

肿瘤综述

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002793

头颈鳞癌中人乳头瘤病毒的检测及意义

龙 丹, 张春林

(遵义医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 遵义 563000)

【摘 要】头颈鳞癌是人体最常见的恶性肿瘤之一,近年来头颈鳞癌的发病率呈逐年上升趋势。新近研究发现感染高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)与头颈鳞癌的发病具有相关性。HPV 相关头颈鳞癌是头颈鳞癌的一个独立亚组,往往表现出淋巴转移早、分期晚,但对放化疗敏感、预后相对较好的临床特性。头颈鳞癌中 HPV 的检测方法众多且各具特点,但多未在临床广泛应用。本文就 HPV 的检测方法及临床应用的最新进展作一综述,旨在提高临床医师对头颈鳞癌中 HPV 检测方法和应用的认识,为推广临床治疗策略提供帮助。

【关键词】头颈鳞癌;人乳头瘤病毒;检测;临床意义

【中图分类号】R739.91

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-09-03

Detection of human papilloma virus and its clinical significance in head and neck squamous cell carcinoma

Long Dan, Zhang Chunlin

(Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University)

【Abstract】Head and neck squamous cell carcinoma is one of the most common malignant tumors, and its incidence has been increasing year by year. Recently, more and more researches have revealed that the infection of high-risk human papilloma virus (HPV) is closely related with head and neck squamous carcinoma. HPV-related head and neck squamous cell carcinoma is an independent subgroup, with the characteristics of early lymph node metastasis and the advanced tumor stage, but chemoradiotherapy sensitivity and relatively good prognosis. There are several methods for HPV detection in head and neck squamous cell carcinoma, each with its advantages and disadvantages, however, most of them are not widely used in clinical practice. Therefore, this article reviews recent researches upon the detection methods of HPV in head and neck squamous cell carcinoma and the significance in clinical practice, which aims to raise the knowledge of HPV detection, and promote the clinical application in the treatment strategy of head and neck squamous cell carcinoma.

【Key words】head and neck squamous cell carcinoma; human papilloma virus; detection; clinical significance

头颈癌是人体最常见的恶性肿瘤之一,主要包括口腔癌、口咽癌、下咽癌和喉癌等,全球范围内,其发病率在恶性肿瘤中居第 6 位^[1]。感染高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是其主要危险因素之一^[2-3]。感染高危型 HPV

与 20%~25%的头颈鳞癌发病相关^[4-5]。HPV 相关头颈鳞癌是头颈鳞癌中一个独立亚组,虽然淋巴转移早,分期晚,但对放化疗敏感,具有预后相对好的临床特性^[6]。流行病学研究发现 HPV 相关头颈鳞癌的发病率呈逐年上升趋势^[7]。因此,头颈鳞癌的 HPV 检测越来越受重视, AJCC 第 8 版头颈部肿瘤分期系统增加了 HPV 相关口咽癌分期法。最新美国病理学会在头颈鳞癌中引入 HPV 检测^[8],建议对所有口咽癌患者和伴有颈部淋巴结转移的喉癌患者进行 HPV 检测,但是未推荐具体检测方法。HPV 检测在研究头颈鳞癌的致癌机制及临床治疗策略选择中至关重要。因此,本文对目前 HPV 检测方法

作者介绍:龙 丹, Email: doc_ld@qq.com,

研究方向:头颈肿瘤的基础及临床研究。

通信作者:张春林, Email: echo_zcl1314@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81760493);贵州省卫计委科学技术基金资助项目(编号:gzwjkj2016-1-038);遵义医学院博士科研启动基金资助项目(编号:院字(2015)11 号)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210413.1106.006.html>
(2021-04-13)

1 头颈鳞癌中 HPV 的检测方法

1.1 HPV 检测的标本类型

组织标本常用于临床研究,根据储存及处理方式的不同,分为新鲜冰冻标本和石蜡标本。新鲜标本是指标本一经离体后立即置于液氮内保存的标本,适用于检测 DNA、mRNA 等绝大部分实验。新鲜标本特异性高,但储存条件要求高,花费大,限制了其在临床上的广泛应用。石蜡标本是指取得标本后使用福尔马林固定、石蜡包埋保存的标本。石蜡标本具有储存条件要求较低、保存时间较长等优点^[9],广泛应用于各种基础研究及临床诊断,但因核酸易降解丢失,不能用于检测 mRNA,且受 DNA 裂解为小片段以及残留物等因素的影响,可能造成检测敏感性降低。一些研究者还在细针穿刺活检标本(fine-needle aspiration biopsies, FNABs)、唾液和血清样本中进行 HPV 检测。Schlecht NF 等^[10]对手术标本同时进行石蜡包埋和新鲜冷冻处理后进行原位杂交 (*in situ* hybridization, ISH)测试所得结果无明显差异,这一结果提示在条件受限的情况下,选用合适的实验技术也可以达到理想的检测结果。此外,一些基础研究中需要使用 HPV 阳性的头颈鳞癌细胞株,常用的有 UM-SCC-047、UPCI-SCC-090 等,适用于检测 HPV 病毒 DNA、mRNA、蛋白质等几乎所有体外实验及动物实验,特异性及敏感性较高,广泛应用于 HPV 相关头颈鳞癌的基础研究。

1.2 HPV 的检测方法

HPV 检测技术已广泛应用于宫颈癌的筛查及宫颈癌疫苗接种效果的评测。随着 HPV 感染与头颈鳞癌相关性的研究增多,HPV 检测技术也逐步在头颈鳞癌中应用。不同于宫颈癌,HPV 相关头颈鳞癌中 HPV 病毒载量及表达量均较低,往往需要组织标本才能完成 HPV 检测。HPV 感染对头颈鳞癌的致病机制影响可存在于 DNA、RNA 和蛋白质以下 3 种层面。HPV 检测方法多种多样,目前尚无统一、公认的方法,常用的方法包括聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和 ISH 检测 HPV DNA 和 mRNA,以及免疫组化法 (immunohistochemical, IHC) 和 Western blot 检测 E6 和 E7 癌蛋白等。不同检测方法适用于不同的研究目的,且需考虑标本类型,确诊 HPV 感染需在标本内检测出 HPV DNA、mRNA 或病毒蛋白。

1.2.1 HPV DNA 的检测 组织标本中常用 PCR 检测 HPV DNA,其通用型引物有 MY09/11、GP5+/GP6+ 和 SPF10 等,不同引物间敏感性略有差异。GP5+/GP6+ 引物在扩增高危型及低危型 HPV DNA 时均显示出较高的敏感性,即便在低拷贝 DNA 样本中也可扩增出产物^[11]。de Abreu PM 等^[12]使用 MY09/

11 和 GP5+/GP6+ 引物或者 PGMY09/11 和 GP5+/GP6+ 引物的巢式 PCR,比传统 HPV DNA 的敏感性更高,并可用于多重 HPV 交叉感染。然而,PCR 检测 HPV DNA 过于敏感,提高了 HPV 一过性感染的检出率,并增加了假阳性的可能,且不能证明病毒的转录活性,而联合 p16 IHC 检测可弥补此不足。Linge A 等^[13]综合多种 HPV 检测对比分析,p16 IHC 联合 GP5+/GP6+ PCR 检测结果与 E6 和 E7 mRNA 的分析结果有一致性。Channir HI 等^[14]在转移性口咽癌和口腔癌 FNAB 中进行 PCR 检测,以 p16 IHC 为金标准,其敏感性为 94.7%,特异性为 100.0%,提示样本量充足时,可提高 FNAB 的敏感性。Bishop JA 等^[15]将临床用于检测宫颈癌高危 HPV 的杂交捕获 II (hybrid capture II, HC2) 实验用于头颈鳞癌中,发现可在组织标本中检测 HPV 状态,提示细胞学检测的一致性对血液和唾液标本有潜在应用价值。

血液和唾液标本以非侵入性方式筛查及监测 HPV DNA 是可行的。血液标本中常以循环肿瘤 DNA 检测 HPV 相关癌的研究,大部分循环肿瘤 DNA 来源于凋亡或坏死的肿瘤细胞。Jensen KK 等^[16]在头颈鳞癌中,对血液循环肿瘤 DNA 进行检测,发现患者治疗前后的血液标本中,HPV DNA 的综合敏感性为 54%,特异性为 98%,提示这项技术可能运用于评估治疗反应和监测动态,但敏感性低,限制了临床运用。Hanna CJ 等^[17]监测 HPV 阳性口咽癌患者的唾液样本,发现唾液中 HPV DNA 水平的变化趋势与治疗反应相一致,但敏感性及特异性均较低。而 Qureishi A 等^[18]使用 p16 IHC 和 HPV DNA 对肿瘤标本进行 HPV 状态检测,并在唾液标本中对其中 37 种不同亚型的 HPV 进行 PCR 扩增,发现唾液标本中 HPV DNA 的敏感性为 72.2%,特异性为 90%,提示对高风险人群以非侵入性方式检测 HPV 可能适用于临床,改善其敏感性值得临床推广。

1.2.2 qRT-PCR 法检测 HPV RNA 定量逆转录 PCR (quantitative reverse transcriptase, qRT-PCR) 是在单一闭管体系中进行核酸扩增、检测和定量的自动化程序检测法,敏感性较高,并可极大降低产物间的污染,克服传统 PCR 的缺点和局限性。HPV 中 E6 和 E7 癌基因的致癌转化能力与其基因表达量相关^[19],用 qRT-PCR 法检测 HPV E6/E7 mRNA 可对病毒的表达进行定量分析,常作为检测转录活性 HPV 的金标准^[13]。Aptima HPV 是一种应用 qRT-PCR 技术自动一体化检测常见高危型 HPV E6/E7 mRNA 的检测法,目前包括 Aptima HPV (可检测 14 种常见高危型 HPV) 和 Aptima 16、18/45。2011 年美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准 Aptima 为唯一针对 E6/E7 mRNA 的检测技术。Chernesky M 等^[20]进行 59 例口咽癌患者的 FNAB 中 HPV E6 癌蛋白和核酸检测,发现 Aptima mRNA 检测阳性率 (94.9%)

高于 HPV DNA 检测阳性率(91.1%),敏感性较高。此外,因 mRNA 阳性可直接证明 HPV 病毒的转录活性,而 DNA 阳性仅证明 HPV 发生过感染,并不能证明病毒是否有转录活性,所以 E6/E7 mRNA 检测比 HPV DNA 检测有更高的特异性。

近几年,miRNA 也被认为是 HPV 相关癌的诊断和预后的可能生物标志物,但唾液标本中少有研究。Wan YX 等^[21]用 qRT-PCR 检测唾液中多种 miRNA 的表达,发现不同 miRNA 可以区分 HPV 阴性患者和健康对照组(敏感性为 60%,特异性为 94%),HPV 阳性患者和健康对照组(敏感性为 65%,特异性为 95%),其中 miRNA-210 的过表达可区分 HPV 阳性和 HPV 阴性患者。但 qRT-PCR 法价格昂贵,操作要求高,有其他可代替检测方法,现多应用于科研,未广泛用于临床检测。

1.2.3 HPV 癌基因蛋白的检测 癌基因 E6 和 E7 蛋白的主要检测方法包括 Western blot 与 IHC 等。Western blot 对 E6 和 E7 癌蛋白进行定性及定量研究,专业性强,操作相对复杂。由于其所需标本组织较大,多用于细胞标本中病毒蛋白表达的定量,而较少用于组织标本的检测,临床应用受限。IHC 法检测 E6 和 E7 蛋白价格便宜,可操作性强,多用于组织标本的检测。随着 HPV 感染与头颈鳞癌相关性的研究增多,可能会逐渐在临床上推广应用,但是 IHC 法敏感性相对较低,且为半定量检测,结果易受人为因素影响而存在偏差。此外,还有其他癌蛋白检测法,如 Chernesky M 等^[20]首次对口咽癌患者淋巴结 FNAB 进行 OncoE6 癌蛋白检测,OncoE6 是使用酶免疫层析法从实验组织中捕获高危型 HPV 的 E6 癌蛋白,结果发现阳性率低于 Aptima mRNA 检测和 HPV DNA 检测,但 E6 癌蛋白阳性可确定肿瘤组织中活动性的 HPV 感染,可以减少非活动性 HPV 感染对实验结果的影响。

1.2.4 ISH 法检测 HPV ISH 是指将特定标记的已知顺序核酸为探针与细胞或组织切片中核酸进行杂交,从而对特定核酸顺序进行精确定量定位的过程,ISH 可以在细胞标本或组织标本上进行。DNA ISH 可直观定位 HPV 病毒感染的宿主细胞,证实头颈鳞癌中存在整合性 HPV,有较高特异性,并可以确定 HPV DNA 亚型,但敏感性较低。Prigge ES 等^[22]报道 DNA ISH 的敏感性均比 HPV DNA PCR 和 p16 IHC 低(85% vs. 98% vs. 94%),Rischin D 等^[23]报道 79% 的 DNA ISH 阴性和 p16 阳性的口咽癌患者中 HPV PCR 检测阳性,提示 HPV DNA ISH 检测敏感性较低,限制了其在临床应用。Bishop JA 等^[24]报道了一种新的 RNA ISH 检测法,可在头颈鳞癌中检测病毒 E6/E7 mRNA,并且能够直接观察到检测标本中的转录活性病毒,由于转录是一个自然的扩增步骤,与 DNA ISH 相比,RNA ISH 有更高的敏感性及特异性,可作为诊断 HPV 感染并具有生物学活性的独立检测方法。Wong KS 等^[25]对 38

例 HPV PCR 阳性的患者进行 RNA ISH 检测,发现阳性率为 97%,且与 p16 IHC 有 92% 的一致性。Rooper LM 等^[26]对 82 例已接受 p16 IHC 和 DNA ISH 检测的头颈鳞癌病例行 RNA ISH 检测,发现 RNA ISH 比 DNA ISH 与 p16 IHC 有更高的敏感性及其一致性,提示 RNA ISH 在检测 HPV 状态中可能具有较高的诊断价值,值得改进以供临床使用。

1.2.5 抑癌基因 p16 的检测 p16 是头颈鳞癌中重要的抑癌基因,在 HPV 病毒持续性感染宿主细胞时,E7 结合视网膜母细胞瘤(Rb)基因,进而使其功能失活,导致 p16 过表达,使 G₁ 期细胞增殖失调,引起肿瘤发生发展^[9]。在宫颈癌和口咽癌中,p16 IHC 已被公认为 HPV 感染初筛的有效方法,最新美国临床肿瘤学会和美国病理学会的指导方针建议对所有口咽组织标本都进行高危型 HPV 状态的检测,p16 IHC 检测应作为初筛方法^[8,27],在头颈鳞癌中的检测意义尚需更多研究论证。Prigge ES 等^[22]报道 p16 IHC/HPV DNA PCR 联合检测 HPV 感染的敏感性与 p16 IHC 一致(93% vs. 94%),但特异性高于 p16 IHC 和 HPV DNA PCR 单独检测(96% vs. 83% vs. 84%),提示 p16 IHC/HPV DNA PCR 联合检测在诊断 HPV 感染中具有较高的应用价值,p16 IHC 阳性作为 HPV 感染的替代指标,其敏感性高、可操作性强、检测花费低,值得在临床推广。然而非口咽癌中 p16 和 HPV DNA 的检出率差异值得关注。Hernandez BY 等^[28]研究发现,超过 20% 的浸润性喉癌中检测到 HPV DNA,但仅有 2% 的病例中 p16 和 HPV 基因检测均为阳性,p16 在非口咽癌中的相关性尚需进一步研究确认。此外,头颈鳞癌中 p16 和 HPV 基因检测均为阳性是活动性 HPV 感染的有力证据,且已证实与患者的预后具有相关性,p16 可作为头颈鳞癌患者预后的有效预测指标。Rischin D 等^[23]和 Lassen P 等^[29]均报道在 HPV 相关口咽癌放疗患者中,p16 阳性患者的总生存率和无瘤生存率更高。p16 IHC 还可作为其他检测方法的补充,从而增加检测结果的敏感性和特异性。Wong KS 等^[25]对 97 例 HPV 基因检测为阳性的头颈鳞癌 FNAB 进行 p16 IHC 检测,阳性率为 92.8%。Chernesky M 等^[20]和 Bishop JA 等^[24]的研究中均有类似报道,p16 IHC 与其他检测结果具有相关性,提示 p16 IHC 检测进行 HPV 感染的初筛或者用于补充其他检测方法都可达到很好的效果,具有重要的检测意义。

2 HPV 相关头颈鳞癌的治疗策略及意义

头颈鳞癌的治疗策略包括根治性手术、放化疗、靶向治疗等。HPV 相关头颈鳞癌是一个独立亚组,其淋巴转移早、分期晚,但对放化疗敏感,预后相对好。HPV 相关头颈鳞癌的治疗具有不同于 HPV 阴性头颈鳞癌的特点,AJCC 第 8 版头颈

部肿瘤分期系统增加了 HPV 相关口咽癌分期法,并将其与其他原因引起的口咽癌区分出来,有望对 HPV 相关口咽癌实施降级治疗策略^[30-31]。Kranjc Brezar S 等^[32]分别对 HPV 阳性(2A3)和 HPV 阴性(FaDu)头颈鳞癌细胞荷瘤裸鼠进行顺铂联合化疗或等效单剂量照射的放射敏感性的比较,发现 HPV 阳性肿瘤的放射敏感性约为 HPV 阴性肿瘤的 5 倍,联合顺铂化疗中 HPV 阳性荷瘤裸鼠的存活率比 HPV 阴性荷瘤裸鼠高 26%。此外,临床上也报道了类似的结果^[23,29]。O'Sullivan B 等^[33]发现 HPV 阳性口咽癌患者对放疗和铂基化疗有较好的疗效及预后,HPV 阳性口咽癌患者远处转移的风险远小于 HPV 阴性口咽癌患者。目前,头颈鳞癌中仅有 7 种 FDA 批准的靶向疗法:3 种 PD-1 抑制剂,3 种 PD-L1 抑制剂和 1 种 EGFR 抗体抑制剂,但是尚缺乏针对 HPV 阳性头颈鳞癌患者的临床疗效报道。与 HPV 感染相关的靶向治疗研究还多处于基础研究阶段,最终能否应用于临床尚需更深入的研究。Brand TM 等^[34]探讨 HER3 在 HPV 阳性头颈鳞癌靶向治疗中的意义,发现 HER3 在 HPV 阳性头颈鳞癌中高表达,并可降低患者的总生存率,进一步研究发现 E6/E7 可调节 HER3 的蛋白表达,为 HER3 靶向治疗 HPV 相关头颈鳞癌提供理论依据。近年来,HPV 疫苗已经广泛应用于宫颈癌的预防,HPV 疫苗接种是否对头颈鳞癌同样具有保护效应,是否推荐重点人群接种 HPV 疫苗,未来需要更多的研究论证,但其必要的前提就是广泛开展头颈鳞癌中 HPV 感染率的大样本流行病学研究。

3 总结与展望

总而言之,HPV 的检测方法各有优缺点,且目前暂无公认的标准,可根据研究目的进行合理选择,联合 2 种或多种检测方法能提高检测的敏感性和特异性。同一种检测方法在不同标本中的敏感性及特异性也有差异。这些方法中部分已应用于临床,例如用于宫颈癌中的 HC2 和用于口咽癌中的 p16 IHC。但大部分检测仍在基础领域,血液及唾液中以非侵入性方式筛查和监测 HPV 的最新检测技术值得关注及改进。HPV 检测在阐述头颈鳞癌致病机制及指导临床策略的选择均具有重要作用,检测 HPV 感染状态有望预测头颈鳞癌患者的预后。然而在非口咽癌的头颈鳞癌中,HPV 检测尚未被相关指南推荐,尚需在临床上进一步推广,以获得更全面的临床证据,提高患者预后。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
- [2] Howard JD, Chung CH. Biology of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2012, 22(3): 187-193.
- [3] Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and demographics of the head and neck cancer population[J]. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 2018, 30(4): 381-395.
- [4] zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers: a brief historical account[J]. *Virology*, 2009, 384(2): 260-265.
- [5] 张春林, 陈月红, 邓泽义, 等. 中国口腔癌中高危型 HPV 感染率的 meta 分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(10): 682-689.
- [6] Zhang CL, Chen YH, Deng ZY, et al. High-risk HPV infection and its cancer risk in Chinese patients with oral cancer: a meta analysis and systematic review[J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2016, 23(10): 682-689.
- [7] Deng Z, Hasegawa M, Matayoshi S, et al. Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011, 268(11): 1625-1631.
- [8] Wittekindt C, Wagner S, Bushnak A, et al. Increasing incidence rates of oropharyngeal squamous cell carcinoma in Germany and significance of disease burden attributed to human papillomavirus[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2019, 12(6): 375-382.
- [9] Lewis JS Jr, Beadle B, Bishop JA, et al. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: guideline from the college of American pathologists[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2018, 142(5): 559-597.
- [10] Taberna M, Resteghini C, Swanson B, et al. Low etiologic fraction for human papillomavirus in larynx squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2016, 61: 55-61.
- [11] Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer[J]. *Mod Pathol*, 2011, 24(10): 1295-1305.
- [12] Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, et al. A general primer GP5+/GP6+-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(3): 791-795.
- [13] de Abreu PM, C6 A, Azevedo PL, et al. Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 324.
- [14] Linge A, Sch6tz U, L6ck S, et al. Comparison of detection methods for HPV status as a prognostic marker for loco-regional control after radiochemotherapy in patients with HNSCC[J]. *Radiother Oncol*, 2018, 127(1): 27-35.
- [15] Channir HI, Gr6nh6j Larsen C, Ahlborn LB, et al. Validation study of HPV DNA detection from stained FNA smears by polymerase chain reaction: improving the diagnostic workup of patients with a tumor on the neck[J]. *Cancer Cytopathol*, 2016, 124(11): 820-827.

- [15] Bishop JA, Maleki Z, Valsamakis A, et al. Application of the hybrid capture 2 assay to squamous cell carcinomas of the head and neck; a convenient liquid-phase approach for the reliable determination of human papillomavirus status[J]. *Cancer Cytopathol*, 2012, 120(1): 18–25.
- [16] Jensen KK, Grønhoj C, Jensen DH, et al. Circulating human papillomavirus DNA as a surveillance tool in head and neck squamous cell carcinoma; a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Otolaryngol*, 2018, 43(5): 1242–1249.
- [17] Hanna GJ, Lau CJ, Mahmood U, et al. Salivary HPV DNA informs locoregional disease status in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer[J]. *Oral Oncol*, 2019, 95: 120–126.
- [18] Qureishi A, Ali M, Fraser L, et al. Saliva testing for human papilloma virus in oropharyngeal squamous cell carcinoma; a diagnostic accuracy study[J]. *Clin Otolaryngol*, 2018, 43(1): 151–157.
- [19] Miller DL, Puricelli MD, Stack MS. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Biochem J*, 2012, 443(2): 339–353.
- [20] Chernesky M, Jang D, Schweizer J, et al. HPV E6 oncoproteins and nucleic acids in neck lymph node fine needle aspirates and oral samples from patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Papillomavirus Res*, 2018, 6: 1–5.
- [21] Wan YX, Vagenas D, Salazar C, et al. Salivary miRNA panel to detect HPV-positive and HPV-negative head and neck cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 99990–100001.
- [22] Prigge ES, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, et al. Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas; a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(5): 1186–1198.
- [23] Rischin D, Young RJ, Fisher R, et al. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(27): 4142–4148.
- [24] Bishop JA, Ma XJ, Wang HW, et al. Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA *in situ* hybridization method[J]. *Am J Surg Pathol*, 2012, 36(12): 1874–1882.
- [25] Wong KS, Krane JF, Jo VY. Heterogeneity of p16 immunohistochemistry and increased sensitivity of RNA *in situ* hybridization in cytology specimens of HPV-related head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Cytopathol*, 2019, 127(10): 632–642.
- [26] Rooper LM, Gandhi M, Bishop JA, et al. RNA *in situ* hybridization is a practical and effective method for determining HPV status of oropharyngeal squamous cell carcinoma including discordant cases that are p16 positive by immunohistochemistry but HPV negative by DNA *in situ* hybridization[J]. *Oral Oncol*, 2016, 55(4): 11–16.
- [27] Fakhry C, Lacchetti C, Rooper LM, et al. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas; ASCO clinical practice guideline endorsement of the College of American pathologists guideline[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(31): 3152–3161.
- [28] Hernandez BY, Rahman M, Lynch CF, et al. p16INK4A expression in invasive laryngeal cancer[J]. *Papillomavirus Res*, 2016, 2: 52–55.
- [29] Lassen P, Lacas B, Pignon JP, et al. Prognostic impact of HPV-associated p16-expression and smoking status on outcomes following radiotherapy for oropharyngeal cancer; the MARCH-HPV project[J]. *Radiother Oncol*, 2018, 126(1): 107–115.
- [30] Stock GT, Colombo Bonadio RRC, de Castro Junior G. De-escalation treatment of human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma; an evidence-based review for the locally advanced disease[J]. *Curr Opin Oncol*, 2018, 30(3): 146–151.
- [31] Chen AM, Felix C, Wang PC, et al. Reduced-dose radiotherapy for human papillomavirus-associated squamous-cell carcinoma of the oropharynx; a single-arm, phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(6): 803–811.
- [32] Kranjc Brezar S, Prevc A, Niksic Zakelj M, et al. Synergistic effect of cisplatin chemotherapy combined with fractionated radiotherapy regimen in HPV-positive and HPV-negative experimental pharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1563.
- [33] O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(5): 543–550.
- [34] Brand TM, Hartmann S, Bhola NE, et al. Human papillomavirus regulates HER3 expression in head and neck cancer; implications for targeted HER3 therapy in HPV+ patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(12): 3072–3083.

(责任编辑:唐秋姗)