

人乳头瘤病毒在头颈部鳞状细胞癌中精准检测的研究进展

周思远^{1,2}, 牛文娟², 张凌楠³, 王文龙², 马向瑞^{2*}

¹滨州医学院口腔医学院 山东烟台

²滨州医学院附属医院口腔颌面外科 山东滨州

³滨州医学院附属医院口腔正畸科 山东滨州

【摘要】人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 持续感染已被公认为是头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 的独立致病因素之一, 与传统的 HNSCC 相比, HPV 相关 HNSCC 是一类具有不同分子生物学发病机制及独特临床病理特征的疾病。多项研究证实 HPV 持续感染是 HNSCC 良好预后的重要标志物之一。临床上针对 HPV 精准有效的检测方法具有极其重要的诊疗意义, 然而到目前为止还没有一种方法可以作为检测头颈部鳞癌 HPV 感染的金标准。本文围绕 HPV 各种检测方法的现状及未来做一综述, 以期临床选择精准快速的 HPV 检测方法提供参考及借鉴。

【关键词】人乳头瘤病毒; 头颈部鳞状细胞癌; 精准检测; 诊断

【收稿日期】2025 年 1 月 6 日

【出刊日期】2025 年 2 月 7 日

【DOI】10.12208/j.ijcr.20250076

Advances in accurate and effective detection of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma

Siyuan Zhou^{1,2}, Wenjuan Niu², Lingnan Zhang³, Wenlong Wang², Xiangrui Ma^{2*}

¹School of Stomatology, Bin Zhou Medical University, Yantai, Shandong

²Department of Oral and maxillofacial Surgery, Bin Zhou Medical University Hospital, Binzhou, Shandong

³Department of Orthodontics, Bin Zhou Medical University Hospital, Binzhou, Shandong

【Abstract】Persistent infection of human papillomavirus (HPV) has been recognized as an independent pathogenic factor of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Compared with traditional HNSCC, HPV-associated HNSCC is a disease with different molecular biological pathogenesis and unique clinicopathological characteristics. Many studies have confirmed that HPV persistent infection is one of the important markers for good prognosis of HNSCC. Accurate and effective detection methods for HPV in clinical practice are of great significance in diagnosis and treatment. However, up to now, no method can be used as the gold standard for detecting HPV infection in head and neck squamous cell carcinoma. This article reviews the current status and future of HPV detection methods, in order to provide reference for clinical selection of accurate and rapid HPV detection methods.

【Keywords】Human papillomavirus; Head and neck squamous cell carcinoma; Accurate detection; Diagnosis

头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 好发于口腔、鼻腔、咽部、喉部, 以口咽部最为常见, 是当今全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 全球每年有超过 89 万例新发癌症病例和 45 万死亡病例^[1]。近几年来, 由人类乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 驱动的头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 的发病率逐年升高, 在美国约 90% 的口咽部鳞状细胞癌

(oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC) 由 HPV 驱动, 如今其发病率在恶性肿瘤中居第六位^[2,3]。吸烟和饮酒是 HNSCC 发病的传统独立因素, 但 HPV 持续性感染越来越被认为是重要的独立致病因素之一^[4]。研究发现由 HPV 驱动的 HNSCC 的预后相对更好, 准确诊断 HPV 的感染状态, 有助于 HNSCC 治疗方案的制定及预后转归。目前检测 HPV 的方法众多, 如常用的 p16 IHC、HPV DNA 原位杂交、PCR 等。遗憾的

*通讯作者: 马向瑞

是, 到目前为止还没有一种方法可以作为检测头颈部 HPV 感染的金标准, 因此临床上急需寻找一种规范化、有效化的检测标准。本文对于现有 HPV 各种检测方法的检验原理、检验效果等做总结分析, 旨在为临床实践中 HPV 相关 HNSCC 快速且精准的规范化检测提供参考和选择。

1 HPV 概述

HPV 是携带约 8000 碱基对 (kb) 基因组的双链 DNA 病毒, 直径约为 52-55nm, 呈球形, 无包膜^[5]。其遗传信息主要集中于三个区域: 早期区 (E1、E2、E4、E5、E6、E7): 控制病毒的转录、复制、和细胞转化; 晚期区 (L): 编码病毒衣壳蛋白; 长控制区 (LCR), 又称上游调控区 (URR): 是病毒复制和转录的调控元件^[3]。迄今为止人类检测发现 HPV 约有 200 多种亚型, 其中 HPV16 是最常见的、危险度最高的致病亚型, HPV 16 阳性约占口咽鳞状细胞癌的 80%-90%^[6,7]。

HPV 驱动相关肿瘤的机制是通过上调 E6 和 E7 癌基因的表达, 控制细胞周期以及细胞凋亡, 从而降低肿瘤抑制蛋白 p53 和视网膜母细胞瘤蛋白 (pRb) 的活性, 导致编码 p16^{INK4a} 的细胞周期依赖性激酶抑制基因 (CDKN2A) 上调和细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 表达下调^[8]。当 p16^{INK4a} 代偿性过度表达, 相关细胞因子因无法调控细胞分裂导致细胞增殖失控, 从而产生肿瘤细胞^[9]。

2 HPV 直接检测

2.1 HPV PCR 检测

DNA 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 因其简便、快速且灵敏度高等优点成为最常用的 HPV 检测方法之一, 通过 PCR 检测可以直接反映出组织内是否含有 HPV^[10]。一些研究表明 PCR 技术检测肿瘤组织中的 HPV DNA 灵敏度和特异度分别为 98% 和 84%^[11]。虽然该方法拥有极高的灵敏度, 但是样本极易受到污染, 由于无法区分是否具有转录活性的 HPV, 所以样本中检测出 HPV DNA 并不意味着患者已经由 HPV 阳性发展为 HNSCC, 只能表明患者体内携带 HPV, 因此单纯的 PCR 检测 HPV 阳性并不能得出 HPV 驱动 HNSCC 的结论^[12]。

2.2 E6/E7 mRNA 检测

HR-HPV 驱动恶性肿瘤的机制主要是 E6/E7 癌基因的持续高表达, 因此基于冷冻标本的 HPV E6/E7 mRNA 的 PCR 分子检测是诊断 HPV 相关肿瘤特异度最高的一种检测方法^[13]。采用逆转录与实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)

方法对冷冻标本中 E6/E7 mRNA 进行扩增和鉴定, 被认为是目前诊断 HPV 阳性相关肿瘤的金标准之一^[14]。由于 qRT-PCR 技术检测 E6/E7 mRNA 成本高、难度大, 目前并不适用于对 HPV 的常规临床筛查。

2.3 HPV 的原位杂交检测

HPV 的原位杂交检测包括靶向 DNA 检测和靶向 RNA 检测, HPV DNA 原位杂交 (in situ hybridization, ISH) 检测因其敏感性低等缺点正逐步被临床淘汰, 而 RNA ISH 是目前公认的肿瘤组织中 HPV 检测的金标准之一^[15]。在 ISH 中, HPV 检测程序发生在受感染细胞的细胞核内, 能够检测到病变组织中具有转录活性的 HPV, 从而准确区分是否是 HPV 相关的感染^[16]。RNA ISH 的灵敏度和特异度为 95% 左右, 与 qRT-PCR 相比具有相似的敏感性和特异性^[17]。然而, 由于 RNA ISH 的检测成本高昂, 其在临床上的应用仍受到限制, 多数被局限于实验室研究。

3 HPV 间接检测

3.1 p16 免疫组化

由于 HR-HPV 的 p16^{INK4a} 在具有转录活性的肿瘤细胞中过度表达, 使 p16^{INK4a} 成为检测 HPV 的良好生物标记物。因此, p16 免疫组化的基本原理是 (Immunohistochemistry, IHC) 通过检测 p16^{INK4a} 表达情况来反映是否是 HPV 驱动的 HNSCC (美国病理学家协会建议阳性细胞数 > 70% 为 p16 阳性、阳性表达定位于细胞核和细胞质且为中等至强阳性, 且组织学形态为非角化型鳞状细胞癌时诊断为 HPV 相关 HNSCC)^[18]。p16 IHC 的优点是容易在 FFPE 组织上进行, 便于保存及易于 HPV 相关肿瘤的筛查^[19]。不过有研究指出, 炎症、p53 基因突变可以造成 p16^{INK4a} 过度表达, 地域和种族差异也影响 p16^{INK4a} 表达效果, 这意味着 p16^{INK4a} 的过度表达并不一定是由 HPV 驱动的^[20, 21]。但是当 p16 IHC 与 PCR 联合检测时, 具有极高的特异度和灵敏度, 能够弥补因其他因素导致 p16 IHC 特异度不足的缺点。

3.2 DNA/RNA 芯片检测

DNA/RNA 芯片检测是基于光学微阵列的固相技术, 将多重 PCR 扩增和多重杂交技术相结合的液体微珠微阵列技术^[22]。DNA 微阵列是通过共价化学基质附着在固体表面的微观 DNA 斑点的集合, 每个 DNA 斑点包含特定 DNA 序列的探针, 用于在高严格条件下杂交 cDNA 或 cRNA^[23]。DNA 微阵列已经成功地用于识别不同肿瘤的基因表达, 其中就包括 HPV 驱动的头颈部癌症^[24]。

3.3 ddPCR 检测 HPV 循环肿瘤 DNA

数字液滴 PCR(droplet digital PCR, ddPCR) 是基于新的超敏感检测方法, 检测血浆中循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 释放的循环肿瘤脱氧核糖核酸 (circulating tumor DNA, ctDNA), 在 HPV 相关肿瘤研究中具有实用临床意义^[25]。通过检测 HPV 癌基因 (E6 或 E7 癌基因) 来反映 ctDNA 在肿瘤组织中的定量分析已被证明可以用于早期头颈癌的检测^[26]。ddPCR 分析正成为近几年研究 HPV 相关肿瘤检测的一项热门检测方法, 该定量技术显示出比 qRT-PCR 更高量级的特异度、灵敏度及可重复性、微创性等优点, 缺点是现阶段成本相对较高^[27], 限制了其在临床的应用。

4 HPV 血清抗体检测

HPV E6/E7 癌基因翻译产物癌蛋白是细胞恶性转化和细胞转化后表型维持所必需的, 因此它们成为 HPV 持续性感染和 HPV 相关瘤变的重要标志物^[28]。例如在 HNSCC 患者的血清中存在 E6/E7 抗体, 而在无肿瘤 HPV 阳性患者中, E6/E7 癌蛋白的表达极少, 提示 HPV 驱动肿瘤细胞导致人体产生 E6/E7 抗体反应, 表明 E6/E7 抗体可以作为 HPV 感染预后的潜在指标之一^[29,30]。E6 血清抗体阳性对于区分是否由 HPV 驱动的 OPC 具有高度特异性 (>99%), 但是 E6 血清抗体阳性只能说明患者处于感染状态, 并不意味着已经造成癌变, 导致 HPV E6 筛查阳性在普通人群中的阳性预测价值很低^[31]。

5 总结

HPV 持续性感染作为 HNSCC 主要病因之一, 精准检测其感染状态对肿瘤诊断、治疗及预后具有重要作用。HPV 相关 HNSCC 检测方法多种多样, 但目前尚无统一、公认的方法, 通常需要联合一种或多种检测方法提高检测的灵敏度和特异度。qRT-PCR 和 RNA ISH 检测 HPV 阳性是目前确诊 HPV 感染的金标准, 具有灵敏度高、特异度高的优点, 但是标本中的 RNA 容易受到污染或破坏。检测血清抗体成本低且具有非侵袭性的优点, 同时 E6/E7 血清抗体阳性提示肿瘤预后良好, 可以作为 HPV 预后的潜在指标之一, 缺点是并不适合用于 HPV 的常规筛查。p16 IHC 阳性作为 HPV 感染状态的潜在生物标志物备受国内外关注, 但是由于我国 HPV 感染率较低, 导致单一行 p16 IHC 检测并不可靠, 常需与 qRT-PCR 联合检测, 而且除口咽鳞癌外, 目前不推荐常规 p16 免疫组化。芯片及 ddPCR 检测肿瘤的基因表达虽然拥有极为快速且精准的优势,

但成本高昂尚处于实验室研究阶段, 并不符合在临床常规应用的要求, 不过随着检测技术的发展, 其成本必将降至合理范围内, 有望在将来成为 HPV 检测的主流方法。

参考文献

- [1] Citron F, Segatto I, Musco L, et al. miR-9 modulates and predicts the response to radiotherapy and EGFR inhibition in HNSCC[J]. *EMBO Mol Med*,2021,13(7):e12872.
- [2] 龙丹, 张春林. 头颈鳞癌中人乳头瘤病毒的检测及意义[J]. *重庆医科大学学报*,2022,47(02):217-221.
- [3] Paver E C, Currie A M, Gupta R, et al. Human papilloma virus related squamous cell carcinomas of the head and neck: diagnosis, clinical implications and detection of HPV[J]. *Pathology*,2020,52(2):179-191.
- [4] Sabatini M E, Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers[J]. *Br J Cancer*,2020,122(3):306-314.
- [5] Kajitani N, Schwartz S. The role of RNA-binding proteins in the processing of mRNAs produced by carcinogenic papillomaviruses[J]. *Semin Cancer Biol*,2022,86(Pt 3):482-496.
- [6] 周潜, 尹跃平. 口咽部人乳头瘤病毒感染检测方法的研究进展[J]. *实用临床医药杂志*,2021,25(16):125-128.
- [7] de Martel C, Georges D, Bray F, et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis[J]. *Lancet Glob Health*,2020,8(2):e180-e190.
- [8] Prime S S, Cirillo N, Cheong S C, et al. Targeting the genetic landscape of oral potentially malignant disorders has the potential as a preventative strategy in oral cancer[J]. *Cancer Lett*,2021,518:102-114.
- [9] Gillison M L, Akagi K, Xiao W, et al. Human papillomavirus and the landscape of secondary genetic alterations in oral cancers[J]. *Genome Res*,2019,29(1):1-17.
- [10] Ma X, Li Y, Liu R, et al. Development of a sensitive and specific nanoparticle - assisted PCR assay for detecting HPV - 16 and HPV - 18 DNA[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(12):3793-3798.
- [11] Prigge E S, Arbyn M, von Knebel D M, et al. Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Cancer*,2017,140(5):1186-1198.
- [12] Santos F, Invenção M, Araújo E D, et al. Comparative analysis

- of different PCR-based strategies for HPV detection and genotyping from cervical samples[J]. *J Med Virol*,2021, 93(11): 6347-6354.
- [13] Giorgi R P, Ronco G, Mancuso P, et al. Performance of HPV E6/E7 mRNA assay as primary screening test: Results from the NTCC2 trial[J]. *Int J Cancer*,2022,151(7):1047-1058.
- [14] Luo R Z, Chen S L, Li M, et al. HPV E6/E7 mRNA in situ hybridization in endocervical adenocarcinoma: implications for prognosis and diagnosis[J]. *Cancer Cell Int*,2021,21(1): 643.
- [15] Randén-Brady R, Carpén T, Jouhi L, et al. In situ hybridization for high-risk HPV E6/E7 mRNA is a superior method for detecting transcriptionally active HPV in oropharyngeal cancer[J]. *Human Pathology*,2019,90:97-105.
- [16] Peterson C, Parikh R N, Ahmad M T, et al. Detection of Human Papillomavirus in Squamous Lesions of the Conjunctiva Using RNA and DNA In-Situ Hybridization[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(13):1-13.
- [17] Keung E S, Souers R J, Bridge J A, et al. Comparative Performance of High-Risk Human Papillomavirus RNA and DNA In Situ Hybridization on College of American Pathologists Proficiency Tests[J]. *Arch Pathol Lab Med*,2020, 144(3):344-349.
- [18] Lewis J J, Beadle B, Bishop J A, et al. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2018,142(5):559-597.
- [19] Benzerdjeb N, Tantot J, Blanchet C, et al. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: p16/p53 immunohistochemistry as a strong predictor of HPV tumour status[J]. *Histopathology*, 2021, 79(3):381-390.
- [20] Mashiana S S, Navale P, Khandakar B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in head and neck cancer: Informing developing strategies for cancer prevention, diagnosis, treatment and surveillance[J]. *Oral Oncol*,2021,113: 105109.
- [21] Sabu A, Ratna Mouli N V, Tejaswini N, et al. Human papillomavirus detection in oropharyngeal squamous cell carcinoma using p16 immunohistochemistry[J]. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*,2019, 9(4):212.
- [22] Kreutz J E, Wang J, Sheen A M, et al. Self-digitization chip for quantitative detection of human papillomavirus gene using digital LAMP[J]. *Lab Chip*,2019,19(6):1035-1040.
- [23] Wang J, Staheli J P, Wu A, et al. Detection of 14 High-Risk Human Papillomaviruses Using Digital LAMP Assays on a Self-Digitization Chip[J]. *Analytical Chemistry*,2021,93(6): 3266-3272.
- [24] Hinić S, Rich A, Anayannis N V, et al. Gene Expression and DNA Methylation in Human Papillomavirus Positive and Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(18):1-20.
- [25] Venuti A, Paolini F. HPV Detection Methods in Head and Neck Cancer[J]. *Head and Neck Pathology*,2012,6(S1):63-74.
- [26] Tanaka H, Suzuki M, Takemoto N, et al. Performance of oral HPV DNA, oral HPV mRNA and circulating tumor HPV DNA in the detection of HPV-related oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary[J]. *Int J Cancer*,2022, 150(1): 174-186.
- [27] Mattox A K, D'Souza G, Khan Z, et al. Comparison of next generation sequencing, droplet digital PCR, and quantitative real-time PCR for the earlier detection and quantification of HPV in HPV-positive oropharyngeal cancer[J]. *Oral Oncol*, 2022, 128:105805.
- [28] Falcucci S, Paolini F, Mileo A M, et al. ePCL Electrospun Microfibrous Layers for Immune Assays: Sensitive ELISA for the Detection of Serum Antibodies Against HPV16 E7 Oncoprotein[J]. *ACS Omega*,2021,6(13):8778-8783.
- [29] Whitmarsh A, Pring M, Thomas S J, et al. Survival advantage in patients with human papillomavirus - driven oropharyngeal cancer and variation by demographic characteristics and serologic response: Findings from Head and Neck 5000[J]. *Cancer*,2021,127(14):2442-2452.
- [30] Lang Kuhs K A, Wood C B, Wiggleton J, et al. Transcervical sonography and human papillomavirus 16 E6 antibodies are sensitive for the detection of oropharyngeal cancer[J]. *Cancer*,2020,126(11):2658-2665.
- [31] Busch C J, Hoffmann A S, Viarisio D, et al. Detection of stage I HPV-driven oropharyngeal cancer in asymptomatic individuals in the Hamburg City Health Study using HPV16 E6 serology - A proof-of-concept study[J]. *EClinical Medicine*, 2022,53:101659.

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS