

# 中国四川地区宫颈癌组织 HPV16 E6/E7 基因变异研究

郅明蓉<sup>1</sup>, 张健<sup>2</sup>

(1. 四川大学华西第二医院妇产科, 四川 610041;  
2. 四川省人民医院妇产科, 四川 610041)

**摘要:** 目的: 探讨中国四川地区宫颈癌患者的 HPV16 感染状况及其癌基因 E6/E7 的变异类型, 及其与宫颈癌发病的关系。方法: 收集中国四川地区宫颈癌及对照组的宫颈组织, 行 HPV16 E6/E7 特异的 RT-PCR 扩增并测序, 检测 HPV16 E6/E7 变异。结果: 四川地区宫颈癌组织 HPV16 阳性率为 70.5% (86/122), 对照组阳性率为 37.0% (51/138), 二者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。四川地区 HPV16 以亚洲株及欧洲株为主, 共获得 72 例宫颈癌样本及 37 例对照组样本的 HPV16 E6 全长序列, 经序列比对分析发现 9 处核苷酸位点共 12 种变异。HPV16R E7 原型在对照组中所占比例 (45.9%) 远远高于宫颈癌中所占比例 (9.7%), 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。结论: HPV16 及其变异在宫颈癌各病理参数之间差异无统计学意义。HPV16 仍是中国四川地区宫颈癌的主要感染型别及高危因素, 亚洲株、欧洲株是本地区的主要变异株, 欧洲株原型在对照组中所占比例明显高于宫颈癌中比例, HPV16 感染及病毒变异可能是宫颈癌的始动因素, 在宫颈癌的进展过程中可能还有很多其他因素起主要作用。

**关键词:** 宫颈癌; HPV16; 变异

**中图分类号:** R737.33

## Variants of HPV16 E6/E7 in cervical cancer in Sichuan, China

Xi Mingrong<sup>1</sup>, Zhang Jian<sup>2</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Sichuan 610041;

2. Dept. of Obstetrics and Gynecology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan 610041)

**Abstract:** Aims: To detect the HPV16 E6/E7 variants in Sichuan Province of China and to explore the relationship between the variants and the clinic-pathological parameters of cervical cancer. Methods: Fresh tissue samples from 122 cervical cancer patients and 138 non-malignant controls were analyzed by RT-PCR and bi-directional sequencing. Results: The infection rate of HPV16 in cervical cancer patients in Sichuan province was 70.5% (86/122), while in controls the rate was 37.0% (51/138), and the difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). We got totally 60 sequences of HPV16 E6 in cervical cancer group and 16 in the controls. We found 12 variants with 11 nucleotide mutations. The Asian prototype and the European prototype were the main variant in Sichuan, China. The HPV16R prototype appeared more frequently in the cervical cancer group (9.7%) than in the controls (45.9%) ( $P < 0.001$ ). Conclusions: HPV16 infection was still the high risk factor for cervical cancer in Sichuan Province of China. The Asian and the European strains were the main variants in this area. The European strain appeared frequently in the non-malignant controls and we deduced that the Asian strain had a higher carcinogenicity than the European strain. Because there were no difference of the variants between the clinic-pathological parameters of cervical cancer, we thought that HPV16 infection was an initial factor in the onset of cervical cancer, and there would be more other factors enrolled in the development of the malignancy.

**Key words:** cervica cancer, HPV16, variation

基金项目: 2009 年教育部博士点基金 (博导类) (20090181110008)

作者简介: 郅明蓉, 女, 主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤. E-mail: qmrjzz@126.com

## 0 引言

宫颈癌是女性恶性肿瘤中仅次于乳腺癌的常见恶性肿瘤。宫颈癌的发生与人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染密切相关。HPV 是最常见的性传播病原体, 约 80% 有性行为的女性随时有可能感染 HPV, 每年新增女性 HPV 感染者达 50 万之多。全世界超过 50 5% 的癌症病例是由这种病毒引起的, 除了宫颈癌外, HPV 还能引发皮肤癌、肺癌、阴茎癌等<sup>[1,2]</sup>。由病例对照研究得出的累计数据发现, 99.7% 的宫颈癌患者能检出 HPV<sup>[3]</sup>, 其中 HPV16 和 HPV18 占 70%。2008 年诺贝尔医学奖获得者之一 Harald zur Hansen 教授于 1974 年最先证实了 HPV 与宫颈癌的相互关系<sup>[4]</sup>。1995 年, 国际癌症研究署专题讨论会将 HPV 感染确定为宫颈癌的主要病因, 明确子宫颈癌是一种感染性疾病。

目前已知的 HPV 基因型超过了 200 多种, 感染生殖道的有 40 余种。其中 HPV16 和 18 型感染者, 具有极高的引发宫颈癌的风险, 相比于非感染者, 被高风险性 HPV 亚型 (即致癌亚型) 持续感染的妇女患恶性肿瘤的风险高 300 倍以上<sup>[5]</sup>。HPV 依据其基因组核酸序列分为不同的型。不同 (type) 指病毒 DNA 与其他任何已知的 HPV E6、E7 和 L1 开放读码框架的 DNA 序列同源性小于 90%; 同源性达到 90-98% 者为亚型 (subtype); 一致性大于 98% 者为型内变异株 (variant)<sup>[6]</sup>。已证实不同的病毒型别具有不同的致病能力, 如 HPV16 及 HPV18 与宫颈癌密切相关, HPV 尽管 HPV16 变异类型的分布在各国或地区不完全一样, 但变异体都较原型的致癌性强这一点基本是相同的。本研究旨在探讨中国四川地区宫颈癌患者的 HPV16 感染状况及其癌基因 E6/E7 的变异类型, 及其与宫颈癌发病的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究纳入病例为 2008 年 3 月至 2009 年 7 月间在四川大学华西第二医院妇科住院手术的宫颈癌患者 108 例以及泸州医学院宫颈癌患者 14 例 (病例组共 122 例), 以及同期因“子宫肌瘤”等于四川大学华西第二医院妇科住院行子宫全切术的非宫颈病变患者 138 例 (对照组)。本研究经四川大学华西第二医院伦理委员会审核通过, 全部病例临床病理资料完整, 术前宫颈局部均未接受物理或手术治疗, 亦无全身或局部抗病毒药物治疗史, 标本取样前均获得患者知情同意。病理诊断均由妇科病理专家确诊、复核。宫颈癌分期采用 FIGO 2000 年临床分期标准, 组织分级按 FIGO 分级法评定。

### 1.2 试剂

TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司; PCR Master Mix (2×)、BamH I、Xho I 购自 Fermentas 公司; ReverTra Ace-α-™ 及 Ligation High 购自 TOYOBO 公司; 引物合成及测序由 TAKARA 公司完成。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Sequence of the primers

| 基因名称  |    | 引物序列                                                      | 产物长度 (bp) |
|-------|----|-----------------------------------------------------------|-----------|
| E6    | 上游 | 5'- TTT AAC CGA AAC CGG TTA GT -3'                        | 527       |
|       | 下游 | 5'- TCT CCA TGC ATG ATT ACA GC -3'                        |           |
| E7    | 上游 | 5'- GCC GGA TCC ATG CAT GGA GAT ACA CCT AC -3' (BamH I)   | 297       |
|       | 下游 | 5'- GCT CTC GAG TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT G -3' (Xho I) |           |
| GAPDH | 上游 | 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'                          | 450       |
|       | 下游 | 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'                          |           |

### 1.3 序列比对方法

80 参照文献,以欧洲株 HPV-16R (Seedorf et al., 1985)<sup>[7]</sup>为标准,进行核苷酸定位及变异分析。采用软件 Mutation Surveyor software (version 2.28).及 GeneDoc (version 2.6.0.2) 进行核苷酸序列及氨基酸产物分析。种系发生学上依据 HPV 16 E6 序列,将其变异只要分为以下六大株,标准如下:欧洲株 (European, E): 序列与 HPV-16R 标准株相同或只相差 1-2 个碱基;亚洲株 (Asian, As): T178G; 非洲株 1 (African1, Af1): G 132 C, C 143 G, G 145 T, 85 T 286 A, A 289 G, 及 C 335 T; 非洲株 2 (African2, Af2): T 109 C, G 132 T, C 143 G, G 145 T, T 286 A, A 289 G, C 335 T, 及 A 403 G; 北美株 (North-American, NA): G 145 T, T 286A, A 289G, C 335 T, 及 T 350 G; 亚美株 (Asian-American, AA): G 145 T, T 286 A, A 289 G, C 335 T, T 350 G, 及 A 532 G<sup>[8-10]</sup>。

### 1.4 统计方法

90 采用 SPSS13.0 软件分析,计量资料采用成组设计两样本 t 检验,计数资料采用卡方检验或 Fisher 确切概率法,检验水准  $\alpha = 0.05$  (双侧),  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床病理资料

本研究纳入 122 例宫颈癌患者,平均年龄 43.8 岁 (20-71 岁),其临床病理信息见表 95 1-5。138 例对照组的平均年龄 46.9 岁 (29-69 岁),其中  $\geq 45$  岁者 89 例,  $< 45$  岁者 49 例。统计学分析发现病例组与对照组之间年龄差异有统计学意义 ( $P = 0.002$ )。

### 2.2 HPV16 阳性率

经 PCR 扩增检测宫颈癌组 HPV16 阳性率为 70.5% (86/122),对照组阳性率为 37.0% (51/138),二者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),感染 HPV16 明显增加患宫颈癌的 100 风险,其  $OR = 1.907$ , 95%可信区间  $CI (1.491, 2.440)$ 。

### 2.3 HPV16 E6 变异

HPV16 E6 PCR 扩增产物长度为 527bp,琼脂糖凝胶电泳结果表明,阳性产物片段大小符合预期值 (图 1)。从扩增阳性的标本中,我们获得了 60 例宫颈癌样本及 16 例对照组样本的 HPV16 E6 全长序列。经序列比对分析发现 11 处核苷酸位点共 12 种变异 (详见表 2)。 105 从表中可以看出,本研究中发现四川地区 HPV16 以亚洲株及欧洲株为主,未发现 Af1、Af2、AA、NA 株。欧洲株原型 (European prototype) 在对照组中占 43.7%,显著高于宫颈癌组的 16.7% ( $P = 0.039$ ),  $OR = 0.381$ , 95%CI (0.172, 0.842)。亚洲株原型 (Asian prototype) 在宫颈癌组中占 40%,与对照组相比,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。E6 变异种类繁多,除 T109C (指第 109 位碱基由 T 突变为 C,后同) 及 A131C 外,均为错义突变,碱基变异后 110 导致相应氨基酸的改变,例如 T178G 变异导致 E6 第 25 位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸 (D25E)。部分样本同时出现两个位点变异。在诸多变异位点中,以 T178G 出现频率最高 (宫颈癌组中占 55%,对照组中占 37.5%),此位点也是亚洲株的特征性位点。文献中广泛报道的 T350G (L83V) 变异在本地区宫颈癌组和对照组中也有发现。

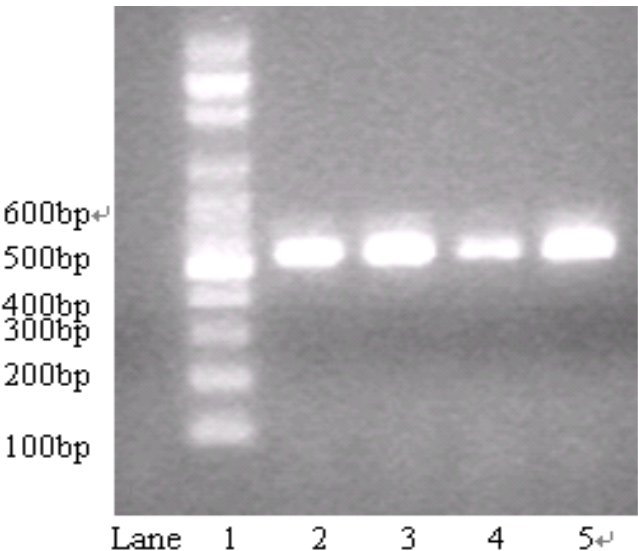


图 1 HPV16 E6 PCR 扩增电泳图  
Fig.1. Electrophoresis of HPV16E7 PCR product  
Lane1: Marker, Lane2-5: 阳性 E6 PCR 扩增产物

表 2 宫颈癌组及对照组中 HPV16 E6 变异分析  
Table 2 HPV 16 E6 variants identified in cervical cancer and the controls

| Class-Subclass     | ORF nucleotides |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Predicted amino acid substitution | Cervical cancer (n=60) | Non-malignant controls (n=16) |
|--------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------------------|------------------------|-------------------------------|
|                    | 109             | 131 | 136 | 168 | 178 | 185 | 276 | 306 | 335 | 350 | 442 |                                   |                        |                               |
| European prototype | T               | A   | G   | C   | T   | T   | A   | A   | C   | T   | A   | -                                 | 10§ (16.7)             | 7 (43.7)                      |
| Asian prototype    | -†              | -   | -   | -   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | D25E#                             | 24 (40.0)              | 6 (37.5)                      |
| E-G276T            | -               | -   | -   | -   | -   | -   | G   | -   | -   | -   | -   | N58S                              | 5 (8.3)                | 0                             |
| E-G306T            | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | C   | -   | -   | -   | K68T                              | 1 (1.7)                | 0                             |
| E-350G             | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | G   | -   | L83V                              | 5 (8.3)                | 1 (6.3)                       |
| As-C109¶           | C               | -   | -   | -   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | F2F+D25E                          | 2 (3.3)                | 0                             |
| As-C131            | -               | C   | -   | -   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | R10R+D25E                         | 1 (1.7)                | 0                             |
| As-C136            | -               | -   | C   | -   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | K11N+D25E                         | 1 (1.7)                | 0                             |
| E-G168G            | -               | -   | -   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | G   | -   | T22S+L83V                         | 4 (6.7)                | 0                             |
| As-G185            | -               | -   | -   | -   | G   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | D25E+L28V                         | 2 (3.3)                | 0                             |
| As-C442            | -               | -   | -   | -   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | C   | D25E+E113D                        | 3 (5.0)                | 0                             |
| E-T335C442T        | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | T   | -   | C   | H78Y+E113D                        | 2 (3.3)                | 2 (12.5)                      |

注：†: No change.  
§: Compared to the non-malignant controls P < 0.05.  
#: 表示第 25 位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸，氨基酸由单字母缩写表示，下同。

2.4 HPV16 E7 变异

125 HPV16 E7 PCR 扩增产物长度为 297bp，琼脂糖凝胶电泳结果表明，阳性产物片段大小符合预期值（图 2）。从扩增阳性的标本中，我们获得了 72 例宫颈癌样本及 37 例对照组样本的 HPV16 E7 全长序列。经序列比对分析发现 9 处核苷酸位点共 12 种变异（详见表 3）。其中 G663A 及 G666A 为同义突变，余均为错义突变。其中值得注意的是，第 29 位氨基酸密码子由第 646，647 和 648 位核苷酸编码，若样本同时出现 A646C 和 A647G 变异，则第 29 位氨基酸由天冬酰胺变为精氨酸（N29R）；若单一 A647G 变异，则第 29 位氨基酸由天冬酰胺变为丝氨酸（N29S）。HPV6R E7 原型在对照组中所占比例（45.9%）远远高于宫颈癌中所占比例（9.7%），差异有统计学意义（ $P<0.001$ ），OR=0.212，95%CI（0.096，0.464）。突变热点 A647G 在宫颈癌组及对照组均占主要比例，分别为 62.5%和 35.1%，差异有统计学意义（ $P=0.007$ ），OR=1.779，95%CI（1.109，2.855）。其中有一例宫颈癌标本，出现两种变异，分别是 A647G+A675G 及 A647G+G758A。宫颈癌组 E7 变异种类较多，某些变异并未在对照组中出现。

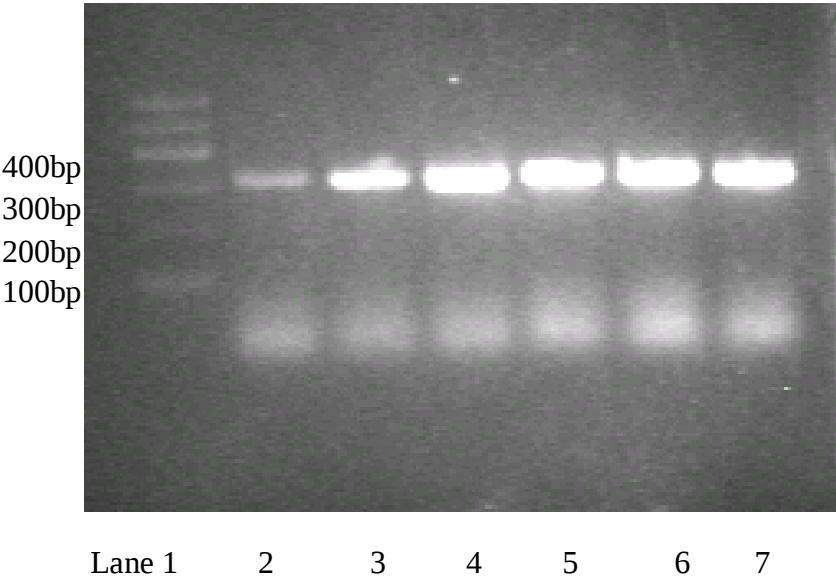


图 2 HPV16 E7 PCR 扩增电泳图  
Fig.2 Electrophoresis of HPV16E7 PCR product  
Lane 1: Marker, Lane 2-7: 阳性 E7 PCR 扩增产物

表 3.宫颈癌组及对照组中 HPV16 E7 变异分析  
Table 3. HPV 16 E7 variants identified in controls and cervical cancer.

| Variant | ORF nucleotides |     |     |     |     |     |     |     |     | Predicted amino acid substitution | Cervical cancer (n=72  ) | Non-malignant controls (n=37) |
|---------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|         | 623             | 646 | 647 | 663 | 666 | 675 | 700 | 712 | 758 |                                   |                          |                               |
| 1       | A               | A   | A   | G   | G   | A   | C   | C   | G   | -                                 | 7§(9.7)                  | 17 (45.9)                     |
| 2       | G               | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | D21G                              | 0                        | 2(5.4)                        |
| 3       | -               | C   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | N29H                              | 9 (12.5)                 | 4 (10.8)                      |
| 4       | -               | -   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | N29S                              | 30 (41.7)                | 7 (18.9)                      |
| 5       | -               | -   | -   | -   | A   | -   | -   | -   | -   | E35E                              | 10 (13.9)                | 0                             |
| 6       | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | T   | -   | H51Y                              | 1(1.4)                   | 0                             |
| 7       | -               | C   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | N29R                              | 2 (2.8)                  | 1(2.7)                        |
| 8       | -               | -   | G   | A   | -   | -   | -   | -   | -   | N29S+E34E                         | 1(1.4)                   | 0                             |
| 9       | -               | -   | G   | -   | A   | -   | -   | -   | -   | N29S+E35E                         | 2 (2.8)                  | 0                             |
| 10      | -               | -   | G   | -   | -   | G   | -   | -   | -   | N29S+I38M                         | 10   (13.9)              | 5 (13.5)                      |
| 11      | -               | -   | G   | -   | -   | -   | -   | -   | A   | N29S+R66Q                         | 1   (1.4)                | 0                             |
| 12      | -               | -   | -   | -   | A   | -   | T   | -   | -   | E35E+P47S                         | 0                        | 1 (2.7)                       |

注：+：No change.  
§：Compared to the non-malignant controls P < 0.01.  
||：Two kinds of variants (A647G+A675G and A647G+G758A) were found in one cervical cancer.

3 讨论

本研究再次证实了 HPV16 感染是宫颈癌的高危因素之一，感染 HPV16 者患宫颈癌的风险是未感染者的近 2 倍（OR=1.907），也说明 HPV16 是四川地区宫颈癌患者的主要感染型别，所占比例>50%（70.5%）。与 Qiu 等<sup>[11]</sup>的报道相近（78.6%）。进一步分析、比较宫颈癌临床病理参数如组织学类型、临床分期、组织学分级、淋巴结是否转移之间 HPV16 感染率，未发现统计学差异，说明 HPV16 感染是宫颈癌发生的始动因素，宫颈癌进展及转移可能与全身因素如免疫状态、基因损伤修复能力等有更大关系。有可能在 HPV 感染的前提下，引发机体一系列结构损伤、功能紊乱，从而发生宫颈癌。既往研究发现宫颈鳞癌中 HPV16 感染更常见，而宫颈腺癌中 HPV18 感染常见<sup>[12]</sup>，本研究未发现宫颈鳞癌与非鳞癌之间 HPV16 感染率的差异，考虑原因可能为将小细胞癌、鳞腺癌统统与单纯腺癌合并比较有关，也不排除同一个宫颈癌患者同时合并感染 HPV16 和 18 的可能性。今后的研究可以扩大腺癌、小细胞癌、大细胞癌、微偏腺癌等特殊类型宫颈癌的样本量，探讨这些特殊类型宫颈癌与 HPV 的关系。

1995 年，国际癌症研究署（IARC）专题讨论会将 HPV 感染确定为宫颈癌的主要病因，明确子宫颈癌是一种感染性疾病。其中，HPV16 是主要高危型别，世界范围内的感染率介于亚洲的 52%与欧洲的 58%之间<sup>[13]</sup>，本文获得的中国四川地区宫颈癌患者的 HPV 感染率为 70.5%，可见 HPV16 也是四川地区宫颈癌的主要感染型别。HPV16 是一双股环状 DNA 病

毒, 基因组长度为 7904bp。1985 年 Seedorf 等<sup>[7]</sup>发表了 HPV16 的全基因组序列。HPV16 分子结构内含早期开放读码框架 (Early open reading frames) E1、E2、E4、E5、E6、E7 和晚期开放读码框架 (Late open reading frames) L1、L2; 以及非编码序列 URR (upper regulation region)。进而, 本文着眼于 HPV16 的两个主要癌基因 E6、E7 在此人群中的变异情况做了进一步研究。从本文研究结果来看, 本地区 HPV16 E6/E7 基因存在多种变异, 某些变异只存在于宫颈癌组中。我们比较、总结了文献报道的中国国内地区 HPV16 E6 变异情况, 详见表 2。从表中可以看出, 作为亚洲株的特征性变异位点 T178G 在中国地区广泛存在, 也印证了 HPV16 变异的地域性特点。然而, 新疆维吾尔族妇女的变异类型与欧洲地区相似<sup>[14]</sup>, 其主要变异类型为 E-350G, 这提示我们 HPV16 变异除了地域特点外, 也许还存在种族差异, 关于后者的研究, 目前尚未见报道。因此, 如果能在世界范围内纳入白种人、黄种人、新疆维吾尔族及藏族等不同种族妇女为研究对象, 在足够大样本量的基础上, 有望解决 HPV16 变异相关的种族差异问题。与现有文献比较, 本研究发现三种 E6 变异是其他文献尚未见报道的, 包括 G136C, T185G 及 A306C, 并且这三个位点变异均出现在宫颈癌组织中。当然, 也有文献报道过而本研究未发现的位点变异, 例如新疆地区报道的 T295G<sup>[14]</sup>。可见 HPV16 变异种类远不止文献报道的, 仍然存在很多的复杂问题等待我们探索 and 解决。文献广泛报道的 T350G 在本研究中也发现, 但是, 该位点变异与宫颈癌的临床病例参数之间的无关, 目前关于该位点变异的临床意义上存在争议。瑞典人群中的研究发现, T350G 是宫颈癌的高危因素, 而在意大利人群中却显示低危的特点<sup>[15]</sup>, 这再次体现了 HPV16 变异的地域特点。E6 编码一个含 115 个氨基酸的肽链, 含有 4 个 Cys-X-X-Cys (半胱氨酸-任意氨基酸-任意氨基酸-半胱氨酸) 框, 形成两个锌指结构<sup>[16]</sup>。其 C-末端(aal06-115, nt419-449)相对保守, 是 p53 蛋白的结合部位, E6 与 p53 结合后通过泛蛋白途径引起 p53 的降解。N 端(aa9-13、45-49, nt128-142、236-250)相对变异, 不参与 p53 的结合, 但对 p53 的降解是必需的。本研究发现的某些变异位点如 A131C、G136C、A442C 均位于这两个功能区域; 另外, 研究认为 N-末端 (nt168-188) 存在 E6 的抗原表位, 能激发体内的 T 细胞免疫反应, 本研究发现此区的三个变异位点, 包括突变热点 T178G, 因此推测, 这些位点变异后导致恶性肿瘤发生。再者, 经统计学分析发现, 无论是 E6 还是 E7, 欧洲株原型在正常对照组中所占比例远远高于宫颈癌组中的比例, 因此能部分解释我国宫颈癌发病率高于欧洲发达国家。从本研究结果看出, E6 位点 nt 120-130, 140-160, 190-260, 280-300, 310-330 及 360-440 相对保守, 关于设计 siRNA 等可以考虑这些区域, 以达到治疗的靶向性目的。

国内外文献报道的 HPV16 E7 变异种类相对于 E6 较少, 但是本研究仍然发现 12 种 E7 变异, 在此我们也发现了 E7 突变热点 A647G, 相应的 E7 蛋白第 29 位氨基酸由天冬酰胺变为丝氨酸 (N29S), 在宫颈癌组及对照组中均占最大比例, 并且宫颈癌组出现频率远远高于对照组, 而该处氨基酸恰是 E7 的主要抗原表位所在, 因此, 我们推测 A647G 变异增加了患宫颈癌的风险, 并且可能与免疫机制相关。文献报道 A647G 变异在中国广东地区<sup>[17]</sup>占 70.2%, 日本<sup>[18]</sup>占 60%, 韩国<sup>[19]</sup>占 59.5%, 而德国<sup>[20]</sup>仅占 0.9%, 这也体现了变异的地域性聚集现象。E7 原癌蛋白的致癌机制主要与其具有 Cys-X-X-Cys 的锌指结构密切相关, E7 蛋白第 22-26 位氨基酸是视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)的结合位点, 是影响细胞周期调控的关键<sup>[21,22]</sup>。本研究发现的 E7 变异并未发生在此区域中, 因此可能有其它的致癌机制值得探讨。本研究中有 1 例样本经检测发现同时存在两种不同的复合变异, 因此, 不排除同一组织中有混合变异株感染的情况存在, 可见, 病毒变异研究相当复杂

综上所述, HPV16 是四川地区宫颈癌的主要致病型, 并且四川地区 HPV16 外显子 E6/E7

存在多种变异,该地区的主要变异株为亚洲株,与对照组比较分析认为亚洲株相对于欧洲株而言,可能增加患宫颈癌的风险。

### [参考文献] (References)

- 205 [1] Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 95 (23) : 1772-83
- [2] Piketty C, Darragh TM, Da Costa M, Bruneval P, Heard I, Kazatchkine MD, et al. High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. *Ann Intern Med*. 2003; 138 (6) : 453-9
- 210 [3] Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348 (6) : 518-527
- [4] 李昌, 靳伟(译), 黄文杰, 胡勤学(校). 引发宫颈癌的人类乳头状病毒及人类免疫缺陷病毒的发现. *生物物理学报*, 2008; 24 (6) : 409-21.
- 215 [5] 人乳头瘤病毒流行病学研究进展, 李霓, 代敏, *中华流行病学杂志*, 2007, 28, (1) : 972-975
- [6] de Villiers EM, Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994, 186:1-12
- [7] Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG, 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 145 (1): 181-185
- 220 [8] Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU,. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol*. 1991; 29 (9): 1765-1772.
- [9] Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol*. 1997; 5 (1): 11-19
- 225 [10] Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*. 1995; 69 (12): 7743-7753.
- [11] Qiu AD, Wu EQ, Yu XH et al. HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China. *Gynecol Oncol*. 2007;104: 77-85
- 230 [12] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 2003, 88: 63-73.
- [13] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*, 2007, 121: 621-632
- [14] 朱开春, 玛依努尔尼娅孜, 刘芳, 代建霞, 阿丽娅克里木, 张晓玲, 刘熔新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 型 E6 基因变异分析. *临床肿瘤学杂志*, 2008; 13 (3) : 209-212
- 235 [15] Zehbe I, Wilander E, Delius H. et al. Human papillomavims l6 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 1998, 58(4): 829-833
- [16] 金莉, 司履生. HPV16 的自然变异及其生物学行为. *国外医学妇幼保健分册*, 1998; 9 (3) : 129-133.
- [17] Wu Y, Chen Y, Li L et al. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol*. 2006;87: 1181-8
- 240 [18] Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes*. 1994;9: 85-92.
- [19] Song YS, Kee SH, Kim JW et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol*. 1997;66: 275-81.
- 245 [20] Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B et al. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer*. 1999;82: 203-7.
- [21] McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR et al Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization and transformation but not for Rb binding. *J Virol*. 1993;67(6): 3142-3150
- 250 [22] 林逸飞, 徐波. 宫颈癌组织中 HPV16 E7 基因的结构变异及其意义. *海南医学*, 2006; 17 (8) : 171-173.

255