

人乳头瘤病毒致癌机制的研究进展

周晓波, 徐宁志

中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤研究所细胞生物学与分子生物研究室, 北京 100021

通信作者: 徐宁志 电话: 010-87788487, 传真: 010-67738220, 电子邮件: xningzhi@public.bta.net.cn

摘要: 人乳头瘤病毒 (HPV) 是一种常见的小 DNA 双链病毒, 主要感染上皮黏膜细胞, 引起良性乳头瘤病变和恶性肿瘤, 高危型 HPV 在子宫颈癌组织中的检出率可高达 90% 以上。E6 和 E7 是 HPV 最重要的两个病毒癌基因, 在病毒整合入宿主细胞基因组后可持续表达, 并分别与细胞内重要的抑癌基因 p53 和 pRb 的蛋白产物相互作用, 阻遏其对细胞增殖分化的负调控, 从而诱发细胞恶性转化。此外, E6 和 E7 表达还可影响基因组稳定性。

关键词: 人乳头瘤病毒; 病毒癌基因; 基因组稳定性; 增殖与分化

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)05-0673-05

Current Advances in the Mechanic Studies of Human Papillomavirus-induced Oncogenesis

ZHOU Xiao-bo, XU Ning-zhi

Department of Cellular and Molecular Biology, Cancer Institute, CAMS and PUMC, Beijing 100021, China

Corresponding author: XU Ning-zhi Tel: 010-87788487, Fax: 010-67738220, E-mail: xningzhi@public.bta.net.cn

ABSTRACT: Human papillomavirus (HPV) is a common small DNA tumor virus that specifically infects squamous epithelial cells and causes benign or malignant epithelial lesions such as genital warts and cervical cancer. High-risk HPV is detected in specimens of more than 90% of cervical cancer. In the 7.9 kb genome of HPV, E6 and E7 are the crucial viral oncoproteins that consistently maintained after viral integration into host cell genome. These two proteins interfere with cell proliferation and differentiation through interacting with important tumor suppressors including p53 and pRb. High-risk HPV E6/E7 also induces genomic instability, facilitating cell transformation.

Key words: human papillomavirus; viral oncogene; genomic instability; cell proliferation and cell differentiation

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(5): 673-677

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一种常见的小 DNA 双链病毒, 基因组小于 8 000 bp, 目前已发现 200 多种基因型。根据感染细胞不同, HPV 可分为表皮型与黏膜型两大类, 分别感染鳞状上皮与黏膜细胞。若根据 HPV 致癌能力的高低, 则可分为高危型与低危型。其中, 黏膜型中的低危型 HPV, 如常见的 HPV 6 和 11 等, 多与子宫颈良性乳头瘤病变及尖锐湿疣的发生相关; 而黏膜型中的高危型 HPV, 如 HPV 16 和 18 感染, 则常见于子宫颈

癌中^[1]。

自 1974 年起, HPV 在子宫颈癌中的作用就开始受到关注, 即子宫颈癌细胞涂片中出现“挖空”细胞 (Koilocytes) 被认为是 HPV 感染引起的重要病理改变之一^[2]。随后, 众多基因型的 HPV 在生殖道肿瘤中被陆续检出。1983 ~ 1984 年, HPV16 型与 18 型先后首次从子宫颈癌标本中分离出来, 从而引发了 HPV 研究领域的飞速发展。随后, 接踵而至的大量实验室研究, 从细胞生物学与分子生物学水平逐

步阐明了 HPV 在子宫颈癌病因学中的作用,如病毒癌基因 *E6* 和 *E7* 可以永生化宫颈上皮细胞;病毒环状分子特定的部位断裂开环而整合入宿主基因组,干扰宿主细胞基因组稳定性等。

进一步的流行病学调查资料显示,持续的 HPV 感染是子宫颈癌发生的最重要危险因素之一。而且,在与宫颈上皮具有一定形态结构相似的其他部位上皮组织肿瘤中,如:头颈部肿瘤、消化系统肿瘤和泌尿系统肿瘤等,也可检出 HPV。这些研究使人们更详细地认识了 HPV 天然状态感染宿主的过程。虽然,HPV 在除子宫颈癌之外的那些肿瘤中的确切作用仍有待进一步研究证实。

基于感染高危型 HPV 与子宫颈癌发生具有明确的因果关系,有关 HPV 致癌分子机理的基础研究大大加速了研制 HPV 疫苗的进程。第 1 个 HPV 预防性疫苗 Gardasil,已于 2006 年被美国食品药品监督管理局批准,用以预防高危型 HPV 16、18 以及低危型 HPV 6、11 的感染^[3]。但是,对于青春前期及青春期女孩注射疫苗预防常见 HPV 感染,诸多社会因素、伦理道德、认知观念所引发的争议有待妥善解决^[4~6]。更为重要的是,疫苗对于已经存在的病毒感染并没有任何治疗作用。而且,高危型病毒感染后直至肿瘤发生是一个十分缓慢的过程,往往需要几十年时间。因此,研究病毒癌蛋白分子致癌机制以更好地诠释其致癌过程,从而阻断其发生和发展极为重要。本文着重总结黏膜型高危 HPV 转化细胞分子机制的研究进展。

HPV 病毒天然感染上皮黏膜的过程

乳头瘤病毒攻击和感染的靶细胞主要是具有高度增殖能力的黏膜上皮细胞,即基底层细胞。但这层细胞之上常覆有几层不能增殖分裂的分化成熟细胞,所以一般只有物理屏障受损时,病毒才有机会进入基底层细胞。而宫颈鳞状-柱状上皮连接处的上皮细胞,结构类似基底层细胞,容易感染病毒。基底层细胞的 $\alpha 6\beta 4$ 整合素很可能是一种病毒受体,介导 HPV 进入基底细胞。

在基底层细胞中,病毒的大部分基因表达受抑制,仅表达一系列早期基因,如 *E5*、*E6* 和 *E7* 蛋白,使病毒借助宿主细胞 DNA 复制体系,维持病毒活性 DNA 复制。环状乳头瘤病毒的 7.9 kb 基因组可分为 3 部分:约 4 kb 的早期编码区与约 3 kb 的晚期编码

区,及 1 个约 1 kb 的非编码区。晚期区编码主要衣壳蛋白与次要衣壳蛋白。早期区域编码 6 个开放阅读框 (open reading frame, ORF),其产物 *E1*、*E2*、*E4*、*E5*、*E6* 和 *E7* 均参与转录调控。非编码区是病毒调节区域长控制区 (long control region, LCR),起增强子的作用。

当病毒随宿主细胞进入基底层之上的表皮细胞时,病毒开始表达晚期基因产生的主要衣壳蛋白与次要衣壳蛋白,包装成熟病毒颗粒从细胞中释放出来,继续感染其他受损上皮。因此,病毒感染发生在基底层未分化的细胞,而病毒基因组的扩增、繁殖与包装成病毒颗粒,发生在感染上皮的终末分化层细胞中。病毒复制并非广泛干扰上皮宿主细胞的分化程序,而是将细胞的分化与增殖过程分割开来,使这些分化成熟的细胞仍具有 DNA 复制潜能,这与病毒癌基因产物 *E6* 和 *E7* 蛋白可以干扰细胞内重要蛋白 *P53*、*Rb* 和 *P21* 功能密不可分。

一般认为,HPV 的 DNA 在良性肿瘤和癌前病变中多以游离形式存在,而在恶性肿瘤中以单拷贝或多拷贝整合于细胞基因组中。病毒整合是恶性进展的一个重要标志。表达整合 HPV *E6/E7* 的细胞比表达游离病毒基因组的细胞具有更强的生长优势。病毒整合时,病毒基因组常从 *E2* 基因处断裂却保留了 HPV *E6* 和 *E7* 两个病毒癌基因。失去了 *E2* 转录抑制子的表达,造成 HPV *E6/E7* 表达上调,直接有利于恶性转化过程。与之相应的是,如在宫颈癌细胞系中重新表达 *E2* 蛋白,则可导致 *E6* 和 *E7* 表达降低,从而部分逆转肿瘤恶性表型。

HPV 病毒癌基因的生物學功能

肿瘤病毒常通过干扰细胞内几套重要信号传导通路而转化细胞,如:细胞周期调控、基因组稳定性及端粒酶活性。而与 SV40 病毒的大 T 抗原类似,HPV *E6* 和 *E7* 分别降解并失活细胞内重要的肿瘤抑癌基因 *p53* 与 *pRb* 的蛋白产物^[7~9],进而干扰正常细胞周期的检验点功能,显著增加基因组不稳定性,从而加速细胞恶性转化。通过重新表达 *E2* 蛋白,或应用反义核酸,以及 RNAi 技术降低 HPV *E6* 和 *E7* 表达后,可引起 HPV 阳性的细胞生长明显变慢,说明高危型 HPV 感染后导致细胞恶性增殖主要依赖 *E6* 和 *E7* 蛋白。*E6* 和 *E7* 蛋白主要通过与细胞周期蛋白相互作用,驱动分化成熟的细胞重新进入细胞周期

不断分裂增殖。而且,表达 HPV E6 和 E7 的细胞保持细胞基因组稳定性的能力减弱,E6 通过降解 P53 使细胞对 DNA 损伤、合成错误的识别纠正能力下降,导致基因结构错误的累积;E7 则通过诱导中心体合成异常增多,导致有丝分裂紊乱,出现非整倍体细胞,使细胞倾向恶性发展^[10]。除了最具恶性转化功能的病毒癌基因 E6 和 E7 外,高危型 HPV 的次要致癌基因编码 E5 蛋白,它在病毒感染早期较重要,可以与表皮生长因子受体结合促进细胞生长,还有试验表明 E5 可抑制 DNA 损伤诱导的细胞凋亡。最近研究还显示,HPV16 E5 是肿瘤排斥抗原,能诱导细胞毒 T 淋巴细胞的免疫活性^[11]。

对细胞周期的影响 高危型 HPV E6 可与细胞内多种蛋白相互作用。其中,E6 通过 E6 关联蛋白(E6 associated protein, E6-AP)与 P53 结合是最重要的功能之一。P53 是细胞内参与细胞周期调控、基因转录和凋亡调控的重要蛋白。E6 通过降解 P53 可影响细胞内多条信号途径。首先表现在细胞 G1/S 检验点失活。正常情况下,细胞内的 P53 半衰期很短,经由鼠双微基因 2 的人同源体(human homolog of MDM2, hMDM2)介导进入泛素水解途径降解。但在 HPV 阳性细胞中,主要靠 E6-AP 介导降解。出现 DNA 损伤或其他刺激时,正常细胞会激活 P53,从而抑制下游基因转录使细胞阻滞于 S 期,DNA 修复后方可继续进入细胞周期进行有丝分裂;但表达高危型 HPV E6 的细胞则通过降解 P53,使积累了损伤 DNA 的细胞越过 G1/S 检验点,细胞周期继续运转,最终导致基因组不稳定性。

HPV E7 蛋白仅有约 100 个氨基酸分子,本身没有内在的酶活性,但是,犹如其他肿瘤病毒癌蛋白一样,它们可以通过与细胞内的重要蛋白分子相互作用形成复合物,改变其功能进而影响细胞正常的增殖调节。E7 最主要的功能是使静止的 G₀ 期细胞进入细胞周期进行有丝分裂,主要通过两种作用方式:(1) E7 激活转录因子激活腺病毒 E2 基因(transcription factor activating adenovirus E2 gene, E2F)依赖性基因的转录表达;(2) E7 直接与周期调控蛋白相互作用,尤其是与周期素依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制分子相结合。

与腺病毒 E1A 蛋白及 SV40 病毒的大 T 抗原相似,HPV E7 可通过其氨基端的保守序列 LXCXE 与抑癌基因 pRb 编码的 pRb 蛋白及相关的 p107 和 p130 相互作用。pRb 是控制细胞 G1/S 检验点的重要调节

因子。正常情况下,G1 期低磷酸化的 pRb 与 E2F 结合作为转录抑制因子,而进入 S 期,Rb 磷酸化使其与 E2F 解离,游离的 E2F 可激活许多与 DNA 合成相关基因的转录。腺病毒的 E1A 蛋白、SV40 的大 T 抗原和高危 HPV E7 与 pRb 作用并降解 pRb 对病毒的转化功能十分重要。高危型 HPV E7 比低危型 HPV E7 更能有效结合 pRb,而且,仅高危型 HPV E7 能降解 pRb。G1/S 有关的蛋白 cyclinE、cyclinA、cdc25A 和 cdc6 均可由 E7 通过 pRb/E2F 途径而激活。而失去 pRb 结合功能的 LXCXE 区突变和氨基端 CR1 区突变,都是 E7 转化缺陷性的突变类型。

另一方面,E7 可抑制 CDK 抑制因子 P21 和 P27,两个上皮细胞分化过程中重要的细胞周期调节蛋白,推动细胞周期进行。表达 E7 的细胞中,出现细胞周期阻滞信号时(如上皮细胞分化、撤血清和无附着生长等),P21 核定位减少,CyclinA/cdk2 复合物活性不受抑制,细胞周期继续进行并进入 S 期。或者 E7 直接与 P21 形成复合物干扰 P21 功能。因为 P21 对上皮细胞周期阻滞与细胞分化均很重要,E7 干扰 P21 功能则将上皮细胞的分化与增殖完全分离开。

对基因组不稳定型的影响 大部分 HPV 感染仅引起良性病变,或在首次感染很多年后才进展为恶性病变。唯有其他细胞遗传学异常改变累积之后,HPV 感染才可能发展为恶性肿瘤。与之相一致的是,高危型 HPV 阳性的子宫颈重度不典型增生发展为子宫颈癌后,常有染色体 3q 特定区域的扩增。高危型 HPV E6 和 E7 蛋白协同作用可以通过诱导中心体异常使正常上皮细胞产生有丝分裂缺陷和非整倍体,细胞基因组不稳定性升高^[12,13]。

肿瘤发生还可以看作是基因组不稳定性的疾病。染色体非整倍性是肿瘤中最常见的基因组不稳定性表现,常由有丝分裂异常引起。在子宫颈癌中,出现异常的三极有丝分裂相是高危型 HPV 阳性的诊断指标之一;而有丝分裂时,对称的位于双极的纺锤体形成,对正确平均分配姐妹染色单体至关重要。中心体作为纺锤体极体合成的结果,与细胞有丝分裂周期密切相关。高危型 HPV E7 蛋白可诱导原发的中心粒异常合成,将中心体合成与有丝分裂周期分割开,最终导致中心体数目增加,出现多级有丝分裂及染色体非整倍性。因此除了阻断细胞正常监控机制外,即使游离表达高危型 HPV,细胞通常也会产生有丝分裂异常,这在很大程度上增加了恶性进

展的可能性。

表达 HPV 癌蛋白的细胞也有一些不依赖中心体的基因组不稳定性,如分裂后期桥的形成,多与 DNA 双链断裂、分裂滞后的染色体物质有关。表达 HPV E6/E7 的细胞出现的双链 DNA 断裂可有助于病毒整合,恶性转化。另外,高危型 HPV E6/E7 表达还会削弱细胞多级有丝分裂检验点功能。

对细胞防卫机制的影响 HPV 感染上皮细胞后,在分化成熟的细胞中诱导细胞和/或病毒 DNA 合成,同时环境中却没有有丝分裂原的刺激。这样条件下,给细胞传导了相互矛盾的生长信号,激活细胞防卫机制:trophic sentinel response,可通过不同途径,如细胞死亡、分化和衰老来清除这种异常增殖的细胞。在转基因鼠模型,HPV E7 过表达可引起细胞异常增殖分化,导致细胞死亡。在细胞培养中,与腺病毒 E1A、癌蛋白 c-Myc 类似,表达 HPV16 E7 的细胞在失去生长因子刺激的培养液中倾向于细胞死亡。整个过程是依赖于 P53 功能的,但并不完全通过细胞凋亡通路^[14,15]。

而高危型 HPV E6 可以失活 P53 而抵消 E7 激活细胞死亡通路的作用。E6 结合细胞内的泛素连接酶 E6-AP,使 P53 泛素化降解,不能转位入核,从而抑制 P53 发挥细胞阻滞与诱导凋亡的作用。另一方面,E6 还可以通过不依赖 P53 的途径影响凋亡,如 HPV18 E6 可通过 E6-AP 与一种在分化上皮高水平表达的前凋亡蛋白 Bak 相互作用介导其降解,而减少凋亡反应或直接干扰肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)受体与 Fas 相关的死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain, FADD)相互作用,抑制 TNF- α 诱导的细胞死亡。

其他基因转录的影响 除了影响受 P53 调节的基因转录,E6 可与 P300/CBP 相互作用抑制 P300/CBP 介导的转录激活,进而影响下游靶基因,包括参与免疫系统信号传导的基因,如白介素 6 与 8 的活性转录。而且,HPV16 E6 还可通过不依赖 P53 的方式激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的转录,促进肿瘤新生血管形成与肿瘤转移。

E7 除了激活 *E2F* 调节基因的转录使感染细胞合成 DNA 进入 S 期外,还需要调节其他基因来帮助病毒基因组的复制和表达,如:E7 与 TATA-盒结合蛋白 TBP 相互作用抑制某些基因;E7 与 c-Jun/AP-1 转录因子结合,激活 AP-1 驱动基因转录;通过 *c-fos* 启

动子区的 cAMP 反应因子激活 *c-fos* 基因表达。HPV16 E7 有两个转录激活区:cd1 功能区与 C 端,都是不依赖 E2F/Rb 的。E7 还可与转录抑制子组蛋白去乙酰酶相互作用调节相关基因转录。

影响端粒酶活性 正常细胞有固定的定时器来保证细胞仅维持有限数量的细胞分裂,每一轮基因组复制后,染色体就会变短一些。染色体末端有一段重复序列,称为端粒,可随细胞分裂逐渐变短。端粒酶是有逆转录酶活性的核糖蛋白,可使端粒长度不变短。在大多数肿瘤细胞中,端粒酶都是高活性的,提示端粒酶对致癌过程的重要性。高危型 HPV E6 可以在转录水平上调细胞端粒酶催化亚基 hTERT 表达,促进细胞永生。其可能的机制是 E6 与 c-Myc 相互作用形成复合物,调节端粒酶表达^[16]。

综上所述,高危型 HPV 感染宿主细胞后,可通过 E6 和 E7 协同作用,改变细胞内关键的信号传导途径,使细胞 DNA 合成异常,逃逸监视和/或不受控制,同时抑制细胞有丝分裂检验点功能,使端粒不缩短,最终出现基因组不稳定性,形成恶性增殖的肿瘤细胞。

参 考 文 献

- [1] Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(1):11-22.
- [2] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(5):342-350.
- [3] New vaccine prevents cervical cancer [J]. FDA Consum, 2006, 40(5):37.
- [4] Sawaya GF, Smith-McCune K. HPV vaccination--more answers, more questions [J]. N Engl J Med, 2007, 356(19):1991-1993.
- [5] Constantine NA, Jerman P. Acceptance of human papillomavirus vaccination among Californian parents of daughters: a representative statewide analysis [J]. J Adolesc Health, 2007, 40(2):108-115.
- [6] Colgrove J. The ethics and politics of compulsory HPV vaccination [J]. N Engl J Med, 2006, 355(23):2389-2391.
- [7] Jones DL, Munger K. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators [J]. Semin Cancer Biol, 1996, 7(6):327-337.
- [8] Munger K, Werness BA, Dyson N, et al. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblas-

- toma tumor suppressor gene product [J]. EMBO J , 1989 , 8(13) :4099-4105.
- [9] Werness BA , Levine AJ , Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53 [J]. Science , 1990 , 248(4951) :76-79.
- [10] Duensing S , Munger K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors : modeling the origins of genomic instability [J]. Oncogene , 2002 , 21(40) :6241-6248.
- [11] Liu DW , Yang YC , Lin HF , *et al.* Cytotoxic T-lymphocyte responses to human papillomavirus type 16 E5 and E7 proteins and HLA-A * 0201-restricted T-cell peptides in cervical cancer patients [J]. J Virol , 2007 , 81(6) :2869-2879.
- [12] Munger K , Hayakawa H , Nguyen CL , *et al.* Viral carcinogenesis and genomic instability [J]. EXS , 2006 , 96 :179-199.
- [13] Duensing A , Liu Y , Spardy N , *et al.* RNA polymerase II transcription is required for human papillomavirus type 16 E7- and hydroxyurea-induced centriole overduplication [J]. Oncogene , 2007 , 26(2) :215-223.
- [14] Thompson DA , Zacny V , Belinsky GS , *et al.* The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts [J]. Oncogene , 2001 , 20(28) :3629-3640.
- [15] Eichten A , Rud DS , Grace M , *et al.* Molecular pathways executing the “ trophic sentinel ” response in HPV-16 E7-expressing normal human diploid fibroblasts upon growth factor deprivation [J]. Virology , 2004 , 319(1) :81-93.
- [16] Plug-DeMaggio AW , Sundsvold T , Wurscher MA , *et al.* Telomere erosion and chromosomal instability in cells expressing the HPV oncogene 16E6 [J]. Oncogene , 2004 , 23(20) :3561-3571.

(2007-06-08 收稿)