

人类乳头瘤病毒及其与子宫颈癌关系的研究进展

仇素英

(山东医科大学微生物学教研室; 济南)

Advances in Research on Human Papilloma Viruses and Relationship between the Viruses and Cervical Cancer

Qiu Su-Ying

(Department of Microbiology Shandong Medical University Jinan)

1932年Shope首先发现棉尾兔 (Cottontail Rabbit) 的乳头瘤由病毒引起, 用疣浸液注射野兔或家兔能引起疣, 部分患疣家兔发展为癌。该病毒是第一个哺乳动物致癌病毒的模型, 称棉尾兔乳头瘤病毒 (Cottontail Rabbit Papilloma Virus, CRPV)。以后相继从羊、鹿、牛、马、狗等动物也分离到此病毒。此外, 还从鹀类 (Chaffinch) 分离到禽类的乳头瘤病毒^[1]。

人类皮肤疣的病因早在1907年已经建立, 接种人疣组织浸液可以在人与人之间传播。人乳头瘤病毒 (Human Papilloma Virus, HPV) 可生长于皮肤、生殖道、口腔及呼吸道引起疣或乳头瘤。HPV易从皮肤疣组织中分离到, 但目前还不能在组织培养中传代。在生殖道、喉的疣组织中不易证实病毒的存在。过去一般认为HPV引起的疣或乳头瘤是表浅的良性疾病, 未给予重视。但近几年发现HPV感染与鳞癌有密切关系, 因而引起人们的普遍关注。HPV与子宫颈癌关系的研究几年来已取得了一定的进展。

一、HPV的主要生物学特性

由于该病毒不能在组织培养中传代, 因而其生物特性的研究进展缓慢, 有关该病毒的知识是通过从疣组织中提取的病毒颗粒获得的。

病毒体直径55nm, 衣壳为20面体对称, 含72个壳微粒, 氯化铯中的浮密度为1.34g/ml。其DNA是以共价键结合的环状超螺旋分子 (Form I) 和开放的缺口环状分子 (Form II) 的混合物。分子量为 5×10^6 daltons, 硷基数为 8×10^3 。病毒的DNA与细胞的组蛋白共同组成病毒的染色质。在转化细胞中病毒的基因组多以不整合的形式存在。

1975年建立了HPV的第一个限制性内切酶模型和物理图谱,病毒DNA是从足跖疣中提取,当时定为HPV—1型。在HPV—1的DNA中200~250碱基长的一段中有两个部位存在相反重复序列。以后在不同的实验室相继报告了其他HPV型,截止1985年已被鉴定的有27个型^[5],是根据酶切物理图谱来划分的。各型HPV在疣的流行病学上有其特异性。现在许多实验室已经用*E. coli* K₁₃质粒PBR322在大肠杆菌中克隆和扩增了完整的或部分的HPV基因组^[1]。与生殖道感染及生殖道癌关系密切的HPV—6、HPV—11、HPV—16、HPV—18DNA的酶解标记探针已应用于HPV生殖道感染及癌组织中HPV DNA的检测。

现在还未证实HPV在组织培养中能产生完整病毒。Laparta (1982)^[4]用连续传代的人皮肤角质细胞和致死性射线照射的3T3细胞混合培养对HPV进行传代。角质细胞生长的集落连接成为成层的鳞状上皮细胞。用从足跖疣中提取的HPV DNA接种此细胞培养,可使病毒的DNA复制,且以稳定的游离基因(Episome)形式存在,并能测出DNA的转录。但在感染的细胞中无CPE出现,也未能测到病毒的壳蛋白抗原。用疣组织来源的角质细胞做细胞培养,接种后也未证实能产生病毒颗粒。

关于HPV的抗原组成,从收集的疣组织提纯的病毒得到了一些资料。病毒的主要壳蛋白为57K,其次还有43K和53K等不同分子量的多肽。HPV的种特异抗原决定簇位于病毒表面,属特异抗原决定簇位于病毒内部。用属特异抗原决定簇免疫所产生的抗体有广泛的交叉反应。

不论是在良性疣还是转化的细胞中都未能测到被病毒编码的非结构蛋白。

HPV具高度组织和宿主的特异性,HPV只感染人的皮肤和粘膜,在人类之间已成功地传播,但未证实能传给其他动物。动物的papilloma viruses除牛乳头瘤病毒(BPV)外也表现有高度宿主特异性。BPV—1及BPV—2可侵犯多种组织,并可在地鼠、家兔及小鼠中引起肿瘤。

二、HPV的侵犯部位及所致疾病

不同型的HPV侵犯的部位及所引起的疾病各有其特点,归纳于下表^[2]。

从表中看出HPV—6、HPV—11、HPV—16及HPV—18与生殖道感染及生殖道癌有密切关系。

HPV感染后在细胞核内复制,被感染的细胞体积增大,核着色深,核质疏松呈泡沫状,以后缩小。核周围有一不着色的空晕,空晕周围有致密、边缘整齐的胞浆。此种病变细胞称为空泡细胞(Koilocytotic Cell),该特征是HPV感染的一个重要诊断标准。在这些受损细胞中仅有一部分能测到病毒颗粒或其壳抗原。尽管HPV感染可以导致细胞增生,但有增殖性病毒复制的细胞则不能再分裂,必定要死亡。

表1 各型HPV侵犯部位及所致疾病

Tab 1 The main sites of HPV infection and the clinical diseases.

病毒型	所致疾病及部位
HPV-1	深部足跖疣(一般为单发)
HPV-2	寻常疣(手,一般为多发)、镶嵌疣(手、足)
HPV-3	扁平疣(臀、面、膝周围、多发) 疣状上皮发育不良(Epidermodysplasia Verruciformis, E.V)(面、躯干、四肢)
HPV-4	深部足跖疣、扁平疣
HPV-5	EV病人的糠疹样点状损伤
HPV-6	生殖道疣(子宫颈、阴道、阴户、阴茎、会阴) 呼吸道乳头瘤(声带或其他部位)
HPV-7	屠夫的寻常疣
HPV-8	疣状上皮发育不良病人的斑点状损伤
HPV-9	EV病人的斑点状损伤
HPV-10	扁平疣(同HPV-3)
HPV-11	生殖道、呼吸道乳头瘤(同HPV-6)
HPV-12	EV的斑点损伤
HPV-13	口腔局灶性上皮增生
HPV-14	EV的斑点损伤
HPV-15	EV的斑点损伤
HPV-16	生殖道癌、生殖道乳头瘤 Bowen's病(癌前皮炎), Bowenoid丘疹
HPV-17	EV的斑点损伤
HPV-18	生殖道癌
HPV-19~25	EV的生殖道损伤

三、HPV与子宫颈癌

70年代以来大量研究报道从流行病学、抗原抗体检测、体外细胞转化等实验结果证明单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-2)与宫颈癌有密切关系,但从宫颈癌组织中检测HSV的DNA除个别报道阳性外,多数报告为阴性,即使被HSV转化的体外培养细胞系中也并不经常测出HSV DNA序列,因此有人提出了“打了就跑”的致癌机理。

人们进一步考虑HPV可能是子宫颈癌或其他鳞癌的病因,其理由是基于以下几个方面:①HPV在人体普遍存在;②HPV是嗜上皮的,而人癌多是Carcinoma;③HPV是唯一天然引起肿瘤(良性的疣、乳头瘤)的病毒;④CRHPV引起的兔乳头瘤有25%转为鳞癌;⑤经放射治疗的喉乳头瘤或严重吸烟患者的喉乳头瘤经常转为恶性;⑥HPV所致的疣状上皮发育不良(EV)往往在阳光曝晒的部位发生恶变。

1982年Zur Hanson⁽⁶⁾提出了HPV与HSV协同致癌作用的假想模型,认为正常细胞被HPV感染可导致增生,但发展为宫颈上皮内瘤样病变(Cervical Intraepithelial

Neoplasia, CIN), 以致最后成为浸润癌则是由某种起始因子介导的。HSV或吸烟是起始因子 (Initiator), HPV为起动因子 (Promotor)。该假说还需要实验加以证实。

近几年关于HPV可能做为宫颈癌病因的实验研究取得了一定的进展, 概括为下列几方面:

1、组织病理学方面: 曾有报道两例幼女外阴湿疣最后发展为外阴癌^[7]。Reid在80例宫颈原位癌和浸润癌中发现73例(91%)合并宫颈湿疣, 对照组仅12.5%有湿疣, 并可看到宫颈湿疣和原位癌之间的过渡组织像, 因此认为两者可能存在着一种生物学的连续性^[8]。Syrjanen报道一例最初在巴氏涂片中有HPV感染的细胞病变, 在不到3年时间内发展为浸润性宫颈鳞癌^[9]。

2、生殖道癌组织中HPV特异抗原的检测

Reid (1984) 用免疫酶法检测了52例宫颈上皮发育异常 (dysplasia) 的72份标本, 发现HPV衣壳抗原的检出率随病变程度加重而减少。亚临床乳头瘤感染(SPI) 为36%, 宫颈上皮内肿瘤病变 (CIN) 为9%^[10]。Piletti (1984) 应用免疫酶试验检测21例阴道上皮内肿瘤患者的HPV属特异内壳抗原 (PV-Ag), 发现64%有核内不等量的PV-Ag存在^[11]。

3、宫颈癌病人血清中HPV抗体的检测

Baird (1983) 用免疫酶法检测了三组病人及对照组血清中HPV抗体, 阳性率有明显差异。肛围外阴疣组95%, 宫颈癌组93%, CIN组60%, 非宫颈癌对照组15%其他性传染病对照组6.5%, 正常对照组0%。作者认为HPV抗体的检测有助于宫颈癌和外阴疣的诊断^[12]。

4、宫颈癌细胞或癌前病变中HPV DNA的检测

近几年这方面的研究报告较多, 多数结果指出生殖道尖锐湿疣和扁平湿疣多能测出HPV-6或HPV-11 DNA序列, 宫颈癌多含HPV-16或HPV-18 DNA序列。Wagner (1984) 应用原位细胞DNA杂交技术分析了47例宫颈涂片异常患者, 其中包括CIN III 22例、CIN I/II 13例、符合HPV感染的12例。结果发现CIN III病人68%与HPV-16和HPV-18 DNA混合杂交阳性, 18%与HPV-6杂交阳性, 14%为阴性。CIN I/II或HPV感染患者1/3与HPV-6杂交阳性, 1/3与HPV-16, HPV-18杂交阳性^[13]。

林玉纯等 (1986) 报道从我国五个省市的宫颈癌病人癌组织标本中提取DNA, 用HPV-16 DNA BamHI酶解片段探针检测了HPV DNA序列的存在情况, 实验结果观察到宫颈癌高发区 (山西) 病例检测到HPV-16 DNA相关序列的阳性率高达68%, 低发区 (四川) 的病例阳性率为35%, 中发省份 (山东、辽宁、北京) 检出率分别为61%、52%及52%, 提示我国各地区的宫颈癌发病与HPV感染及其传播有一定关系^[14]。

Luca (1986) 检查了34例妇女生殖道肿瘤 (包括宫颈浸润癌、CIN、阴道上皮内瘤样病变、阴道浸润癌) 组织内HPV-16 DNA, 结果有16例为阳性, 对照组为阴性, 并发现在多数肿瘤细胞中病毒的DNA是整合的, 在3例中发现了HPV-16的变异株或缺损的基因组^[15]。

Carale (1985) 以HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18的DNA探针检测了从人宫颈癌建立的8个细胞系中的HPV DNA序列, 其中6个系显示有HPV DNA序列

被整合, 有 5 个系测出了 HPV 特异的聚腺苷酸 RNA。从人类其他鳞癌建立的细胞系中均未测出 HPV DNA 序列, 结果见表 2^[16]。

表2 在人癌细胞系中 HPV DNA 的检测

Tab 2 Detection of HPV DNA in human cervical carcinoma cell lines

细胞系	癌的类型	HPV DNA				HPV RNA	
		6	11	16	18	16	18
C33A	宫颈癌	-	-	-	-	-	NT
HT-3	宫颈癌	-	-	-	-	-	NT
ME180	宫颈癌	-	-	-	+	-	-
MS751	宫颈癌	-	-	-	+	-	+
SiHa	宫颈癌	-	-	+	-	+	-
C-411	宫颈癌	-	-	-	+	-	+
HeLa	宫颈癌	-	-	-	+	-	+
Caski	宫颈癌	-	-	+	+	+	-
Seaber	膀胱癌	-	-	-	-	-	-
FaDu	喉癌	-	-	-	-	NT	NT
SK-Mes-1	肺癌	-	-	-	-	NT	NT
A421	阴道癌	-	-	-	-	NT	NT
TE-1	食管癌	-	-	-	-	NT	NT
TE-2	食管癌	-	-	-	-	NT	NT
正常脾	-	-	-	-	-	NT	NT

NT=untested

5、papilloma病毒对体外培养细胞的转化

早在1963年Paul等就进行了BPV对细胞的转化实验, 结果证明从牛疣组织分离的BPV能使牛的结膜二倍体细胞发生形态学转化, 且转化率较高^[17]。1964年Thomas等用BPV转化C3H/eB、C57/BL、和BALB/C小鼠的胚胎细胞, 发现细胞形态有改变, 大量染色体断裂, 并有细胞代谢的改变^[18]。1980年Douglas等用BPV-1及BPV-2的基因组转化NIH 3T3小鼠细胞成功, 并证明BPV DNA的0.69片段也能使细胞转化^[19]。1981年Ming-Fan Law等分别用BPV-1完整的病毒颗粒、完整的线状DNA及有转化活性的亚基因组片段转化小鼠C127细胞, 检测了细胞中病毒DNA序列。发现在以上转化细胞中都含有BPV-DNA的多个拷贝, 是以染色体外超螺旋或缺口环状DNA分子形式存在。用BPV完整DNA转化的细胞系中有输入的DNA的重新环化, 此环化的DNA有时能丢失线状DNA中的特定部位。用DNA的亚基因组片段转化的细胞中有环化的病毒DNA并伴有所获得的序列或复制和重排的BPV-1 DNA序列。但在所有转化细胞中都找不到整合于宿主细胞染色体中的BPV-1基因组。作者认为支持细胞转化的BPV DNA可以是以不完整的形式存在于细胞中^[20]。

BPV对细胞转化试验的成功启示人们用HPV进行细胞转化试验。1984年Susan等用克隆的HPV-5和HPV-1的DNA诱导小鼠C127细胞(来自RⅢ小鼠乳腺癌)发生了形态学转化, 在转化细胞中含有多个持续存在的游离拷贝。作者分析了该转化细胞的特点

及致癌潜能(见表)^[21]。这一实验结果对研究HPV与人癌的关系起到了促进作用。

表3 HPV DNA的转化效果

Tab 3 Transformation effect of HPV DNA

克隆的DNA	克隆部位	转化的C127细胞 (每μg转染DNA产生的转化灶)		
		实验一	实验二	实验三
PBR322HPV-1	BamH I	120	138	132
PBR322HPV-5	BamH I	188	152	134
PML HPV-5	BamH I	N I	N I	248
(未诱导转化)				
PBR322CRPV	ECOR I	163	162	128
PBR322BPV-1	Hind III	137	125	80
PBR322		0	0	0

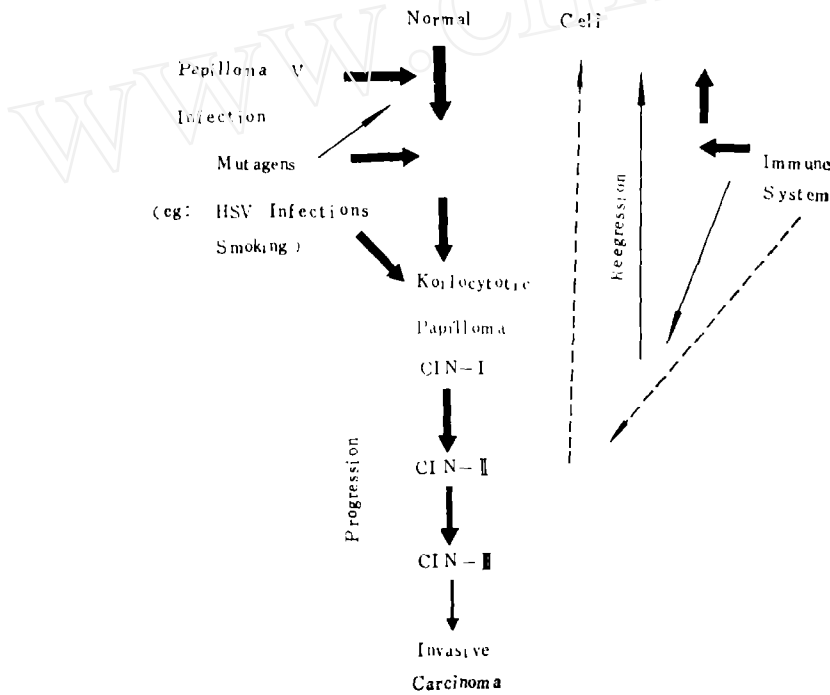


图1 HPV感染与起始因子协同致癌作用的假想模型
Fig.1 The model of synergism between HPV and initiating events

1986年Shigeru等用HPV—16 DNA转化小鼠NIH 3T3细胞成功, 实验结果证明带有完整HPV—16 DNA的重组质粒(PSHPV 16d)能诱导细胞形态转化(潜伏期四周以上), 转化细胞对裸鼠有成瘤能力。转染的DNA最初以多节段形式存在, 并有重排序列, 在转化细胞中还测出了RNA_s的表达^[22]。

目前还未见用HPV DNA转化体外培养的人上皮细胞成功的报道, 若能在这方面获

表4 HPV DNA转化的细胞所表现的特点
Tab4. The properties of transformed cells by HPV DNA

C127克隆	形态转化	在琼脂中的生长情况	每个细胞中病毒游离基因组	裸鼠成瘤
经PBR322 HPV-5转染	+	+	6	+(3/5)
经PBR322 HPV-1转染	+	-	12	-(0/8)
经CRPV 感染	+	+	3	+(7/7)
对照(未经处理)	-	-	0	0(0/0)

得成功,将会对HPV与人癌关系的研究有重大意义。

综上所述,引起生殖道感染主要是HPV—6、HPV—11、HPV—16、HPV—18,尤以HPV—16、HPV—18与子宫颈癌的关系最为密切。随着分子病毒学及DNA杂交技术的发展,HPV在宫颈癌病因中的作用将会有新的研究进展。

参 考 文 献

- [1] Leo A P, et al., 1983, *Viruses Associated with Human cancer*, 269~287
- [2] Field., 1985, *Virology*, 371~380
- [3] Carole A H, et al., 1980, *J Virology* 36(2): 395~407
- [4] Laporta k, et al., 1982, *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3393~3397
- [5] Carole y, et al., 1985, *Am J Pathol* 119: 361~366
- [6] Zur H H., 1982, *Lancet* 2: 1370
- [7] Zur H H., 1977, *Curr Top Microbiol Immunol* 78: 1
- [8] Reid R, et al., 1982, *Cancer* 50: 377
- [9] Surjánen k, et al., 1985, *Lancet* 1(8427): 510
- [10] Reid R, et al., 1984, *Cancer* 53(4): 943
- [11] Pilotti s, et al., 1984, *Am J Surg Pathol* 8(10): 751
- [12] Baird P J, et al., 1983, *Lancet* 2: 17-18
- [13] Wagner D, et al., 1984, *Obstet Gynecol* 64(6): 767
- [14] 林玉纯等, 1986, 首届病毒学术会议论文集P.169
- [15] Luca D Di, et al., 1986, *J General Virology* 67(3): 583-589
- [16] Carele Y, et al., 1985, *Am J Pathol* 119: 361-366
- [17] Paul H B, et al., 1963, *Nature* 199: 1016-1018
- [18] Thomas M, et al., 1964, *Nature* 202: 709-710
- [19] Douglas RL, et al., 1980, *Nature*, 287: 72-74
- [20] Ming-Fan Law, et al., 1981, *Proc Natl Acad sci USA* 78: 2727-2731
- [21] Susan L W, et al., 1984, *Science* 225: 634-636
- [22] Shigeru Y, et al., 1986, *J Virology* 57: 572-577