的研究又集中于 HPV16 及 HPV18。目前以 HPV16 的基因组的结构、功能及其致病致癌性的研究最为广泛和深入。

HPV 与肿瘤

(一) HPV 与宫颈癌

现在,已有大量的流行病学、病毒学和分子生物学的研究成果明确地证明 HPV 尤其是某些特异的基因型如: HPV-16、-18 等与人宫颈癌的发生有密切联系。进而有人提出在宫颈癌的发展中 HPV 的起始作用。并且已有大量的体外及动物实验表明高危型 HPV 能诱导细胞转化与癌变。高达 90% 的侵袭性宫颈癌中含有 HPV 的序列。其中 60% 以上为高危型的感染。虽 HPV 没有直接诱导癌变的证据,但研究表明, HPV 在癌发生发展这样一个多因素多阶段的过程中,起着一定的作用。

(二) 口腔癌中的 HPV

1988 年 Scully 等学者注意到 HPV_s 可能在口腔癌发生中起一定作用。口腔粘膜在组织结构、外部环境以及存在癌前良性增生病损、原位癌、浸润癌等一系列变化方面与宫颈癌有许多共性。因此推测在口腔癌中可能具有类似于在宫颈癌中的致癌特性。1983 年 Syrjanen 采用免疫组化的方法首次报道口腔鳞癌中 HPV 抗原存在。随后一系列的研究均表明口腔与癌前病变中确实存在 HPV 感染,并且以高危型 HPV16、18 为主,提示 HPV 在口腔癌的发生和发展过程中起着一定作用。Shindoh 等对口腔鳞癌中的 HPV16、p53 和增殖细胞核抗原的表达作了检测,认为 HPV 具有维持上皮细胞增殖状态的能力并可产生有恶变潜力的产物。

(三) 口腔癌与 HPV 的研究

口腔癌中 HPV 检出率由于各种原因差异相当大(8%~100%),总体的检出率明显低于宫

颈癌中的水平。迄今为止的研究提示 HPV 与口腔粘膜疾病、口腔癌、口腔癌前病变有一定的关系。而且,许多研究发现在口腔癌组织中 HPV 感染呈局灶性。Ostwald 等报道用 PCR 检测 HPV16 和 HPV18,在口腔癌中的检出率为 61.5%,癌旁正常粘膜中为 26.9%,远处正常粘膜中为 3.8%,同时在健康志愿者的正常颊粘膜中检出率仅为 1%,因而他们认为 HPV 是口腔癌的致病因子之一而不是一过性感染;Woods 等在 78% 的口腔鳞癌组织中检测出 HPV DNA,44% 的癌旁粘膜有同型的 HPV 感染;国内报告口腔癌组织中 HPV16 阳性率为 27.3% ~ 36.0%,显著高于癌旁正常组织。而且有学者在口腔癌的淋巴转移灶中检测出同肿瘤原发灶类型相同、拷贝数相当的 HPV DNA,更加说明 HPV 与口腔癌的发生、发展关系密切。但目前对 HPV 在口腔疾病中的致病机理尚不够深入。

HPV 感染后的分子生物学机制

(一)在宫颈癌的发生中

现在认为 HPV 感染细胞后,其 DNA 在宿主细胞内以两种形式存在:以游离体的形式游离存在或整合到宿主染色体 DNA 的基因组中。在宫颈癌的研究中病毒的存在形式与细胞的癌变过程有一定关系。有人在研究宫颈癌时发现大多数浸润癌组织中的 HPV 为整合状态,而良性病变及癌前病变中则以游离体状态占大多数。同时有些病例中可同时检测到两种状态的 HPV 序列。整合多发生在宿主细胞染色体的脆弱部位或其附近,影响邻近原癌基因与肿瘤抑制基因的转录。宫颈癌中整合位点在 c - myc 及 N - myc 附近,可引起该基因结构的改变或过表达。HPV16,18 可以使人类子宫颈、皮肤、口腔粘膜上皮细胞永生化。这些永生的细胞虽然在开始时对裸鼠无致瘤性,但在经过长期培养后,可产生恶性克隆,或经一些化学致癌剂处理后具有了恶性表型,在进一步受到活化的 H - ras 癌基因作用后,也可具备成瘤性;HPV16 与活化的 ras 癌基因共同转染可以转化人原代成纤维细胞和鼠原代上皮细胞;HPV 协同 c - myc 与 H - ras 能够完全克服肿瘤抑制基因 p53 对增殖转化的抑制作用。有人对整合位点两侧的宿主 DNA 序列进行研究,但未发现有任何的规律性,进而认为这种整合是随机的。同时进一步的分子生物学的研究证实整合过程中 HPV DNA 也会发生改变,宫颈癌中这种改变常发生于一段大约 4 ~ 5kb 的区域,通常出现 E1、E2 及 L2 区基因的断裂及缺失,而 E6、E7 基因保持完整。这导致 E2 区对转录的抑制丧失,E6, E7 基因高水平转录表达。而由整合后的基因所编码的病毒多肽可通过与肿瘤抑制基因蛋白结合使其失活的方式发挥其诱导转化与癌变的作用。Zur Hausen 提出细胞内监控机制出现缺陷可能在癌变过程中发挥重要作用。在这个过程中,抑癌基因 p53 和 Rb 蛋白与 HPV 的关系较密切。体内、外实验均表明高危型 HPV 的 E6 蛋白可与 p53 蛋白结合形成复合物,促使 p53 迅速降解,从而失去正常活性。表现为 HPV 感染的细胞系 p53 蛋白半衰期明显缩短,蛋白水平低于正常细胞;p53 的反式激活活性被抑制;细胞受刺激后 p53 蛋白水平不能反应性增高,使细胞丧失在 G1 期进行 DNA 修复的机会,突变积累,癌变危险性增加。低危型 HPV E6 蛋白与 p53 蛋白的结合力要明显的低于高危型,体外实验中不能引起 p53 蛋白迅速降解,不能协同其他因子转化人类细胞或转化率很低,亦不具有抑制野生型 p53 反式激活的作用。这一切都表明使 p53 蛋白丧失活性是高危型蛋白诱导癌变的重要机制。同时实验证明 E7 的转化蛋白可与视网膜母细胞瘤敏感基因(retinoblastoma gene, Rb 是第一个被分离鉴定的人类肿瘤抑制基因,1986)的产物 Rb 蛋白结合并使其失活,从而诱导转化及癌变。Rb 基因位于 13 号染色体的长臂(13q14)编码一个 105kd 的核磷酸蛋白。Rb 及 p53 的磷酸化状态在细胞正常周期的调节中起关键作用。E5 蛋白可能作为生长因子介导的信号增强子导致癌基因 c - fos 的过表达,促使细胞增殖。因此 HPV DNA 的整合可能是成癌的一个重