

Orale karcinomer

HPV, apoptosis og p53-ekspression

Troels Bundgaard, Per Pfeiffer og Henning Lindeberg

Sammenhængen mellem tobak, alkohol og oralt karcinom er velkendt og veldokumenteret, men 15% af patienterne har dog aldrig røget og har ikke haft noget regelmæssigt alkoholforbrug - og næsten alle patienter i denne gruppe er ældre kvinder. Denne gruppe af »non-users« adskiller sig således fra hovedparten af patienter mht. både alder og køn, og karcinomudviklingen må skyldes endnu ukendte ætiologiske faktorer. Humant papillomvirus (HPV), hvis plads i ætiologien af oral cancer er stærkt kontroversiel, kunne måske være en sådan faktor i de tilfælde hvor der hverken er tobak eller alkohol i anamnesen.

Orale karcinomer fra to patientgrupper, *users* og *non-users* af tobak og/eller alkohol, undersøgte for forekomst af HPV, apoptose samt p53 overekspression. Der blev ikke fundet afgørende forskelle mellem de to grupper. Totalt forekom HPV-DNA i 12,5% af tumorerne, HPV type 16 dog kun i en enkelt tumor (2,5%).

Hovedparten af pladeepitelkarcinomer i munden (1-5) opstår hos patienter med massivt forbrug af alkohol og/eller tobak, og man anser den karcinogene effekt heraf som både dosisrelateret og synergistisk (1-5). Til trods for disse forhold optræder 15% af tumorerne hos patienter der aldrig har røget, og som ikke indtager alkohol regelmæssigt: *non-users*. Denne gruppe patienter består helt overvejende af ældre kvinder. Mens tumorer i mundbunden udgør 28% hos *users* (dvs. patienter der ryger eller regelmæssigt indtager alkohol, eller begge dele), er den tilsvarende frekvens hos *non-users* 4% (6). *Non-users* udgør således en undergruppe blandt patienter med oral cancer, der afviger markant fra majoriteten, både hvad køn og lokalisation angår, og det er vanskeligt at pege på en årsag til tumorudviklingen i denne gruppe.

Vi har fundet det af interesse at undersøge orale karcinomer fra 20 *non-users* for forekomst af humant papillomvirus (HPV) og for eventuel overekspression af p53 samt at vurdere forekomsten af apoptotiske celler, sammenlignet med en kontrolgruppe bestående af orale karcinomer fra *users*.

Materiale og metoder

I perioden 1986-90 indgik 161 patienter med oralt karcinom i en prospektiv undersøgelse. Hver patient besvarede et detaljeret spørgeskema for at klarlægge sin eksposition for tobak og spiritus. Treogtyve patienter var *non-users*. For tre patienters vedkommende var det ikke muligt at fremskaffe vævsblokke, og disse patienter indgår således ikke i undersøgelsen. Fra det samlede materiale af *users* blev der udvalgt en kontrolgruppe, bestående af 20 aldersmatchede patienter.

Histologisk evaluering

Der blev fremstillet nye H&E-farvede snit til vurdering og for at sikre at der fortsat var tumorvæv i paraffinblokken.

HPV – Der fremstilledes 3-6 snit fra hver vævsblok. Behandling af snittene og forholdsregler for at undgå falsk positive resultater er beskrevet tidligere (7). For at sikre at prøverne indeholdt amplificerbart DNA, blev hver prøve amplificeret med primere rettet mod et fragment af det humane betaglobingen. PCR for HPV blev udført med konsensusprimere CPI/CPII, mod et ~188 bp stort område af E1-regionen (8).

Amplifikaterne blev analyseret ved gelelektroforese (4% 3:1 NueSieve® agarose i TAE-buffer), farvet med ethidiumbromid og vurderet under UV-gennemlysning. Tilstedeværelsen af et ~188 bp DNA-bånd blev tolket som at der var HPV-DNA til stede. Typebestemmelse blev derefter foretaget ved PCR med primere, specifikke for HPV type 6/11, 16 og 18 (9).

p53-immunofarvning – Fra de individuelle vævsblokke blev skåret 5 µm snit der blev monteret på SuperFrost Plus glas, tørret i 60 min. ved 60 °C, hvorefter paraffinen blev fjernet med xylen og snittene rehydrerede. Endogen peroxidase-aktivitet blev blokeret med 0,5% H₂O₂ i methanol (10 min.), efterfulgt af vask i vand og TBS (*trisbuffered saline*). Snittene blev herefter anbragt i citratbuffer i mikrobølgeovn og kogt ved 650 W (*heat induced epitope retrieval, HIER*), 5 min. x 3, afkølet og vasket i vand. Efter forudgående blokering med serum inkuberedes natten over ved 4 °C med p53-antibody D07 (DAKO), koncentration 1:300, efterfulgt af vask x 2 i TBS. Som detektionssystem anvendtes LSAB som beskrevet (10). Det sekundære antistof (biotinyleret goat anti-mouse E432, DAKO) blev anvendt i 30 min. efterfulgt af streptavidin-HRP i 30 min., hvorefter peroxidaseaktiviteten blev visualiseret med DAB i 20 min. Efter vask og hæmatoxylin-farvning blev snittene monterede. Efter gennemsyn under lav forstørrelse blev et repræsentativt område undersøgt ved 400 x forstørrelse. Undersøgeren var blindet mht. kliniske data. Procenten af positivt reagerende tumorceller blev estimeret, idet man anvendte en semikvantitativ skala fra 0-100%, med 10% per interval. Da det mediane antal positive kerner var 40%, blev denne værdi valgt som skæringspunkt.

Apoptosis – DNA i apoptotiske celler blev mærket ved TUNEL-teknik (Roche, Danmark), *TdT-mediated X-dUTP Nick End Labelling*-teknik. De deparaffinerede og rehydrerede snit blev inkuberede med terminal deoxynucleotidyl transferase og dUTP-digoxigenin (DIG), hvorved fragmenteret DNA vil mærkes, mens intakt DNA forbliver umærket. Efterfølgende inkuberedes med anti-DIG-alkalisk fosfatase og fremkaldt med NBT/BCIP, der giver et blåsort præcipitat med alkalisk fosfatase. Antal apoptotiske celler blev scoret arbitrært som

0-3, hvor 0 angiver at apoptotiske celler var totalt fraværende.

Statistiske metoder

Forskelle i scoringsværdier blev evalueret med χ^2 test (signifikansniveau 5%).

Resultater

Histologi

I gruppen af karcinomer fra *non-users* var 18 tumorer epidermoide, én var basaloid og én var verrukøs. For karcinomer fra *user*-gruppen var de tilsvarende tal 16, 4 og 0.

Apoptose – Score var 0,8 og 1,4 i henholdsvis *user* og *non-user*-gruppen (Fig. 1). Forskellen var ikke signifikant.

HPV – Betaglobin kunne amplificeres fra alle prøver, der således alle indeholdt DNA af en amplificérbar kvalitet. Fire af 20 tumorer i *non-user*-gruppen var positive for HPV: type 6/11 i ét tilfælde, type 16 i ét tilfælde, mens typen ikke kunne bestemmes i to tilfælde. Blandt tumorer fra *user*-gruppen var blot én tumor positiv; i denne fandtes HPV type 6/11. Samme patient havde et larynxkarcinom, som også var positivt for HPV 6/11. Som helhed blev der påvist HPV i fem af 40 karcinomer (12,5%).

p53 – Tre tumorer fra *non-users* og syv fra *users* manglede totalt p53-overekspression, dvs. der fandtes ikke reaktion med den anvendte teknik. Forskellen var ikke signifikant ($\chi^2 = 2,13$). Vi fandt en lidt højere værdi af p53-positive kerner i tumorerne fra *non-user*-gruppen, idet henholdsvis 12 og otte havde en score på eller større end medianværdien på 40%. Denne forskel var imidlertid ikke signifikant.



Fig. 1. A: Oralt karcinom, H&E, 100x. B: Påvisning af apoptotiske celler. Der ses kun enkelte positive (mørke) kerner. Ufarvet snit, TUNEL-reaction. C: Påvisning af p53-overekspression. Der ses en del moderat positive kerner.

Fig. 1. A: Oral carcinoma, hematoxylin & eosin, x 100. B: Few apoptotic cells (dark nuclei) are demonstrated. Unstained section, TUNEL-reaction. C: Demonstration of p53 overexpression. A number of medium-stained positive nuclei are present.

Diskussion

Der blev i denne undersøgelse ikke fundet signifikante forskelle mellem orale karcinomer hos *users* og *non-users*, hverken mht. forekomst af HPV, p53-expression eller apoptosis.

Hvis de to grupper betragtes samlet, fandtes HPV i fem af 40 tumorer (12,5%). Kun i ét af disse 40 tilfælde (2,5%) var der tale om HPV type 16, som ellers er langt den hyppigste HPV-type, der angives at være fundet i orale karcinomer (se artiklen »Virus og cancer II« i *Tandlægebladet* 2002; 106: 450-6. At HPV-typen ikke kunne bestemmes i to tilfælde vil sige at resultatet alene består i bedømmelsen af elektroforeseresultatet, efter amplificering med konsensusprimere. Vi har desværre ikke faciliteter til DNA-sekventering. Fundet af HPV type 6/11 hos patienten med dobbeltcancer skal tolkes med forsigtighed, idet kontaminering fra den ene tumor til den anden ikke kan udelukkes. Forfatternes holdning til HPV som ætiologisk faktor i udviklingen af cancer i hoved-hals-regionen er stærkt kritisk; imidlertid er der arbejder der tyder på at basaloide karcinomer i hoved-hals-regionen har en høj frekvens af HPV-DNA (11,12). Den ene basaloide tumor der forekom i vort materiale, var netop HPV-16 positiv. Imidlertid udgør den basaloide karcinomtype kun en mindre del af samtlige hoved-hals-karcinomer, formentlig omkring 5-7%. Hvis den basaloide karcinomtype virkelig viser sig at være HPV-relateret, er det svært ikke at parallelisere til forholdene omkring vulva-karcinomer; her er det overvejende de basaloide karcinomer, der indeholder HPV-DNA (13).

Der er tiltagende evidens for at inaktivering af tumor suppressor-genet p53 er en kritisk begivenhed i karcinomudviklingen for mange humane tumorer. Denne inaktivering kan påvises ved forskellige molekylærbiologiske teknikker. Inaktivering kan skyldes punktmutationer som fører til dannelse af et funktionelt inaktivt protein med en stærkt formindsket halveringstid, hvilket ved immunhistologisk farvning for p53 vil vise sig som et forøget antal positive kerner, dvs. p53-overekspression. Imidlertid er det ikke altid at p53-overekspression (vurderet ved immunfarvning af histologiske snit) skyldes mutationer i p53-genet, idet bl.a. virale proteiner kan binde p53; det gælder således HPV E6-protein, og for HPV 16's vedkommende kan E6-proteinet ydermere degradere p53. I begge tilfælde resulterer det i manglende funktion af p53. Da p53 indgår i regulering af apoptosen, vil bortfald af p53-aktivitet, uanset årsag, kunne betyde at celler der ellers ville undergå normal celledød, i stedet lever videre; en adfærd der netop karakteriserer cancerceller. I denne undersøgelse er der dog ikke tegn til at p53-overekspression skulle være forårsaget af interaktion med HPV-genprodukter. Inaktivering af p53 kan muligvis være en prognostisk faktor ved hoved-hals-karcinom (14,15), men andre studier

har ikke fundet en sådan sammenhæng (16). Betydningen af overekspression af p53 i hoved-hals-karcinomer er således fortsat spekulativ.

English summary

Oral carcinomas – HPV, apoptosis and p53-expression

Most patients with oral carcinomas are users of tobacco and/or alcohol. However, 15% of the carcinomas occur in non-users: patients who do not have a regular intake of alcohol, and who never smoked. The majority of these patients are women. Thus, non-users with oral carcinomas differ from the majority of patients with oral carcinomas, and the aetiology of the tumours is similarly different. In the present study we examined carcinomas from 20 non-users for HPV (by PCR), apoptosis (the TUNEL-reaction, applied to histological sections) and P53-expression immunostaining. The results were compared with 20 carcinomas from an age-matched group. We were unable to demonstrate significant differences between the two groups. Thus, 54 of 20 tumours in the non-user group harboured HPV DNA: both type 6/11 and 16 in one case, while the actual type could not be determined in two cases. In the group of users we found a single HPV-positive tumor with HPV 6/11 DNA. However, this particular patient had in addition a laryngeal carcinoma in which HPV 6/11 had been found, and contamination between the tumours cannot be excluded. The difference in the occurrence of HPV DNA in the two groups was not statistically significant.

Recently, HPV has rather convincingly been connected with basaloid carcinomas of the pharynx (11), and with basaloid oral carcinomas (12). In this respect it is interesting that the single HPV 16 positive tumour in this study was of the basaloid type.

However, basaloid oral carcinomas hardly comprise more than 5-7% of oral carcinomas, and considering the total group of oral carcinomas it still seems prudent to maintain a critical attitude regarding the putative causative role of HPV.

Litteratur

1. Bundgaard T, Wildt J, Frydenberg M, Elbrønd O, Nielsen JE. Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control* 1995; 6: 57-67.
2. International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Humans. Lyon, France. 1986; 38.
3. International Agency for Research on Cancer. Alcohol and alcoholic beverages. IACR Monogr Eval Carcinog Risk Chem Humans. Lyon, France. 1988; 44.
4. Marshall JR, Graham S, Haughey BP, Shedd D, O'Shea R, Brasure J, et al. Smoking, alcohol, dentition, and diet in the epidemiology of oral cancer. *Oral Oncol* 1992; 28B: 9-15.

5. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 3282-7.
6. Bundgaard T, Wildt J, Elbrønd O. Oral squamous cell cancer in non-users of tobacco and alcohol. *Clin Otolaryngol* 1994; 97: 707-12.
7. Buchwald C, Franzmann M-B, Jacobsen GK, Lindeberg H. The presence of human papillomavirus in sinonasal papillomas, demonstrated by polymerase chain reaction with consensus primers. *Hum Pathol* 1993; 24: 1354-6.
8. Smits HL, Tieben LM, Hung SP, Jebbink MF, Minnaar RP, Jansen CL. Detection and typing of human papillomaviruses present in fixed and stained archival cervical smears by a consensus polymerase chain reaction and direct sequence analyses allow the identification of a broad spectrum of human papillomavirus types. *J Gen Virol* 1992; 73: 3263-8.
9. Buchwald C, Franzmann M-B, Jacobsen GK, Lindeberg H. Human papillomavirus (HPV) in sinonasal papillomas: A study of 78 cases using in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 1995; 105: 66-71.
10. Pfeiffer P, Grabau DA, Nielsen O, Clausen PP. Immunohistochemical bulk staining of slides using a rack peroxidase-labelled streptavidin-biotin technique. *Appl Immunohistochem Molecul Morphol* 1996; 4: 135-8.
11. Gillison ML, Koch WM, Capone RBC, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-20.
12. van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, van Leeuwen B, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 232-5.
13. Møller B, Lindeberg H. The presence of HPV types 6/11 and 16 in a giant vulvar carcinoma, arising in pre-existing condylomas, demonstrated by PCR and DNA in-situ hybridization. *Eur J Gynecol Oncol* 1996; 17: 497-500.
14. Wenneberg J. Predicting response to therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck (review). *Anticancer Res* 1996; 16: 2389-96.
15. Shin DM, Lee JS, Liippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, et al. p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 519-29.
16. Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, Le Bihan ML, Douc Rassy S, Duvillard P, et al. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene* 1995; 10: 1217-27.

Forfattere

Troels Bundgaard, overlæge, dr.med., cand.odont.
Øre-Næse-Halsafdelingen, Århus Kommunehospital

Per Pfeiffer, overlæge, ph.d.
Onkologisk Afdeling, Odense Universitetshospital

Henning Lindeberg, lektor, speciallæge, specialtandlæge, ph.d., dr.med.
Afdeling for Kæbekirurgi og Oral Patologi, Odontologisk Institut,
Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet