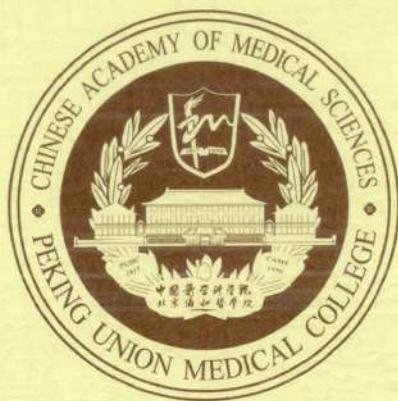


北京協和醫學院
中國醫學科學院

碩士研究生學位論文



北京協和醫學院研究生院

学校代码: 10023

学 号: S2010018014

中国医学科学院医学生物学研究所
硕 士 学 位 论 文

中国西南地区妇女宫颈标本中人乳头瘤病毒的分子
流行病学研究

**Molecular epidemiologic studies on Human
papillomavirus in cervical samples from Southwest
China**

论文作者: 杨丽娟
指导教师: 孙强明研究员
导师小组: 李琦涵研究员
刘龙丁研究员
马绍辉副主任技师

学科专业: 生物化学与分子生物学
研究方向: 分子流行病
完成日期: 二〇一三年五月

目 录

中文摘要.....	1
Abstract.....	3
前 言.....	5
材料与方法.....	12
1. 研究对象的筛选.....	12
2. 样品的收集.....	12
3. 病毒 DNA 的提取.....	12
4. HPV 定型.....	13
5. PCR 引物的设计与合成.....	13
6. PCR 扩增.....	14
7. 序列测定及核苷酸变异分析.....	14
8. 基因进化树及选择压力分析.....	14
研究结果.....	15
1. 病毒 DNA 质量鉴定.....	15
2. 巢式 PCR (nest-PCR) 结果.....	15
3. ASC-US 人群 HPV 流行情况.....	16
4. 宫颈癌患者 HPV 流行情况.....	18
5. ASC-US 人群 HPV16 型, 58 型 E6 和 E7 基因的突变分析.....	20
6. 宫颈癌患者 HPV16 型, 18 型 E6 和 E7 基因的突变分析.....	30
讨论.....	37
1. 中国西南地区妇女 HPV 流行情况及型别分布.....	37
2. 中国西南地区妇女中 E6/E7 基因变异情况.....	39
3. 意义.....	41
小结.....	41
参考文献.....	42
附 录.....	50
致 谢.....	52
个人简历.....	53

中文摘要

感染人乳头状瘤病毒（HPV）是导致宫颈癌的一个重要因素。宫颈癌在全球每年新发病例约50万，死亡例数约25万，在妇科肿瘤中发病率居第2位。HPV主要感染皮肤以及粘膜鳞状上皮，分为2大类，皮肤型和粘膜型。粘膜型主要感染人泌尿生殖道的黏膜上皮，导致与泌尿生殖器官相关的多种疾病。根据与癌症发生的关系大小，粘膜型HPV分为高危型（HR）和低危型（LR）。高危型主要有HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59和66型；低危型主要有HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81型。分子流行病学和病毒学研究发现，HPV感染宫颈可发展为宫颈癌与HPV型别有关。在不同国家和地区HPV感染率及其型别分布存在差异，具有很强的地域性，其与宫颈癌相关的型别、E6/E7基因变异情况也不同。关于宫颈癌疫苗的研究，预防性疫苗主要以L1基因为主，治疗性疫苗主要以E6/E7基因为靶点。到目前为止，对于人乳头状瘤病毒(HPV)在西南地区妇女中的流行情况，优势型别以及优势型别的E6/E7基因变异情况的报道很少。本研究旨在探讨中国西南地区妇女HPV感染的分布规律以及HPV-16、18和58型E6、E7基因的变异情况，为评价HPV疫苗接种情况以及筛查与癌症相关的潜在风险因素提供了研究数据，并为下一步研究以HPV E6和E7蛋白为基础的治疗性疫苗提供了重要的实验数据。

本论文以中国西南地区妇女门诊病人中正常以及炎症细胞人群（ASC-US，即意义不明的不典型鳞状细胞）和宫颈癌患者为研究对象，调查了该区HPV亚型的感染以及分布。对采集获得2000例妇科门诊宫颈脱落细胞样品以及74例宫颈癌标本开展相关的研究。通过提取基因组DNA，以MY09/ MY11 为外引物，GP5 + / GP6 + 为内引物，采用nest-PCR法对样品HPV-DNA高变区L1区的相应基因进行扩增、测序和分型，并对优势型别进行E6和E7基因特异性扩增，测序。E6和E7基因测序后用软件Geneious4.8.4进行比对，将比对的序列上传至GenBank获得基因登录号。用软件Mega4.1使用邻接法（Neighbor Joining, NJ），对E6和E7基因完成进化树分析。应用 PAML4.0 软件内的位点模型分析E6和E7基因经受正向选择的位点，依卡方 χ^2 分布进行似然比值检验。

结果表明，中国西南地区妇女ASC-US人群中HPV的流行高危型主要型别为HPV-16型，HPV-58型，HPV-33型；低危型主要为HPV-6型，HPV-11型。宫颈癌患者中以HPV-16，HPV-18型为主。ASC-US人群易感人群为31岁-40岁妇女，宫颈癌患者的易感人群比上述年龄推后10岁。而且，宫颈鳞状细胞癌患者中，HPV-16型为主要感染亚型。通过对E6/E7基因变异分析发现，中国西南地区妇女中HPV-16型E6基因最常见的突变位点为T178G或T178A，即D25E；E7基因常见突变位点为A647G（N29S）和同义突变点T846C。E6/E7基因序列联合分析发现HPV-16型突变位点E6-D25E与E7- N29S-T846C为连锁突变位点，并且为常见变异型。HPV-58型E6基因最常见的突变位点为K93N，E7基因常见突变位点为同义突变点T744G和非同义突变

点T20I, G41R, G63S, G63D和V77A, 且突变T20I-G63S和突变G41R-G63D为连锁突变位点。HPV-18型E6基因发现T485C和C549A两个同义突变点。

进化树分析表明中国西南地区流行的HPV-16E6/E7变异体主要为亚洲型变异体, 没有发现非洲1型变异体和非洲2型变异体。HPV-58型 E6/E7基因序列起源于东南亚分支。

选择压力分析表明, 虽然发现HPV-16型E6基因正选择突变位点为32E, E7基因正选择突变位点为29S; HPV-58型E7基因63G为正选择位点, 但经过LRT检验, 差异没有统计学意义, 即没有没有证据表明HPV-16型、HPV-58型E6/E7基因受到正选择。

【关键词】 子宫颈癌 人乳头瘤病毒 进化树分析 基因变异 E6 基因 E7 基因

Molecular epidemiologic studies on Human papillomavirus in cervical samples from Southwest China

Abstract

HPV is suggested to be an important risk factor for the progression of cervical cancer. Cervical cancer had about 500,000 new cases and death cases about 250,000 every year in the world, the incidence of gynecology tumor is at the second place. The HPV mainly infect skin and mucosal squamous epithelium, divided into 2 categories, skin type and mucous membrane type. Mucous membrane type main infect the mucosal epithelium of the urogenital tract, leading to various urogenital canal diseases. HPV have been classified on the basis of their epidemiological association with cervical cancer as high-risk types (HR, HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66) and low-risk types (LR, HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81). Molecular epidemiology and virology study indicate that the HPV infection cervical can develop into cervical cancer which is associated with HPV type. In different countries and regions, the distribution of HPV infection rate and type is different, its distribution has distinct local characteristics, the type which associated with cervical cancer and E6 / E7 gene variants are also different. A preventive vaccine mainly targets L1 gene, therapeutic vaccine mainly targets the E6 / E7 gene. So far, there are few data on the population prevalence of HPV infection, dominant types as well as the E6/E7 gene mutation of the advantage types in Southwest Chinese women. This study provides research data for evaluating HPV vaccination and screening potential risk factors which was associated with cancer. It provides experimental data for the development of HPV therapeutic vaccine which is based on HPV protein E6 and E7.

This paper investigated the distribution of HPV subtypes in southwest China ASC - US groups (normal and inflammatory cells) and cervical cancer patients. The genome DNA was extracted from 2000 gynecological outpatient samples and cervical cancer tissues. For Human papillomavirus (HPV) genotyping, the genomic DNA was first amplified by the consensus MY09/MY11 primer pair followed by nested PCR with GP5+/GP6+ primers, then the PCR products were subjected to direct DNA sequencing. E6 and E7 genes of HPV advantage type viral DNA were then amplified using E6 and E7 specific primers, the PCR products were purified and sequenced. Geneious4.8.4 multiple sequence alignment analysis was carried out to calculate the percentage of sequence similarity between E6/E7 genes. Phylogenetic trees of E6/E7 gene sequences were constructed by the Neighbor-Joining method and the Kimura 2-Parameter model by MEGA package, version4.1. The E6 and E7 gene sequences of the HPV viral strains

studied were deposited into the NCBI GenBank database. To estimate selection pressure acting on the HPV-16 and HPV-18 E6/E7 gene sequences, codon-specific, non-synonymous and synonymous substitutions were inferred using the PAML 4.0.

The results show that high risk subtypes(HPV16, HPV58, HPV33) and low risk subtypes (HPV6 , HPV11) were the most common in Southwest China among ASC-US groups. HPV16, HPV18 were the most common in Southwest China among cervical cancer. ASC-US susceptible age were 31 to 40 years old women, cervical cancer were after 10 years old than ASC-US groups. what is more, HPV16 is the main type in cervical squamous cell carcinoma. Investigate E6 and E7 gene variations found that T178G或T178A, namely D25E in HPV16 E6 gene, A647G(N29S) and synonymous mutations T846C in HPV16 E7 gene were the most common mutations. E6 / E7 gene sequence combined analysis found that HPV 16 E6 - D25E and E7 - N29S-T846C was a linkage mutation which is the common variant. K93N in HPV58 E6 gene, synonymous mutations T744G and T20I, G41R, G63S, G63D, V77A in HPV16 E7 gene were the most common mutations. The mutation T20I and G63D in E7 gene was a linkage mutation. HPV18 E6 gene found two synonymous mutations, C549A and 485C.

Phylogenetic analysis showed that Asian (As) variants of HPV-16 were predominant in southwest China. None of African-1, African-2 variants of HPV-16 was found in this region. HPV-58 E6/E7 sequences in Southwest China originating in Southeast Asia branches.

Selection pressure analysis showed that HPV-16 E6 gene positive selection sites was 32E, E7 gene positive selection sites was 29S; HPV-58 E7 gene positive selection sites were 63G. There was no evidence of positive selection in the sequence alignment of HPV-58 E6 and E7 genes.

Key words: Cervical cancer; human papillomavirus; Phylogenetic analysis; Genetic variability; E6 gene; E7 gene

前言

宫颈癌在妇科肿瘤中发病率居第2位,就世界范围而言,全球每年新发病例约50万,死亡例数约25万^[1]。感染人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是导致宫颈癌的一个重要因素。分子流行病学研究发现,在宫颈癌患者的标本中,有96.6%检测出人乳头瘤病毒^[2]。

1. HPV生物学特性

人乳头瘤病毒(HPV)属乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒属,是一种小分子DNA病毒,主要感染人类表皮和粘膜鳞状上皮。其基因组为双链环状DNA,长度为7.5-8.0kb,有9个开放阅读框(ORF),分为早期基因区(E区)、晚期基因区(L区)和上游控制区(LCR区)三个功能区。(1)E区:分别编码E1、E2、E4、E5、E6、E7等六个早期蛋白,参与病毒DNA的复制、转录和翻译调控等功能。E1与病毒的起始与复制相关;E2可作为反式激活蛋白,其与病毒DNA转录的反式激活过程相关;E4与病毒的成熟胞浆蛋白相关;E5编码一种小蛋白,这种蛋白通过细胞生长因子受体激活上游调控区;E6蛋白能与E6相关蛋白E6AP和E6结合蛋白E6BP结合。E5、E6和E7蛋白通过蛋白-蛋白相互作用,在病毒生活周期中发挥重要作用^[3]。(2)L区:编码主要衣壳蛋白L1和次要衣壳蛋白L2。L1高度保守,其特异性强,可以诱导产生中和抗体;L2参与编码的衣壳蛋白较少,但容易发生突变。

(3)长末端调控区(LCR)区:含有病毒基因组DNA的复制起点以及病毒表达所必需的调控元件,调控病毒的转录与复制。

2. HPV与疾病

目前发现HPV有100多种基因亚型,其中有30多种可以特异性感染生殖器,20多种与肿瘤的发生相关^[4]。皮肤类HPV和粘膜类HPV其组织嗜异性不同。在粘膜类中,根据HP型别与宫颈癌发生的危险性高低,将其分为低危型(low-risk types)和高危型(high-risk types)。近年来的研究证实,高危型HPV持续感染是宫颈癌的主要致病因素。低危型HPV有HPV6、11、40、42、43、44、54、61、70、72、81等亚型,引起皮肤疣状增生、外生殖器疣和宫颈良性病变,不引起癌变。高危型HPV有HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66等亚型,持续感染高危型HPV与子宫颈癌及宫颈上皮内瘤变(CIN)的发生有关^[5]。其中,HPV16、18是世界范围内的宫颈癌中比较常见的亚型^[6]。宫颈鳞癌中HPV16、18、58、59等亚型多见,主要以HPV16型为主;而在宫颈腺癌、腺鳞癌中则以HPV18型常见,但也有研究发现在宫颈腺癌中,HPV16型所占的比例也比较高^[7,8]。

3. HPV流行情况

在不同国家和地区HPV感染率及其型别分布存在差异,具有很强的地域性,其与宫颈癌相关的型别也不同^[2]。研究发现,在宫颈癌患者组织标本中,检测到HPV16、18、56等亚型,其中HPV16、18型占70%^[9,10]。研究表明,中国的HPV感染率为

15.9%^[11]，除了 HPV16、18 型外，HPV52、58 型检出率最高^[12]，而在亚裔美国人中除了 HPV16、18 型外，HPV45 型也较常见^[13]。在年轻女性中，HPV 感染一直有较高的感染率，其感染率可达 20%-50%；感染的高峰年龄在 15-25 岁之间，30 岁后感染率下降，之后随着年龄的增长，感染率呈逐渐下降的趋势。但是中国妇女 HPV 感染者的年龄分布曲线却呈现下降后再升高的趋势^[14, 15]。世界卫生组织（WHO）以及国际癌症研究署（IARC）在中国山西省阳城县、广东省深圳市和辽宁省沈阳市共 3 个地区的研究表明，中国妇女 HPV 的感染，年龄分布发现中年女性（35-44 岁）感染率最高，25 岁以下妇女感染率则较低，这说明中国中老年女性具有更大机会获得 HPV 持续性感染^[14-16]。

4. HPV 感染的高危因素

HPV 的感染途径主要是性传播，但经生殖部位的皮肤接触（如阴茎-阴唇），也可以引起 HPV 传播。初次性交年龄早，性生活活跃，妊娠，吸烟，饮食，卫生状况以及人体免疫状态差等人群容易感染 HPV。对于初次性交年龄过早的女性而言，由于其子宫颈表层鳞状上皮细胞还没有完全发育成熟，易被病毒感染，这也是 HPV 感染的高危因素^[17-19]。而吸烟，饮食，卫生状况，HIV 或疱疹病毒感染等因素亦会增加感染 HPV 的风险，协同促进宫颈癌的发生^[20, 21]。对于 HPV 感染的高危因素的研究，口服避孕药（OCP），婚姻状况及性伴的数量等因素不同的研究，其相关系数也不同^[11, 20]，这可能是研究者在研究时入选标准不同以及国家与地域差异。

5. HPV 感染宿主细胞过程

HPV 衣壳蛋白由 L 区基因编码的主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 组成，20 面立体球形结构，病毒 DNA 则包裹于球心，使其可免受核酸酶的破坏。L1 序列在不同型别的 HPV 中高度保守，是 HPV 主要的种属特异性抗原，可诱导产生中和性抗体^[22]。HPV 感染是一个动态的过程，L1 蛋白可识别和侵袭宿主细胞的特定部位，协助病毒 DNA 进入宿主细胞。HPV L1 识别宿主细胞并与细胞表面黏附后，携带病毒 DNA 利用延迟摄取动力学，经由网格蛋白介导的细胞内小囊泡或不依赖网格蛋白细胞膜穴样内陷等途径进入细胞，之后 L1 降解并释放病毒 DNA，实现 HPV 的感染^[23, 24]。当基底层细胞在皮肤或粘膜的上皮细胞受轻微损伤暴露或其他原因暴露后，病毒 DNA 便通过基底层细胞进入机体，并建立起低复制状态的游离病毒基因组，随细胞染色体共同复制，之后感染细胞离开基底并分化，在上层高度分化的上皮细胞核内，赘生物基因组复制，晚期基因表达并完成病毒颗粒的装配^[25]。宿主感染 HPV 后，能够自行清除大多数的 HPV，HPV 自然清除率为 82.03%，但不同型别的 HPV 自我清除率不同，高危型 HPV 的清除率比低危型 HPV 低^[11]。有些高危型 HPV 在宿主的免疫防御机制发生缺陷或病毒基因发生突变的情况下，会持续感染宿主，最终发展为宫颈癌。

宿主感染 HPV 病毒后，其 DNA 主要以两种形式存在于基底细胞中，一种以游

离形式存在于细胞核内,一般引起外生殖器疣以及良性或癌前病变;另一种则与宿主细胞 DNA 整合,发生整合后,病毒 DNA 片段将永久插入宿主染色体中,随宿主细胞复制不断表达病毒 DNA,这种整合现象是宫颈病变的标志^[26]。HPV 的致癌蛋白是早期转录 E 区编码的 E6 和 E7 蛋白^[27]。E6 蛋白为含 151 个氨基酸的锌指蛋白,可持久存在于人类乳房原始细胞中,使乳腺上皮细胞永生化。E7 蛋白为含有 98 个氨基酸的磷酸化核蛋白,与位于 C 末端的锌指结构形成二聚体,与 E6 蛋白作用可持久存在于人类原始角质细胞中,其单独也能使人角质细胞(HFK)永生化,如 HPV16、18、31 型的 E7 蛋白^[27, 28]。

许多因素综合在一起可以导致癌症,但从 HPV 感染宫颈组织的基底细胞到不同级别的宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)再到宫颈癌(cervical cancer, CC)是一个渐进过程。在这个过程中,HPV 抑制宿主的免疫应答,实现持续感染;宿主细胞形态学改变,如细胞的永生化;遗传物质的改变,如染色体的复制、缺失;基因的突变;细胞周期的调节;辅助因子的作用,如易感基因、吸烟、饮食、性激素等。病毒持续感染宿主,此时病毒 DNA 复制发生在上皮细胞,由于上皮细胞受到基底膜的分隔,使得免疫系统无法接触感染的上皮细胞和释放的病毒粒子,病毒就能在这个免疫豁免组织中持续感染。

6. HPV 致癌机制

E6、E7 原癌蛋白致癌的 p53 和 pRb 依赖性途径。HPV 感染宫颈上皮细胞后,HPV 病毒感染宿主后,在游离体中,由于 E2 的抑制作用,E6、E7 的表达量比较低,但在整合体中,E2 的抑制作用缺损,此时 E6、E7 的表达大大增强。p53 是一种肿瘤抑制蛋白,抑制细胞周期 G1 期,促进细胞凋亡和 DNA 修复^[29]。E6 蛋白通过泛素连接酶与 E6 相关蛋白(E6-AP),p53 蛋白的核心部分相结合形成三聚体,E6 蛋白将活化的泛素转移到 p53 蛋白上,使 p53 蛋白进行泛素化分解,使 p53 蛋白失去控制 G1/S 节点,导致细胞基因突变和染色体不稳定,有利于病毒基因组复制^[30]。pRb 是一种生长抑制蛋白,调控细胞周期。非磷酸化的 pRb 蛋白可以与 E2F 家族的转录因子结合,形成 pRb-E2F 复合物,阻断 E2F 激活 S 期相关基因,从而抑制细胞增殖。当 Cyclin/CDK 复合物磷酸化 Rb 后,E2F 释放,S 期相关基因激活,细胞方可进入 S 期。E7 蛋白通过 Rb 结合位点与非磷酸化的 pRb 结合形成高亲和性复合物,使 pRb-E2F 复合物解离,E2F 被释放,激活 S 期相关基因,使细胞增殖失控^[31]。

E6、E7 原癌蛋白致癌的非依赖 p53 和 pRb 途径。E6 原癌蛋白可能通过激活端粒酶使正常细胞逃避衰老而永生化。干扰素调控因子 3 (IRF-3) 在双链 RNA 存在或病毒感染时会被激活,与其它转录调控因子,干扰素 β (IFN- β) 启动子调控元件结合,是 IFN- β 的转录激活因子。IRF-3 与 HPV16 结合后,转录活性被抑制,使 IFN- β 的表达降低,HPV 病毒可逃逸正常的免疫反应^[32]。E7 原癌蛋白的锌指结构,可以

与组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HD) 结合, 使细胞无限增殖。

7. HPV 预防性疫苗

持续感染高危型 HPV 是宫颈癌发生的一个重要危险因素。采用 HPV 疫苗预防 HPV, 从而预防宫颈癌, 是预防宫颈癌的最有效的防治方法。HPV 疫苗包括预防性疫苗和治疗性疫苗。HPV 的主要衣壳蛋白 L1 可诱导产生中和抗体, 纯化的 L1 蛋白可自行装配, 形成类似 HPV 的中空的壳, 无传染性和致瘤性, 有良好的抗原性、耐受性和免疫原性, 命名为病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP), VLP 是预防性疫苗的基础。目前已经有两种商品化的 HPV 预防性疫苗上市, 两种疫苗均是应用重组技术, 不包含任何活的生物制品或 DNA。美国食品与药物管理局 (Food and drug administration, FDA) 在 2006 年正式批准美国默克公司生产的 Gardasil 宫颈癌预防性疫苗上市。Gardasil 疫苗使用了病毒基因组晚期区的 L1 基因, 为四价疫苗, 包含 HPV-16、HPV-18、HPV-6 和 HPV-11 四个型别, 每剂量中 HPV-6、HPV-11、HPV-16 以及 HPV-18 的 VLP 配方分别是 20、40、40、20 μ g, 并添加 225 μ g 的传统铝盐佐剂 (amorphous aluminum hydroxyphosphate sulfate adjuvant, AAHS); 在疫苗生产上, 采用酿酒酵母发酵以及胞内提取技术; 采用肌肉注射, 共注射 3 次, 每次 0.5mL, 注射时间顺序为 1、2 及 6 个月后; 接种年龄及人群适用于 9-26 岁的女性和男性人群。由于使用了新型佐剂, 2007 年美国 FDA 才正式批准英国葛兰素史克公司生产的 Cervarix 宫颈癌预防性疫苗上市。Cervarix 疫苗使用了临床分离株 GU-1, 该株最大的特点是其 L1 基因含有 C 端的缺失突变, 因此表达产物具有更高的免疫原性。Cervarix 疫苗为二价疫苗, 包含 HPV16 和 HPV18 两个型别, 每剂量 HPV16 和 18 的 VLP 均含 20 μ g, 并添加 500 μ g 的氢氧化铝佐剂和 30 μ g 的新型佐剂 3 去乙酰单磷酸脂质 A (3-deacylated monophosphoryl lipid A); 疫苗生产上则采用了昆虫表达系统 (甜菜夜蛾的细胞系); 同样采用肌肉注射, 共注射 3 次, 每次 0.5mL, 注射时间顺序为 0、1 及 6 个月后; 接种年龄及人群适用于 10-25 岁的女性人群。自两种疫苗上市以来, 国际上超过 170 个国家已引进这两种疫苗, 但在中国未获得国家食品药品监督管理局批文, 原因是两种疫苗在中国的临床试验尚未结束。另外, 厦门大学的国家传染病诊断与疫苗工程研究中心已完成了 HPV 预防性疫苗的研发。该疫苗也为二价疫苗, 包含 HPV16 和 HPV18 两个型别, 每剂量中 HPV16 和 18 的 VLP 含量分别 40 μ g 和 20 μ g, 同时也添加了传统的铝盐佐剂, 采用肌肉注射, 免疫量为 0.5mL, 目前 II 期临床已经结束, III 期临床正在进行。两种上市 HPV 预防性疫苗自上市以来, 无论是从生产方得到的数据还是美国的 FDA 和疾病预防控制中心 (CDC) 得到的数据, 均显示疫苗的安全性是可信的。避免感染的最重要基础就是能够产生中和抗体。临床研究表明, 在接种完 3 个剂量以后, 在 15-26 岁的女性中, 两种疫苗均可以检测到任一 HPV 型别的抗体, 而且抗体水平为自然感染引起的抗体水平的 10-104 倍^[33-35]。上

述两种疫苗不仅可以防止妇女感染 HPV16 和 HPV18, 预防效果达 100%, 而且对 HPV 其他型别的预防也有一定效果, 另外四价疫苗还能预防生殖器疣的发生^[34, 36, 37]。预防性疫苗的研制成功给世界各国的宫颈癌防治带来了巨大影响, 通过疫苗预防癌症也是防治癌症的一种方法。自 2006 年 HPV 预防性疫苗上市以来, 人群对疫苗的认知与接受情况不容乐观。虽然各国人群中 HPV 疫苗的接受意愿较高^[38, 39], 但在年轻女性人群中疫苗实际接种率低^[30]。影响疫苗的接种率的因素主要有: (1) 年轻女性对 HPV 知识的缺乏和对危险因素的错误认识^[40]; (2) 不同国家及地区由于种族与宗教的不同, 疫苗接受程度也不同, 白人约有 63% 的人接受疫苗, 而非洲裔美国人和南亚的女性只有 11%-25% 接受^[41]。(3) 疫苗价格费用太高, 在欧洲, 人群对疫苗接种的意愿虽然很高, 但卫生部资料显示, 仍有 10.5% 的患者因疫苗价格较高而没有接受疫苗接种。此外, 疫苗的安全性、有效性以及副反应, 政府的政策也是影响 HPV 疫苗接种的因素^[42]。

8. HPV 治疗性疫苗

宫颈病变的治疗虽然可以用传统的手术治疗, 如子宫颈电圈环切术 (Loop Electrosurgical Excision Procedure, LEEP), 但是根治的方法还是用 HPV 治疗性疫苗。E6 和 E7 蛋白在大部分宫颈癌组织中持续表达, 因此 E6 和 E7 蛋白是研制宫颈癌治疗性疫苗的靶点^[43]。目前研制的 HPV 治疗性疫苗主要有活载体疫苗, 多肽/蛋白疫苗, DNA 疫苗以及树突状细胞 (dendritic cell, DC) 疫苗。活载体疫苗是一种将编码目标抗原的外源基因插入到病毒或细菌疫苗株的基因组中, 使其在机体里能够高效表达抗原蛋白的技术。Lm-LLO-E7 疫苗, 是一种以李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 为载体, 以 E7 为抗原的 HPV 治疗性疫苗, 其临床应用显示对于 15 例传统疗法失败的 15 例晚期患者注射该疫苗后, 8 例患者病情得到控制^[44]。TA-HPV 是以牛痘病毒为载体, 携带 HPV16 和 HPV18E6/E7 基因的 HPV 治疗性疫苗, 其 I / II 期临床研究表明, 该疫苗可诱发晚期宫颈癌患者^[45], I b 期或 II a 期宫颈癌患者^[46]产生 HPV 抗原特异性免疫反应。多肽/蛋白疫苗是一种将病毒合成的蛋白质产物输入到体内, 诱导细胞毒性 T 细胞 (CTL) 起反应, 杀伤肿瘤细胞。SGN-00101 疫苗是将卡介苗 (BCG vaccine) 的热休克蛋白 Hsp65 共价结合 HPV16 E7 蛋白, 以 Poly-ICLC 为佐剂的蛋白疫苗, II 期临床实验表明, 52.9% 的受试者出现免疫反应^[47], 而以 Montanide ISA-51 为佐剂, 含有 HPV16 E6/E7 全长的重叠多肽疫苗, 其治疗 20 例外阴鳞状上皮内瘤变 III 期患者的结果表明, 79% 的患者出现客观的临床缓解, 85% 的患者产生特异 T 细胞^[48]。DNA 疫苗就是将重组的真核质粒 DNA (含有编码特定抗原的基因) 注射到体内, 促使外源基因在体内表达, 刺激机体产生抗原特异性的体液及细胞免疫反应。ZYC101a (Amolimogene) 疫苗是一种将重组质粒 DNA (含有编码 HPV16 和 HPV18 E6、E7 基因) 包裹到一种生物降解的颗粒中, 然后注射到体内的 DNA 疫苗。临床试验发现, 其对年轻 CIN2/3 患者有明显

的治疗效果^[49]。由于用树突状细胞制作疫苗的费用昂贵，制作方法繁琐，并且需要大规模的培养，同时有部分病人会发生超敏反应，目前进入临床阶段的 DC 疫苗很有限。

9. HPV 筛查技术

目前子宫颈癌的筛查技术及方案有多种。(1)传统的细胞学检查方法用的是巴氏涂片法，涂片中的凹空细胞与 HPV 感染有关。自使用此法筛查宫颈癌以来，宫颈癌死亡人数急剧下降。尽管此法特异度很高，但是其敏感性不高，易出现假阴性，临床应用中发现多数 HPV 阳性病人的涂片中都没有发现凹空细胞。近年来新的细胞学检查方法采用液基超薄技术 (ThinPrep cytology test, TCT) 进行宫颈细胞学检查，辅助细胞学诊断方法 TBS (The Bethesda System) 描述性细胞学诊断分级，该法降低了巴氏涂片的假阴性率^[50]。国际癌症协会 TBS 分期将宫颈细胞学检查分为以下 5 种：正常范围内的细胞 (within normal limits, WNL)；意义不明的非典型鳞状细胞 (atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS)；轻微的鳞状上皮内病变 (squamous intraepithelial lesion, SIL)；低度鳞状上皮内病变 (low grade squamous intraepithelial lesion, LGSIL)，即 CIN1；高度鳞状上皮内病变 (high grade squamous intraepithelial lesion, HGSIL)，即 CIN2 和 CIN3^[51]。(3)利用病毒样颗粒通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测血清中 HPV 特异性抗体的血清学检测方法，该法临床应用很少，这是因为血清中的抗体滴度较低，很难被检测到。(4)使用 HPV 病毒高度保守序列 L1 区各型别的通用引物，如 MY09/MY11 或 GP5+/GP6+，通过 PCR 检测方法有效特异地扩增相应的亚型，该法灵敏度高，可以区分出 HPV 各型别。(5)使用原位杂交检测法 (放射性或非放射性的 DNA 或 RNA 探针标记细胞或组织切片)，该法实验程序复杂，常用来 HPV 相关的细胞和病理学研究，但不适用于流行病学方面的研究。(6)Southern 杂交法的实验步骤复杂，很少使用。该法是制备细胞 DNA (酚氯仿抽提) 后，通过琼脂糖凝胶电泳、变性、转膜、探针标记、杂交和放射自显影进行 HPV 型别鉴定。(7)第二代杂交捕获法 (HybridCaptureTM, HC-II)，一种液相杂交法，采用 96 孔平板法，利用特异的非放射性 RNA 探针与变性后的 HPV-DNA 单链进行杂交，同时利用酶联免疫化学发光的原理将基因信号放大，达到检测靶基因的目的。可以区分 13 种高危型 HPV (HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 型) 和 5 种低危型 HPV (HPV6、11、42、43、44 型)，该法是目前美国 FDA 惟一批准的可在临床使

用的一种检测 HPV-DNA 技术。(8) 醋酸染色法 (VIA), 用 5% 醋酸涂抹宫颈, 1 min 后观察宫颈, 可根据染色后的白色上皮的范围、厚度、浑浊度、表面形态等做出相应的初步诊断。碘染色法 (VILI), 用 5% 碘液涂抹宫颈后观察宫颈颜色变化情况, 正常的子宫颈呈棕褐色, 病变区未着色呈芥末黄, 根据没有着色的程度、边界状况、大小、表面形态等做出初步诊断。阴道镜检查法, 在阴道镜指示下进行活检。

2003 年美国妇产医师会 (ACOG) 推荐以下筛查方法: 未超过 30 岁的妇女, 如果其连续 3 年 (每年 1 次) 的宫颈细胞学检查为阴性, 则可以每 2-3 年进行 1 次细胞学检查。30 岁以上的妇女应联合使用巴氏涂片进行粗筛。对于细胞学诊断为 ASCUS 或 LSIL 的患者, 对 HPV-DNA 进行检测, DNA 检测为阳性的患者再进行阴道镜检查^[52]。

在西方发达国家, 宫颈癌筛查方法的有效实施使该病的死亡人数急剧下降, 但在那些社会经济不发达的地区, 由于缺乏上述方法所需的设备和专业人员, 宫颈癌不仅相当常见, 而且多为晚期, 预后很差。因此可以采用醋酸或碘染色法 (VIA/VILI) 初筛, 之后对可疑患者再采用阴道镜检查法, 该筛查方法已在发展中国家应用, 并取得了一些效果^[53]。

研究表明, HPV L1 蛋白随 SIL 的进展, 其表达水平逐渐降^[54]。此外, 病毒在感染宿主细胞后, L1 降解释放 DNA。因此, 对宫颈组织 HPV L1 蛋白表达进行检测, 将不仅可以监测病毒繁殖周期, 还可以根据蛋白定量检测结果判断患者病情是否恶化。根据这一特性, 对于宫颈癌的预防和筛查也可以采用以下方法: 定期随访宫颈液基细胞学筛查阴性的患者, 阳性患者对其进行 HPV 感染检测, 对于 HPV 阳性的患者, 进一步检测其 HPV L1 蛋白的表达情况, 如果结果为阳性则应密切随访, 阴性患者进行下一步治疗^[55]。

国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 专题工作组警示, 设计筛查检测人乳头瘤病毒的方法时必须考虑 HPV 病毒类型之间的差异和其他社会因素^[56]。到目前为止, 对于中国西南地区妇女 HPV 的主要流行型别, 易感年龄段以及宫颈癌中 HPV 的感染情况以及癌症中的主要感染型别等相关数据很少。本研究主要是针对中国西南地区, 研究该地区人乳头状瘤病毒的分布, 并检测 HPV16、18、58 型 L1、L2、E6 和 E7 的核苷酸变异、基因多态性以及发展史, 这些数据为评估人乳头状瘤病毒在该地区的潜在危险提供了依据, 为该地区宫颈癌预防和筛查工作提供了数据基础, 并为研究基于 E6、E7 蛋白为抗原的 HPV 治疗疫苗提供了流行病学方面的相关资料。

材料与方法

1. 研究对象的筛选

宫颈脱落细胞标本取材于昆明医科大学第一附属医院、昆明医科大学第三附属医院（云南省肿瘤医院）以及贵州省兴义市医院进行 HPV 检测的妇女宫颈脱落细胞标本（ASC-US 人群，正常以及炎症细胞）。对自愿参与（签署知情同意书）的研究对象进行登记并排除妊娠和产后不足 3 个月的妇女，有子宫切除病史的妇女，患鳞状上皮内病变 CIN1、CIN2 和 CIN3 的妇女以及正进行宫颈癌治疗的妇女。宫颈癌组织标本取材于昆明医科大学第三附属医院（云南省肿瘤医院）以及贵州省兴义市医院宫颈癌患者。同样对自愿参与（签署知情同意书）的研究对象进行登记并排除妊娠和产后不足 3 个月的妇女，有子宫切除病史的妇女以及患鳞状上皮内病变 CIN1、CIN2 和 CIN3 的妇女。

2. 样品的收集

宫颈脱落细胞的收集：采样前 24 小时内禁止性行为，采用专用毛刷取材，采样时用窥器使子宫颈完全暴露，擦净子宫颈口的分泌物，然后将宫颈刷尖端伸入宫颈口，直至两翼刷毛和宫颈口两侧紧密接触，将宫颈刷朝一个方向稍用力旋转 2 周后，以取得脱落细胞，抽出宫颈刷，将取样后的毛刷放入加有专用细胞保存液的取样管中，4℃保存。将标本保持 4℃运到相对独立的实验室（应远离细胞学和分子生物学检测），小批量分装于 2 个 1.5ml 容量的 Eppendorf 管中，每管各分装 1ml 用于 HPV DNA 的 PCR 分型检测。

宫颈癌组织的收集：标本为经组织病理学检查确诊为宫颈癌患者的术后样本，手术后由医生将组织置于灭菌的 2ml 冻存管中，快速冻入液氮中，由小型液氮罐运送至实验室，用于 HPV DNA 的 PCR 分型检测。组织病理学检查诊断报告采用 WHO 子宫颈肿瘤组织学分类(2003 年)标准，临床分期采用 FIGO 子宫颈癌临床分期(2009 年)分期标准。

3. 病毒 DNA 的提取

根据美国国家癌症研究所（National Cancer Institute, NCI）的标准操作程序来提取细胞样本中的病毒 DNA。其操作过程简述如下：将细胞悬液于 13,000 rpm 离心 5 分钟，然后分别用 1mL 的去离子水和 1mL 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 8.1）进行洗涤和离心。将细胞沉淀用 100μL 的蛋白酶 K 裂解液（1mg/ml 蛋白酶 K，10mmol/L Tris-HCl，pH8.1）悬浮，在 50℃消化过夜。随后将消化液于 95℃变性 10 分钟，13000rpm 离心 5 分钟，小心的将上清液批量平均分装于 3 个经过灭菌的 0.25ml 容量的小离心管中，一支-20℃储存备用，一支用作 HPV 分型，另外一支用作 L 区基因与 E 区基因的扩增。

组织中 DNA 的提取：用大连宝生物总基因组 DNA 试剂盒（TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit），操作过程如下：取 30 mg 的组织，

0.01mol/LPBS 洗去残留血液,置于灭菌的 1.5 ml 离心管中,用灭菌的眼科剪尽可能地剪成碎块,加入 180 μ L 的 Buffer GL、20 μ L 的 Proteinase K 和 10 μ L 的 RNase A (10 mg/ml),于 56 $^{\circ}$ C 水浴至组织碎块完全裂解。裂解液 12,000 rpm 离心 1 分钟,取上清。将上清溶液移至柱形离心管中,12,000 rpm 离心 2 分钟,弃滤液。用 500 μ L 的 Buffer WA 清洗柱形离心管 1 次,12,000 rpm 离心 1 分钟,弃滤液。再用 500 μ L 的 Buffer WB (用之前加入 56 ml 的 100%乙醇)清洗柱形离心管 2 次,12,000 rpm 离心 1 分钟,弃滤液。将柱子安置于新的 1.5 ml 的离心管上,在膜的中央处加入 50 μ L 的灭菌水,室温静置 5 分钟后 12,000 rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA,得到的基因组 DNA 同样批量平均分装于 3 个经过灭菌的 0.25ml 容量的小离心管中。

4. HPV 定型

使用巢式 PCR 对 HPV L1 高变区基因片段扩增。外引物使用 MY09 和 MY11。

MY09: 5'-CGTCCAAAAGGAAACTGAGC-3';

MY11: 5'-GCACAGGGACATAACAATGG-3'^[57];

反应条件: 20 μ L 反应体系,内含模板 1 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 45s, 50 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

巢式 PCR 内引物使用 GP5+和 GP6+;

GP5+: 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3';

GP6+: 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'^[58];

反应条件: 50 μ L 反应体系,内含模板(外引物的 PCR 产物)10 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 45s, 50 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

将 PCR 扩增得到的 HPV L1 高变区 150bp 产物经纯化后,对测序产物直接进行测序。所测序列经生物学在线软件 BLAST

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) 进行 HPV 分型。

所有提取的 DNA 样品均经过 PCR 扩增 β -globin 基因(内参照)验证其质量。

β -globin 上游引物 5'-ACACAACTGTGTTCAGTAGC-3';

β -globin 下游引物 5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'^[59]。

反应条件: 50 μ L 反应体系,内含模板 1 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 45s, 50 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

5. PCR 引物的设计与合成

根据 Genbank 标准株 NC001526 的 HPV16 型序列,标准株 AY262282 的 HPV18 型序列以及标准株 D90400 的 HPV58 型的序列应用软件 Primer Premier 5.0 设计 E6、

E7 特异性扩增引物。引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物以及适宜各片段的相应退火温度见表 1。

6. PCR 扩增

HPV 16 型 E6 和 E7 基因扩增: 以经过确定的 HPV16 型病毒 DNA 为模板, HPV16 E6 基因扩增反应条件: 选用 50 μ L 反应体系, 内含模板 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L (20mmol/L), TaKaRa Taq (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer (Mg^{2+} Plus) 5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mM) 4 μ L, 剩余用灭菌蒸馏水补齐。94 $^{\circ}$ C 预变性 10min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 54 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。HPV16 E7 基因扩增反应条件, 退火温度为 52 $^{\circ}$ C; 其他条件同 HPV16 E6 反应条件。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。HPV 18 型 E6 和 E7 基因扩增以及 HPV 58 型 E6 和 E7 基因扩增条件同 HPV16 E6 扩增反应条件。

7. 序列测定及核苷酸变异分析

PCR 扩增产物经纯化后, 由上海生工生物工程有限公司测序。对测序序列分析后, 凡发现突变的样品均经 PCR 重新扩增, 并再次测序以排除 PCR 过程中碱基错配而可能产生的误差。用软件 Geneious4.8.4 对测序获得基因序列与标准株基因序列进行比对, 并将 E6/E7 基因序列在线上传于 GenBank 数据库得到基因登录号, 其登陆网址为(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>)。

二级结构预测使用人工神经网络方法中的基于人工神经网络模型的预测软件 PHDsec。PHD 被认为是二级结构预测的标准。二级结构预测一般对于 α 螺旋预测精度较好, 对 β 折叠差些, 而对除 α 螺旋和 β 折叠等之外的无规则二级结构则效果很差。

8. 基因进化树及选择压力分析

将已测序获得的基因序列通过软件 Geneious4.8.4 进行比对, 用软件 Mega4.1 使用邻接法 (Neighbor Joining, NJ) [60-62], 基于 Kimura 2-parameter 模型进行遗传距离的计算, 完成进化树分析。

应用 PAML4.0 软件内的位点模型 site-model (M7 和 M8, dN/dS rate ratios) 进行具有正选择压力位点的检测, 对这对模型用统计量 $2\Delta l$ 依卡方 (χ^2) 分布进行似然比值检验 (likelihood ratio test, LRT), 同时利用贝斯方法 (Bayes empirical Bayes, BEB) 的后验概率检测正选择位点 (后验概率大于 0.9) [63]。

用软件 SPSS12.0, 通过卡方检验 χ^2 (Pearson Chi-square test, P) 和线性相关的卡方 (Linear-by-Linear Association, P_{trend}) 检查的 HPV 16/18 型 E6/E7 基因变异位点与 HPV16、18 型致癌性的相关性, 如果 P 值 < 0.05 (双面), 则被认为有统计学意义。

表 1 HPV 16, 18 及 58 型 E6/E7 引物
Table 1: E6/E7 primers of HPV-16, HPV-18 and HPV-58

引物名称	上游引物 (5'到 3')	下游引物 (5'到 3')	扩增长度	退火温度
HPV16E6	aactaagggcgtaaccgaaatc	ctcctcctctgagctgtcattt	645bp	54℃
HPV18E6	aaaaagggagtaaccgaaaacg	cgctaattgctcgtgacatag	657bp	52℃
HPV58E6	cgaaaccgggtgcatatataaa	gctcatagcagaatagggtcagtt	596bp	50℃
HPV16E7	acagcaatacaacaaccgttg	cattacatcccgaccctcttc	544bp	52℃
HPV18E7	cgttgaatccagcagaaaaact	cataaaaccagccgttacaacc	536bp	52℃
HPV58E7	cagtgtgtggagaccccgga	cctgttcttcgtctattaccgc	450bp	56℃

研究结果

1. 病毒 DNA 质量鉴定

所提取的 DNA 经 β -globin 基因引物进行 PCR 扩增, 2%琼脂糖凝胶电泳可见一条清晰的条带, 大小约 110bp (图 1)。出现阳性条带的样品, 证明所提 DNA 质量良好。

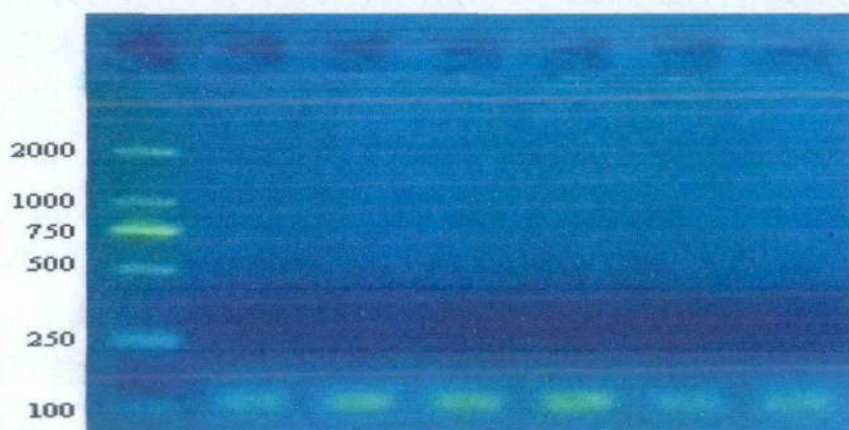


图 1 所提取样品 DNA 经 β -globin 引物扩增验证质量 (仅列出部分条带)

没出现条带的说明没有提出 DNA 或所提取样品 DNA 模板质量不行

Figure 1 the DNA extracts amplification results by the β -globin gene primer
(Only partial bands are listed)

No band appeared if the extracts had no DNA or poor template quality.

2. 巢式 PCR (nest-PCR) 结果

用 nPCR 对所有样品进行 PCR 扩增, 2%琼脂糖凝胶电泳, 可见清晰的条带, 大小约 150bp (图 2)。出现特异扩增条带的样品经纯化后由上海生工生物工程有限公司完成测序, 测序后的序列通过生物学在线软件 BLAST 进行 HPV 分型。

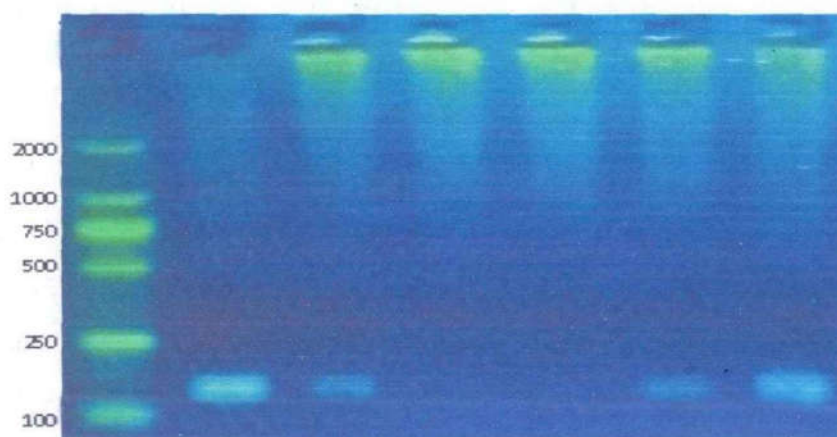


图 2 nPCR 电泳结果 (仅列出部分条带)

Figure 2 Nested-PCR (n-PCR) electrophoresis results (only partial bands are listed)

3. ASC-US 人群 HPV 流行情况 (正常以及炎症细胞)

本研究共取得自愿参加实验并符合本次实验要求 (有性行为, 排除妊娠期、产后以及患鳞状上皮内病变的妇女) 的门诊病人宫颈脱落细胞标本共 2000 例, 年龄在 20-70 岁。经巢式 PCR (MY09/MY11 与 GP5+/GP6+) 检测所提病毒 DNA, HPV 流行情况为, 全部检测人群中 HPV 阳性感染者 323 例, 感染率为 16.15%(323/2000); 其中高危型 (high-risk, HR) 感染者为 215 例 (215/2000), 感染率为 10.75%, 低危型 (low-risk, LR) 感染者为 108 例 (108/2000), 感染率为 5.4%。

在所有 HPV 阳性感染者中, 发现 5 种最常见的高危感染类型 (HR) HPV-16, HPV-58, HPV-33, HPV-18 以及 HPV-35, 其感染率按降序排列依次为 23.84% (77/323)、21.36% (69/323)、11.46% (37/323)、4.64% (15/323) 和 3.1% (10/323); 3 种最常见的低危感染类型 (LR) HPV-6, HPV-11 以及 HPV81, 其感染率按降序排列依次为 19.5% (63/323)、7.12% (23/323) 和 5.26% (17/323), 见表 2。

将 HPV 阳性感染者按照每 10 岁一个年龄组分为 6 个组, 其中不愿透露其年龄的受试者归为其他组。实验结果得出, 无论是高危型还是低危型, 31 岁-40 岁年龄组其 HPV 感染人数都最高, 21-30 岁年龄组与 41-50 岁年龄组次之, HPV 感染人数在年龄大于 50 岁组最低, 见表 2。从图 3 的各型年龄分布图中可以看出, HPV-16 型, HPV-58 型, HPV-6 型和 HPV 81 型在 31-40 岁年龄组感染人数最多, 而 HPV-18 型 21-30 岁感染人数最多。

表 2 ASC-US 人群 HPV 阳性感染者年龄分布
Table 2: Specific age-related prevalence of each positive HPV type for ASC - US groups' samples

类别	型别	No.	感染率		11-20 岁		21-30 岁		31-40 岁		41-50 岁		51-60 岁		61-70 岁		其他	
			%(1)	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
高危型	16	77	3.85	23.84	0	-	14	4.33	33	10.22	13	4.02	4	1.24	0	-	13	4.02
	58	69	3.45	21.36	0	-	16	4.95	34	15.53	14	4.33	1	0.31	1	0.31	3	0.93
	33	37	1.85	11.46	0	-	5	1.55	12	3.72	12	3.72	6	1.86	0	-	2	0.62
	18	15	0.75	4.64	0	-	6	1.86	3	0.93	1	0.31	2	0.62	1	0.31	2	0.62
	35	10	0.5	3.10	0	-	3	0.93	3	0.93	1	0.31	2	0.62	1	0.31	1	0.31
	31	6	0.3	1.86	0	-	1	0.31	0	-	3	0.93	1	0.31	0	-	1	0.31
	68	1	0.05	0.31	0	-	0	-	1	0.31	0	-	0	-	0	-	0	-
Total		215	10.75	66.56	0	-	45	13.93	85	26.32	44	13.62	16	4.95	3	0.93	22	6.81
低危型	6	63	3.15	19.5	0	-	13	4.02	29	8.98	12	3.72	4	1.24	2	0.62	3	0.93
	11	23	1.15	7.12	0	-	2	0.62	12	3.72	6	1.86	0	-	1	0.31	2	0.62
	81	17	0.85	5.26	1	0.31	4	1.24	6	1.86	2	0.62	0	-	0	-	4	1.24
	43	3	0.15	0.93	0	-	1	0.31	0	-	1	0.31	0	-	0	-	1	0.31
	32	1	0.05	0.31	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0.31
	53	1	0.05	0.31	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0.31
	Total		108	5.4	33.44	1	0.31	20	6.19	47	14.55	21	6.50	4	1.24	3	0.93	12

%(1) = No. /ASC-US 人群总数 (2000 人)

% = No. /HPV 阳性感染者总数 (323 人)

其他=不愿透露年龄的病人

%(1) = No. /the ASC - US groups' samples total number.

% = No. /the positive HPV total number.

Others=the Patients who didn't wish to reveal their age and the other information.

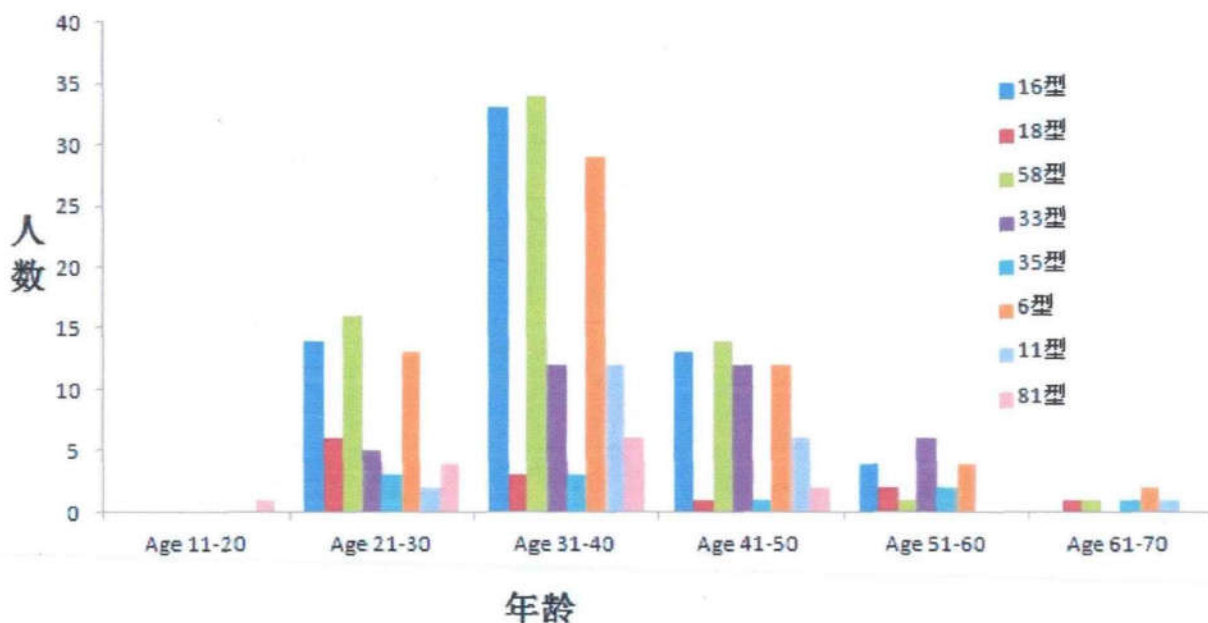


图 3 HPV 阳性感染者年龄分布柱图
Figure 3 the age distribution of HPV positive patients

4. 宫颈癌患者 HPV 流行情况

本研究共取得自愿参加实验并符合本次实验要求（组织病理学检查确诊为宫颈癌）的患者组织标本共 76 例，年龄在 31-66 岁，其中确诊为宫颈鳞状细胞癌（Cervical squamous cell carcinomas）的患者 41 例，宫颈腺癌的患者（cervical adenocarcinoma）12 例。所提病毒 DNA，经巢式 PCR（MY09/MY11 与 GP5+/GP6+）检测后，HPV 流行情况为，全部标本中 HPV 阳性感染者 61 例，感染率为 82.43%（61/74）；余下 15 例中，2 例经 β -globin 引物验证其 DNA 质量不好，13 例经 β -globin 引物验证其 DNA 质量良好，但经巢式 PCR 扩增不出目的片段。

在 61 例 HPV 阳性感染者中，没有发现 HPV 低危型（LR），高危型（HR）中 HPV-16 型 45 例，感染率为 73.77%（45/61）；HPV-18 型 10 例，感染率为 16.39%（10/61）；HPV-58 型 4 例，HPV-59 型、56 型各占 1 例，见表 3。

将 61 例 HPV 阳性感染者按照每 10 岁一个年龄组分为 4 个组，其中不愿透露其年龄的受试者归为其他组。实验结果得出，41-50 岁年龄组宫颈癌感染人数最高，31-40 岁年龄组与 51-60 岁年龄组次之，而相应的在各型别中，41-50 岁年龄组宫颈癌感染人数也最多，图 4。从图 5 的宫颈癌症类型在各型别中的分布柱形图中可以看出，HPV-16 型在宫颈鳞状细胞癌比在宫颈腺癌中常见，且差异比较明显，18 型虽然宫颈鳞状细胞癌比宫颈腺癌人数多，但差异不大。

表3 宫颈癌患者 HPV 阳性感染者年龄分布

Table 3: Specific age-related prevalence of each HPV type for cervical cancer samples

型别	感染率		31-40 岁		41-50 岁		51-60 岁		61-70 岁		其他	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
16	45	73.77	10	16.39	20	32.77	8	13.11	1	1.64	6	9.84
18	10	16.39	2	3.28	5	8.20	0	-	0	-	3	4.92
58	4	5.56	0	-	4	5.56	0	-	0	-	0	-
59	1	1.64	1	1.64	0	-	0	-	0	-	0	-
56	1	1.64	0	-	1	1.64	0	-	0	-	0	-
Total	61	-	13	21.31	30	49.18	8	13.11	1	1.64	9	14.75

% = No. / 宫颈癌 HPV 阳性患者总数 (61 人) % = No. / the positive HPV total number of cervical cancer samples

其他=不愿透露年龄的病人 Others=the Patients who didn't wish to reveal their age and the other information.

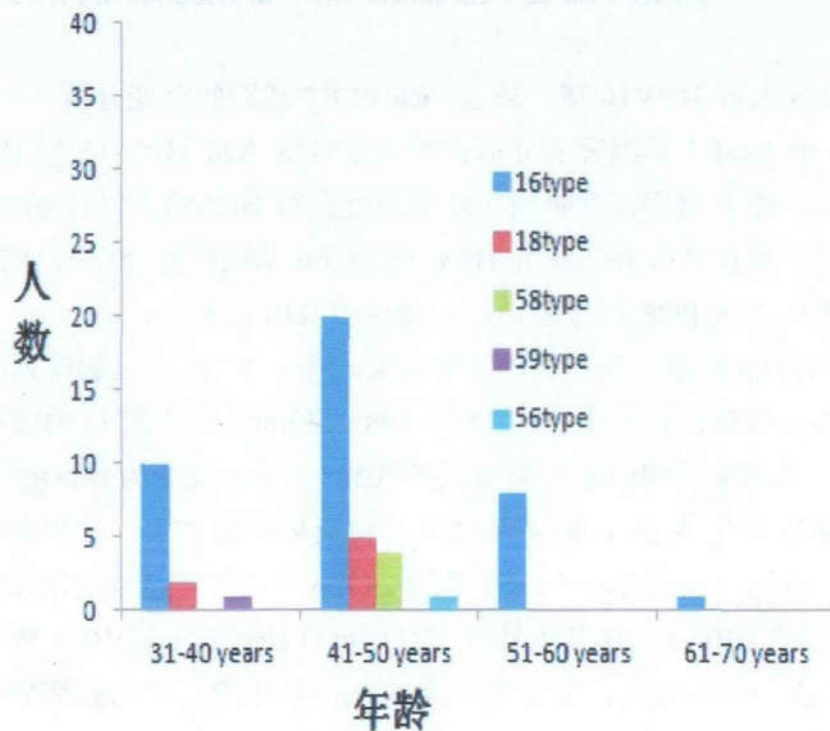


图4 HPV 宫颈癌患者阳性感染者年龄分布柱图

Figure 4 the age distribution of HPV positive patients from cervical cancer

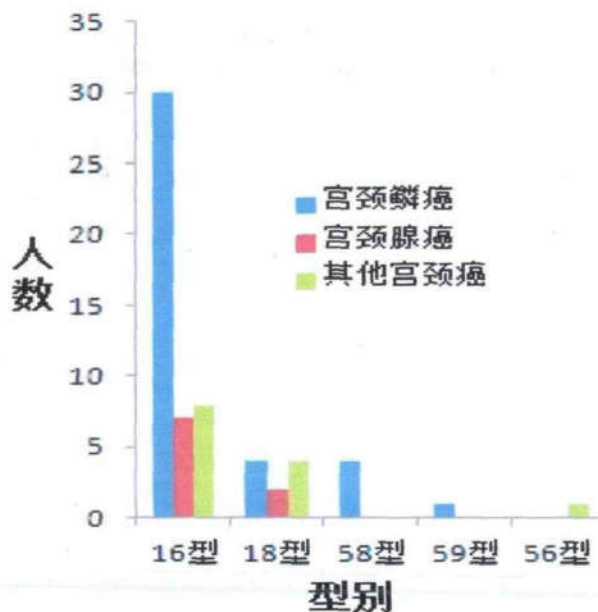


图 5 宫颈癌类型在各型别中的分布

Figure 5 the cervical cancer type's distribution of each HPV types

5. ASC-US 人群 HPV16 型, 58 型 E6 和 E7 基因的突变分析

HPV-16 型 E6/E7 基因突变分析: 将 ASC-US 人群 HPV-16 型 DNA 样品用特异性引物进行扩增并测序, 并将测序结果通过在线 BLAST 比对, 在 77 个 HPV-16 型样本中成功扩增出片段并确认为 HPV-16 型 E6 基因的有 20 个, E7 基因的有 20 个, 突变位点经二次 PCR 结果验证, 突变位点及碱基无误。

E6 基因 477bp 片段扩增产物的测序结果表明, 在 20 个已测序列的 HPV-16 E6 基因片段 (与标准株比较) 中有 10 个其 178 位基因发生 T 到 G 的碱基突变, 突变频率为 50%, 其相应的编码氨基酸由天冬氨酸 (Asp) 突变为谷氨酸 (Glu); 有 5 个其 276 位基因发生 A 到 G 的碱基突变, 突变频率为 25%, 其相应的编码氨基酸为同义突变; 其他位点突变较少。E7 基因 297bp 片段扩增产物的测序结果表明, 在 20 个已测序列的 HPV-16 E7 基因片段 (与标准株比较) 中有 10 个样本的 647 位基因发生 A 到 G 的碱基突变, 突变频率为 50%, 其相应的编码氨基酸由天门冬酰胺 (Asn) 突变为丝氨酸 (Ser); 有 6 个其 666 位基因发生 G 到 A 的碱基突变, 突变频率为 30%, 该突变为同义突变; 有 10 个其 846 位基因发生 T 到 C 的碱基突变, 突变频率为 50%, 该突变为同义突变; 其他位点突变较少。对同一样本 E6/E7 基因序列与标准株 (NC001526) E6/E7 基因序列联合比对分析发现, E6-T178G 与 E7-A647G-T846C 为连锁突变, 并且为 HPV16 型中常见突变位点 (表 4)。

将所测 20 个 HPV-16 型 E6 基因序列与其他国内外 HPV-16 型序列共 29 个序列片段, 经 Mega4.1 分析, HPV-16 E6 基因的进化树很明显与非洲变异型不在同一支; 从进化树图中可得知, 欧洲变异型与亚洲变异型遗传关系密切, 亚洲变异型可

能为欧洲变异型的祖先；而 ASC-US 人群中人乳头状瘤病毒 HPV-16 的所有样品没有在同一分支，可见不同地区，基因的变异程度也不一样。进化树中，没有样品与非洲变异型（非洲 1 型，非洲 2 型）在同一分支。YUNNAN01 与亚洲美洲变异型在同一分支，其他样品都与亚洲变异型、欧洲变异型同一分支（图 6）。由此可见，人乳头状瘤病毒 HPV-16 型地域性分布极其明显。而从 HPV-16 E7 基因的进化树也可得出类似的结果（图 7）。有关 HPV16 型的基因参比序列及登录号如下：

（1）非洲变异型：非洲 1 型（African type 1）：AF472508；非洲 2 型（African type 2）：AF472509；

（2）美洲变异型：南美洲亚马逊变异型（Amazonian）：HM057182；亚洲美洲变异型（Asian-American）：AF402678；

（3）亚洲变异型：东亚变异型（East Asian）：AF534061；中国甘肃（Gan Su）：EU918764；中国新疆（Xin Jiang）：FJ006723；泰国变异型（Thailand）：FJ610152；

（4）欧洲变异型：德国变异型（European German）：AF536179。

通过分析表明 ASC-US 人群 HPV-16 的 E6 基因与标准株（NC001526）的氨基酸同源性的为 98.7%~100%，而其他变异株型（非洲变异型，美洲变异型，亚洲美洲变异型，亚洲变异型，欧洲变异型）E6 基因与标准株的氨基酸同源性的为 98.3%~99.8%。E7 基因与标准株的氨基酸同源性的为 99.0%~100%，而其他变异株型 E7 基因与标准株的氨基酸同源性的为 97.0%~100%（表 5）。

表 4 ASC-US 人群 HPV-16 E6/E7 基因核苷酸变异位点 (只列出有变异的位点)

Table 4: HPV-16 E6/E7 nucleotide mutation site (only variable site listed) for gynecological outpatient samples

	Base Sites														
	145	178	276	286	289	335	350	532	647	666	732	789	795	843	846
NC001526	G	T	A	T	A	C	T	A	A	G	T	T	T	T	T
YUNNAN01	T	-	-	G	G	T	G	G	-	-	C	C	G	-	-
YUNNAN02	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	C	C
YUNNAN03	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-
YUNNAN04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
YUNNAN05	-	-	G	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
YUNNAN06	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN07	-	-	G	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
YUNNAN08	-	-	G	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
YUNNAN09	-	-	G	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
YUNNAN10	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN11	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN12	-	-	G	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-
YUNNAN13	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN14	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN15	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN16	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN17	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YUNNAN18	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN19	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C
YUNNAN20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表所列 20 个西南地区妇女 ASC-US 人群 HPV-16 E6/E7 变异情况。标准株 GenBank 基因登录号为 NoNC001526。注: E6/E7 序列没有上传 GenBank 数据库
Nucleotide sequence variations in the E6 and E7 open reading frames (ORFs) are listed about 20 HPV-16 positive in ASC-US groups of Southwest Chinese women.

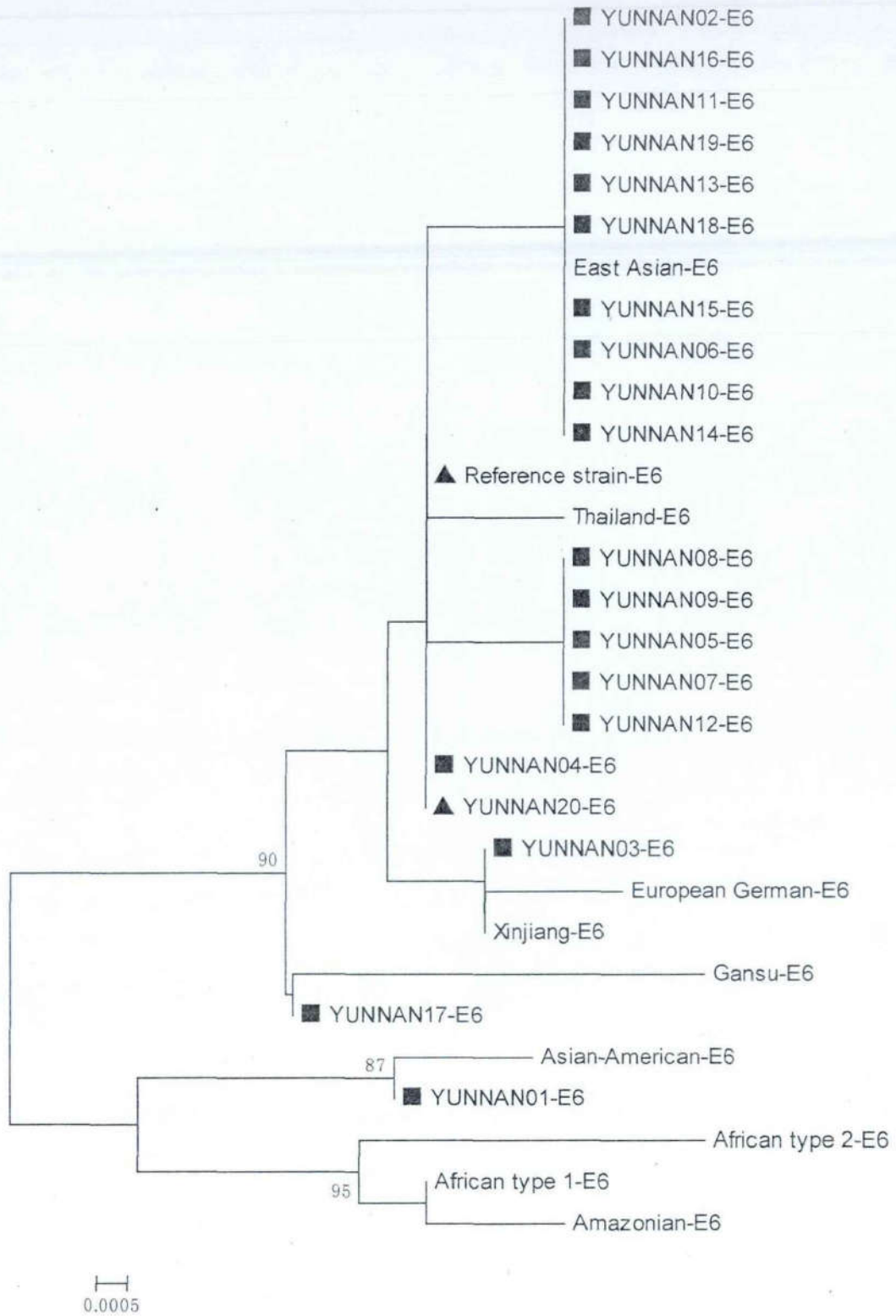


图 6 HPV16 E6 变异型 477bp 片段进化树 (研究序列用■区出, 标准株用▲区出)
Figure 6 Phylogenetic tree constructed from 477 bp fragment of 20 HPV16 E6 variants

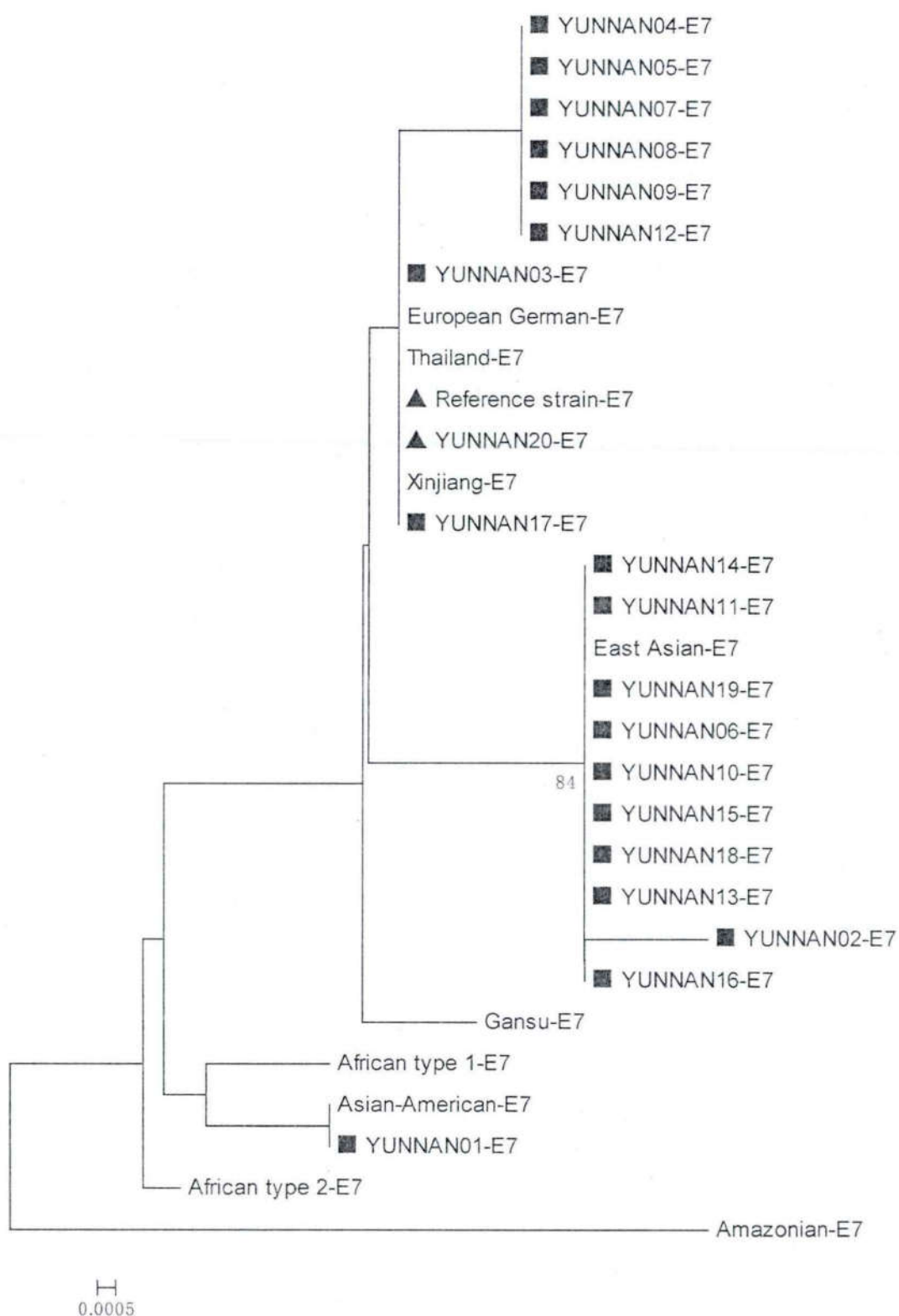


图 7 HPV16 E7 变异型 297bp 片段进化树 (研究序列用■区出, 标准株用▲区出)

Figure 7 Phylogenetic tree constructed from 297 bp fragment of 20 HPV16 E7 variants

表5 HPV-16 E6/E7 核苷酸和氨基酸同源性比较
Table5 HPV-16 E6/E7 gene nucleotide and amino acid
homologies comparison between strains from Yunnan province and the other areas

	E6		E7	
	nucleotide (Identities, %)	amino acid (Positives, %)	nucleotide (Identities, %)	amino acid (Positives, %)
YUNNAN01	98.7	98.1	99.0	100
YUNNAN02	99.8	99.4	99.0	99.0
YUNNAN03	99.8	99.4	100	100
YUNNAN04	100	100	99.7	100
YUNNAN05	99.8	99.4	99.7	100
YUNNAN06	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN07	99.8	99.4	99.7	100
YUNNAN08	99.8	99.4	99.7	100
YUNNAN09	99.8	99.4	99.7	100
YUNNAN10	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN11	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN12	99.8	99.4	99.7	100
YUNNAN13	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN14	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN15	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN16	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN17	99.8	99.4	100	100
YUNNAN18	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN19	99.8	99.4	99.3	99.0
YUNNAN20	100	100	100	100
African type 1	98.7	98.1	99.0	100
African type 2	98.3	98.1	99.0	99.0
Amazonian	98.5	96.9	97.0	97.0
Asian-American	98.5	98.1	99.0	100
East Asian	99.8	99.4	99.3	99.0
European				
German	99.6	98.7	100	100
Gan Su	99.2	98.1	99.7	99.0
Thailand	99.8	99.4	100	100
Xin Jiang	99.8	99.4	100	100

HPV58 型 E6/E7 基因突变分析: 用 E6 和 E7 特异性引物进行对 ASC-US 人群 69 个 HPV-58 型 DNA 样品扩增并测序, 成功扩增出 E6 基因片段 (450bp) 22 个, E7 基因片段 (297bp) 22 个, 突变位点经二次 PCR 结果验证, 突变位点及碱基无误。将上述 22 个 HPV 58 E6 与 E7 基因序列上传于 NCBI 基因数据库

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>) ; 得到基因登录号 E6 基因为 JX401164-JX401185; E7 基因为 JX401186-JX401207。

22 个所测序列与标准株 (D90400) 经过软件 Geneious4.8.4 比对后, 发现 4 个不同突变位点, 其中 1 个为非同义突变 A388C 和 3 个同义突变 C187T, A260C, C307T。22 个已测序列样本中, 有 8 个在第 388 位碱基位点发生 A 到 C 的非同义突变, 突变频率为 36.36% (8/22); 导致其相应的编码氨基酸由赖氨酸 (Lys) 突变为天冬酰胺 (Asn),

突变又称为 K93N。有 10 个样本在第 307 位碱基位点发生 C 到 T 的同义突变, 突变频率为 45.45% (8/22), 见表 6。经二级结构预测分析, 突变 A388C 位于蛋白质折叠的 α 螺旋区, 见表 6。在与标准株 (D90400) 的比对中, ASC-US 人群中 HPV 58 型 E6 基因的突变中没有发现核苷酸缺失或插入而导致的过早终止密码子的情况。

在 22 个已测序列的 E7 基因中, 发现 8 个不同突变位点, 其中 G599A, C632T, G694A, G760A, G761A, T803C 共 6 个为非同义突变; T726C, T744G 为同义突变。在 22 个样本中, 有 17 个在第 744 位碱基位点发生同义突变, 突变频率为 72.73 % (16/22)。非同义突变 C632T, G760A 和 T803C 的突变频率均为 27.27% (6/22), 导致相应的编码氨基酸发生突变依次为 T20I, G63S 和 V77A。突变 G694A, G761A 的突变频率均为 18.18% (4/22), 导致相应的编码氨基酸发生突变为 G41R, G63D。此外, 在 E7 所有突变位点中发现, 突变 C632T 和 G760A (T20I-G63S) 以及突变 G694A 和 G761A (G41R-G63D) 为连锁突变。二级结构预测分析发现, 非同义突变 G760A 发生在蛋白质折叠的转角区; 但同义突变 T744G 发生在蛋白质折叠的 β 折叠区, 见表 6。

所测的 22 个 HPV 58 型 E6/E7 基因序列与其他国内外 HPV 58 型参比序列共 28 个, 经 Mega4.1 做进化树分析, 得出 HPV 58 型地域性分布明显: 西南地区 HPV58 型 E6 基因进化树共分成 3 支, 所得序列均与参比序列印度株 (IND)、美国 (USA) 株不同支, 图 8。西南地区 HPV58 型 E7 基因共分成 4 个支: 一支与日本株 (JAN, 标准株), 中国甘肃 (CHN-GS) 与四川株 (CHN-SC) 同支, 一支与中国天津株 (CHN-TJ) 同支, 与印度株 (IND)、美国 (USA) 株不同支, 图 9。有关 HPV58 型的基因参比序列及登录号如下:

(1) 国外株: 日本株 (JAN): D90400, 即标准株; 美国株 (USA): HQ537776; 印度 (IND): No.JN041044 (部分);

(2) 中国株: 中国甘肃株 (CHN-GS): EU918765; 中国天津株 (CHN-TJ): GQ472850; 中国四川 (CHN-SC): FJ407217。

应用 PAML4.0 软件经正选择压力检测得出, E6 基因受到很强的负选择, E7 基因 63G 为正选择位点, 但选择不强烈。经似然比值检验 (LRT), $P > 0.05$, 差异不显著, 没有证据显示 E6/E7 基因受到正选择, 见表 7。

表 6 ASC-US 人群 HPV-58 E6/E7 基因核苷酸变异位点 (只列出有变异的位点)
Table 6: HPV-58E6/E7 nucleotide mutation site (variable site only be listed) for gynecological outpatient samples

	E6 base sites					E7 base sites							
	187	260	307	388		599	632	694	726	744	760	761	803
D90400	C	A	C	A	D90400	G	C	G	T	T	G	G	T
JX401164	-	-	-	C	JX401186	-	-	-	-	G	-	-	C
JX401165	-	-	T	-	JX401187	-	T	-	-	G	A	-	-
JX401166	T	-	-	-	JX401188	-	-	-	C	-	-	-	-
JX401167	-	-	T	-	JX401189	-	-	A	-	G	-	A	-
JX401168	-	-	T	-	JX401190	-	T	-	-	G	A	-	-
JX401169	-	-	T	-	JX401191	-	-	A	-	G	-	A	-
JX401170	-	-	T	-	JX401192	-	T	-	-	G	A	-	-
JX401171	-	-	-	C	JX401193	-	-	-	-	G	-	-	C
JX401172	-	-	-	C	JX401194	-	-	-	-	G	-	-	C
JX401173	-	C	-	C	JX401195	-	-	-	-	G	-	-	C
JX401174	-	-	T	-	JX401196	-	T	-	-	G	A	-	-
JX401175	-	-	-	C	JX401197	-	-	-	-	-	-	-	-
JX401176	-	-	-	C	JX401198	A	-	-	-	G	-	-	C
JX401177	-	-	T	-	JX401199	-	-	A	-	G	-	A	-
JX401178	-	-	T	-	JX401200	-	T	-	-	G	A	-	-
JX401179	-	-	T	-	JX401201	-	-	A	-	G	-	A	-
JX401180	-	-	-	-	JX401202	-	-	-	-	-	-	-	-
JX401181	-	-	-	-	JX401203	-	-	-	-	-	-	-	-
JX401182	-	-	-	C	JX401204	-	-	-	-	-	-	-	-
JX401183	-	-	T	-	JX401205	-	T	-	-	G	A	-	-
JX401184	-	-	-	C	JX401206	-	-	-	-	G	-	-	C
JX401185	-	-	-	-	JX401207	-	-	-	-	-	-	-	-
Secondary structure	Alpha helix					Beta sheet				Turn			

表所列为 22 个西南地区妇女 HPV-58 E6/E7 变异情况。标准株 GenBank 基因登录号为 No.D90400, E6 序列为 JX401164-JX401185, E7 序列为 JX401186-JX401207。

Nucleotide sequence variations in the E6 and E7 open reading frames (ORFs) are listed about 22 HPV-58 positive Southwest Chinese women. GenBank accession numbers in this paper are JX401164-JX401185 for E6 sequences, JX401186-JX401207 for E7 sequences and HPV-58 prototype (No. D90400).

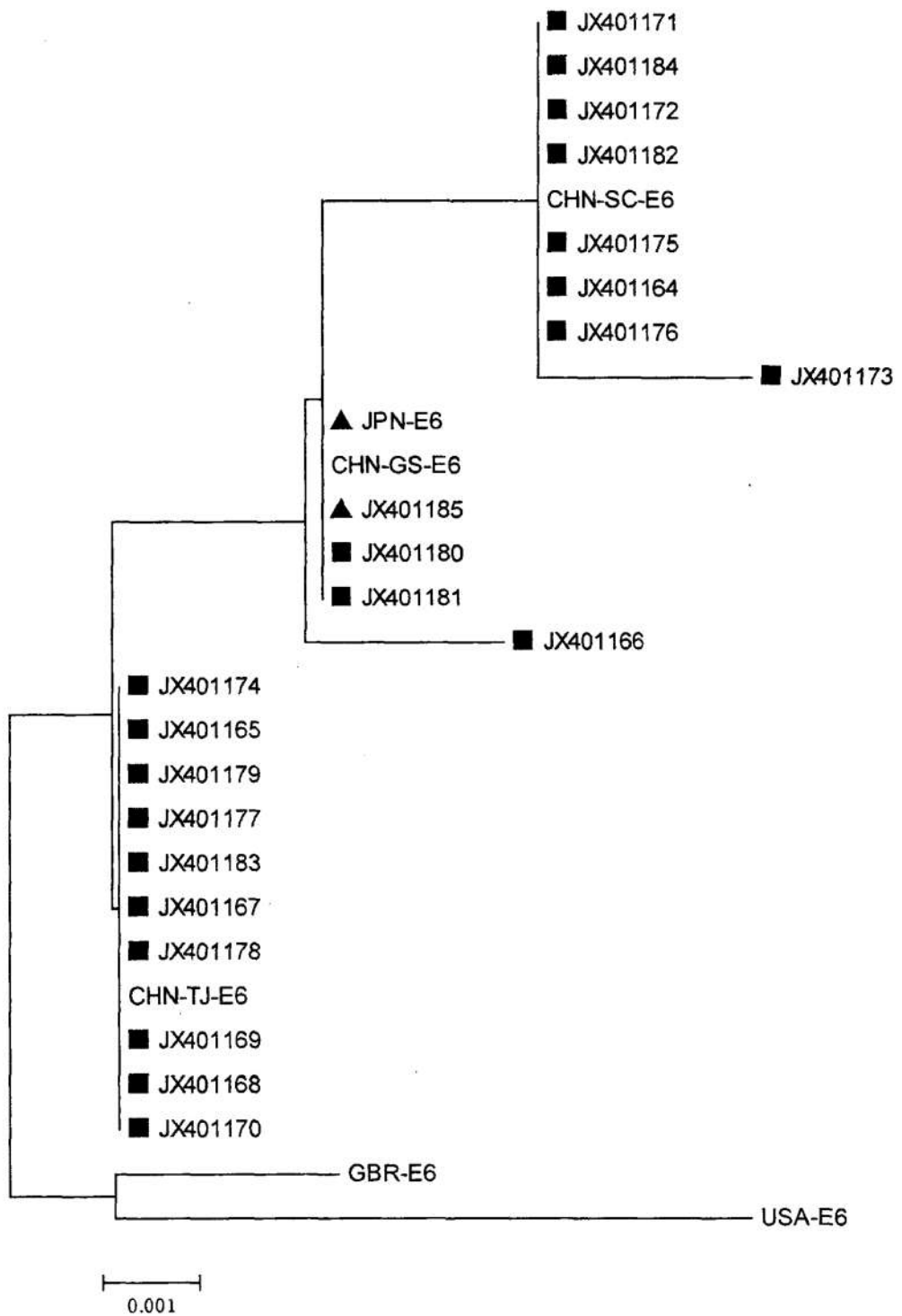


图 8 22 个 HPV58 E6 变异型进化树 (研究序列用■区出, 标准株用▲区出)
Figure 8 Phylogenetic tree constructed from E7 nucleotide sequences of 22 HPV-58 Variants

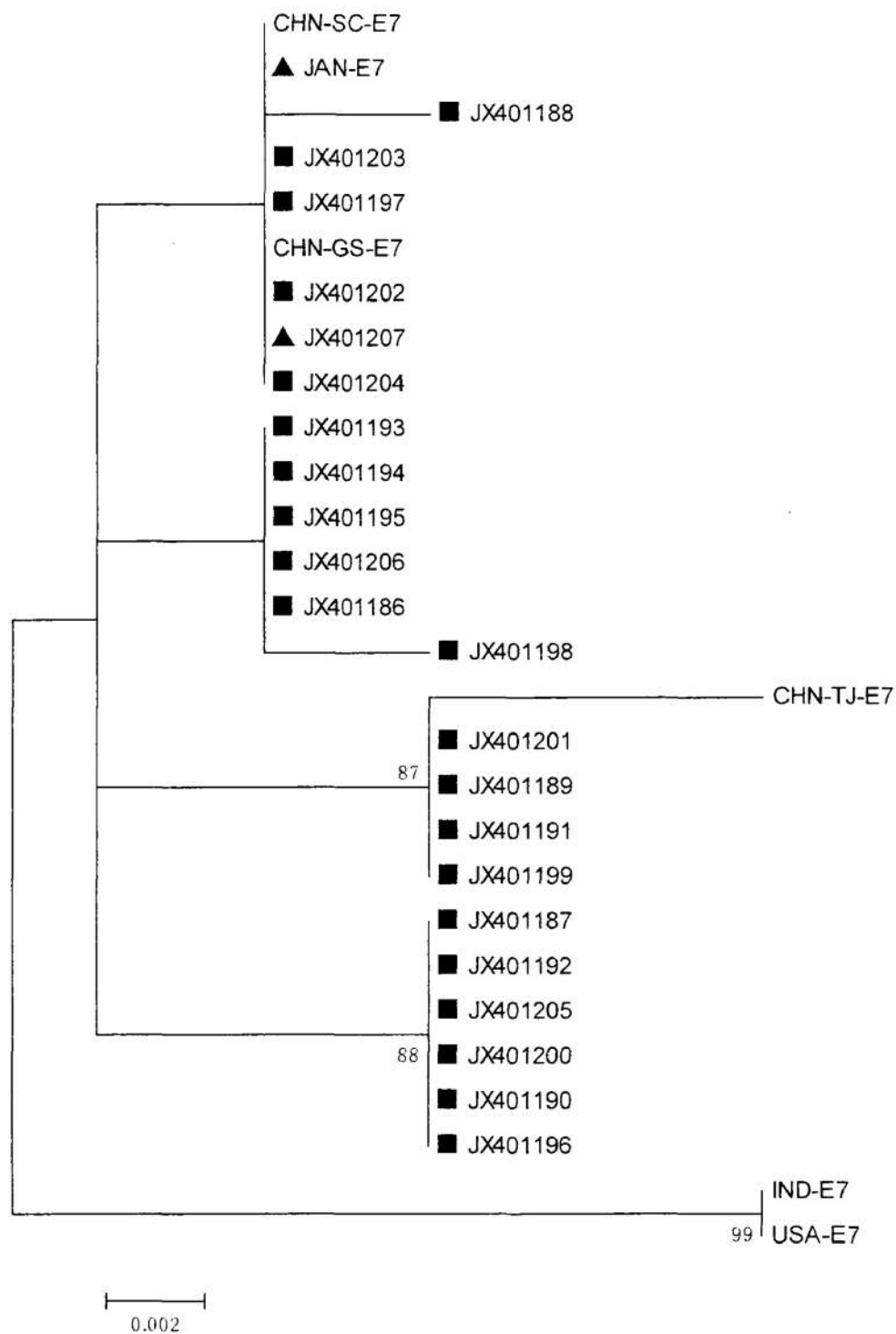


图 9 22 个 HPV58 E7 变异型进化树 (研究序列用■区出, 标准株用▲区出)
Figure 9 Phylogenetic tree constructed from E7 nucleotide sequences of 22 HPV-58 Variants

表 7 HPV58 E6/E7 正选择位点
Table 7: Site-specific tests for positive selection on HPV-58 E6/E7

	Models	lnL	Estimates of parameters	2Δl	Positively selected sites
E6	M7	-606.97	p=6.789, q=99.000	0	NA
	M8	-606.97	p0=1.00, p=6.788, q=99.000, (p1=0.000), ω=1.00	P=1	NONE
E7	M7	-451.61	p=2.879, q=0.050	2.10	NA
	M8	-450.56	p0=0.819, p=0.007, q=2.062, (p1=0.181), ω=7.762	p>0.05	63G

lnL, 两个模型下的似然值; 2Δl, 依卡方分布的似然比值; 使用贝叶斯 (BEB) 方法, 后概率≥0.9 为正选择位点。一个星号表示后验概率≥0.95, 两个星号表示后验概率≥0.99。NA 表示无应答。NS 表示位点处于正选择压力但没有达到显著性水平。

lnL, the log-likelihood difference between the two models; 2Δl, twice the log-likelihood difference between the two models; the positively selected sites were identified with posterior probability ≥ 0.9 using Bayes empirical Bayes (BEB) approach. One asterisk indicates posterior probability ≥ 0.95, and two asterisks indicate posterior probability ≥ 0.99. NA means not allowed. NS means the sites under positive selection but not reaching the significance level of 0.8.

6. 宫颈癌患者 HPV16 型, 18 型 E6 和 E7 基因的突变分析

HPV16 型 E6/E7 基因突变分析: 用 E6 和 E7 特异性引物进行对宫颈癌患者 HPV-16 型 DNA 样品扩增并测序, 成功扩增出片段并确认为 HPV16 型 E6 基因 (477bp) 的有 38 个, E7 基因 (297bp) 的有 38 个, 突变位点经二次 PCR 结果验证, 突变位点及碱基无误。将 38 个 HPV 16 E6 与 E7 基因序列上传于 NCBI 基因数据库得到基因登录号 HPV 16 型 E6 基因为 JX412112-JX412149; E7 基因为 JX412150-JX412187。

所有测序序列与标准株 (NC001526) 经过软件 Geneious4.8.4 比对后, 发现 18 个不同突变点, 其中 13 个为非同义突变 (A95G, G145T, T178A, T178G, T183C, T185G, G188C, G267A, A276G, C335T, T350G, A442C, A482C), 5 个同义突变 (G94A, A131C, T286A, A289G, A532G), 见表 8。结合其编码的氨基酸, 突变 A131C, G145T, T183G, T185G, A276G, T286A, A289G, C335T, T350G, A442C, A532G 突变又称为 R10R, Q14H, I27R, L28V, N58S, A61A, V62V, H78Y, L83V, E113D, S143S。38 个已测 477bp E6 基因序列的扩增片段中, 在第 178 位碱基位点有 26 个样本发生 T 到 G 的碱基突变, 2 个样本发生 T 到 A 突变, 突变频率为 73.68%, 其相应的编码氨基酸由天冬氨酸 (Asp) 突变为谷氨酸 (Glu), 即 D25E, 其他突变位点的突变频率较低。经二级结构预测分析, 非同义突变 G145T, T178G 或 T178A, T183C, T185G 和 T350 G 位于蛋白质折叠的 β 折叠区, 非同义突变 A95G 和 A442C 位于蛋白质折叠的 α 螺旋区, 见表 8。在与标准株 (NC001526) 比对中, 宫颈癌组织中 HPV 16 型 E6 基因的突变中没有发现核苷酸缺失或插入而导致的过早终止密码子的情况。

而对于 E7 基因发现 10 个不同突变点, 其中 3 个为非同义突变 (A646C, A647G, C 790T), 7 个同义突变 (G663A, G666A, T732C, T789C, T795G, T843C, T846C), 见表 8。38 个已测 297bp E7 基因序列的扩增片段中, 26 个样本 (26/38, 68.42%) 在第

647 位碱基位点发生从 A 到 G 的碱基突变, 导致相应的氨基酸由天冬酰胺 (Asn) 变为丝氨酸 (Ser), 突变又称为 N29S。在与标准株 (NC001526) 比对中, HPV 16 型 E7 基因的突变中没有发现核苷酸缺失或插入而导致的过早终止密码子的情况, 但发现在每个样本中非同义突变 A647G 与同义突变 T846C 都是同时存在。二级结构预测分析发现, 没有氨基酸突变发生在蛋白质折叠的 α 螺旋区和转角; 但非同义突变 C790T 发生在蛋白质折叠的 β 折叠区。同一样本中 E6 基因登录号为 JX412112, E7 基因登录号为 JX412150, 依次类推。对同一样本 E6/E7 基因序列与标准株 (NC001526) E6/E7 基因序列联合比对分析发现, 在同一样本中, 只要有 E6-T178G 发生, 则 E7-A647G-T846C 同时伴随存在, 即连锁突变, 并且为 HPV16 型中常见突变位点。而突变 E6-T178A 在 E7 基因突变点中却没有伴随任何突变点, 见表 8。

所测的 38 个 E6/E7 基因序列与国内外 HPV16 型 E6/E7 基因序列共 47 个序列经 Mega4.1 做进化树分析, 结果得出人乳头状瘤病毒 HPV-16 型地域性分布极其明显, 宫颈癌组织 HPV-16 的 E6/E7 基因很明显与非洲变异型 (非洲 1 型, 非洲 2 型) 不在同一支, 图 10-11。

应用 PAML4.0 软件经正选择压力检测得出, E6 基因受到正选择的位点为 32E, E7 基因 29S 为正选择位点, 但选择不强烈。经似然比值检验 (LRT), $P>0.05$, 差异不显著, 没有证据显示 E6/E7 基因受到正选择, 见表 9。

通过软件 SPSS 12.0, 将门诊病人与宫颈癌患者中 HPV16 E6/E7 的突变位点作卡方检验得出, P 值 > 0.05 (双面), 没有统计学意义, 见表 10-11。

HPV18 型 E6/E7 基因突变分析: 宫颈癌患者 HPV18 型样本中, 成功扩增出 E6 基因 (477bp) 9 个, E7 基因 (318bp) 9 个。上传于 NCBI 基因数据库得到的基因登录号 E6 基因为 JX412188-JX412196; E7 基因为 JX412197-JX412205。与标准株 (AY262282) 经过软件比对后, 发现 4 个不同突变点, 其中 E6 突变点 T485C 和 C549A, E7 突变点 C751T 为同义突变, 而 A218T 为非同义突变, 导致相应的氨基酸由酪氨酸 (Tyr) 变异为苯丙氨酸 (Phe), 见表 11。二级结构预测分析得出突变 A218T 发生在蛋白质折叠的无规则卷曲区, 而突变 C751T 发生在 α 螺旋区, 见表 12。

表 8 宫颈癌患者 HPV-16 E6/E7 基因核苷酸变异位点 (只列出有变异的位点)

Table8: HPV-16E6/ E7 nucleotide mutation site (only variable site listed) for cervical cancer samples

	E6 base sites																E7 base sites											
	94	95	131	145	178	183	185	188	267	276	286	289	335	350	442	482	532		646	647	663	666	732	789	790	795	843	846
NC001526	G	A	A	G	T	T	T	G	G	A	T	A	C	T	A	A	A	NC001526	A	A	G	G	T	T	C	T	T	T
JX412112	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412150	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412113	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412151	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412114	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412152	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	JX412153	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-
JX412116	A	-	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412154	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-
JX412117	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412155	-	G	-	-	-	-	-	-	C	C
JX412118	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412156	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412157	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-
JX412120	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412158	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-
JX412121	A	G	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412159	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-
JX412122	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	A	G	T	G	-	-	G	JX412160	-	-	-	-	C	C	-	G	-	-
JX412123	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	A	G	T	G	-	-	G	JX412161	-	-	-	-	C	C	-	G	-	-
JX412124	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412162	-	G	-	-	-	-	-	-	C	C
JX412125	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412163	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412126	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412164	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412127	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412165	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412128	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412166	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412129	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	JX412167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JX412130	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412168	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	JX412169	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-
JX412132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	JX412170	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-
JX412133	-	-	C	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412171	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412134	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412172	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412135	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412173	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412136	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412174	-	G	-	-	-	-	-	-	C	C
JX412137	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	JX412175	-	G	-	-	-	-	-	-	C	C
JX412138	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412176	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412139	-	-	-	-	G	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412177	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412140	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	JX412178	-	G	A	-	-	-	-	-	-	C
JX412141	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412179	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412142	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412180	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412143	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412181	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412144	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	JX412182	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JX412145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	JX412183	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JX412146	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412184	-	G	-	-	-	-	-	-	C	C
JX412147	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412185	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412148	-	-	C	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412186	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
JX412149	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JX412187	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
secondary structure	Alpha helix	Alpha helix	turn	Beta sheet	Beta sheet	Beta sheet	Beta sheet						Beta sheet	Alpha helix		turn	secondary structure		Alpha helix	Alpha helix	Beta sheet	Beta sheet	Beta sheet			Beta sheet		

表所列 38 个西南地区妇女 HPV-16 E6/E7 变异情况,标准株 GenBank 基因登录号为 No.NC001526, E6 序列为 JX412112-JX412149, E7 序列为 JX412150-JX412187。Nucleotide sequence variations in the E6 and E7 open reading frames (ORFs) are listed about 38 HPV-16 positive Southwest Chinese women. GenBank accession numbers in this paper are JX412112-JX412149 for E6 sequences, JX412150-JX412187 for E7 sequences and HPV-16 prototype (No.NC001526).

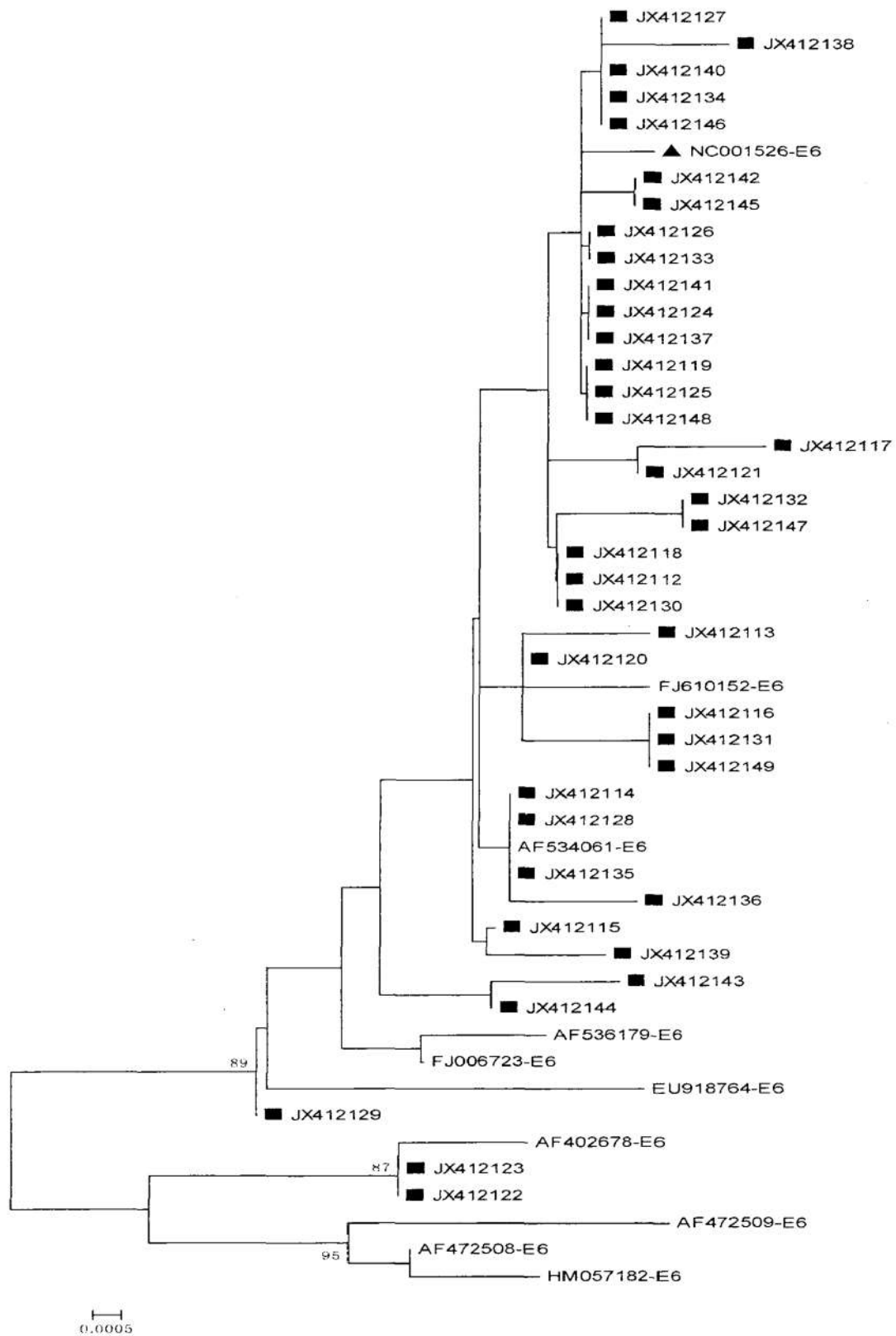


图 10 38 个 HPV16 E6 变异型进化树 (研究序列用■区出, 标准株用▲区出)
Figure 10 Phylogenetic tree constructed from E6 nucleotide sequences of 38 HPV-16 Variants

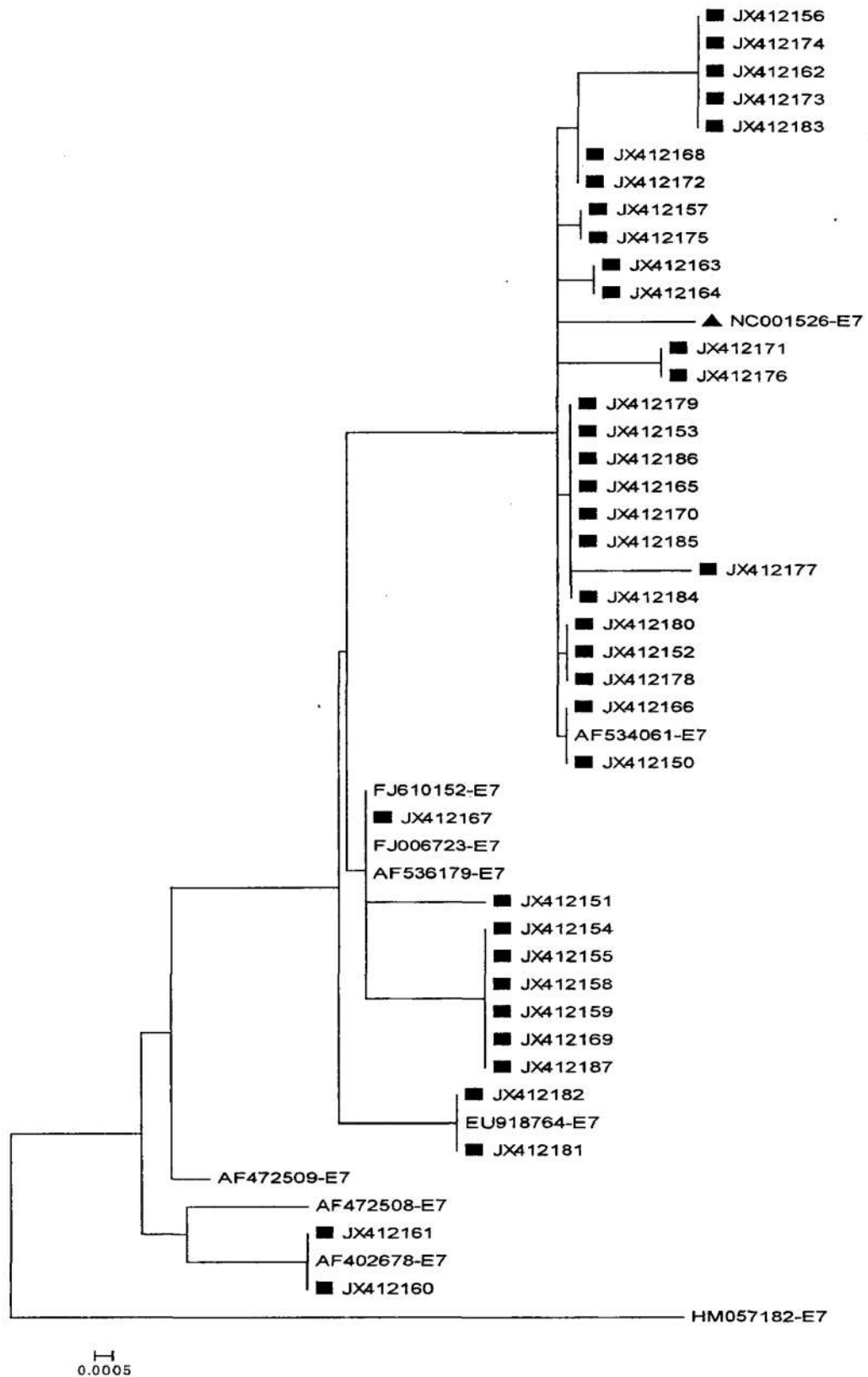


图 11 38 个 HPV16 E7 变异型进化树 (研究序列用■区出, 标准株用▲区出)

Figure 11 Phylogenetic tree constructed from E7 nucleotide sequences of 38 HPV-16 Variants

表 9 HPV16 E6/E7 正选择位点

Table 9: Site-specific tests for positive selection on HPV-16 E6/E7

	Models	lnL	Estimates of parameters	2Δl	Positively selected sites
E6	M7	-766.30	p=0.054, q=0.050	2.38 p>0.05	NA
	M8	-765.11	p0=0.988, p=72.549, q=99.000, (p1=0.012), ω=10.60		32E
E7	M7	-458.68	p=0.050, q=0.048	1.4 p>0.05	NA
	M8	-457.98	p0=0.962, p=0.005, q=3.014, (p1=0.038), ω=4.43		29S

lnL, 两个模型下的似然值; 2Δl, 依卡方分布的似然比值; 使用贝叶斯 (BEB) 方法, 后概率≥0.9 为正选择位点。一个星号表示后验概率≥0.95, 两个星号表示后验概率≥0.99。NA 表示无应答。NS 表示位点处于正选择压力但没有达到显著性水平。

lnL, the log-likelihood difference between the two models; 2Δl, twice the log-likelihood difference between the two models; the positively selected sites were identified with posterior probability ≥ 0.9 using Bayes empirical Bayes (BEB) approach. One asterisk indicates posterior probability ≥ 0.95, and two asterisks indicate posterior probability ≥ 0.99. NA means not allowed. NS means the sites under positive selection but not reaching the significance level of 0.8.

表 10 不同宫颈样本 HPV16 E6 变异位点统计学分析

Table 10: HPV-16E6 variants statistical analysis in different cervical samples

E6 Variants distribution		No.(%) of women with HPV		P	P _{trend}
Nucleotide sequence variation	Amino acid substitution	NE	CC		
		20	38		
G94A	K-K	0	3(7.89)	(-)	(-)
A95G	R-E	0	1(2.63)	(-)	(-)
A131C	R-R	0	2(5.26)	(-)	(-)
G145T	Q-H	1(5)	2(5.26)	0.966	0.966
T178G or T178A	D-E	10(50)	28(73.68)	0.071	0.074
T183G	I-R	0	1(2.63)	(-)	(-)
T185G	L-V	0	1(2.63)	(-)	(-)
G188C	E-Q	0	1(2.63)	(-)	(-)
G267A	R-K	0	1(2.63)	(-)	(-)
A276G	N-S	5(25)	3(7.89)	0.073	0.075
T286A	A-A	1(5)	2(5.26)	0.966	0.966
A289G	V-V	1(5)	2(5.26)	0.966	0.966
C335T	H-Y	2(10)	3(7.89)	0.786	0.788
T350G	L-V	2(10)	2(5.26)	0.499	0.502
A442C	E-D	0	3(7.89)	(-)	(-)
A482C	N-H	0	1(2.63)	(-)	(-)
A532G	S-S	1(5)	2(5.26)	0.966	0.966

NE=正常上皮细胞; CC=宫颈癌组织; P_{trend}=线性相关; P=皮尔森卡方检验; (-)=无法统计学分析 NE=Normal epithelium; CC=cervical cancer tissues; P_{trend}= linear-by-linear association; P=Pearson Chi-square test; (-)=too few isolates for statistical analysis.

表 11 不同宫颈样本 HPV16 E7 变异位点统计学分析

Table 11: HPV-16E7 variants statistical analysis in different cervical samples

E7 Variants distribution		No.(%) of women with HPV		P	P _{trend}
Nucleotide sequence	Amino acid	NE	CC		
variation	substitution	20	38		
A646C	N-S	0	2(5.26)	(-)	(-)
A647G	N-S	10(50)	26(68.42)	0.169	0.173
G663A	E-E	0	1(2.63)	(-)	(-)
G666A	E-E	6(30)	6(15.79)	0.203	0.208
T732C	F-F	1(5)	2(5.26)	0.966	0.966
T789C	I-I	1(5)	2(5.26)	0.966	0.966
C790T	R-C	0	1(2.63)	(-)	(-)
T795G	T-T	1(5)	2(5.26)	0.966	0.966
T843C	C-C	1(5)	5(13.16)	0.332	0.336
T846C	S-S	10(50)	26(68.42)	0.169	0.173

NE=正常上皮细胞; CC=宫颈癌组织; P_{trend}=线性相关; P=皮尔森卡方检验; (-)=无法统计学分析 NE=Normalepithelium; CC=cervical cancer tissues; P_{trend}= linear-by-linear association; P=Pearson Chi-square test; (-)=too few isolates for statistical analysis.

表 12 宫颈癌患者 HPV-18 E6/E7 基因核苷酸变异位点 (只列出有变异的位点)

Table12: HPV-18E6/ E7 nucleotide mutation site (only variable site listed) for gynecological outpatient samples

	E6 base sites			E7 base sites	
	218	485	549	751	
AY262282	A	T	C	AY262282	C
JX412188	-	-	-	JX412197	-
JX412189	-	-	-	JX412198	-
JX412190	-	-	-	JX412199	-
JX412191	-	-	-	JX412200	-
JX412192	-	-	-	JX412201	-
JX412193	-	-	-	JX412202	-
JX412194	T	C	A	JX412203	-
JX412195	-	-	-	JX412204	-
JX412196	-	C	A	JX412205	T

表所列为 8 个 HPV-18 E6/E7 变异情况。标准株 GenBank 基因登录号为 No.AY262282, E6 序列为 JX412188-JX412196, E7 序列为 JX412197-JX412205。

Nucleotide sequence variations in the E6 and E7 open reading frames (ORFs) are listed about 9 HPV-18 positive Southwest Chinese women. GenBank accession numbers in this paper are JX412188-JX412196 for E6 sequences, JX412197-JX412205 for E7 sequences and HPV-18 prototype (No. AY262282).

讨论

宫颈癌是一种常见的导致全球妇女死亡率居高不下的妇科肿瘤，每年新增病例约50万。分子流行病学的相关研究表明，持续感染高危型人乳头状瘤病毒（HPV）是导致宫颈癌一个重要危险因素^[64]。本研究共调查了中国西南地区妇女中2000例门诊病人宫颈脱落细胞标本（正常与炎症上皮细胞，排除宫颈癌及子宫颈上皮内瘤变标本）以及74例宫颈癌患者标本（经组织病理学检查确诊）人乳头状瘤病毒（HPV）流行情况。

1. 中国西南地区妇女HPV流行情况及型别分布

在不同国家和地区HPV感染率及其感染的型别分布有很强的地域性。本课题通过对2000例ASC-US人群宫颈脱落细胞标本的HPV检测得出：中国西南地区妇女正常人群中HPV感染率为16.15%（323/2000），其中高危型（high-risk, HR）感染率为10.75%

（215/2000），而低危型（low-risk, LR）感染率为5.4%（108/2000）。在高危型（HR）中，发现5种最常见的感染亚型，根据其感染率按降序排列依次为HPV16型（23.84%，77/323），HPV58型（21.36%，69/323），HPV33型（11.46%，37/323），HPV18型（4.64%，15/323）以及HPV35型（3.1%，10/323）；低危型（LR）中，3种最常见亚型依次为HPV6型（19.5%，63/323），HPV11型（7.12%，23/323）以及HPV81型（5.26%，17/323）；即在西南地区妇女正常人群中，妇女感染HPV高危型主要以HPV16型，HPV58型，HPV33型为主，低危型感染以HPV6型，HPV11型为主。对74例宫颈癌患者标本的HPV检测得出：HPV阳性感染率为82.43%（61/74），且感染的亚型全部为高危型（HR）；其中HPV16型感染率为73.77%（45/61），HPV18型感染率为16.39%（10/61）；即在西南地区妇女宫颈癌人群中，妇女感染HPV高危型主要以HPV16型，HPV18型为主，没有感染低危型，这也证实了HPV16型与HPV18型是宫颈癌中的常见亚型^[6]。李丽等对苏州地区1827例女性宫颈细胞HPV感染分析发现，该地区的HPV总感染率为33.44%^[65]；而南京地区3678例已婚妇女中HPV感染率则为10.79%^[66]。大连地区454例健康体检妇女中HPV阳性感染率为12.78%，感染亚型中，高危型以HPV16型、HPV58型、HPV52型为主；低危型以43型为主^[67]。浙江地区4987例妇女宫颈标本中，HPV阳性率为13.3%，高危型感染率10.2%，其中高危型以HPV 52型为主，HPV16型，HPV58型，HPV68型常见^[68]。西藏自治区3036例妇女中HPV阳性率为9.19%，其中高危型感染率为7.05%（214/3036），低危型感染率为2.14%（65/3036），高危型以HPV16型为主，HPV33型，HPV58型，HPV52型以及HPV31型常见^[69]。北京地区妇女高危型HPV感染率（正常以及炎症细胞，ASC-US）为6.45%，在宫颈病变妇女中HPV16型，HPV58型和HPV33型为常见亚型^[70]。广东潮州48559例妇女感染高危型HPV（HR）的阳性率为7.89%，HPV 52型，HPV16型，HPV58型，HPV33型，HPV68型和HPV18型为常见类型^[71]。在宫颈癌死亡率最高的湖北五峰，1,100例妇女中高危型HPV感染率为11.14%，HPV16型为主要感染类型，HPV52

型, HPV58型, HPV18型, HPV45型和HPV33型较常见^[72]。在成都地区的144例宫颈癌患者中, HPV 感染率为80.6%, 其中HPV16型为主要感染类型, HPV18型, HPV31型, HPV33型, HPV35型, HPV45型和HPV52型较常见^[73]。谢静等人对内蒙古地区75例宫颈癌患者的研究中发现, HPV阳性率为80%, 感染主要为HPV16型^[74]。将中过各地区HPV的流行情况以及本实验西南地区宫颈标本中HPV的流行情况列表, 表13。IARC专题工作组建议: 在筛查检测HPV必须考虑主要病毒类型之间的差异^[56]。综合上述各地区HPV的流行情况来看, 无论是在研究适合中国人群的预防性疫苗以及治疗性疫苗方面还是在预防HPV的感染方面, 除了考虑HPV16型和HPV18型两种型别外, HPV58型, HPV52型以及HPV33型应考虑在内。

在中国西南地区妇女 ASC-US 人群中 HPV 流行主要集中在 31 岁-40 岁人群中, 而在宫颈癌患者中, 主要集中在 41 岁-50 岁; 两种人群中 HPV 感染的年龄分布都是呈单峰。而澳门地区 1600 人 HPV 感染的年龄分布却呈双峰现象, 即 25 岁前出现高峰, 之后降低, 在 50 岁又出现高峰^[75]。湖北五峰地区 20-24 为 HPV 高发年龄^[72]。

中国西南地区妇女宫颈癌患者中, HPV16 型中以宫颈鳞状细胞癌为主。而在四川成都地区的 144 例宫颈癌患者中, HPV18 型在宫颈腺癌中比在宫颈鳞状细胞癌中常见^[73]。对台湾地区 85 例宫颈癌患者的研究中发现, 在宫颈腺癌中以 HPV18 型为主, 而在宫颈鳞癌中以 HPV16 常见。另外, 在内蒙古的 75 例宫颈癌患者中也得到了同样的结果^[74]。

表 13 中国各地区 HPV 流行情况

Table13: HPV prevalence in China

标本来源	样本数 (人)	阳性率 (%)	高危型感染主要型别	地区
宫颈脱落细胞 (ASC-US)	2000	16.15	16,58,33,18	西南 (本研究)
宫颈脱落细胞	1827	33.44%	(-)	苏州 ^[65]
宫颈脱落细胞	3678	10.79	(-)	南京 ^[66]
宫颈脱落细胞	454	12.78	16,58,52	大连 ^[67]
宫颈脱落细胞	3036	9.19	16,33,58,52,31	西藏 ^[69]
宫颈脱落细胞 (ASC-US)	6339	6.45%	16,58,33	北京 ^[70]
宫颈脱落细胞	48559	7.89%	52,16,58,33,68,18	广东潮州 ^[71]
宫颈	4987	13.3	52,16,58,68	浙江 ^[68]
宫颈癌组织	74	82.43	16,18	西南 (本研究)
宫颈癌组织	1100	(-)	16,52,58,18,45,33	湖北五峰 ^[72]
宫颈癌组织	144	80.6%	16,18,31,33,35,45,52	成都 ^[73]
宫颈癌组织	75	80%	16	内蒙古 ^[74]

2. 中国西南地区妇女中 E6/E7 基因变异情况

人乳头状瘤病毒(HPV) E6 基因的表达或突变可引起肿瘤抑制基因 p53 的失活, 摧毁 p53-Notch1 肿瘤抑制途径, 引起细胞分化不足及非正常细胞生长, 从而导致癌的发生^[76, 77]。E7 基因结合 pRb 并致其失活, 促进抑癌基因 pRb 被降解^[78, 79]。HPV 早期表达蛋白 E6/E7 已成为 HPV 治疗性疫苗研究焦点, 由于 E6、E7 在 HPV 感染人群中、宫颈癌患者以及癌前病变组织中持续表达, 且持续表达是维持癌细胞恶性表型所必需的等特点。研究人员多采用 E6 和 E7 蛋白抗原肽段作为 HPV 治疗性疫苗, 但由于 HPV E6、E7 蛋白在同一型别中会发生变异, 这样会直接影响多肽疫苗的治疗效果。在宫颈癌患者中 HPV 16 型, HPV18 型是最常见的型别^[80]。在中国西南地区妇女 ASC-US 人群以及宫颈癌患者中 HPV16 型均为主要流行亚型。因此, 有必要对西南地区妇女正常人群中以及宫颈癌患者中 HPV16 型 E6、E7 基因测序, 了解 HPV E6 和 E7 基因的变异情况。

研究结果表明, 中国西南地区妇女 ASC-US 人群中 HPV16 型 E6 基因最常见的突变位点为 T178G, 即 D25E; E7 基因最常见的突变位点为 A647G(N29S)和同义突变 T846C, 且两突变点同时存在。此外, 还发现 HPV-16 型 E6-T178G 与 E7-A647G-T846C 为连锁突变, 并且为 HPV16 型中常见突变位点。中国西南地区妇女宫颈癌患者中, T178G/T178A 为 E6 基因序列常见突变点; A647G, T846C 为 E7 基因序列常见突变点。对 E6/E7 基因序列联合比对分析发现, 除突变 E6-T178A 外, 突变 E6-T178G 与 E7-A647G-T846C 为连锁突变。山东青岛地区宫颈癌患者中 E6 基因突变主要以 T178G 或 T178A 为主^[81], 而在湖北地区宫颈癌患者 E6 基因突变中仅发现 T178G, 没有突变 T178A^[82]。另外一个对湖北地区 72 例宫颈癌患者的 HPV16 E6 变异发现, D25E 为主要突变点^[83]。辽宁省妇女宫颈病变中 E6 基因突变点以 D25E 与 L83V 为主, E7 基因以 N29H, N29S 以及同义突变 G666A, T846C 为主^[84]。北京地区 31 例 HPV 16 型阳性宫颈癌患者中, E6 基因突变中以突变 T178G 和 T178A 为主, E7 以突变 A647G 和 T846C 为主^[85]; 将其所列 E6/E7 基因序列表联合分析发现突变 E6-T178G 与 E7-A647G-T846C 为连锁突变, 另外还发现野生株 CC44 其突变 E6-T178G 与 E7-A647G-T846C 也同时存在。泰国关于宫颈鳞癌中 HPV16 型 E6/E7 基因的变异发现, 90%的 E6-T178G(D25E)与 E7-A647G(N29S)同时存在, 并且为常见变异型^[86]。

用软件 SPSS 12.0 分析检查 HPV 16 型 ASC-US 人群与宫颈癌患者中 E6 基因(D25E, N58S, H78Y, L83V, E113D) 和 E7 基因(N29S) 变异位点, 没有发现与 HPV16、18 型致癌性相关的变异位点。HPV16 型 E6 D25E 以及 E7 N29S 可能与地理因素有关。有相关报道, 在中国人口中 E6 基因变异 D25E 可能提高患宫颈癌的风险^[83]。而在韩国妇女中 D25E 虽然也是 HPV16 型流行的突变位点, 但没有发现其能够提高患宫颈癌的风险^[87]。

通过进化树分析表明,中国西南地区流行的 HPV-16 变异体主要为亚洲型变异体,其次为欧洲变异体,亚洲美洲变异体也有发现,没有发现非洲 1 型变异体和非洲 2 型变异体。中国湖北地区流行的 HPV-16 变异体的研究得到了类似的结果,但其没有发现亚洲美洲变异体^[82]。研究认为,不同变异株的致癌能力可能会随着地区不同而发生改变^[88],而不同地区流行的人乳头状瘤病毒(HPV)的变异体也不同。因此,做好 HPV16 型高危人群的预防,减少宫颈癌的发生就显得非常重要了。

虽然 HPV58 型在中国妇女中有相对较高的患病率,但对于 HPV58 型 E6/E7 基因变异的研究却很少,因此有必要对 HPV58 型 E6/E7 基因进行测序,了解 HPV58 型 E6/E7 基因变异情况。HPV58 E6/E7 基因序列研究结果表明,E7 基因比 E6 基因更易发生变异。E6 基因常见突变位点为非同义突变 nt307 (C→T) 以及同义突变 nt388 (A→C),相应的氨基酸变异为 K93N,另外还发现 C187T 和 A260C 两个突变位点。对 2021 例中国妇女宫颈标本 HPV58 型 E6 基因变异位点的研究除了发现 C187T, C307T 和 A388C 外,还有 G203C, A259G, C317T, C367A, G432A 和 A479C 等突变位点^[89]。对四川宫颈癌患者中 HPV58 型 E6 基因变异位点的研究也发现了突变点 C307T 和 A388C^[90],而在韩国仅发现了突变点 C307T^[91]。E7 基因常见突变位点为同义突变 T744G 以及非同义突变 C632T, G694A, T744G, G760A, G761A, T803C, 相应的氨基酸变异分别为 T20I, G41R, G63S, G63D, V77A, 另外还发现 G599A (R9K) 和 T726C (同义突变) 两个突变位点。E6/E7 基因序列表联合分析发现突变 C632T 和 G760A (T20I-G63S), 突变 G694A 和 G761A (G41R-G63D) 为连锁突变。HPV58 型 E7 基因突变点 C632T, G694A, T744G, G760A, G761A 和 T803C 在中国四川^[90]以及韩国^[91]中均有发现,而对 2021 例中国妇女宫颈标本 HPV58 型 E7 基因变异位点的研究中却没有发现这些突变点^[89]。尽管研究表明 HPV58 E6/E7 基因变异与宫颈癌的发生相关,但其得出的与癌症相关的 HPV58 型 E6/E7 变异位点却不同^[89-91],对 2021 例中国妇女宫颈标本 HPV58 型 E6/E7 基因变异位点的研究认为 E6 基因突变点 A388C(K93N), E7 基因突变带点 C632T/G760A (T20I/G63S) 可能与宫颈癌有关^[89]。这可能与特定的地理区域与人群有关^[92]。

进化树分析表明西南地区 HPV58 型 E6/E7 基因序列起源于东南亚分支,与 Yanyun Li 等的研究一致^[93]。这些结果表明,国内和东南亚 HPV58 型变体在全球传播和迁移过程中扮演了“传播源”的角色,这也部分解释了宫颈癌仅在一些国家和地区中有高患病率的原因。在病毒基因组核苷酸替换可能影响病毒装配,致癌潜力以及宿主免疫反应^[94]。HPV58 型 E6/E7 基因的多样性可能帮助我们理解这些病毒株的潜在致癌性。而 E6/E7 基因氨基酸的变化可能会影响 HPV58 早期蛋白的免疫反应以及提出 HPV 58 治疗性疫苗策略的进展。

西南地区 HPV18 型在 ASC-US 人群与宫颈癌患者中都有较低的发病率,这与 Balz

等的研究一致^[95]。对中国西南地区宫颈癌患者中HPV18 E6/E7 基因变异分析发现, E6 基因发生两个同义突变T485C, C549A。四川省60例宫颈癌患者中HPV18型E6基因的研究也发现了这两个突变位点^[96], 但是C183G是台湾地区宫颈癌患者中HPV18型E6基因变异种中比较特别的突变位点^[97]。

3. 意义

我们对人乳头状瘤病毒(HPV)在西南地区妇女中的流行情况、优势型别的研究, 为系统筛查 HPV 提供了策略, 并研究适合中国人群的 HPV 预防性疫苗提供了方向, 同时可作为疫苗开发商评估 HPV 疫苗的人口福利以及成本效益的数据基础。研究表明, HPV 不同变异型的致癌性可能会根据地区的不同而改变^[98]。本课题对于中国西南地区妇女中 HPV16 型, HPV18 型以及 HPV58 型 E6/E7 的研究为将来研究适合中国人群的 HPV 治疗性疫苗提供了重要的科学依据。

小结

1. 在不同国家和地区 HPV 感染有很强的地域性。西南地区 HPV 的流行高危型主要型别为 HPV-16 型, HPV-58 型, HPV-33 型; 低危型主要为 HPV-6 型, HPV-11 型。ASC-US 人群中易感人群为 31 岁-40 岁妇女, 宫颈癌患者易感人群比上述年龄推后 10 岁。
2. 中国西南地区妇女宫颈鳞状细胞癌患者中, HPV-16 型为主要感染亚型。
3. E6/E7 基因变异分析表明, 中国西南地区妇女中 HPV16 型 E6 基因最常见的突变位点为 D25E, E7 基因为 N29S 和同义突变 T846C, 且两突变点同时存在。E6/E7 基因序列表联合分析发现 E6-T178G (D25E) 与 E7-A647G (N29S) 连锁突变, 并且为常见变异型。对致癌性相关的变异位点统计学分析发现差异不显著, 没有统计学意义。选择压力分析虽发现正选择位点, 但经 LRT 检验, 差异不显著, 没有证据表明 E6/E7 基因受到正选择。进化树分析表明中国西南地区流行的 HPV-16 型 E6/E7 变异体主要为亚洲型变异体, 其次为欧洲变异体, 亚洲美洲变异体也有发现, 没有发现非洲 1 型变异体和非洲 2 型变异体。
4. 中国西南地区妇女中 HPV58 型 E6 基因最常见的突变位点为 K93N, E7 基因常见突变位点为同义突变 T744G 和非同义突变 T20I, G41R, G63S, G63D, V77A。E6/E7 基因序列表联合分析发现突变 C632T 和 G760A (T20I-G63S) 以及突变 G694A 和 G761A (G41R-G63D) 为连锁突变, 且为常见变异型。选择压力分析虽发现正选择位点, 但经 LRT 检验, 差异不显著, 没有证据表明 E6/E7 基因受到正选择。进化树分析表明西南地区 HPV58 型 E6/E7 基因序列起源于东南亚分支。
5. 西南地区 HPV18 型在 ASC-US 人群与宫颈癌患者中都有较低的发病率, HPV18 E6/E7 基因变异分析表明, E6 基因发现 T485C, C549A 两个同义突变。

参考文献

- [1] DM Parkin, F Bray, J Ferlay, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 [J]. International Journal of Cancer, 2001, 94(2): 153-156.
- [2] N Munoz, FX Bosch, S de Sanjose, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 348: 518-527.
- [3] Graham S. Human papillomavirus gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies [J]. Future Microbiol, 2010, 5(10): 1493-1506.
- [4] N Munoz, FX Bosch, X Castellsagué, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen the international perspective [J]. International Journal of Cancer, 2004, 111(2): 278-285.
- [5] TS Hwang, JK Jeong, M Park, et al. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray [J]. Gynecologic Oncology, 2003, 90(1): 51-56.
- [6] GM Clifford, JS Smith, M Plummer, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis [J]. British Journal of Cancer, 2003, 88(1): 63-73.
- [7] H Pilch, S Günzel, U Schäffer, et al. The presence of HPV DNA in cervical cancer Correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance 10 years experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University [J]. International Journal of Gynecological Cancer, 2001, 11(1): 39-48.
- [8] 刘继红, 黄欣, 廖革望, 等. 中国和澳大利亚宫颈癌患者人乳头状瘤病毒感染及其他危险因素的对比研究 [J]. 中华医学杂志, 2003, 83(9): 748-752.
- [9] JS Smith, L Lindsay, B Hoots, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update [J]. International Journal of Cancer, 2007, 121(3): 621-632.
- [10] JJ Carter, LA Koutsky, JP Hughes, et al. Comparison of Human Papillomavirus Types 16, 18, and 6 Capsid Antibody Responses Following Incident Infection [J]. J Infect Dis., 2000, 181(6): 1911-1919.
- [11] 秦广益, 陶敏芳. 宫颈高危型人乳头状瘤病毒潜伏感染者病毒自然清除率的研究 [J]. 中国临床医学, 2011, 18(3): 307-309.
- [12] Y Wu, Y Chen, L Li, et al. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China [J]. Journal of Clinical Virology, 2006, 35(3): 264-269.
- [13] KD Quint, MN de Koning, LJ van Doorn, et al. HPV genotyping and HPV16 variant

analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix [J]. *Gynecologic Oncology*, 2010, 117(2): 297-301.

[14] M Dai, Y.P.B., N Li, et al. Human papillomavirus infection in Shanxi Province, People's Republic of China: a population-based study [J]. *British Journal of Cancer*, 2006, 95(1): 96-101.

[15] LK Li, M Dai, GM Clifford, et al. Human papillomavirus infection in Shenyang City, People's Republic of China: a population-based study [J]. *British Journal of Cancer*, 2006, 95(11): 1593-1597.

[16] R Wu, M Dai, Y Qiao, et al. Human papillomavirus infection in women in Shenzhen City, People's Republic of China, a population typical of recent Chinese urbanisation [J]. *International Journal of Cancer*, 2007, 121(6): 1306-1311.

[17] 李清, 郝松茹, 张聪英, 等. 宫颈癌的相关因素分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2004, 19(12): 56-57.

[18] 郝瑞凤, 王培玉. 宫颈癌流行病学及高危因素探讨 [J]. *医学综述*, 2009, 15(10): 1495-1498.

[19] 乌恩岳苏, 宋伟奇, 段仙芝. 宫颈癌高危因素的研究进展 [J]. *内蒙古民族大学学报 (自然科学版)*, 2011, 26(1): 92-95.

[20] MMBP Salcedo, GPG Silveira. Immunohistochemical expression of p16 and herpes simplex virus type 2 in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer [J]. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, 2008, 30(2): 61-66.

[21] 何林, 吴赤蓬. 吸烟与宫颈癌关系的 Meta 分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(34): 4584-4586.

[22] M Li, TP Cripe, PA Estes, et al. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli* characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly [J]. *J. Virol.*, 1997, 71(4): 2988-2995.

[23] JL Smith, SK Campos, MA Ozbun, et al. Human Papillomavirus Type 31 Uses a Caveolin 1- and Dynamin 2-Mediated Entry Pathway for Infection of Human Keratinocytes [J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(18): 9922-9931.

[24] L Pelkmans, J Kartenbeck, A Helenius. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER [J]. *Nature Cell Biology*, 2001, 3(5): 473-483.

[25] 许廷贵, 王敬云, 张惠珍, 等. HPV 的分子生物学特征及其致病机理 [J]. *国外医学病毒学分册*, 2004, 11(1): 1-5.

- [26] S Ackermann, MW Beckmann, D Skiba, et al. Prognostic Significance of Serum Antibodies to HPV-16 L1 Virus-like Particles in Patients with Invasive Cervical Cancer [J]. *Anticancer Research*, 2006, 26(6): 4921-4926.
- [27] G Boulet, C Horvath, DV Broeck, et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(11): 2006-2011.
- [28] X Liu, A Clements, K Zhao, et al. Structure of the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 281(1): 578-586.
- [29] PL Cheah, LM Looi. p53 immunohistochemical expression: messages in cervical carcinogenesis [J]. *Pathology*, 2002, 34(4): 326-331.
- [30] M Lehoux, CM D'Abramo, J Archambault. Molecular Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis [J]. *Public Health Genomics*, 2009, 12(5-6): 268-280.
- [31] J Wang, A Sampath, P Raychaudhuri, et al. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20(34): 4740-4749.
- [32] LV Ronco, AY Karpova, M Vidal, et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity [J]. *Genes & Development*, 1998, 12(13): 2061-2072.
- [33] DM Harper, EL Franco, C Wheeler, et al. Efficacy of a Bivalent L1 Virus-Like Particle Vaccine in Prevention of Infection With Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Young Women: A Randomized, Controlled Trial [J]. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 2005, 60(5): 303-305.
- [34] DM Harper, E.F., CM Wheeler, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial [J]. *Lancet*, 2006, 367: 1247-1255.
- [35] LL Villa, KA Ault, AR Giuliano, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18 [J]. *Vaccine*, 2006, 24(27-28): 5571-5583.
- [36] LL Villa, RLR Costa, CA Petta, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial [J]. *Lancet Oncology*, 2005, 6(5): 271 - 278.

- [37] SM Garland, M Hernandez-Avila. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356: 1928-1943.
- [38] AE Tozzi, L Ravà, D Stat, et al. Attitudes towards HPV immunization of Italian mothers of adolescent girls and potential role of health professionals in the immunization program [J]. *Vaccine*, 2009, 27(19): 2625-2629.
- [39] I Sam, LP Wong, S Rampal, et al. Maternal Acceptance of Human Papillomavirus Vaccine in Malaysia [J]. *Journal of Adolescent Health*, 2009, 44(6): 610-612.
- [40] CD Walsh, A Gera, M Shah, et al. Public knowledge and attitudes towards Human Papilloma Virus (HPV) vaccination [J]. *BMC Public Health*, 2008, 8(1): 368.
- [41] LAV Marlow, J Wardle, AS Forster, et al. Ethnic differences in human papillomavirus awareness and vaccine acceptability [J]. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 2009, 63(12): 1010-1015.
- [42] ML Katz, PL Reiter, BC Kluhsman, et al. Human papillomavirus (HPV) vaccine availability, recommendations, cost, and policies among health departments in seven Appalachian states [J]. *Vaccine*, 2009, 27(24): 3195-3200.
- [43] M Moniz, M Ling, CF Hung, et al. HPV DNA vaccines [J]. *Front Biosci*, 2003, 8: 55-68.
- [44] PC Maciag, S Radulovic, Rothman. The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: A Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix [J]. *Vaccine*, 2009, 27(30): 3975-3983.
- [45] LK Borysiewicz, A Fiander, M Nimako, et al. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer [J]. *The Lancet*, 1996, 347(9014): 1523-1527.
- [46] AM Kaufmann, EM Rankin, H Sommer, et al. Safety and Immunogenicity of TA-HPV, a Recombinant Vaccinia Virus Expressing Modified Human Papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 Genes, in Women with Progressive Cervical Cancer [J]. *Clin Cancer Res.*, 2002, 8 (12) : 3676-3685.
- [47] LD Roman, S Wilczynski, LI Muderspach, et al. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Gynecologic Oncology*, 2007, 106(3): 558-566.
- [48] GG Kenter, MJP Welters, ARPM, et al. ValentijnVaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia [J]. *N Engl J Med.*, 2009, 361: 1838-1847.
- [49] F Garcia, KU Petry, L Muderspach, et al. ZYC101a for Treatment of High-Grade

- Cervical Intraepithelial Neoplasia [J]. *Obstetrics & Gynecology*, 2004, 103(2): 317-326.
- [50] 魏丽惠, 屠铮, 王悦. 宫颈病变的筛查与治疗进展 [J]. *当代医学*, 2001, 7(4): 25-28.
- [51] LG Koss. The new Bethesda System for reporting results of smears of the uterine cervix [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82: 988-992.
- [52] ACOG practice bulletin. Cervical Cytology screening [J]. *Int J Gynecol Obstet*, 2003, 83(2): 237-247.
- [53] R Sankaranarayanan, R Wesley, Somanathan Thara, et al. Test characteristics of visual inspection with 4% acetic acid (VIA) and Lugol's iodine (VILI) in cervical cancer screening in Kerala, India [J]. *International Journal of Cancer*, 2003, 106(3): 404-408.
- [54] H Lee, KJ Lee, CK Jung, et al. Expression of HPV L1 capsid protein in cervical specimens with HPV infection [J]. *Diagnostic Cytopathology*, 2008, 36(12): 864-867.
- [55] T Yoshida, Sano, T Kanuma, et al. Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions [J]. *Cancer*, 2008, 114(2): 83-88.
- [56] V Coglianò, R Baan, K Straif, et al. Carcinogenicity of human papillomaviruses [J]. *The Lancet Oncology*, 2005, 6(4): 204-204.
- [57] I Zehbe, E Wilander. Two Consensus Primer Systems and Nested Polymerase Chain Reaction for Human Papillomavirus Detection in Cervical Biopsies A Study of Sensitivity [J]. *Human pathology*, 1996, 27: 812-815.
- [58] AM de Roda Husman, Jan M. M. Walboomers, Adriaan J. C. van den Brule, et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR [J]. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 1057-1062.
- [59] Maryam Ayatollahi, Maryam Zakerinia, Mansour Haghshenas. Molecular Analysis of Iranian Families with Sickle Cell Disease [J]. *Journal of Tropical Pediatrics*, 2005, 51(3): 136-140.
- [60] J Felsenstein. Numerical methods for inferring evolutionary trees [J]. *The Quarterly Review of Biology*, 1982, 57: 379-404.
- [61] Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.
- [62] Felsenstein, J. PHYLIP—phylogeny inference package (version 3.2) [J]. *Cladistics*, 1989, 5: 163-166.

- [63] Yang, Z. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [64] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(5): 342-350.
- [65] 李丽, 王志蕙, 耿建祥, 等. 1827 例女性宫颈细胞 HPV 感染基因型分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(23): 2884-2886.
- [66] 张劲松, 耿建祥, 韩春荣, 等. 3578 例已婚女性宫颈细胞 HPV 感染基因谱的研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(4): 439-441.
- [67] 张春蕾, 华正宇, 袁小林, 等. 大连地区 454 例健康体检女性人乳头瘤病毒感染调查 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(7): 1134-1137.
- [68] Ye J, Cheng X, Chen X, et al. Prevalence and risk profile of cervical Human papillomavirus infection in Zhejiang Province, southeast China: a population-based study [J]. *Virol J*, 2010, 23: 7: 66.
- [69] Jin Q, Shen K, Li H, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Tibet Autonomous Region of China [J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2009, 44(12): 898-902.
- [70] Li C, Wu M, Wang J, et al. A population-based study on the risks of cervical lesion and human papillomavirus infection among women in Beijing, People's Republic of China [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(10): 2655-2664.
- [71] Chen Q, Xie LX, Qing ZR, et al. Epidemiologic characterization of human papillomavirus infection in rural Chaozhou, eastern Guangdong Province of China [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32149.
- [72] Zhang L, Wang Y, Peng M, et al. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus infections among women in Wufeng County, China [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286(3): 695-699.
- [73] Li J, Zhang D, Zhang Y, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in women with cervical cancer or high-grade precancerous lesions in Chengdu, western China [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2011, 112(2): 131-134.
- [74] 谢静, 乔惠珍, 王琳, 等. 内蒙古妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒的 PCR 检测 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2005, 37(4): 299-302.
- [75] 叶玉清, 黄香婷, 文剑明, 等. 澳门宫颈人类乳头瘤病毒感染的分布与基因分型 [A]. 见中华医学会病理学分会 2010 年学术年会, 2010, A-14: 49-56.
- [76] Kramer MS, Kahn SR, Platt RW, et al. Mid-trimester maternal plasma cytokines and CRP as predictors of spontaneous preterm birth [J]. *Cytokine*, 2010, 49(1): 10-14.

- [77] Mackenzie R, Walker M, Armson A, et al. Progesterone for the prevention of preterm birth among women at increased risk: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 194(5): 1234-1242.
- [78] Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(10): 1505-1511.
- [79] Strati K, Lambert PF. Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11585-11593.
- [80] Lo KW, Wong YF, Chan MK, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in China [J]. *Int J Cancer*, 2002, 100(3): 327-331.
- [81] 彭丽娜, 王言奎, 罗兵, 等. 山东青岛地区宫颈癌组织中 HPV16 型 E6 和 E2 基因突变分析 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(7): 608-612.
- [82] 丁晓华, 张帆, 蔡红斌, 等. 中国湖北地区 HPV16 型 E6 和 E7 基因变异和进化发生学研究 [J]. *病毒学报*, 2010, 26(5): 368-372.
- [83] Cai HB, Chen CC, Ding XH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2010, 36(2): 160-163.
- [84] Sun Z, Ren G, Cui X, et al. Genetic diversity of HPV-16 E6, E7, and L1 genes in women with cervical lesions in Liaoning Province, China [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(3): 551-558.
- [85] 熊光武, 袁杨, 李萌, 等. 北京地区宫颈癌 HPV16 上游调控序列、E6、E7 癌基因序列初步分析 [J]. *遗传*, 2010, 32(4): 339-347.
- [86] Vaeteewoottacharn K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2C): 1927-1931.
- [87] Kang S, Jeon YT, Kim JW, et al. Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical tissues of Korean women [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2005, 15(1): 107-112.
- [88] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population [J]. *Cancer Lett*, 2000, 156(2): 159-165.
- [89] Ding T, Wang X, Ye F, et al. Distribution of human papillomavirus 58 and 52 E6/E7 variants in cervical neoplasia in Chinese women [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 119(3): 436-443.

- [90] Wu EQ, Zha X, Yu XH, et al. Profile of physical status and gene variation of human papillomavirus 58 genome in cervical cancer [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 5): 1229-1237.
- [91] Bae JH, Cheung JL, Lee SJ, et al. Distribution of human papillomavirus type 58 variants in progression of cervical dysplasia in Korean women [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(9): 1051-1054.
- [92] Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(15): 1045-52.
- [93] Li, Y, et al. Human papilloma virus 58 type system geography analysis [J]. *China science C series: life science*, 2009, 39: 654-661.
- [94] Cerqueira DM, de S Moraes D, Camara GN, et al. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil [J]. *Arch Virol*, 2007, 152(1): 75-83.
- [95] Balz V, Scheckenbach K, Götte K, et al. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(6): 1188-1191.
- [96] En-Qi, W, et al. Analysis of E6 Variants of Human Papillomavirus Type 18, 45 Isolated [J]. *Chemical journal of chinese universities*, 2006, 27: 263-267.
- [97] Chang CH, Chen TH, Hsu RC, et al. The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan [J]. *J Clin Virol*, 2005, 32(1): 33-37.
- [98] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population [J]. *Cancer Lett*, 2000, 156(2): 159-165.

附录 缩略词语表

VLP	Virus Like Particle	病毒样颗粒
HPV	human papillomavirus	人乳头状瘤病毒
ORF	open reading frame	开放阅读框
URR	upstream regulation region	上游控制区
E6AP	E6 association protein	E6 相关蛋白
E6BP	E6 binding protein	E6 结合蛋白
HR-HPV	high risk human papillomavirus	高危型人乳头状瘤病毒
LR-HPV	low risk human papillomavirus	低危型人乳头状瘤病毒
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤变
IARC	international agency for research on cancer	国际癌症研究署
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
OCP	oral contraceptive	口服避孕药
HKC	Human keratin cells	人角质细胞
CC	cervical cancer	宫颈癌
IRF-3	interferon regulatory factor 3	干扰素调控因子 3
IFN- β	Interferon- β	干扰素 β
HD	histone deacetylase	去乙酰化酶
CDKs	Cyclin Dependent Kinase	细胞周期素依赖激酶
VLP	Virus-like particle	病毒样颗粒
FDA	Food and drug administration	美国食品与药物管理局
AAHS	amorphous aluminum hydroxyphosphate sulfate adjuvant	铝盐佐剂
	3-deacylated monophosphoryl lipid A	3 去乙酰单磷酸脂质 A
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	疾病预防控制中心
LEEP	Loop Electrosurgical Excision Procedure	子宫颈电圈环切术
DC	dendritic cell	树突状细胞
LM	Listeria monocytogenes	李斯特菌
BCG	Bacillus Calmette Guerin vaccine	卡介苗
TCT	ThinPrep cytology test	液基超薄技术

TBS	The Bethesda System	细胞学诊断分级标准
WNL	within normal limits	正常范围细胞
ASCUS	atypical squamous cells of undetermined significance	意义不明的不典型鳞状细胞
SIL	squamous intraepithelial lesion	鳞状上皮内病变
LGSIL	low grade squamous intraepithelial lesion	低度鳞状上皮内病变
HGSIL	high grade squamous intraepithelial lesion	高度鳞状上皮内病变
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附法
HC- II	HybridCaptureTM	第二代杂交捕获法
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists	美国妇产医师会
STIs	sexually transmitted infections	性传播感染
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
rpm	revolutions per minute	每分钟转数
SCC	squamous cell carcinoma	鳞状细胞癌
AC	adenocarcinoma	腺细胞癌
FIGO	the International Federation of Gynecology and Obstetrics	国际妇产科学联合会
GP5+/GP6+	general primer HPV L1	片段内的 PCR 通用引物
NCI	National Cancer Institute	美国国家癌症研究所
NJ	Neighbor Joining	邻接法
BEB	Bayes empirical Bayes	贝斯方法
IC	internal control	内对照

致谢

本课题的顺利完成以及论文的撰写是在导师孙强明老师的精心指导下完成的。在此首先对我的导师孙强明老师表示衷心的感谢！

本课题从开始选题、实验设计、实验探索、结果分析及论文撰写与修改中孙老师都倾注了大量的心血。在三年的研究生学习与生活中，孙老师给予我很大的帮助，并教会了许多做人的道理。特别是在论文的最后修改阶段，孙老师百忙中抽出时间帮我修改论文。孙老师这种务实、忘我的工作作风、严谨的治学态度、平易近人的品格使我受益匪浅。再次对孙老师表示衷心的感谢！

在中国医学科学院医学生物学研究所三年的研究生学习与生活中，得到了马绍辉老师、施海晶老师给与的支持和帮助；陈俊英老师、潘玥老师在试验给予的无私帮助，在此表示真挚的谢意！

感谢三年来人事教育处的李艳梅老师、陈瑜娜老师、段男老师、陈晨老师等对研究生培养工作的大力支持以及生活中无微不至的关怀。感谢中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所给了我这个宝贵的学习机会，为我提供了一个良好的学习和生活。

三年来，师姐赵玉娇，同窗黄新伟、岳耀斐、王丽萍、王越、刘正伶，师妹丁晓洁、邱丽娟和师弟李多陪我走过了那些一起为实验而奋斗的日子，在他们的帮助下，我克服了一个个难点，终于完成了课题。在此表示真挚的谢意！

衷心感谢灵长类一部的代解杰老师、唐东红老师和黄英老师等各位老师对本实验的支持和帮助。

衷心感谢石怀生老师对本实验的支持和帮助。

二十多年的学习生涯，父母以及亲人给了我最无私的支持和关怀，他们是我永远不变的精神动力！

最后，谨向在生活中给我帮助的朋友王红英、樊红娥等人表示最诚挚的谢意！感谢所有关心、帮助和支持过我的人们！

杨丽娟

2013年5月于昆明

个人简历

杨丽娟，女，汉族，1985 年出生于山西省临汾市

2005 年 9 月-2009 年 7 月 就读于云南大学生态学专业，获得理学学士学位

2010 年 9 月-2013 年 7 月 就读于中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所攻读硕士学位

攻读硕士期间发表的文章：

- 1、云南省人乳头状瘤病毒16型E6/E7基因的变异分析（第一作者，病毒学报，已发表）
- 2、云南省 3000 例妇女宫颈人乳头瘤病毒的检测与基因分型（第二作者，中华妇幼临床医学杂志，已发表）
- 3、IV 型登革病毒中国株 LD34 在 KMB17 细胞上的适应性及其生物学特性；I 型登革病毒 D06063 株人二倍体细胞适应株的筛选及纯化（参与作者，中国生物制品学杂志，已发表）
- 4、II 型登革病毒 D01090 株在人胚肺二倍体细胞 KMB17 上适应株选育及初步鉴定（参与作者，中国生物工程杂志，已发表）

发表的 sci 论文：

1. Genetic Variability in L1 and L2 Genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China（参与作者，PLOS ONE，已发表）
2. The Variation of HPV-16/HPV18 E6/E7 genes in cervical neoplasia in Southwest Chinese women（第一作者，正投稿）
- 3.Genetic Variability in E6/E7 Genes of HPV-58 in Southwest China（第一作者，正投稿）

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外,不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名: 杨丽娟 签字日期: 2013年 6月 7日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 北京协和医学院 有关保存、使用学位论文的管理办法。有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅和借阅。本人授权 北京协和医学院 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名: 杨丽娟

导师签名: 孙强明

签字日期: 2013年 6月 7日

签字日期: 2013年 6月 7日

学位论文作者毕业后去向:

工作单位:

电话:

通讯地址:

邮编: