

# 人乳头瘤病毒感染与原发肺癌相关性研究

熊为旻 何斐 肖仁栋 俞婷婷 张鑫 刘志强 徐秋萍 蔡琳

350108 福州,福建医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(熊为旻、何斐、俞婷婷、张鑫、刘志强、徐秋萍、蔡琳); 350001 福州,福建医科大学附属第一医院胸外科(肖仁栋)

通信作者:蔡琳, Email:cailin\_cn@hotmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.12.020

**【摘要】** 目的 探索 HPV 感染与原发肺癌的关联。方法 检测 83 对匹配的肺癌和癌旁正常组织中 HPV 感染情况。采用 HPV 高保守 L1 区 PCR 扩增和特异探针反向杂交相结合的方法,检测 21 种临床相关的 HPV 型别。应用配对  $\chi^2$  检验分析肺癌与癌旁正常组织 HPV 检出率差异。应用  $\chi^2$  检验及确切概率法分析不同性别、年龄、组织学类型、临床分期、吸烟和饮酒情况下肺癌组织 HPV 检出率差异。结果 7 份肺癌组织和 6 份癌旁正常组织检出 HPV, HPV 阳性率在肺癌与癌旁正常组织间差异无统计学意义 ( $P > 0.999$ )。在不同性别、年龄、吸烟、饮酒,不同病理类型、临床分期和淋巴结转移情况下,肺癌组织 HPV 检出率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 在福建人群中未发现 HPV 感染与原发肺癌发生风险有明显关联。

**【关键词】** 人类乳头瘤病毒; 肿瘤, 肺; 生物标志

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81172766, 81402738); 福建省卫生计生委青年科研项目 (2014-1-37); 福建省卫生教育联合攻关项目 (WKJ-FJ-18); 福建医科大学博士启动基金项目 (2014MP006)

**Association between human papillomavirus infection and lung cancer** Xiong Weimin, He Fei, Xiao Rendong, Yu Tingting, Zhang Xin, Liu Zhiqiang, Xu Qiuping, Cai Lin  
Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China (Xiong WM, He F, Yu TT, Zhang X, Liu ZQ, Xu QP, Cai L); Department of Chest Surgery, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China (Xiao RD)  
Corresponding author: Cai Lin, Email: cailin\_cn@hotmail.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the association between human papillomavirus (HPV) and lung cancer. **Methods** We examined a series of 83 lung cancer patients with HPV DNA in both lung tumor specimens and adjacent normal specimens from Fujian province. Twenty-one of the most clinically relevant HPV types from the highly conserved L1 region of the viral genome were analyzed, using the PCR amplification and were followed by reverse hybridization with specific probes. Chi-square test of paired design was used to test the difference of HPV positive rates between lung cancer specimens and adjacent normal specimens. Chi-square test and Fisher's exact test were used to analyze the differences of HPV positive rate of tumor specimens on factors as gender, age, histological subtype, clinical stage, smoking status and alcohol consumption. **Results** HPV was detected in 7 of the 83 tumor specimens and in 6 of the paired normal lung tissues. There was no significant correlation between HPV and lung cancer ( $P > 0.999$ ). Neither demographic characteristics nor clinical features were found with significant differences on HPV in lung cancer tissues ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Our data showed that HPV was not significantly associated with the risk of lung cancer in Fujian province.

**【Key words】** Human papillomavirus; Lung neoplasms; Biomarker

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (81172766, 81402738); Youth Research Project of Health and Family Planning Commission in Fujian Province (2014-1-37); Joint Project of Health Education in Fujian Province (WKJ-FJ-18); Doctors' Start-up Foundation Projects of Fujian Medical University (2014MP006)

自 1979 年 Syrjänen<sup>[1]</sup>在支气管肺癌组织中发现 HPV 及上皮角化形态学改变后, HPV 感染在肺癌发生发展中的作用引起广泛争议。既往研究显示肺癌中 HPV 感染率在 0 ~ 78.3%<sup>[2]</sup>。由于正常肺组织难以获得, 大部分研究仅检测肺癌组织中的 HPV 感染情况<sup>[3]</sup>。为了探索 HPV 感染与福建人群肺癌的关系, 本研究检测匹配的肺癌和癌旁正常组织中 HPV 感染情况。

**对象与方法**

1. 研究对象: 病例来源于福建医科大学附属第一医院胸外科 2013 年 10 月至 2015 年 5 月的原发性肺癌新发病例。行手术时切取肺部癌组织和癌旁正常组织作为自身对照, 所有组织标本在术后 10 min 内放入冻存管存于 -80 °C 冰箱。本研究经过福建医科大学伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。

**2. 研究方法:**

(1) 资料收集: 查阅患者的电子病历, 收集临床信息(病理分型、临床分期、肿瘤发生部位、淋巴结转移等), 同时面对面询问患者的吸烟饮酒情况。吸烟定义为累计吸烟 > 100 支; 吸烟包-年 = 每日吸烟支数 ÷ 20 × 吸烟年数; 饮酒定义为每月饮酒精饮料至少 1 次<sup>[4]</sup>。

(2) 样本检测: 癌和癌旁组织的基因组 DNA 利用黏膜细胞 DNA 提取试剂盒(广东凯普生物科技股份有限公司)提取, 采用 DeNovix DS-11 超微量紫外可见分光光度计对抽提的 DNA 产物的浓度及纯度进行定量测定。采用 21 种 HPV 分型检测试剂盒(广东凯普生物科技股份有限公司)检测 HPV 感染情况, 包括 15 种高危型别(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68)和 6 种低危型别 [HPV6、11、42、43、44、CP8304(81)]。

为防止交叉污染, 整个过程分为 3 个独立区域: 样品准备和 DNA 提取区、PCR 扩增区以及导流杂交检测区。每张杂交膜上具有双质控点, Biotin 点 (DNA 对照) 及 IC 点 (监测 PCR 反应的有效性)。同时检测宫颈细胞刷样品作为阴性和阳性对照。

3. 统计学分析: 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。采用配对  $\chi^2$  检验比较肺癌与癌旁正常组织间 HPV 检出率差异。利用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法分析不同性别、年龄、组织学类型、临床分期、淋巴结转移、吸烟和饮酒情况的 HPV 检出率差异。所有 P 值基于双侧检验,  $\alpha = 0.05$ 。

**结 果**

1. 一般特征: 共有 83 例原发性肺癌病例, 确诊年龄为 38 ~ 82 (58.9 ± 9.8) 岁, 年龄 M 为 60 岁。其中鳞癌 20 例 (24.1%)、腺癌 55 例 (66.3%)、腺鳞癌 5 例 (6.0%)、大细胞癌 2 例 (2.4%)、小细胞癌 1 例 (1.2%); 47.0% 的病例是非吸烟者, 89.2% 的病例是非饮酒者 (表 1)。

**表 1** 83 例肺癌患者的一般人口学特征和临床特征

基本特征	病例数(构成比, %)	基本特征	病例数(构成比, %)
确诊年龄(岁)		临床分期	
≤60	43(51.8)	I	39(47.0)
>60	40(48.2)	II	18(21.7)
性别		III	23(27.7)
男	53(63.9)	IV	3(3.6)
女	30(36.1)	吸烟	
组织学类型		是	44(53.0)
腺癌	55(66.3)	否	39(47.0)
鳞癌	20(24.1)	饮酒	
其他 <sup>a</sup>	8(9.6)	是	9(10.8)
		否	74(89.2)

注: <sup>a</sup>包括腺鳞癌、大细胞癌和小细胞癌

2. 肺癌组织和癌旁正常组织 HPV 感染状况: 所有样本 Biotin 点及 IC 点同时显色。肺癌组织 HPV 阳性率为 8.4%, 7 例 HPV 阳性的具体型别: 3 例 HPV42, 2 例 HPV51, 1 例 HPV44, 1 例 HPV35、42、44 多重感染; 癌旁正常组织 HPV 阳性率为 7.2%, 6 例 HPV 阳性的具体型别: 3 例 HPV42、1 例 HPV18、1 例 HPV6、1 例 HPV18、33 多重感染。配对  $\chi^2$  检验结果显示, HPV 检出率在肺癌与癌旁正常组织间差异无统计学意义 ( $P > 0.999$ )。

3. 分层分析肺癌组织 HPV 感染状况: 分层分析不同性别、年龄、吸烟、饮酒, 不同病理类型、临床分期和淋巴结转移情况下肺癌组织 HPV 检出情况,  $\chi^2$  检验结果显示, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

**讨 论**

HPV 是一种无包膜双链环状嗜上皮小 DNA 病毒, 直径 55 nm, 由 20 面体衣壳包裹的基因组包括早期结构基因 (E1-E8) 和晚期结构基因 (L1、L2)<sup>[5]</sup>。近半个世纪以来, 科学家们对 HPV 的潜在致癌作用与各种癌症发生发展的关系进行了深入研究, 有研究证明 HPV 与生殖系统癌症密切相关<sup>[6]</sup>, 但与非生殖恶性肿瘤的关系尚未阐明, 尤其是呼吸系统恶性肿瘤。

表2 肺癌组织 HPV 感染分层分析

因素	HPV DNA		$\chi^2$ 值	P值
	阳性	阴性		
性别			0.717 <sup>a</sup>	0.397 <sup>a</sup>
男	6(85.7)	47(61.8)		
女	1(14.3)	29(38.2)		
年龄组(岁)			0.010 <sup>a</sup>	0.920 <sup>a</sup>
≤60	3(52.6)	40(42.9)		
>60	4(47.4)	36(57.1)		
吸烟			2.005 <sup>a</sup>	0.157 <sup>a</sup>
是	6(85.7)	38(50.0)		
否	1(14.3)	38(50.0)		
吸烟(包/年)			5.412	0.067
0	1(14.2)	38(50.0)		
≤20	3(42.9)	10(13.2)		
>20	3(42.9)	28(36.8)		
病理类型			0.831	0.660
腺癌	5(71.4)	50(65.8)		
鳞癌	2(28.6)	18(23.7)		
其他 <sup>b</sup>	0(0.0)	8(10.5)		
临床分期			2.410	0.492
I	2(28.6)	37(48.7)		
II	3(42.8)	15(19.7)		
III	2(28.6)	21(27.6)		
IV	0(0.0)	3(4.0)		
淋巴结转移			1.361 <sup>a</sup>	0.243 <sup>a</sup>
是	5(71.4)	31(40.8)		
否	2(28.6)	45(59.2)		
合计	7(100.0)	76(100.0)		

注:<sup>a</sup>如果有某个格子出现  $1 \leq T < 5$ , 用校正  $\chi^2$  检验;<sup>b</sup>包括腺鳞癌、大细胞癌和小细胞癌; 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%)

本研究对 83 对匹配的肺癌和癌旁正常组织的 HPV 感染情况进行检测, 结果显示, 肺癌组织 HPV 阳性率为 8.4%, 癌旁正常组织 HPV 阳性率为 7.2%, 两者 HPV 阳性率差异无统计学意义。Galvan 等<sup>[7]</sup>用相同原理的检测方法, 在 100 对匹配的肺癌和癌旁正常组织中均未检测到 HPV DNA, 认为 HPV 与肺癌发生风险无关联。有研究报道, 亚洲人群的肺癌组织 HPV 感染率为 28.1%(95%CI: 26.6%~30.3%)<sup>[8]</sup>, 调整年龄、性别、吸烟状况和肿瘤分期后, 亚洲人群的肺癌组织 HPV 感染率为 4.60%(95%CI: 3.48%~5.73%), 肺癌组织的 HPV 感染率高于正常肺组织 ( $OR=3.86, 95\%CI: 2.87 \sim 5.19$ )<sup>[9]</sup>。HPV 感染与肺癌的关系及关联强度的差异可能与年龄、性别、吸烟状况、肿瘤分期和地区 HPV 感染率不同有关。

本研究进一步对不同性别、年龄、吸烟、饮酒、病理类型、临床分期和淋巴结转移情况下肺癌组织 HPV 检出情况进行分层分析, 结果显示差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 与已有研究类似<sup>[9-10]</sup>。也有研究显示, 吸烟肺癌患者相比非吸烟患者有更高的

HPV 感染率<sup>[11]</sup>。实验研究也显示烟草烟雾中的致癌物会增加 HPV16/18 的病毒合成以及与 HPV16 E6/E7 癌蛋白的相互作用, 使肺细胞恶性增殖<sup>[12]</sup>。但 Hasegawa 等<sup>[8]</sup>对有关非吸烟非小细胞(型)肺癌(NSCLC)患者 HPV 感染率的研究进行系统综述显示, 东亚地区吸烟 NSCLC 患者与非吸烟患者的 HPV 感染率差异无统计学意义(33.9% vs. 39.2%)。本研究未发现肺癌患者吸烟状态与 HPV 感染有明显关联, 但还须加大样本进一步研究。有研究报道 HPV 感染与肺鳞癌关系密切<sup>[13]</sup>, 也有研究显示 HPV 阳性的肺癌组织均为腺癌<sup>[14]</sup>。但 Zhai 等<sup>[15]</sup>的 Meta 分析结果显示 HPV 感染、尤其是 HPV16/18 型别与肺鳞癌发生风险显著相关 ( $OR=9.78, 95\%CI: 6.28 \sim 15.22, P<0.001$ ), 而与肺腺癌无关。研究者认为, 吸烟可导致呼吸道正常柱状上皮鳞状化, HPV 对鳞状上皮黏膜具有高度亲嗜性, 能引起宿主黏膜异常增生<sup>[9]</sup>。本研究未发现不同组织病理类型 HPV 感染有明显差异, 可能与样本较小和腺癌病例所占比例较大有关。

目前有关 HPV 与肺癌关系的研究结论仍不一致, 可能的影响因素: ①检测样本的不同(血液或组织); ②样本的处理方法不同(新鲜冻存或石蜡包埋); ③检测方法不同(PCR 或 ISH); ④研究人群不同(年龄、性别、吸烟饮酒史、组织病理学类型、病理分期和种族等); ⑤样本采集的时间点不同(在治疗措施前、中、后)。故本研究采取了下列措施以提高结果的可靠性: ①标准化样本操作流程, 手术后标本立即放入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱冻存, 最大限度减少污染和核酸降解; ②采用导流杂交法检测多种 HPV 型别, 灵敏度及特异度均较高; ③采用癌旁正常组织作对照, 年龄、性别、吸烟饮酒史、组织病理学类型、临床分期和种族等均相同, 不存在基本人口学资料不同的情况; ④采集样本者均未在手术前采取放疗措施。

本研究未发现 HPV 感染与肺癌的明显关联。由于样本量较小及病例对照研究本身的时序局限性, 不能得出 HPV 感染与肺癌间的因果联系。为进一步探索在福建地区人群中, HPV 感染与原发性肺癌发生风险关系, 需要扩大样本量并采用更高级别的研究设计如巢式病例对照研究进行验证。

利益冲突 无

#### 参 考 文 献

- [1] Syrjänen KJ. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report of a case[J]. Respiration, 1979, 38(5): 299-304. DOI: 10.1159/000194095.
- [2] Srinivasan M, Taioli E, Ragin CC. Human papillomavirus type

16 and 18 in primary lung cancers—a meta-analysis [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(10): 1722–1728. DOI: 10.1093/carcin/bgp177.

[3] Syrjänen K. Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta-analysis [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(8): 3235–3250.

[4] Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: Results from two large case-control studies in high-incidence regions [J]. *Int J Epidemiol*, 2011, 40(2): 489–502. DOI: 10.1093/ije/dyq249.

[5] Psyrri A, Boutati E, Karageorgopoulou S. Human papillomavirus in head and neck cancers: Biology, prognosis, hope of treatment, and vaccines [J]. *Anticancer Drugs*, 2011, 22(7): 586–590. DOI: 10.1097/CAD.0b013e328344ec44.

[6] Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, et al. The role of human papillomavirus in nongenital cancers [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 57–81. DOI: 10.3322/caac.21167.

[7] Galvan A, Noci S, Taverna F, et al. Testing of human papillomavirus in lung cancer and non-tumor lung tissue [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 512. DOI: 10.1186/1471-2407-12-512.

[8] Hasegawa Y, Ando M, Kubo A, et al. Human papilloma virus in non-small cell lung cancer in never smokers: A systematic review of the literature [J]. *Lung Cancer*, 2014, 83(1): 8–13. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.10.002.

[9] Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, et al. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(6): 1267–1275. DOI: 10.1093/carcin/bgu038.

[10] Fei Y, Yang J, Hsieh WC, et al. Different human papillomavirus 16/18 infection in chinese non-small cell lung cancer patients living in wuhan, China [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2006, 36(5): 274–279. DOI: 10.1093/jjco/hyl017.

[11] Carpagnano GE, Koutelou A, Natalicchio MI, et al. HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(8): 1183–1190. DOI: 10.1038/bjc.2011.354.

[12] Muñoz JP, González C, Parra B, et al. Functional interaction between human papillomavirus type 16 e6 and e7 oncoproteins and cigarette smoke components in lung epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38178. DOI: 10.1371/journal.pone.0038178.

[13] 高志棣, 邵纬, 李黎, 等. 青岛地区人乳头状瘤病毒感染亚型与肺鳞状细胞癌的相关性 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2013, 25(2): 111–114. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616x.2013.02.007.

Gao ZD, Shao W, Li L, et al. The correlation between HPV infection subtype and lung squamous cell carcinoma in Qingdao region [J]. *Carcinogen Teratogen Mut*, 2013, 25(2): 111–114. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616x.2013.02.007.

[14] Joh J, Jenson AB, Moore GD, et al. Human papillomavirus (HPV) and merkel cell polyomavirus (mcpv) in non small cell lung cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 89(3): 222–226. DOI: 10.1016/j.yexmp.2010.08.001.

[15] Zhai K, Ding J, Shi HZ. HPV and lung cancer risk: a meta-analysis [J]. *J Clin Virol*, 2015, 63: 84–90. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.09.014.

(收稿日期:2016-07-13)  
(本文编辑:万玉立)

### 读者·作者·编者

### 本刊常用缩略语

本刊对以下较为熟悉的一些常用医学词汇将允许直接用缩写,即在文章中第一次出现时,可以不标注中文和英文全称。

OR	比值比	HBcAg	乙型肝炎核心抗原
RR	相对危险度	HBeAg	乙型肝炎e抗原
CI	可信区间	HBsAg	乙型肝炎表面抗原
$P_n$	第n百分位数	抗-HBs	乙型肝炎表面抗体
AIDS	艾滋病	抗-HBc	乙型肝炎核心抗体
HIV	艾滋病病毒	抗-HBe	乙型肝炎e抗体
MSM	男男性行为者	ALT	丙氨酸氨基转移酶
STD	性传播疾病	AST	天冬氨酸氨基转移酶
DNA	脱氧核糖核酸	HPV	人乳头瘤病毒
RNA	核糖核酸	DBP	舒张压
PCR	聚合酶链式反应	SBP	收缩压
RT-PCR	反转录聚合酶链式反应	BMI	体质指数
Ct值	每个反应管内荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数	MS	代谢综合征
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳	FPG	空腹血糖
PFGE	脉冲场凝胶电泳	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇
ELISA	酶联免疫吸附试验	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇
A值	吸光度值	TC	总胆固醇
GMT	几何平均滴度	TG	甘油三酯
HBV	乙型肝炎病毒	COPD	慢性阻塞性肺疾病
HCV	丙型肝炎病毒	CDC	疾病预防控制中心
HEV	戊型肝炎病毒	WHO	世界卫生组织