

# HPV的外周循环血测定及临床意义

段雅晨 综述, 陈小军, 吴小华 审校

复旦大学附属肿瘤医院妇瘤科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

**[摘要]** 高危人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的持续性感染是宫颈癌重要的致病因素, 随着近年来宫颈癌HPV疫苗投入市场, 关于HPV的检测及临床意义也成为研究热点。因为HPV致癌的特殊性, 我们分析了HPV血液检测及临床应用方面存在的困难, 并以血液中HPV的检出为理论基础, 论证了其重要的临床意义, 包括患者预后及治疗的相关最新研究进展。已有研究证实, 宫颈癌患者外周循环血中HPV的持续性检出与患者的不良预后密切相关。在此基础之上, 针对HPV的靶向治疗及免疫治疗在宫颈癌患者中显现出越发重要的地位。针对我们需要解决的问题, 本文将着重阐述目前HPV病毒的血液学检测现状, 并对其提出精准检测及治疗预后方面的展望。

**[关键词]** 宫颈癌; 人乳头状瘤病毒检测; 临床意义

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.11.012

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)11-0908-05

**Detection of HPV in peripheral blood and its clinical significance** DUAN Yachen, CHEN Xiaojun, WU Xiaohua (Department of Gynecological Oncology, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: WU Xiaohua E-mail: docwuxh@hotmail.com

**[Abstract]** High risk human papillomavirus (HPV) has been considered as the most pathogenic factor in cervical cancer patients. Since the HPV vaccine was launched on the market, the detection of HPV and its clinical significance have become hot topics. We analysed the difficulties in peripheral blood detection of HPV and clinical practice, and demonstrated the significance including the latest research progress on prognosis and treatment. It has been verified that the persistent detection of HPV in peripheral blood is in accordance with poor prognosis. On this basis, the targeted therapy and immunotherapy for HPV appear more important in treatment. Focusing on the problem we want to solve, this review presented the current state of blood detection. In the end, we gave our perspective on the precise examination means and clinical application.

**[Key words]** Cervical cancer; Human papillomavirus detection; Clinical significance

宫颈癌是女性中第二常见的恶性肿瘤, 我国宫颈癌的发病率从2000年的4.0/10万到2011年的9.5/10万呈成倍上升趋势<sup>[1]</sup>, 超过98%的宫颈癌<sup>[2]</sup>组织中能分离出人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV), 目前有足够的证据证明高危HPV的持续感染是宫颈癌发生、发展的主要原因<sup>[2]</sup>。此外, HPV的感染与阴道、外阴、食管、头颈部、肛门和阴茎的肿瘤也密切相关<sup>[3]</sup>。鉴于其在多种肿瘤中的致病作用, 对该病毒的预防及治疗的相关研究也在持续进行中。2006年人类第一个预防肿瘤的HPV疫苗问世<sup>[4]</sup>, ACOG在今年子宫颈癌的筛查和预防实践

指南中更新了HPV的起始筛查年龄, 从30岁降低到了25岁<sup>[5]</sup>。作为宫颈癌一、二级预防的有效手段, 人群中HPV的筛查及其疫苗的广泛接种, 已成为人类抗击肿瘤的成功典范。

基于HPV-DNA在宫颈癌患者中的高检出率, 我们猜测这些患者外周循环血中应该也存在HPV的痕迹, 并且, 同样是病毒致病的鼻咽癌, 监测血液EB病毒拷贝数已作为常规临床指标。因此, 我们进一步猜想它可否作为监测宫颈癌患者肿瘤进展的预后指标; 另一方面, 由于HPV预防性疫苗已取得了显著进展, 那么该病毒是否也可成为一个治疗靶点? 针对于HPV的免疫治疗是否

可广泛应用于临床?

### 1 宫颈癌发病机制与外周血中HPV存在的特异性

高危HPV编码的E6和E7蛋白是HPV导致宫颈癌的重要癌蛋白，E2开放读码框具有负性调节E6和E7癌蛋白表达的功能，当高危HPV-DNA整合入宿主DNA时，HPV双链DNA通常在E2发生断裂，导致其对E6和E7癌蛋白的负性调节功能丧失，加快细胞的恶性转化<sup>[6]</sup>。

HPV是黏膜侵袭性病毒，可潜伏于宫颈黏膜基底细胞中，早期较难入血。从高危HPV感染到宫颈浸润癌的发生通常认为需要10年以上的时间，期间存在不同程度的宫颈癌前病变，其中，在大多数宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I级及部分II级组织中，HPV主要以游离病毒的形式存在，大部分患者可以不经治疗而自然消退，而在CIN III级或宫颈浸润癌组织中，HPV-DNA通常已整合入宿主DNA，此时病变无法逆转，表明高危HPV-DNA整合入宿主DNA是宫颈癌发生的晚期事件，同时也是不可逆的关键步骤<sup>[7]</sup>。

对于HPV的嵌入位点，Hu等<sup>[8]</sup>通过大样本的全基因组测序及高通量病毒嵌入检测研究发现，HPV病毒的嵌入呈现多样性，除了之前已被证实的6个位点POU5F1B(9.7%)、FHIT(8.7%)、KLF12(7.8%)、KLF5(6.8%)、LRP1B(5.8%)和LEPREL1(4.9%)外，还发现3个新的嵌入热点HMGA2(7.8%)、DLG2(4.9%)和SEMA3D(4.9%)，并证实HPV病毒可能通过MHs介导的DNA修复通路，如FoSTeS/MMBIR方式插入人类染色体。

HPV较难入血与易嵌入宿主DNA的生物学特性是它在外周血中检出困难的生物学原因。相信随着检测技术灵敏度的提高，该瓶颈终将被克服，HPV也可作为宫颈癌患者肿瘤负荷监测及预后的指标，相关研究目前已取得了一定进展。

### 2 HPV的血液检测现状

早期相关文献报道提示，宫颈浸润癌患者血液中HPV DNA的检出范围为7%~45%<sup>[9-11]</sup>。周

围血中HPV的低检出率与HPV整合入人体DNA的生物性质密不可分。对于整合入宿主DNA的HPV检测一直是一个亟待解决的关键问题。人们先后研发了多种整合入宿主DNA的HPV检测方法<sup>[12-14]</sup>。目前较被认可的是通过二代测序的方式，将测序结果与NCBI数据库中HPV序列进行比对，一般比对E6或E7片段<sup>[14]</sup>。首先在聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的基础之上进行质谱分析，筛除发生错配的产物，接下来通过BioBloom Tools<sup>[15]</sup>进行RNA-Seq数据读取，再通过PathSeq<sup>[16]</sup>进行RNA-Seq中的病原体检测。该方法的灵敏度及特异度均相对较高，在宫颈癌患者中的检出率为95%<sup>[14]</sup>。

另外，通过实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, RTFQ-PCR)的方法分别检测组织中HPV的肿瘤基因E6、E7及E2，通过其比值来判断HPV的嵌入或整合状态<sup>[17]</sup>。通过该研究方法发现，在宫颈癌的早期即可发生HPV病毒的嵌入，6例CIN I级患者中有5例(83.3%)存在HPV-16的嵌入，在CIN II~III级中有10例(90.9%)患者存在HPV-16的嵌入<sup>[18]</sup>。

连接介导PCR可更加直观的检出血清中嵌入的HPV片段<sup>[19]</sup>，该方法的检测位点是HPV整合入宿主DNA后的连接区域，在16例已知HPV16/18感染及嵌入位点的宫颈癌患者外周循环血清中使用该检测方法<sup>[20]</sup>，被检出的片段即为循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)，通过该方法可排除外周循环血中游离HPV对研究造成的影响，直观的研究ctDNA与患者预后之间的关系。

### 3 血液中HPV的检测与患者预后

部分研究认为，宫颈癌患者血液中HPV的检测可作为疾病进展的DNA标志物<sup>[11,20-23]</sup>。Widschwendter等<sup>[11]</sup>对24例宫颈癌组织和血清中检出同型别HPV的患者进行随访，其中有13例患者发生局部或远处的复发转移，4例患者在初始治疗中出现疾病的持续或进展。Ho等<sup>[22]</sup>研究发现，10例宫颈癌患者中有8例患者血清中可检测出HPV DNA，并且在治疗3个月后发现复发，其中有87.5%(7/8)的患者发生了远

处转移。Campitelli等<sup>[20]</sup>检测了13例肿瘤大于20 mm的宫颈癌患者,发现其中有11例的血清中可检出HPV的ctDNA,通过对血清中HPV DNA的检测发现,患者血清中的ctDNA浓度与肿瘤的动态变化具有相关性。Pornthanasem等<sup>[21]</sup>研究发现,在50例宫颈癌组织HPV阳性的患者中,有6例血浆中可检出HPV,其中有3例是IVB期或已发生远处的复发转移,且复发转移患者血浆中HPV的检出拷贝数是未发生复发转移患者的3倍。在1年的随访过程中,同期别血浆中检出HPV的患者其复发率较血浆中未检出该病毒的患者高。在CIN患者血清中,很难检测出HPV<sup>[22]</sup>。以上研究显示,外周循环血中HPV的检出与患者的不良预后相关,提示其ctDNA可作为晚期宫颈癌患者复发转移检测的肿瘤指标。

进一步将HPV分型与疾病进展程度进行分析,发现随着宫颈癌患者FIGO分期的升高,HPV16的病毒载量会随之升高,但是HPV18感染的人群中无此现象<sup>[22,24-25]</sup>。也有研究表明,血浆中HPV16-DNA与FIGO分期(P1/4 0.733)、肿瘤分级(P1/4 0.879)和病理类型(P1/4 0.733)之间没有相关性<sup>[23]</sup>。研究结果的不一致性可能在于诸多研究不能成功区分外周循环血中游离的HPV和嵌入的HPV。

#### 4 血液中HPV检出的治疗意义

如前文所述,HPV是宫颈癌的主要致病因素,E6、E7为其主要致癌蛋白,能够通过多条肿瘤信号通路的激活导致癌症的发生。外周循环血中HPV的检出为宫颈癌的全身化疗,特别是HPV的靶向治疗及免疫治疗提供了更高效的理论基础。

##### 4.1 HPV的靶向治疗

通过对HPV相关分子通路的分析发现,HPV E6蛋白的表达可以抑制PDZ、p53的表达并可靶向作用于几个miRNA;同时也可激活Wet、Notch和Akt通路。E7蛋白也可激活PI3K/Akt信号通路<sup>[26]</sup>。这些通路的激活可引起肿瘤的发生、发展,如果可以在E6、E7蛋白水平阻断其与肿瘤相关通路之间的相互作用,即可降低HPV的致肿瘤性,从而起到治疗的效果。

PI3K/Akt通路是一个常见的肿瘤生存调节通路<sup>[27]</sup>,E6蛋白可激活该通路<sup>[28]</sup>。有研究报告,在拉丁美洲宫颈癌患者中,PIK3CA的突变率为33%<sup>[29]</sup>;我国的数据显示,PIK3CA在宫颈癌中的突变率为13.6%<sup>[30]</sup>。

PAM(PI3K/AKT/mTOR)抑制剂是针对该通路的靶向制剂,雷帕霉素及依维莫司是针对乳腺癌内分泌治疗耐药患者的mTOR抑制剂,目前在临床上取得了较好的疗效<sup>[31]</sup>。该类药物在宫颈癌中尚未进行相关临床试验。

##### 4.2 HPV的免疫治疗

外周血T细胞会编码表达一种肿瘤靶向的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)及T细胞受体(T cell receptor, TCR),因为上皮性肿瘤的靶向抗原同时存在于肿瘤和正常组织中,所以该研究受限于重要组织的靶向非肿瘤毒性作用<sup>[32]</sup>。这种毒性作用可通过靶向于健康组织不表达的抗原来避免,但是在上皮性肿瘤中,恶性肿瘤独有的且大量表达的抗原极少见<sup>[32-33]</sup>。HPV的E6/E7肿瘤蛋白是T细胞靶向治疗的理想靶点。它们表达于HPV+的宫颈癌患者肿瘤细胞中,并且对患者生存率具有较大影响;同时,在健康组织中不表达<sup>[33]</sup>。

在晚期及复发的肿瘤患者中,肿瘤特异度T细胞的过继性转移治疗(adoptive T-cell Therapy, ACT)是一非常有前景的免疫治疗模式。

Stevanovic等<sup>[34]</sup>报道了一项在9例转移性宫颈癌患者中进行ACT治疗的研究,其中有3例患者表现出肿瘤缓解(2例完全缓解,1例部分缓解),2例完全缓解的患者治疗结束后的无进展生存期(progression-free survival, PFS)分别为22和15个月,1例部分缓解的患者PFS为3个月。针对这一结果,Draper等<sup>[35]</sup>在分子水平上对这一现象进行了解释验证,证实了有E6特异性TCR的T细胞能够靶向杀伤HPV16+的肿瘤细胞。HPV16阳性的宫颈癌患者中,血液和肿瘤组织中可分离出HPV16特异性T细胞的概率分别为30%<sup>[36]</sup>和35%<sup>[37]</sup>。

#### 5 展望

虽然有证据证实,宫颈癌患者外周血中

HPV ctDNA的检出与患者预后相关,但是如何研发低成本高敏感性的检测方法是目前亟待解决的问题。考虑到HPV特殊的生物学特征,可通过测序的方式对外周循环血液中的ctDNA进行检测,为宫颈癌患者的预后提供精准预测。根据宫颈癌HPV的高致病性及相关通路的研究结果,可以在以下两个方面进行宫颈癌靶向药物的尝试:可针对HPV的E6、E7蛋白进行靶向药物的设计,特异性杀伤表达E6、E7的肿瘤细胞;另外根据*PIK3CA*的突变率,可探究PAM靶向抑制剂在宫颈癌患者中的临床应用。HPV在宫颈癌中不仅是主要的致病因素,其血液学检测还与患者预后息息相关;同时也是靶向治疗的首选靶点,需要通过更多的研究去证实。

#### [参 考 文 献]

- [ 1 ] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [ J ] . CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115–132.
- [ 2 ] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [ J ] . Nat Rev Cancer, 2002, 2(5): 342–350.
- [ 3 ] XI R, PAN S, CHEN X, et al. HPV16 E6–E7 induces cancer stem-like cells phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma through the activation of PI3K/Akt signaling pathway in vitro and in vivo [ J ] . Oncotarget, 2016, 7(35): 57050–57065.
- [ 4 ] JOURA E A, GIULIANO A R, IVERSEN O E, et al. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women [ J ] . N Engl J Med, 2015, 372(8): 711–723.
- [ 5 ] Practice Bulletin No. 157: Cervical Cancer Screening and Prevention [ J ] . Obstet Gynecol, 2016, 127(1): e1–e20.
- [ 6 ] PETT M R, ALAZAWI W O F, ROBERTS I, et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes [ J ] . Cancer Res, 2004, 64(4): 1359–1368.
- [ 7 ] WOODMAN C B J, COLLINS S I, YOUNG L S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues [ J ] . Nat Rev Cancer, 2007, 7(1): 11–22.
- [ 8 ] HU Z, ZHU D, WANG W, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism [ J ] . Nat Genet, 2015, 47(2): 158–163.
- [ 9 ] DONG S M, PAI S I, RHA S H, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma [ J ] . Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002, 11(1): 3–6.
- [ 10 ] LIU V W S, TSANG P, YIP A, et al. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients [ J ] . Gynecol Oncol, 2001, 82(2): 269–272.
- [ 11 ] WIDSCHWENDTER A, BLASSNIG A, WIEDEMAIR A, et al. Human papillomavirus DNA in sera of cervical cancer patients as tumor marker [ J ] . Cancer Lett, 2003, 202(2): 231–239.
- [ 12 ] DAS P, THOMAS A, MAHANTSHETTY U, et al. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women [ J ] . PLoS One, 2012, 7(7): e41012–e41020.
- [ 13 ] HO C M, CHIEN T Y, HUANG S H, et al. Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer [ J ] . Gynecol Oncol, 2006, 102(1): 54–60.
- [ 14 ] CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, ANALYTICAL BIOLOGICAL SERVICES, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer [ J ] . Nature, 2017, 543(7645): 378–384.
- [ 15 ] CHU J, SADEGHI S, RAYMOND A, et al. BioBloom tools: fast, accurate and memory-efficient host species sequence screening using bloom filters [ J ] . Bioinformatics, 2014, 30(23): 3402–3404.
- [ 16 ] KOSTIC A D, OJESINA A I, PEDAMALLU C S, et al. PathSeq: software to identify or discover microbes by deep sequencing of human tissue [ J ] . Nat Biotechnol, 2011, 29(5): 393–396.
- [ 17 ] LIM M Y, DAHLSTROM K R, STURGIS E M, et al. Human papillomavirus integration pattern and demographic, clinical, and survival characteristics of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma [ J ] . Head Neck, 2016, 38(8): 1139–1144.
- [ 18 ] HUANG L W, CHAO S L, LEE B H. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis [ J ] . J Clin Pathol, 2008, 61(5): 627–631.
- [ 19 ] LUFT F, KLAES R, NEES M, et al. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells [ J ] . Int J Cancer, 2001, 92(1): 9–17.
- [ 20 ] CAMPITELLI M, JEANNOT E, PETER M, et al. Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients [ J ] . PLoS One, 2012, 7(8): e43393–e43397.
- [ 21 ] PORNTHANAKASEM W, SHOTELERSUK K, TERMRUNGRUANGLERT W, et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer [ J ] . BMC Cancer, 2001, 1: 2.
- [ 22 ] HO C M, YANG S S, CHIEN T Y, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients [ J ] . Gynecol Oncol, 2005, 99(3): 615–621.

- [ 23 ] YANG H J, LIU V W S, TSANG P C K, et al. Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer [ J ] . *Int J Gynecol Cancer*, 2004, 14(5): 903-910.
- [ 24 ] SWAN D C, TUCKER R A, TORTOLERO-LUNA G, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type [ J ] . *J Clin Microbiol*, 1999, 37(4): 1030-1034.
- [ 25 ] GRAVITT P E, BURK R D, LORINCZ A, et al. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation [ J ] . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12(6): 477-484.
- [ 26 ] CHEN J. Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications [ J ] . *Rev Med Virol*, 2015, 25 Suppl 1: 24-53.
- [ 27 ] CHEN J, ZHAO K N, LI R, et al. Activation of PI3K/Akt/mTOR pathway and dual inhibitors of PI3K and mTOR in endometrial cancer [ J ] . *Curr Med Chem*, 2014, 21(26): 3070-3080.
- [ 28 ] SPANGLE J M, MUNGER K. The HPV16 E6 oncoprotein causes prolonged receptor protein tyrosine kinase signaling and enhances internalization of phosphorylated receptor species [ J ] . *PLoS Pathog*, 2013, 9(3): e1003237-e1003248.
- [ 29 ] LOU H, VILLAGRAN G, BOLAND J F, et al. Genome analysis of Latin American cervical cancer: frequent activation of the PIK3CA pathway [ J ] . *Clin Cancer Res*, 2015, 21(23): 5360-5370.
- [ 30 ] XIANG L, JIANG W, LI J, et al. PIK3CA mutation analysis in Chinese patients with surgically resected cervical cancer [ J ] . *Sci Rep*, 2015, 5: 14035-14042.
- [ 31 ] KAKLAMANI V G. Clinical implications of the progression-free survival endpoint for treatment of hormone receptor-positive advanced breast cancer [ J ] . *Oncologist*, 2016, 21(8): 922-930.
- [ 32 ] HINRICHS C S, RESTIFO N P. Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy [ J ] . *Nat Biotechnol*, 2013, 31(11): 999-1008.
- [ 33 ] HINRICHS C S, ROSENBERG S A. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer [ J ] . *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 56-71.
- [ 34 ] STEVANOVIĆ S, DRAPER L M, LANGHAN M M, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells [ J ] . *J Clin Oncol*, 2015, 33(14): 1543-1550.
- [ 35 ] DRAPER L M, KWONG M L, GROS A, et al. Targeting of HPV-16+ epithelial cancer cells by TCR gene engineered T cells directed against E6 [ J ] . *Clin Cancer Res*, 2015, 21(19): 4431-4439.
- [ 36 ] HEUSINKVELD M, WELTERS M J, VAN POELGEEST M I, et al. The detection of circulating human papillomavirus-specific T cells is associated with improved survival of patients with deeply infiltrating tumors [ J ] . *Int J Cancer*, 2011, 128(2): 379-389.
- [ 37 ] PIERSMA S J, WELTERS M J, VAN DER HULST J M, et al. Human papilloma virus specific T cells infiltrating cervical cancer and draining lymph nodes show remarkably frequent use of HLA-DQ and -DP as a restriction element [ J ] . *Int J Cancer*, 2008, 122(3): 486-494.

( 收稿日期: 2017-05-12 修回日期: 2017-06-22 )