

## 편도암의 발암 원인으로 Human Papilloma Virus를 통한 발암 기전과의 상관 관계\*

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

김세현 · 변형권 · 천제영 · 박영민 · 정진세 · 이소운

= Abstract =

### Correlation of Human Papilloma Virus Infection Status with Tonsillar Squamous Cell Carcinoma\*

Se Heon Kim, M.D., Hyung Kwon Byun, M.D., Jei Young Cheon, M.D.,  
Young Min Park, M.D., Jin Sei Jung, M.D., So Yoon Lee M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background** : Squamous cell carcinoma (SCC) of the palatine tonsils represents approximately 15–23% of all intraoral SCC. The most frequently reported risk factors for oropharyngeal cancer are smoking and alcohol. In a recent overview of HPV and tonsillar squamous cell carcinoma (TC), 51% contained HPV DNA, and HPV-16 being the most frequent type. We aimed to clarify whether HPV directly effects on the oncogenesis and biologic behavior of TC by comparison with infection prevalence, and physical status of virus.

**Material and Method** : We used HPV genotyping DNA chip (Biocore, Korea, Seoul) arrayed by multiple oligonucleotide probes of L1 sequence of 26 types of HPV and HPV genotypes are identified by fluorescence scanner. The copy numbers of HPV E2 and E6 open reading frames (ORF) were assessed using a TaqMan-based 5'-exonuclease quantitative real-time PCR assay. The ratio of E2 to E6 copy numbers was calculated to determine the physical status of HPV-16 viral gene.

**Results** : We observed a significant difference in HPV prevalence between 52 TCs and 69 CFTs (73.1% vs. 11.6%), and most of the HPVs were type 16 (87.2%) and non-episomal (94.1%) state.

**Conclusions** : This study regarding HPV infection prevalence and mechanism in the largest population of palatine tonsillar squamous cell carcinoma with chronic follicular tonsillitis revealed significant difference of HPV prevalence between TC and CFT. Most of HPV were 16 type and integrated or mixed, HPV-16 integration could be directly related to tonsillar carcinogenesis.

**KEY WORDS** : Human papillomavirus · Integration · Tonsil cancer.

## 서 론

편도의 편평상피암종(Tonsillar Squamous Cell Carci-

\*본 연구는 2006학년도 연세대학교 의과대학 교수연구비로 이루어졌음.

교신저자 : 김세현, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (02) 2228-3600 · 전송 : (02) 393-0580

E-mail : shkimmd@yumc.yonsei.ac.kr

noma)은 전체 구인두암(Oropharyngeal Carcinoma)의 약 80%를 차지한다. 해부학적 위치상 수술적 치료시 언어기능과 연하기능의 막대한 지장을 초래하며, 수술 및 방사선 치료법의 발전에도 불구하고 5년 생존률이 30% 미만으로 저조한 편이다. 따라서 정확한 암형성과정의 기전을 밝히는 것이 새로운 치료법 개발의 필수요소이고 환자의 생존률을 높이는 데 꼭 필요한 부분이다. 구인두암의 발생 위험인자로서 가장 흔한 것으로 밝혀진 것은 흡연과 음주이지만, 자궁경부암 환자의 배우자 또한 고위험군인 것으로 밝혀진

바 있다. Human Papilloma Virus (HPV)와 편도암에 관한 최근 보고에 의하면, 전체 환자의 51%에서 HPV DNA를 가지고 있었고, 이 중 가장 흔하게 동정된 유형은 고위험군인 HPV-16라는 보고가 있다<sup>1)</sup>. 따라서 편도암(Tonsillar Squamous Cell Carcinoma)의 발병기전에 있어 HPV가 관여한다고 추정할 수 있는데, 이는 자궁경부암과 편도암이 형태학적으로 서로 유사점이 있다는 근거 외에도 점막의 편평상피층은 자궁경부에서처럼 바이러스 감염에 쉽게 노출이 된다는 점 때문이다. 구인두 점막 부위에서의 HPV 감염은 그 이환률이 높은 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 특히 편도선에서 가장 흔하게 발견된다. 또한 편도암은 HPV 감염시 나타나는 koilocytotic atypia를 보이는 종양 세포를 동반하며, verrucous 혹은 papillomatous 형태를 보이는 경우가 흔하다. 하지만, 편도를 포함한 구인두 종양의 악성화에 있어 HPV가 직접적으로 연관이 있는지의 여부는 아직 불확실하다.

현재까지 여러 연구를 통해 밝혀진 HPV의 자궁 경부암 생성과 연관된 분자생물학적 병인론을 요약하면 다음과 같다. HPV 단백질 E6는 p53의 분해를 촉진하고 E7은 pRb를 불활성화 시키고 이어서 숙주의 게놈으로 바이러스의 융합(integration)이 일어난다. 바이러스 융합과 관련한 유전자의 분리는 E2 ORF(open reading frame)에서 가장 흔하게 일어나지만, 소수의 환자들에서는 E1 ORF(open reading frame)에서 발생하기도 한다. 두 부분 모두 바이러스의 복제와 전사에 있어 중요하며, E2의 분리는 E6/E7 종양단백의 조절 장해를 초래하여 궁극적으로 악성화를 유발한다. 게놈내로 융합이 안 된 Episome 상태에서는 E6/E7의 전사 단계는 HPV에 감염된 세포 내 Promotor 인자에 의해 조절되는데 이것은 전사인자 YY1의 결합부위를 포함한 바이러스성 그리고 세포성 전사인자에 의해 영향을 받는다<sup>2)3)</sup>. 따라서 HPV의 숙주 게놈내의 융합 여부를 포함한 physical status를 연구하는 것은 HPV와 편도암 발생 기전과의 연관성을 규명하는 데 꼭 필요할 것으로 사료된다.

따라서 연구자 등은 HPV의 감염률, physical status, 그리고 HPV감염으로 인한 종양생성과 연관된 유전자들 간의 비교분석을 통하여 편도암의 종양 형성과정에 있어 HPV가 직접적인 영향을 끼치는가를 밝혀내고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. c-DNA chip을 이용한 편도암과 만성편도염 환자에서 HPV 유형률 비교

#### 1) 조직 표본의 선택과 DNA 추출

1995년부터 2005년까지 기간 동안 연세대학교 의과대학

이비인후과 교실에서 편도암으로 수술 받은 52명 환자의 편도암 조직 표본과 대조군으로 만성편도염으로 편도절제술을 시행받은 총 60명의 편도 조직을 대상으로 하였다. 파라핀 블록으로 10 마이크로미터단위로 절편을 하여 DNA 추출을 위해 1.5ml 에펜드르프 튜브에 담았다. 상호 오염을 방지하기 위해 매번 마이크로팁날을 철저히 세척하고 난 후 각 블록을 절편하였다. 파라핀에 담긴 표본은 자일렌에 5분간 처리하고 이후 14,000rpm의 속도로 원심분리하였다. QiaAmp DNA minikit(Qiagen, USA, CA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 광밀도 측정을 하여 분리된 DNA의 양(260/280nm의 비율)과 질(260nm에서의 흡수)을 결정하였다. Positive control로 쓰일 CasKi 세포와 SiHa 세포는 적절한 배지에 약 5일간 동정하였다(CasKi 세포와 SiHa 세포, RPMI 1,600 [Gibco-BRL, Grand Island, N.Y.]). 단층으로 배양된 세포에 대한 프로토콜에 의해 QiaAmp DNA minikit를 이용하여 DNA를 분리하였다.

#### 2) DNA 칩을 이용한 HPV 유전자형 확정

26가지 HPV형의 L1서열로 이루어진 다수의 올리고뉴클레오티드 탐침에 의해 배열된 HPV 유전자형 DNA 칩을 사용하였다(Biocore, Korea, Seoul). 상응하는 L1의 PCR 생성물을 HPV 칩의 배열된 탐침에 보합결합시키며, Cy3를 발광시키는 532-nm laser를 사용한 형광 스캐너로 HPV 유전자형을 확인하였다(GenPix 4000B, Axon Instruments Inc, USA, CA). 이 후 그 특정 탐침의 발광도에 대한 결과는 엑셀 스프레드시트에 출력하였다.

### 2. HPV의 숙주 게놈내 Integration 여부 판정 및 Viral copy number 정량화

#### 1) Real time quantitative PCR

TaqMan 5'-exonuclease에 의한 정량적 실시간 PCR 배열을 이용하여 HPV E2 ORF와 E6 ORF의 복제수를 산출하였는데, 여기서 각각 HPV-16 E2와 E6에 특정한 상보성 탐침 존재 하에 E2 ORF의 76-bp 서열과 E6 ORF의 81-bp 서열에 대한 DNA를 증폭시키는 PCR을 시행하였다. E2 배열에 대한 프라이머와 탐침은 E2 ORF의 E2 중심부위를 검출할 수 있도록 고안되었는데, 이는 자궁경부암에서 HPV-16 융합에 따라 흔히 삭제되는 부위이다. 각 표본에 대하여 HPV-16의 E6, E2 서열을 위한 동량의 DNA가 정량화되었다. 각 표본은 3차례 배열하였다. PCR 증폭은 1×iQ SuperMix(BioRad, Hercules, CA), 200nM E2, E6 특정 프라이머(Table 1), 100nM의 이중표지된 E2(5'Hex와 3'BHQ2), E6(5'FAM과 3'BHQ1) 발광성 상보결합성 탐침 그리고 genomic DNA 템플레이트 200 ng 이 포함된 25- $\mu$ l 용액에서 시행하였다. 모든 실험은 실시

**Table 1.** Primers and probes used for real time PCR

Name	Sequence	Tm(°C)
Probe 16E2	5'-(Hex)-CACCCCGCCGCGACCCATA-(BHQ2)-3'	70
Primer 16E2F	5'-AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG-3'	59
Primer 16E2R	5'-CCAAGGCGACGGCTTTG-3'	60
Probe 16E6	5'-(6-FAM)-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT-(BHQ1)-3'	69
Primer 16E6F	5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3'	59
Primer 16E6R	5'-TGTATAGTTGTTGCAGCTCTGTGC-3'	60

간 iCycler PCR 장비(BioRad, Hercules, CA)를 사용하여 진행하였다. 연속적인 희석을 통해 HPV 바이러스 복제수에 대한 표준 그래프가 산출되었는데, 여기서 매실험마다 각 genome당 600개(각 genome당 6.6pg의 DNA)에 상응하는 CasKi(American Type Culture Collection, Manassas, VA) cell line genomic DNA를 이용하였다. 증폭 과정은 50°C에서 2분 그리고 95°C에서 10분간의 정제 단계와 이어져 녹는 단계를 위한 95°C에서 15초와 결합 단계를 위한 60°C에서 1분간의 두 단계 PCR 주기를 거쳐 총 45 주기로 이어져 과정을 포함하였다. HPV-16 바이러스 유전자의 물리적 상태를 확인하기 위해 E6 복제수에 대한 E2 복제수의 비를 산출하였다. 순수 에피솜 형태(episomal state)의 HPV-16은 동량의 E2 유전자수와 E6 유전자수를 가질 것(다시 말해 E2/E6 비=1)으로 추정되었으나, 바이러스 융합에 따른 E2의 선택적 파괴로 인한 경우에서는 E6 유전자수에 비해 E2 유전자수가 상대적으로 적을 것으로 예상되었다. 이는 곧, E2/E6 비가 1 미만일 경우에는 융합된 형태(integrated state)와 에피솜 형태(episomal state) 모두 존재함을 나타내나 비가 0일 경우에는 융합된 형태만 존재함을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 융합된 E6 유전자수는 E6 유전자 전체 수(에피솜 형태와 융합 형태)로부터 에피솜 형태의 E2 유전자수를 감하여 산출하였다. E2 대 융합 형태의 E6 유전자의 비는 융합된 형태에 대해 에피솜 형태의 양을 의미하는 것이다. 1미만의 값은 융합된 형태가 많음을 의미한다. E2(음성)와 E6(양성) 증폭에 대한 대조군으로 자궁경부암 세포로부터 얻어진 SiHa에서 추출한 DNA를 이용하였는데, 이는 순수한 융합 형태의 HPV-16 유전자를 포함하고 E2 ORF와 E4 ORF를 분열시키는 것으로 알려져 있다. 바이러스 복제의 상대적인 양은 E6 유전자수 대 SiHa 세포의 E6 유전자수의 비를 산출하여 추정하였다<sup>4-6)</sup>.

### 3. 통계학적 분석

SAS software, version 9.1(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)으로써 교차 도표와 Fisher' exact test를 이용하여 HPV의 상태간의 상관성을 분석하였다.

## 결 과

### 1. 편도암과 만성편도염 환자에서 HPV 유병률

편도암 환자 52명 중 38명에서 HPV가 검출되었으며(73.1%), HPV 양성 중앙 환자 중에서 34명이 HPV-16 양성이었다(87.2%). 나머지 4개의 표본은 HPV-18, 33, 35, 58 등의 16번 형이 아닌 고위험형 바이러스에 감염된 경우였다. 복합 감염을 보인 환자는 없었다. 69개의 만성편도염 표본 중 8개에서 HPV가 검출되었다(11.6%) : 3개에서 HPV-16이 확인되었고 나머지는 HPV-58형과 저위험형 바이러스에 감염되었다(HPV-6, 11 혹은 84). 편도암은 HPV 감염과 통계학적으로 유의한 상관성을 보였다( $p < 0.0001$  by Chi square).

### 2. 바이러스의 물리적 상태 연구

연속적으로 희석한 HPV-16의 플라스미드 DNA를 이용한 E2 ORF와 E6 ORF에 대한 실시간 증폭 시스템상 둘 간의 흡사한 증폭 그래프를 통해 볼 때 비슷한 증폭 효율을 보임을 알 수 있었다. HPV-16의 E2와 E6의 물리적 상태와 복제수에 대한 결과는 Table 2에 나타나 있다(Table 2). 융합 형태의 E6는 E6의 값으로부터 E2의 값을 감하여 산출되었다. E2 대 융합형 E6의 비는 융합형에 대한 에피솜 형태의 양을 대표하였다. 1보다 작은 값은 융합형이 지배적임을 나타냈다.

에피솜 형태만 존재할 때에는 동량의 E2와 E6가 검출되어야 할 것이다. 이는 총 34개의 HPV-16 양성 편도암의 표본 중 두 개에서 확인되었다(5.9%). 본 연구의 결과상에서는 총 34개의 HPV-16 양성 편도암 중 94.9%에서 HPV-16 융합이 나타났다. 이 중에는 E2 서열을 확인할 수 없는 14개의 표본(41.2%)과 E2/E6의 비가 0과 1사이의 값을 갖는 총 18개의 표본(52.9%)을 포함하였다. 이는 각각 숙주 계놈에 바이러스 유전자가 완벽히 융합되었다는 것과 융합형과 에피솜 형태가 혼합되어 존재한다는 것을 의미한다. 에피솜 형태의 상태가 아닌 총 31개의 HPV-16 표본 중에서 30개에서 바이러스 융합형이 지배적으로 존재하

**Table 2.** Physical status of HPV-16 infection in tonsillar cancer and tonsillitis patients

Dx	HPV-16 copies/cell	E2/E6 ratio	E2/integrated E6	Physical status
TC-1	0.29	0.03	0.03	Mixed (>Integrated)
TC-2	0.24	0.33	0.50	Mixed (>Integrated)
TC-3	0.01	0	0	Integrated
TC-4	0.05	0	0	Integrated
TC-5	2.58	0.05	0.06	Mixed (>Integrated)
TC-6	0.21	0.45	0.82	Mixed (>Integrated)
TC-7	0.06	0.34	0.52	Mixed (>Integrated)
TC-8	0.09	0.45	0.83	Mixed (>Integrated)
TC-9	0.001	0.37	0.58	Mixed (>Integrated)
TC-10	0.28	1.35		Episomal
TC-11	0.13	0.18	0.22	Mixed (>Integrated)
TC-12	0.04	0.39	0.64	Mixed (>Integrated)
TC-13	3.41	0.41	0.70	Mixed (>Integrated)
TC-14	0.001	0	0	Integrated
TC-15	0.01	0	0	Integrated
TC-16	0.04	0.07	0.07	Mixed (>Integrated)
TC-17	0.03	0	0	Integrated
TC-18	0.01	0.06	0.06	Mixed (>Integrated)
TC-19	0.08	0.08	0.09	Mixed (>Integrated)
TC-20	0.09	0.05	0.06	Mixed (>Integrated)
TC-21	0.16	0.05	0.05	Mixed (>Integrated)
TC-22	0.14	0.07	0.08	Mixed (>Integrated)
TC-23	1.26	0.49	0.96	Mixed (>Integrated)
TC-24	0.03	0.23	0.30	Mixed (>Integrated)
TC-25	0.34	0.36	0.57	Mixed (>Integrated)
TC-26	0.02	0.27	0.37	Mixed (>Integrated)
TC-27	0.07	0.34	0.53	Mixed (>Integrated)
TC-28	0.26	0.13	0.15	Mixed (>Integrated)
TC-29	1.48	0.28	0.40	Mixed (>Integrated)
TC-30	2.43	0.34	0.51	Mixed (>Integrated)
TC-31	0.005	0.65	1.84	Mixed (>episomal)
TC-32	0.07	0.28	0.38	Mixed (>Integrated)
TC-33	0.62	0.33	0.50	Mixed (>Integrated)
TC-34	0.00003	1.94		Episomal
CFT-1	0.002	1.01		Episomal
CFT-2	0.00001	1.51		Episomal
CFT-3	0.00001	26.6		Episomal
SiHa	1	0	0	Integrated

였는데, 여기서 E2 대 융합형의 E6의 비는 1미만이였다.

HPV-16 양성인 만성 편도염 환자 중 3명에서 순수 에피솜 형태를 보였다. 사망, T4 병기, N3병기, M1 병기 그리고 재발 등 불길한 임상적 양상들은 에피솜 형태가 아닌 (융합형 혹은 혼합형) HPV-16형에서 더 흔히 목격되었으나 이들은 N 병기를 제외하고는 통계학적으로 유의하지는 않았다(Fisher's exact test 에 의해  $p < 0.0001$ ). HPV 음성군과 HPV-16 양성군의 생존률간의 유의한 차이는

없었다(HPV 음성군 대 HPV-16 에피솜형의 군 대 HPV 비에피솜형의 군의 생존률 : 61.5% 대 100% 대 75%).

## 고 찰

문헌에 의하면 편도의 편평세포암종에서 HPV의 검출률이 51%로 HPV 감염과 편도 편평세포암종 간에 강한 상관 관계가 존재함을 보인 바 있다<sup>7)</sup>. 그러나 기존의 연구는 HPV의 존재를 면역화학염색, PCR, 또는 in situ hybridization 등에 의한 검출법으로 HPV의 유전자가 핵의 염색체에 융합된 상태(integrated state)인지 아니면 기회 감염 등에 의해 종양의 형성과는 직접적 상관이 없이 에피솜 형태(episomal state)로 발견되는지의 구분이 안되어 있는 상태였다. 제한효소에 의한 분해, 결합과 역 PCR 방법을 이용하여 HPV의 물리적 상태를 밝힌 최근 한 논문에서는 전체 22개의 편도암 표본에서 HPV가 검출 가능했던 11례(50%)에서 모두 에피솜 형태로 존재한다는 보고도 있으나<sup>8)</sup>, Koskinen 등의 연구에 의하면 두경부암 23례에서 HPV-DNA 중 65%에서 융합형 혹은 혼합형으로 존재한다고 보고한 바 있다<sup>9)</sup>.

본 연구는 이러한 문제점에 대한 궁금증을 확인하고자 DNA칩을 이용하여 HPV의 유형별 감염 빈도를 조사하였고, HPV-16감염의 경우 감염 상태가 종양 형성과 직접적 영향이 있는 숙주내 염색체로 HPV의 유전자가 융합된 상태인지 아니면 에피솜 상태로 존재하는지를 분석하였다. 본 연구 결과에 의하면 전체 편도편평세포암종 환자 52명 중 38명(73.1%)에서 HPV가 검출되었으며, 이 HPV 양성 종양 환자 중에 34명은 HPV-16형 양성이었다(87.2%). 나머지 4명은 HPV-18, 33, 35, 58 등 다른 고위험형 바이러스에 감염되었다. 저위험형 HPV 감염이 보고된 예는 없었으며 HPV 복합 감염도 역시 없었다. HPV-16에 감염이 확인된 34례 중 32례에서 숙주 염색체로 HPV 유전자의 융합이 존재하는 경우였다. 대조군인 편도선염에서의 연구에서는 HPV는 11.6%에서 검출되었으며, 이 중 3례에서는 HPV-16 감염을 보였고 나머지는 HPV-58과 HPV-6, 11 혹은 84번 형과 같이 저위험형 HPV 감염을 보였다. 따라서 만성편도염의 경우와 비교했을 때, 편도편평세포암종에서 HPV 감염과 유의한 상관 관계가 있음을 알 수 있었다.

HPV-16 양성 암종 환자에 여러 결실 부위들이 있음을 발견되었는데, 그 중 가장 흔한 부위로는 단백 '경첩' 부위에 해당하는 E2 ORF의 일부분이었다. 이러한 성질을 이용하여 HPV유전자 중 E2와 E6유전자의 quantitative real time PCR 결과의 비율로 HPV-16의 감염 상태가 융합형인지 에피솜 형태인지를 판단 할 수 있다<sup>10-12)</sup>. 다량의 융합

된 HPV-16는 자궁경부 상피내암의 빠른 진행과 밀접한 관련이 있다. 이전 여러 연구를 포함하여, 본 연구에서 편도편평세포암종에서 부분 혹은 완전 융합 상태의 HPV-16가 고빈도로 존재한다는 사실은 자궁경부암에서의 상황과 흡사한데, 바이러스의 융합은 많게는 전체의 63~100%까지 검출될 수 있다. 실시간 PCR이라는 기술을 이용하여 편평상피암에서 HPV의 물리적 상태를 용이하고도 언제든 재현 가능할 수 있게 분석한 경우는 더러 있었지만, 편도편평세포암종에서 적용한 경우는 없었다. 본 연구의 결과상 HPV-16 양성 편도편평세포암종 환자의 94.9%에서 HPV-16 융합을 보였으며, 이 중 41.2%에서는 완벽한 융합을 보였고, 52.9%에서는 융합형과 episomal형의 혼합 형태가 존재함을 확인 할 수 있었다. 반면에 HPV-16 양성의 만성편도염 환자 3명에서는 순수 에피솜 형태가 관찰되었다.

연구자들의 실험 결과로 미루어 편도편평세포암종의 중앙 형성 과정과 HPV감염과의 관계는 매우 상관성이 있다고 판단된다. 자궁 경부암의 병인으로 HPV의 중요성은 이미 많은 부분 밝혀졌고, 이로 인하여 HPV의 백신 개발이 이루어져 상용화 되기에 이른 점을 감안 하면, 편도편평세포암종과 HPV와의 관련성을 밝히는 것은 앞으로 편도편평세포암종의 예방 및 치료에 있어 새로운 치료법의 개발을 가능하게 하리라 기대된다.

**중심 단어 :** 편도편평세포암종 · 인간유두종바이러스.

## References

- 1) Syrjanen S: *HPV infections and tonsillar carcinoma. J Clin Pathol.* 2004;57:449-455
- 2) Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM: *Complex formation of human papillomavirus E7 protein with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J.* 1989;8:4099-4105
- 3) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM: *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell.* 1990;63:1129-1136
- 4) Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S: *Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative realtime PCR technique. J Clin Microbiol.* 2002;40:886-891
- 5) Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B: *Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. Int J Gynecol Pathol.* 1998;17:146-153
- 6) Vernon SD, Unger ER, Miller DL, Lee DR, Reeves WC: *Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. Int J Cancer.* 1997;74:50-56
- 7) Mellin H, Dahlgren L, Munik-Wikland E, et al: *Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. Int J Cancer.* 2002;102:152-158
- 8) Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, et al: *Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. Int J Cancer.* 2003;107:401-406
- 9) Venuti A, Manni V, Morello R, De Marco F, Marzetti F, Marcante ML: *Viral integration into the host genome occurred in 43% of cases of HPV-16 and in 20% of cases of HPV-6. Viral RNA expression was detected by reverse transcription-PCR only in HPV-16 positive tumors. J Med Virol.* 2000;60:396-402
- 10) Si HX, Tsao SW, Poon CSP, Wong YC, Cheung ALM: *Physical status of HPV-16 in esophageal squamous cell carcinoma. J Clin Virol.* 2005;32:19-23
- 11) Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B: *Disruption of the E1 and E2 open reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. Int J Gynecol Pathol.* 1998;17:146-153
- 12) Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S: *Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. J Clin Microbiol.* 2002;40:886-891