

人乳头瘤病毒及宫颈癌疫苗的研究 ——解读 2008 年诺贝尔生理学或医学奖

许雪梅*

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医院基础学院, 北京 100005)

摘要 德国科学家 Harald zur Hausen 因发现人乳头瘤病毒(HPV)导致子宫颈癌, 与另外两位科学家共享了 2008 年的诺贝尔生理学或医学奖。HPV 是一组小 DNA 病毒, 目前已鉴定有 118 型。HPV 感染人的上皮组织, 诱发产生包括妇女宫颈癌和尖锐湿疣在内的多种良恶性增生性疾病, 目前已有两种人乳头瘤病毒预防性疫苗上市。对病毒的生物学特性、致癌机制及相关的疫苗的研究进行综述。

关键词 人乳头瘤病毒, 宫颈癌, 疫苗

学科分类号 Q939.4, R73

2008 年 10 月 6 日, 瑞典皇家科学院诺贝尔奖委员会宣布将 2008 年度诺贝尔生理学 / 医学奖(The Nobel Prize in Physiology or Medicine)授予德国科学家楚尔·郝森(Harald zur Hausen)和两位法国科学家巴雷·西诺希(Françoise Barré-Sinoussi)和路克·蒙塔尼埃(Luc Montagnier), 以表彰 Harald zur Hausen “发现人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)导致子宫颈癌”及 Françoise Barré-Sinoussi 和 Luc Montagnier “在人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)研究方面作出的成就”。本年度的诺贝尔生理学或医学奖授予了导致严重人类疾病的 2 种病毒的发现。高危型 HPV 从肿瘤的启动、发生、发展及恶性表型的全过程都密切相关, 是与人类肿瘤关系最为密切的肿瘤病毒。HIV 感染后破坏机体的免疫系统, 导致机体的免疫力下降, 进而诱发多种感染及多种恶性肿瘤, 从广义上讲, HIV 病毒也属肿瘤病毒。Françoise Barré-Sinoussi 和 Luc Montagnier 的开创性研究证实艾滋病(AID)是由于 HIV 病毒感染所致, 极大地推进了艾滋病的科学防治与治疗。本文重点介绍人乳头瘤病毒与人类肿瘤发生的细胞分子生物学及肿瘤预防型疫苗的研究进展。

对病毒致癌作用的研究可追溯到 20 世纪。1911 年, Peyton Rous 等利用鸡梭形细胞肉瘤制备的无细胞滤液接种同一群鸡, 3 周后大部分被接种的鸡长出了梭形细胞肉瘤, 发现无细胞滤液中的“滤过性因子”可诱发肿瘤。1947 年 Claude 电镜分析发现这种滤过性因子其实就是病毒颗粒, 并将其命名为 Rous 肉瘤病毒。Rous 等的创新性研究开辟了肿瘤病毒病因学研究的新领域, 之后人们又发现了小鼠乳腺癌病毒等多种动物肿瘤病毒, 而人类肿瘤病毒的确立则是近二三十年的事, 主要原因是: a. 人类肿瘤病毒从病毒感染到最后转化为恶性肿瘤所需的时间长, 不像鸟类或啮齿类肿瘤病毒那样仅需几周或数月, 而是需有数年, 乃至数十年潜伏演变期。如 HPV 感染高峰在 20 岁左右的青春后期, 而宫颈癌发病的高峰期则在 40~50 岁。b. 和动物肿瘤病毒不同, 人类肿瘤病毒感染自身不足以诱发恶性肿瘤, 需要与其他致癌或促癌因子协同作

* 通讯联系人。

Tel: 010-65296932, E-mail: xuemeixu@vip.sina.com

收稿日期: 2008-10-13, 接受日期: 2008-10-14

用, 是一个多因素参与的漫长的过程, 最终才能导致恶性转化事件的发生. c. 许多人类肿瘤病毒缺乏理想的动物实验模型. 如 HPV 具有严格的宿主范围和组织特异性, 既难以通过体外培养的方法大量获得病毒颗粒, 又难以在体内进行病毒转化活性的实验. 因此限制了人类肿瘤病毒的研究进展. 1972 年 zur Hausen 在对宫颈癌危险因素探索研究的基础上首次提出宫颈癌可能由 HPV 感染引起, 其所在的实验室于 1977~1984 年从生殖道疣中克隆到 HPV-6、-11、-16 和 -18, 20 世纪 80~90 年代证实 HPV 感染可诱发包括宫颈癌在内的多种恶性肿瘤. zur Hausen 的探索研究确立了人类肿瘤可由病毒感染所致的概念, 大大推动人类肿瘤病毒的研究. 目前已明确的与人类肿瘤发生密切相关的肿瘤病毒至少有 6 种, 其中 4 种是 DNA 病毒, 分别是 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EB virus), 高危型人乳头瘤病毒 (high risk human papillomavirus, HR-HPV), 乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)及人类疱疹病毒 8 型(human herpesvirus-8, HHV-8), HHV-8 又称 Kaposi's 肉瘤疱疹病毒(Kaposi's sarcoma herpesvirus, KSHV), 另 2 种为 RNA 病毒: 即人类 T 淋巴细胞病毒 1 型(human T lymphotropic virus type 1)和丙肝病毒(hepatitis C virus). 约有 10% 的人类肿瘤的发生与病毒感染密切相关, 其中由 HPV 及 HBV 诱发的肿瘤占人类肿瘤 10%~15%, 占病毒诱发癌症的 80%.

1 HPV 的一般概况及生活周期

乳头瘤病毒(papillomavirus, PV)是一组无包膜的小 DNA 病毒, 属乳头瘤病毒科(papillomaviridae), 可感染人和多种高级脊椎动物的皮肤及黏膜上皮组织, 诱发产生的疣状增生乃至引发良恶性肿瘤. 不同种属的乳头瘤病毒具有严格的种属限制性, 不会出现物种间交叉感染, 而且具有严格的组织限制性, 即只能在相应种属的上皮组织内建立感染并完成病毒的生活周期. 因此 HPV 难以建立动物模型, 难以体外培养获得病毒颗粒, 限制了 HPV 的相关研究. 分子生物学及基因工程等相关技术的发展推动了乳头瘤病毒结构的研究. 不同种属的乳头瘤病毒具有相似的形态特征, 通常为直径 52~60 nm 的正十二面体, 核心为单拷贝的病毒基因组 DNA, 外壳由主要外壳蛋白(L1)和次要外壳蛋白(L2)组成, 5 个 L1 蛋白分子聚合形成

的五聚体(pentamer), 又称子粒(capsomer). 病毒外壳共有 72 个子粒(图 1), 以 $T=7$ 的正十二面体方式排列, 一个子粒可能与 5 个或者 6 个其他子粒相邻, 其中 12 个为五邻体, 位于面与面相邻的顶点, 另 60 个为六邻体, 构成 20 个面. L2 蛋白含量相对较少, 每个 HPV 中约有 12~36 个 L2, L2 N 端部分序列伸展在病毒的表面, 其他区域则主要位于病毒的内部, 与 L1 五聚体相结合, 一起将病毒基因组 DNA 包裹在内.

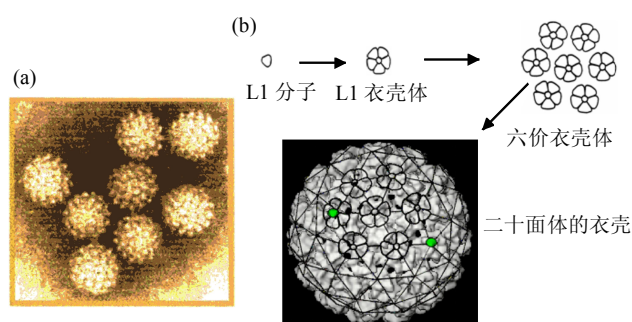


Fig. 1 Transmission electron micrograph of HPV (a) and the structure of HPV capsids (b)

图 1 乳头瘤病毒电镜图 (a) 及外壳结构示意图 (b)

病毒基因组为闭合环状双链 DNA 分子(图 2), 各型 HPV 基因组 DNA 长度在 7 200~8 000 bp 之间, 分为编码区和非编码区, 非编码区又称上游调控区(URR)或长控制区(LCR), 位于 L1 和 E6 之间,

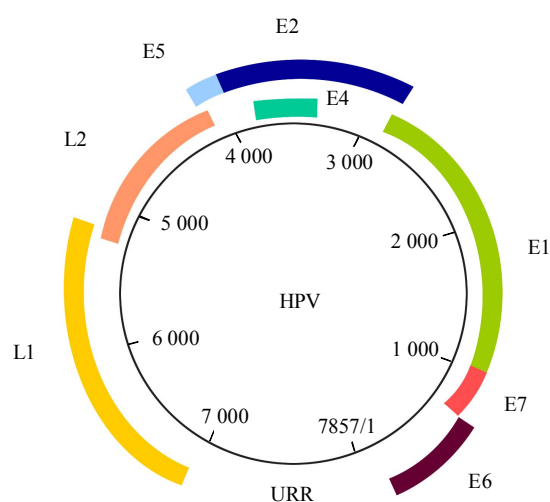


Fig. 2 The genomic structure of HPV

图 2 HPV 的基因结构示意图

长约 1 000 bp, 该区域含有 DNA 复制的起始位点和重要的转录调控元件, 如细胞分化特异性的增强子及各种结合位点、与核基质的结合点和与 E1、E2 蛋白的结合位点。所有蛋白质均由有义链依赖的多顺反子编码, 至少含有 8 个开放读码框架, 阅读框架之间可以部分或者完全重叠。编码区又分为早期区和晚期区, 早期区编码的蛋白有 E6、E7、E1(E8)、E2、E4(E3)和 E5。牛乳头瘤病毒(BPV)的早期区含有 E1~E8 共 8 个 ORF, HPV 的早期区一般不含 E3 和 E8 基因, 个别 HPV 缺少 E5 基因。早期区蛋白的功能主要涉及 DNA 复制、转录调节及细胞转化。其中 E4 参与细胞骨架的破坏, 利于病毒颗粒的出胞, 目前倾向于将其归类为晚期蛋白。E5、E6、E7 蛋白具有转化活性。E5 蛋白能与多种细胞生长因子受体结合, 通过活化多种细胞生长因子的受体信号通路刺激细胞增殖。E6 及 E7 蛋白是病毒的主要转化蛋白。E6 蛋白与 p53 结合使其功能失活, E7 与视网膜细胞瘤抑制蛋白家族(Rb, p107, p130)、组氨酸酰化酶(HDAC)、AP-1 转录因子、细胞周期素、细胞周期素依赖激酶(CDKs)和细胞周期素依赖激酶抑制物相互作用, 参与诱导细胞增殖、永生化和转化等过程。晚期区只编码 L1 和 L2 两种外壳蛋白。L1 蛋白是构成病毒外壳的主要成分, 其单体的核心部分为 8 股反向平行的 β 折叠卷(jelly-roll)构成貌似三明治样结构, 不同 β 折叠卷之间的部分呈绊状, 其中绝大部分绊伸展到五聚体和颗粒外表面, 是病毒型别特异性中和抗体依赖表位的所在区。核心结构域 C 端折叠成 α 螺旋和长螺线管结构, 从五聚体中心的核心结构域向侧面伸出, 参与五聚体的形成, 最后 C 端剩余的 30 个带正电的富含碱性氨基酸的无序结构, 则延伸到五聚体或病毒颗粒的内部, 参与病毒 DNA 相互作用, 利于病毒的包装。病毒外壳包装只对 DNA 的长度有要求, 只要 DNA 的大小合适, 不管基因序列如何, 均可被包裹入病毒外壳, 目前尚未发现乳头瘤病毒具有确定的包装信号。体外表表达的 L1 蛋白, 在 L2 蛋白存在和不存在的条件下, 都具有组装成病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)的能力, 分别形成 L1/L2-VLP 及 L1-VLP。

乳头瘤病毒基因组十分保守。病毒型别的区分和鉴定主要是依据 L1 基因序列的同源性比较进行的。如果 L1 基因的同源性与其他型别相比小于 90%, 则称其为一个新“型”(type), 如果同源性在 90%~98%之间, 则称其为“亚型”(subtype),

同源性在 98% 以上, 则称为型内“变异株(variant)”。另外以 L1 基因的结构分析为依据, 根据不同 PV 在进化树(phylogenetic tree)中亲源关系的远近也可将乳头瘤病毒进行分类, 该分类法的优点是便于将病毒归类, 但和第一种分类法一样, 也不能将生物学特性和致病性类似的病毒型别完全归为一类, 因此文献报道多见的是依据 HPV 的生物学特性和致病性的不同进行分类的。根据感染部位的不同将 HPV 分为嗜皮肤组和嗜黏膜组两大类: 嗜黏膜组又根据感染后诱发病变的良恶性不同, 分为: a. 诱发上皮组织恶性增生的高危型 HPV (high-risk human papillomavirus, HR-HPV), 如 HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 和 -82 计 15 种型别, 高危型 HPV 感染与宫颈癌及癌前病变的发生密切相关, 此外还与阴道、肛门、阴唇、阴茎及口咽癌及癌前病变的发生相关; b. 诱发上皮组织良性增生的低危型 HPV (low-risk human papillomavirus, LR-HPV), 目前已鉴定有 12 型, 有 HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81, -CP6108, 其中 HPV-6 和 -11 的感染与 90% 以上的生殖器疣和宫颈低级鳞状上皮增生病变的发生密切相关; c. 中间型或可疑高危型有 3 型, 分别是 HPV-26, -53 和 -66; d. 另外还有些型别诱发病变的良恶性的能力尚未确定, 如 HPV-34, -57 和 -83。多种型别的 HPV 混合感染及先后顺序感染其他型别的情况十分常见。

HPV 的生活周期与上皮组织的分化密切相关。HPV 经过皮肤及黏膜的微小创伤感染上皮的基底干细胞。病毒入侵细胞的受体目前尚不明确, 文献报道的可能受体有 $\alpha 6$ 整合素、CD16 和肝素(heparin)。由于乳头瘤病毒除了能与正常的鳞状上皮细胞结合之外, 还能够与许多种类型的细胞结合, 因此病毒嗜角化上皮的特性似乎不取决于细胞受体, 也间接说明基底细胞可能并不存在 HPV 特异的细胞受体。病毒入胞后迁移入细胞核然后脱衣壳, 进行病毒基因的转录及表达。感染早期仅表达少量的病毒复制相关蛋白 E1 和 E2, E1/E2 复合物与复制起点结合, 进一步募集宿主的 DNA 聚合酶及其他病毒 DNA 复制所需的相关蛋白, 启动病毒基因组的复制。随着基底细胞的分裂, 其中一个子代细胞离开基底层进入棘层, 病毒基因组以染色体外游离的形式存在, 且呈多拷贝, 每个感染细胞内病毒基因组的拷贝数多达 20~100 个。另外, 此阶

段病毒早期表达的 E5、E6、E7 蛋白在维持感染细胞处于活跃的增殖周期中起着主要的作用, 利于病毒基因组的复制转录. 随后感染细胞向表层迁移, 细胞开始渐进的程序化角化分化过程, 病毒基因组的扩增及细胞角质素的表达激活了病毒晚期启动子, 启动病毒晚期转录本编码蛋白 L1、L2 和 E4 的表达. 因此在高度分化的细胞内, 构成病毒的各种组分均已准备完毕, 病毒外壳蛋白的自组装和对病毒基因组的包裹同时发生, 形成完整的病毒, 表层细胞破裂后释放, 伺机进行下一轮的感染. 可以看出在病毒的生活周期中病毒基因组的复制事件发生在上皮组织的基部细胞内, 此时晚期蛋白的启动子处于抑制状态, 晚期启动子激活及病毒外壳蛋白合成发生在终末分化的表层角化上皮细胞, 因此病毒的颗粒包装只能在兼具病毒基因组及外壳蛋白的表层, 是上皮细胞分化依赖的.

2 HPV 的传播方式及致病性

HPV 主要经高度密切接触传播, 嗜皮肤性 HPV 主要经与感染者病变部位的密切接触而直接传播, 或与接触被污染的物体而间接传播, 另外感染者本身病变也可直接播散接种到身体的其他部位, 母婴之间垂直传播常见于生殖道感染 HPV 的母亲在分娩过程中传播给新生儿, 如儿童复发性乳头状瘤可能是患儿在分娩过程中从阴道分泌物获得 HPV-6 及 -11 感染所致. 生殖道 HPV 主要经性行为传播, 性活动时 HPV 可经黏膜 - 黏膜途径传播, 也可经生殖器周围的皮肤 - 皮肤途径传播.

目前 HPV 已分离鉴定出 118 型, 其中 2/3 为嗜皮肤组 HPV, 嗜黏膜型仅占 1/3. 嗜皮肤组 HPV 感染人角化上皮组织后最常见的病变就是皮肤疣, 包括寻常疣、扁平疣、跖疣等. 皮肤疣通常为表皮组织的良性增生, 愈后较好, 多数病变在 2 年内自行消退. 少数病例会持续更长的时间, 其病程长短、病变程度及是否恶性转化与机体的免疫状态密切相关. 疣状表皮发育不良 (epidermodysplasia verruciformis, EV) 是一种罕见的难以自愈的皮肤病, 常伴有明显的家族史, 约 1/3 病人数年后恶变为皮肤非黑色素皮肤癌, HPV-8 和 -38 阳性血清可提示 EV 恶变. EV 患者多伴有细胞免疫功能缺陷, 病灶中常可检出多种型别 HPV 混合感染. EV 恶变后常呈现原位癌或浸润性鳞癌的病理改变, 但生长缓慢, 很少发生转移. 因此皮肤型 HPV 对人类的危害较黏膜组 HPV 相对较小.

黏膜型 HPV 至今已分离鉴定了约 40 种, 其中 2/3 为高危型, 其余的 1/3 为低危型. 主要感染人泌尿生殖道、肛周及咽喉部的黏膜上皮, 诱发的病变包括各种疣状增生、鳞状上皮异型增生及恶性肿瘤. 病变发生的部位有宫颈、阴道、阴唇、阴户、外阴、阴茎、肛周皮肤及黏膜的移行区上皮, 还可发生在口腔、扁桃体及咽喉甚至支气管等. 病变主要为咽喉及泌尿生殖及肛周的各种疣状增生、癌前病变及良恶性增生, 有咽喉部的尖锐湿疣、儿童复发性乳头状瘤 (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis, JORRP)、口腔鳞癌、扁桃体癌、喉癌、生殖器疣 (尖锐湿疣 (condylomata acuminata))、肛周疣、鲍温氏病、宫颈及阴道和外阴黏膜的不典型增生、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌、肛周癌等. 良性病变中以男女两性均可发生的尖锐湿疣的发病率最高, 尖锐湿疣是我国第二位的高发性病, 主要由低危型 HPV 感染所致, 其中由 HPV-6 及 -11 感染所致的尖锐湿疣占总数的 90%. 恶性病变中以妇女宫颈癌的发病率最高, 全球范围内, 宫颈癌是第二位的妇女高发恶性肿瘤, 在某些落后地区是妇女第一位高发恶性肿瘤, 由高危型 HPV 感染所致, 其中 54% 以上的重度异型增生及宫颈癌由 HPV-16 引起, 10%~15% 由 HPV-18 引起. 各种感染诱发的黏膜上皮异型性增生的 HPV 感染型别可检出低危型和高危型, 但在中重度上皮异型增生病变中, 则为高危型 HPV, 且以 HPV-16 为主. 宫颈癌及其他部位的恶性病变, 都是高危型 HPV, 检出率最高的与宫颈癌前病变一致, 亦为 HPV-16. 此外, HPV-16 及 -18 型还是阴道癌、外阴癌、肛门和阴茎癌的重要病因. 其他部位的肿瘤, 如前列腺癌、卵巢癌、膀胱癌及子宫内膜癌似乎与 HPV 的感染没有关系, 另外 HPV 感染与肺癌发生的相关性也不显著.

3 慢性持续性高危型 HPV 感染是宫颈癌发生的主要诱因

由于妇女宫颈癌的发病率和死亡率远较其他 HPV 相关恶性肿瘤高, 因此 HPV 人群感染率的研究都是在女性中进行的. 结果显示, 性活跃期妇女 HPV 感染率最高, 约占 50%~80%, 其中 50% 为高危型 HPV 感染. HPV 感染无任何临床症状, 而且约 50%~90% 的 HPV 感染可在感染后的数月至 2 年内被免疫系统清除, 感染的平均持续时间为 8~12 个月, 其中低危型 HPV 感染的平均清除时

间为 5~6 个月, 高危型 HPV 为 8~14 个月, 而且 HPV-16 或 -18 的持续感染时间比其他型别更长. 如果在间隔一年以上的时间内连续两次检测出同一高危型的 HPV DNA 被认为是持续性感染. 只有慢性持续性高危型 HPV 感染, 才能最终演变为宫颈癌. 慢性持续性感染的易感因子包括免疫抑制、慢性炎症和某些 HLA 基因型等, 如 HIV 感染患者或器官移植病人及宫颈 HSV-2 及沙眼衣原体 CT 感染患者中, 宫颈 HPV 感染率、宫颈鳞状上皮内病变、宫颈癌及肛门癌的发病率均明显增高. 另外, 其他促癌因素还包括机体营养状况及宫颈局部环境因素. 特别值得注意的是, 几乎所有高危型别 HPV 即使病毒拷贝数很低时仍有恶性转化能力, 因此这一特点与其他人类致病病毒显著不同.

早在 19 世纪人们就发现妓女的宫颈癌发病率较高, 20 世纪通过对宫颈癌风险因素的流行病学研究, 1972 年 zur Hausen 首次提出宫颈癌可能由 HPV 感染引起, 其所在的实验室于 1977~1984 年从生殖道疣中克隆到 HPV-6、-11、-16 和 -18. 1976 年, Meisels 和 Fortin 提出, 宫颈分泌物中的凹空的角化细胞(koilocyte)是由感染 HPV 所致, 并指出良性的疣状病变不会进展为宫颈癌, 而宫颈上皮中度不典型病变可发展为宫颈癌. 这些观点后来都得到了证实. zur Hausen 等在 1981 年完成的 HPV 与宫颈癌关系的流行病学研究, 认为 HPV 可能在宫颈癌的发病中起重要作用. 他们的结论得到体外实验研究的支持. 中国医学科学院基础医学研究所李昆、司静懿等领导的研究组自 1984 年开始, 与中国预防医学科学院病毒学研究所的曾毅院士及德国海德堡肿瘤研究所的 zur Hausen 教授合作, 开展对我国宫颈癌的流行病学研究, 建立了多重引物 PCR 法, 对中国华北、东北、新疆、贵州、陕西等地区的大规模妇女宫颈癌患者的标本检测发现: HPV-16 是诱发我国妇女宫颈癌主要病毒型别, 在宫颈癌中阳性率高达 60.4%, 首次报道了中国妇女宫颈癌的发生与高危型 HPV 感染相关的文章^[1]. 随后又证实了高危型 HPV-E6 及 E7 蛋白是病毒主要转化蛋白, 其转化活性主要表现在 E6 或 E7 单独作用均可诱导 NIH3T3 等可传代细胞系在软琼脂上形成集落并生长, E7 单独诱导啮齿类动物原代细胞出现永生化, 协同 Hi-ras 及 fos 可完全转化原代啮齿细胞, E6/E7 协同作用可增加永生化啮齿类原代细胞的效率, 并可诱导人原代上皮细胞永生化(并建立了永生化的人宫颈上皮细胞系), 若再辅以

HSV 或 HCMV 协同, 可使永生化细胞出现恶性变. 封闭 HPV 感染阳性肿瘤细胞中 E6 和 E7 的表达, 可使瘤细胞的恶性表型向良性逆转. 20 世纪 80~90 年代的大量基础研究结果不仅基本揭示病毒癌基因的功能及 HPV 致癌机制, 同时在 HPV 的生活周期及预防性疫苗的研究方面都取得了实质性的进展. 这些研究结果从不同的角度上都证实了持续性高危型 HPV 感染是宫颈癌发生的主要诱因.

HPV 感染细胞及低级鳞状上皮内病变细胞中病毒常成游离状态, 随着细胞异型程度的加重, 高危型病毒基因组常发生断裂, 诱发病毒序列整合到宿主基因组中, 整合发生时, E1、E2、E5 及大部分的壳蛋白基因序列断裂丢失, 而 E6 和 E7 基因及其上游的 LCR 总是被选择性保留. E2 在产毒性感染阶段可抑制 E6 和 E7 的表达, 病毒基因的整合使这种抑制活性得以解除, 导致 E6 和 E7 的高水平表达, 外壳蛋白的表达缺失或仅部分低水平的表达. 另外, 如果细胞基因组中的启动子处于整合位点附近, 也有可能促进病毒癌基因的高水平表达. 与 HPV 感染细胞相比, 感染相关的高级的鳞状上皮内病变及恶性肿瘤中 E6 和 E7 蛋白的表达水平显著提高, 表明 E6 及 E7 蛋白的表达水平与病变的进展程度及细胞的恶性转化密切相关. HPV-18 及 -16 阳性的肿瘤细胞系及宫颈癌细胞中病毒基因序列整合形式存在的比例很高, 仅少量病毒基因组 DNA 呈游离的形式存在, E6 及 E7 癌蛋白呈高水平表达^[2]. 与诱发细胞恶性转变密切相关的最重要生物学事件是 E6 和 E7 癌蛋白对细胞内肿瘤抑癌基因的灭活. 高危型 HPV E7 蛋白与细胞周期负调控蛋白 pRB 结合并灭活其功能. E7 蛋白可与 E2F 生长因子竞争性的结合 pRB, 导致 E2F 释放, 诱发细胞从 G1 期到 S 期转换. 高危型 HPV E6 蛋白通过 E6-AP (E6 associated protein, E6-AP) 的介导, 促使 p53 蛋白进入泛素依赖的降解途径, 利于感染细胞克服因遗传物质损伤引发的细胞周期停止的压力. 研究发现端粒酶的激活与宫颈异型增生和宫颈癌的进展过程有关. E6 还可活化端粒酶, 抑制细胞凋亡. E5 虽然一般在病毒整合时丢失, 但仍有少量病毒基因组以染色体外的游离体存在, 可表达 E5 蛋白, 进而促进 EGF-R 家族成员蛋白和 ErbB4 蛋白的高水平表达, 传递促进细胞增殖信号, 参与感染细胞的恶性进展. 上述因素在不同的阶段协同作用, 使 HPV 感染细胞处于不断的细胞周期中, 进而利于病毒基因组的复制和繁殖, 并使

含有整合状态的病毒癌基因的细胞不断的增殖, 为病毒整合基因创造在宿主细胞内“繁殖”的机会, 在宿主因素及其他多种促癌因素的协同作用下, 使感染细胞基因变异不断累积, 最终使感染细胞走上了不归路——发生恶性转化. 低危型和高危型 HPV 的早期蛋白在生化和生物学上有很多不同的特性. 如 HPV-6/-11 E7 蛋白与 Rb 结合效率较高危型 HPV-16/-18 低 10 倍, 而且低危型 HPV 的 E7 蛋白在细胞转化和被 CKII 磷酸化的效率上也明显低于高危型 HPV. 因此低危型 HPV 的早期蛋白不具

恶性转化活性.

宫颈异型增生一般好发于宫颈与柱状上皮的移行区附近及外周区, 恶性转化细胞总是发生在宫颈移行区的鳞状上皮. 从慢性持续性高危型 HPV 感染到最后进展为恶性肿瘤常需要 10~20 年的时间, 但少数病例例外, 1~2 年内即可进展为恶性肿瘤. 根据感染组织的病理学特征, 将从持续性病毒感染到恶性转变整个过程分为 4 个阶段, 如图 3 所示.

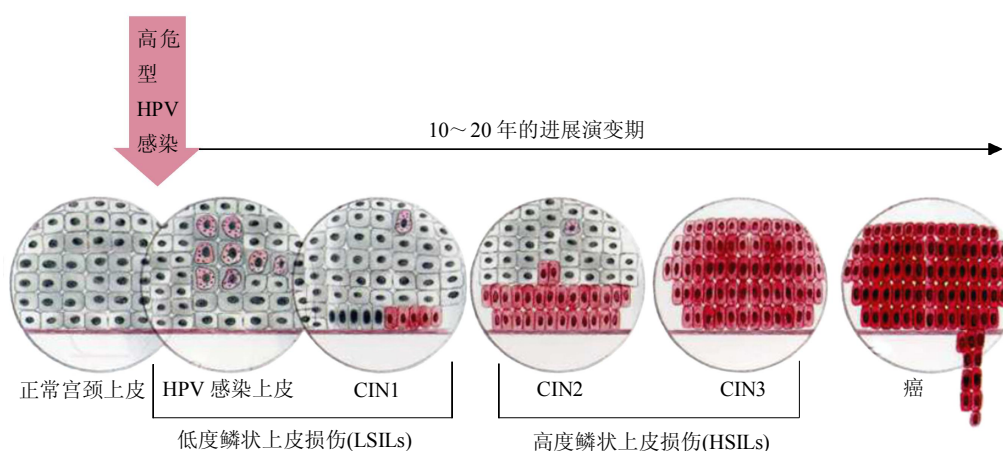


Fig. 3 Disease progression from koilocytosis to carcinoma

图 3 从 HPV 感染至宫颈癌发生的过程的模式图

阶段 1: 宫颈上皮内增生 1 级 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN/1), 细胞异型增生较轻, 仅累及上皮基部的细胞, 又称低级鳞状上皮内病变 (low squamous intraepithelial lesions, LSIL). LSIL 病变可由低危型或高危型 HPV 感染引起, 可伴有多种 HPV 型别共同感染, 病毒 DNA 常以游离形式存在, E6 和 E7 表达水平较低, 表达病毒衣壳蛋白, 并可释放病毒颗粒. 绝大多数 CIN1 可自愈, 仅少数进展为中重度异性增生性病变, 甚至恶性肿瘤.

阶段 2: 宫颈上皮内增生 2 级 (CIN/2), 细胞中度异型增生, 表层细胞仅部分为形态相对正常的细胞, 属高级鳞状上皮内病变 (high squamous intraepithelial lesions, HSIL).

阶段 3: 宫颈上皮内增生 3 级 (CIN/3), 该阶段病变上皮的全层均为重度异型性增生细胞, 属

HSIL, 也包括可能突破基底膜的原位癌.

阶段 4: 此阶段异型病变的细胞突破基底膜, 侵入皮下及深层组织, 又称侵袭性癌阶段.

高级鳞状上皮内病变, 又称癌前病变, 在癌前病变或癌症中, 病毒 DNA 常整合进宿主细胞, 且随着病变程度的加重, 整合的比例增高, 恶性转化后, 病毒序列则主要是以整合形式存在, 特别是在 HPV-16 阳性的肿瘤细胞中.

宫颈癌是危及全球妇女健康的重要疾病, 发病率仅次于乳腺癌, 高居妇科恶性肿瘤的第二位, 每年全世界约有 50 万新发病例, 25 万死亡病例, 其中发展中国家占 2/3. 我国是宫颈癌的高发区, 占全球宫颈癌总数的 10%. 分子流行病学研究发现约 99.7% 以上的宫颈癌标本 HPV 阳性. 国际癌症研究组织 (IARC) 对世界 25 个国家 (不包括东亚地区) 的 3 607 例宫颈癌标本的研究发现了 15 种高危

型 HPV, 按照在宫颈癌组织中检出的阳性率由高至底依次为 HPV-16(53.5%)、-18(17.2%)、-45(6.7%)、-31(2.9%)、-33(2.6%)、-52(2.3%)、-58(2.2%)、-35(1.4%)、-59(1.3%)、-56(1.2%)、-51(1.0%)、-39(0.7%)、-68(0.6%)、-73(0.5%)和-82(0.3%)。而与我国宫颈癌密切相关主要病毒类型依次为 HPV-16、-58 和 -18, HPV-58 是我国、日本、朝鲜等东亚地区高发病毒流行株。对源自我国北京、长沙、香港、江西、上海、四川和西安的 1 555 例中国妇女 ICC 组织中 HPV 的分子流行病学分析显示, 高危型 HPV 的检出率为 82.5%, 其中以 HPV-16 最为常见, 占 60.2%, 其次为 HPV-18 (8.2%)、-58(6.1%)、-52(2.8%)、-33(2.2%)、-31 (1.2%)、-6 (0.8%)、-59 (0.7%)、-45 (0.6%) 和 -35(0.2%)^[3]。

4 HPV 疫苗的研究现状及进展

4.1 HPV 预防性疫苗

宫颈癌和生殖器疣病因的确定大大推动了相应疫苗的研究。研究发现从棉尾兔乳头瘤病毒 (CRPV) 消退兔子分离的淋巴细胞, 被动输入感染有乳头瘤病毒的兔子后, 可以诱发兔肿瘤的消退, 表明免疫系统在控制 HPV 感染中起着重要作用。目前有关 HPV 预防性疫苗的研究主要集中在病毒的外壳蛋白 L1 及 L2。1991 年, 周健等首先证明了 HPV L1 可以自组装成病毒样颗粒 (VLP)^[4]。VLP 具有与病毒颗粒一样的形态结构和免疫原性。动物模型实验结果显示: L1-VLP 免疫动物可以预防乳头瘤病毒感染或促进乳头瘤病毒相关病变消退, VLP 不含病毒基因组 DNA, 无感染性, 安全性好, 但不同型别的 VLP 引起的免疫反应具有高度型别特异性, 仅在高度同源的 HPV 型别之间 (如 HPV-18 和 -45, HPV-16 和 -31) 有一定程度的交叉保护反应, 因此一种型别的 HPV L1 VLP 难以交叉保护预防其他型别的感染。因此理想的 L1 VLP 疫苗应涵盖所有的高危型 HPV。目前已有两种 HPV 预防性疫苗上市, 分别是 Merck 公司的四价疫苗 “Gardasil” 及 GSK 公司的双价疫苗 “Cervarix”。 “Gardasil” 是第一个上市的宫颈癌疫苗。该疫苗为包含 HPV-16、-18 两个高危型以及 HPV-6、-11 两个低危型 L1-VLP 混合性疫苗, 蛋白表达体系为酿酒酵母, 使用的佐剂为氢氧化铝。 “Gardasil” 的临床 III 期实验表明, 该疫苗的安全性良好, 能 100% 预防相关型别 HPV 引起的生殖器疣以及宫

颈、阴户、阴道的癌前损伤, 疫苗的保护期可达 5 年。 “Gardasil” 于 2006 年 6 月获得美国 FDA 批准在 9 岁以上的人群中使用。目前该疫苗已在美国、墨西哥、加拿大、欧盟等 60 多个国家和地区获得批准上市。GSK 公司的双价疫苗 “Cervarix” 包含来源于昆虫细胞表达系统的 HPV-16 和 -18 两个型别 L1-VLP 混合性疫苗, 采用 AS04 佐剂 (氢氧化铝加 MPL)。该疫苗在 16 000 名以上的妇女中进行的临床 II 期及 III 期试验, 结果表明, 疫苗能够保护 HPV-16 和 -18 相关的病毒感染及 CIN1-3 病变, 并且对 HPV-31 和 -45 型两个型别有一定程度的交叉保护效果。临床 II 期实验的跟踪结果显示, 疫苗的保护期可达 6.4 年^[5~7]。目前该疫苗仅在澳大利亚获得批准用于 45 岁以下的女性, 在其他国家的上市许可申请仍在审批中。鉴于 HPV 感染进展到宫颈癌是一个漫长的过程, 常需要 10~20 年, 因此两类上市疫苗对宫颈癌的预防效果最早也需要在 2020 年之后才能获得。

我国 HPV 预防性疫苗的基础研究始于 20 世纪 90 年代末期, 我们课题组早期探索利用大肠杆菌及昆虫表达系统表达获得了免疫原性好的 HPV-16、-6 及 -11 的 L1-VLP, 目前我课题组在国家 “863” 计划项目的持续支持下, 又与国内外同行合作, 正在利用昆虫细胞表达体系进行涵盖我优势流行病毒株 HPV-58 的多价混合性 L1-VLP 疫苗的临床前研究, 该疫苗包含有 HPV-16, -18, -58, -6, -11 等 5 种型别 HPV L1-VLP, 其特点是集成性强, 适于我国国情, 生产 VLP 所用的外壳蛋白基因均为自主优化改造后获得, 与野生性 L1 基因相比, 表达 VLP 的产量高, 具有工业生产前景, 成功后易获得知识产权的保护。目前国内有多家公司也在进行 HPV 预防性疫苗的临床前研究, 预计 2~3 年可进入临床实验研究阶段。

上述两种问世的 HPV 预防性疫苗, 仅涵盖 HPV-16 及 -18 两种高危型 HPV, 可预防约 70% 的宫颈癌, 临床实验表明这两类疫苗对其他高危型 HPV 的感染及癌前病变没有预防作用, 再加上价格昂贵, 需要低温保存等因素, 极大地限制了在宫颈癌高发的发展中国家使用。因此, 第二代预防性疫苗的发展方向主要是提高疫苗对不同型别的覆盖程度和降低成本。目前第二代的 HPV 预防性疫苗集中在乳头瘤病毒的次要外壳蛋白 L2。Roden 等在 2000 年发现, 远缘的 HPV-6、-16、-18 型 L2 蛋白或多肽所诱发产生的抗体有交叉中和能力, 特别

是 BPV-L2 及 HPV-16 L2 的 N 端 1~200 aa 的肽段诱发产生的中和抗体覆盖的 HPV 型别较广, 抗体的滴度也相对较高, 但与 L1-VLP 诱发产生的中和抗体相比要低 2~3 个数量级. 为此, John T. Schiller 研究小组将 HPV-16 L2 的 17~36 位氨基酸构成的肽段与一种改良的 TLR2 配体及一个 Th 表位 P25 通过赖氨酸偶联形成分支状结构, 在小鼠中得到了很好的免疫效果. 另外, 探索非注射形式应用的疫苗也是目前研究的方向.

由于目前上市的宫颈癌预防疫苗仅涵盖 HPV-16 及 -18 两种高危型, 而且只对 HPV-16 及 -18 感染阴性的人群有预防相应型别 HPV 感染相关的肿瘤的作用, 所以接种宫颈癌疫苗不能完全代替宫颈癌筛查, 目前宫颈癌筛查仍是预防宫颈癌的有效手段.

4.2 HPV 治疗性疫苗

由于在 HPV 感染相关的癌前病变及转化的恶性肿瘤细胞中, 病毒序列常呈整合形式存在, 晚期蛋白基因常断裂丢失, 难以检测到晚期蛋白, 因此预防性疫苗对业已建立的感染相关病变没有治疗作用. HPV 治疗性疫苗主要是针对感染相关病变细胞中高水平且呈构成性表达的 E6 及 E7 蛋白而进行的, 主要目的是诱发产生针对癌蛋白特异的细胞免疫反应. 现有的治疗性疫苗研究常常是以 E6、E7 为基础, 这些疫苗有多种形式, 包括病毒/细菌载体疫苗、DC 细胞疫苗、多肽或蛋白疫苗及 DNA 疫苗等. 现用于临床实验的 HPV-16 E7 多肽疫苗包括 HLA-A *0201、HLA-A *2401、T 辅助性肽及 B 细胞肽, 以 E7 多肽免疫 HPV 相关肿瘤病人, 可产生特异性的 CTL 反应. 编码 HPV-16/-18 的 E6/E7 抗原表位的 DNA 疫苗 ZYC101、ZYC101a 在 I 期和 II 期临床试验中也显示出了良

好的抗 HPV 反应. 另外, 重组微生物载体疫苗, 如病毒及细菌载体疫苗在动物实验获得肯定的结果后, 也进行临床 I/II 期实验. 我们课题组于 1995 年开始针对 HPV16 的治疗性疫苗的研究, 经过对 E7 基因免疫原性及免疫活性分子包括 B7-1、HSP70、CD40L 及 IL-15 的全面研究, 获得了安全性好、免疫原性强的加强型 HPV-16 DNA 疫苗, 该疫苗可很好地诱导小鼠产生 E7 特异的细胞免疫, 并可完全保护免疫小鼠对抗 HPV-16 阳性肿瘤细胞的攻击, 具有进一步进行临床研究的价值. 由于肿瘤免疫治疗的复杂性, 目前尚无有效的 HPV 治疗性疫苗问世.

参 考 文 献

- 1 谷淑燕, 韩日才, 司静懿, 等. 宫颈癌中乳头瘤病毒核酸的检测. 病毒学报, 1986, 2(3): 260~262
Gu S Y, Han R C, Si J Y, *et al.* Chin J Virol, 1986, 2(3): 260~262
- 2 zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic study to clinical application. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 342~350
- 3 Bao Y P, Li N, Smith J S, *et al.* Human papillomavirus type-distribution in women from asia: A Meta-analysis. Int J Gynecol Cancer, 2007, 17: 1~9
- 4 Zhou J, Sun X Y, Stenzel D J, *et al.* Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. Virology, 1991, 185: 251~257
- 5 Govan V A. A novel vaccine for cervical cancer: quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) recombinant vaccine (Gardasil). Ther Clin Risk Manag, 2008, 4(1): 65~70
- 6 Heymann W R. The human papillomavirus vaccine. J Am Acad Dermatol, 2008, 58(6): 1047~1048
- 7 Keam S J, Harper D M. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]. Drugs, 2008, 68(3): 359~372

Human Papillomaviruses and Cervical Cancer Vaccines: To Decode 2008 Nobel Prize in Physiology or Medicine

XU Xue-Mei *

*(Institute of Basic Medical Sciences, The Chinese Academy of Medical Sciences & School of
Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)*

Abstract Human papillomaviruses are small DNA viruses and over 118 types have been identified. They often infect host through mucosal surface or skin. Some of them (types 6 and 11) cause benign tumors such as condylomas whereas others (16, 18 etc) cause malignant tumors such as cervical cancers. Currently, there are two kinds of HPV preventive vaccine have been approved to market abroad. This article reviews progress in the field of human papillomaviruses (HPVs) biology, mechanism of carcinogenesis by persistent infection of high risk HPVs, and the development of prophylactic and therapeutic viral vaccines.

Key words human papillomavirus, cervical cancer, vaccine

*Corresponding author.

Tel: 86-10-65296932, E-mail: xuemeixu@vip.sina.com

Received: October 13, 2008 Accepted: October 14, 2008