

第一军医大学

硕士学位论文

宫颈癌组织中人乳头瘤病毒基因检测及其E基因变异的研究

姓名：刘欣

申请学位级别：硕士

专业：妇产科学

指导教师：邢福祺;刘国炳

20050521

宫颈癌组织中人乳头瘤病毒基因检测及其 E 基因变异的研究

硕士研究生：刘欣

指导教师：邢福祺、刘国炳

摘 要

目的：(1)探索检测宫颈癌组织中人乳头瘤病毒(human papillomavirus) DNA 的有效手段；(2)分析宫颈癌组织 HPV 各高危型的检出率与临床的关系；(3)探讨宫颈癌患者盆腔淋巴结 HPV-DNA 检测的临床意义；(4)探索广东地区宫颈癌组织中 HPV16 肿瘤相关性抗原 E6 及 E7 基因序列的多态性。

方法：(1)采用 HPV 通用引物对宫颈癌标本中的 HPV L1 区基因序列进行 PCR 扩增，根据 PCR 产物序列分析对 HPV 分型。(2)分析宫颈癌患者感染的高危 HPV 类型与患者临床分期、病理分型、分化程度、有无淋巴结转移等的关系。(3)采用 HPV 通用引物进行 GP-PCR，扩增出宫颈癌患者盆腔淋巴结组织中 HPV L1 区基因序列，通过序列分析对盆腔淋巴结中的 HPV 进行型别鉴定，分析淋巴结中检出的各型 HPV 阳性率与淋巴转移组织病理学结果之间的关系。(4)采用通用引物 PCR 直接测序法对宫颈癌标本中的 HPV 分型，对含有 HPV16 型的标本采用自行设计的多重引物通过巢式 PCR 分别扩增出 HPV16 E6 及 E7 段基因序列，比较基因库中的 HPV16 (德国标准株)与检出的各临床病例的 E6 及 E7 段基因序列和蛋白序列，通过 DNAsis 分析临床病例分离株 HPV16 E6 及 E7 区的基因多态性和氨基酸变异。通过 Antigenicity ValueX10 方法进行抗原性分析。

结果：(1)50 例宫颈癌组织 HPV-DNA 的检出率为 78%，其中 HPV16、18 混合感染型最多见，检测出 1 例 HPV58 型，其 L1 区基因序列与德国标准株 58 型比对，未发现碱基变异。(2)50 例宫颈癌组织中 HPV16、18 混合感染型最多见。宫颈鳞癌组织中 HPV16、18 混合感染型最多占 48%。5

例宫颈腺癌组织中检出 HPV18 型 2 例, HPV16、18 混合感染型 2 例, HPV16 型 1 例。(3) 40 例宫颈癌患者盆腔淋巴结 HPV-DNA 的检出率为 40% (共 16 例)。组织病理学发现淋巴转移的 10 例患者淋巴结 HPV-DNA 检测均为阳性。宫颈癌病灶中检测到 HPV18 型的患者盆腔淋巴结也都可检测到 HPV18 型。(4) 50 例宫颈癌组织中 33 例扩增出 HPV16, 其中 HPV16、18 混合感染型 18 例, 单纯 HPV16 型感染 15 例。在含有 HPV16 型的 34 例标本中扩增出 HPV16 E6 及 E7 各 25 例。HPV16 E6 有 16 例在 178 位核苷酸碱基“A”变异为“C”, 导致相应氨基酸由天冬氨酸变异为谷氨酸。HPV16 E7 有 17 例在 647 位核苷酸碱基“T”变异为“C”, 导致相应的蛋白质由天冬氨酸变异为丝氨酸。

结论: (1) PCR 直接测序法是对宫颈癌组织中 HPV 检测和分型的一种有效方法, 并可检测到 HPV 少见的特殊类型, 同时也能提供已知的 HPV 型别的突变信息。(2) 广东地区宫颈癌组织中检出 HPV16、18 混合感染型最多见。宫颈鳞状细胞癌以 HPV16 型多见, 腺癌以 HPV18 型多见, HPV16、18 混合感染型在鳞状细胞癌和腺癌中均占相当大的比例。单纯或混合感染 HPV18 型的患者临床分期均较晚, 细胞分化程度多为中、低分化, 而且更易早期出现淋巴转移, 是较单纯 HPV16 型感染患者风险高的一种高危类型。

(3) 盆腔淋巴结中检出 HPV-DNA 对盆腔淋巴结转移有提示作用, 有助于发现组织病理学不易发现的淋巴结隐匿性转移, 是判断预后不良的指标。宫颈癌病灶中检测到 HPV18 型的患者更易发生淋巴转移, 是预后不良的一种高危类型。(4) HPV16 E6 DNA 序列发生碱基替换的区域主要在氨基端 94 位至 241 位, 羧基端相对保守, 未见变异。广东地区宫颈癌组织中 HPV16 E6 的热点突变为 Nt178。HPV16 E7 DNA 序列发生碱基替换的区域主要在 647 位至 846 位。广东地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 的热点突变为 Nt647 位和 Nt846。

关键词: 人类乳头瘤病毒; 聚合酶链反应; 测序分析; 宫颈癌; 淋巴转移; E6 基因; E7 基因

Detection of human papillomavirus DNA and its E gene mutation in Cervical Cancer Tissue

Name: Liuxin

Supervisor: Xing Fuqi, Liu Guobing

ABSTRACT

OBJECT: (1) To explore an effective method for the detection of human papilloma virus DNA in cervical cancer tissue. (2) To study the relationship between the detection rates of high-risk HPV types and the clinical diagnosis of cervical cancer. (3) To test the significant of HPV-DNA amplification in finding pelvis lymph node in cervical cancer. (4) To explore the intratypic nucleotide and amino acid sequence variations in the E6 and E7 open reading frame of human papillomavirus type16 in cervical cancer tissue in GuangDong.

METHODS: (1) HPV L1 gene fragment in cervical cancer tissue was amplified by HPV-specific PCR with general consensus primers. The types of HPV was identified by PCR product sequencing. (2) HPV L1 gene fragment in cervical cancer tissues was amplified by HPV-specific PCR with general consensus primers. The types of HPV was identified by PCR product sequencing. (3) HPV L1 gene fragment in cervical cancer tissue was amplified by HPV-specific PCR with general consensus primers. The types of HPV were identified by PCR product sequencing. The relationship between the detecting of HPV and the pathological alternation in the pelvis lymphatic node of cervical cancer was analyzed. (4) The types of HPV was identified by PCR product sequencing. HPV16 E6 and E7 gene fragment in cervical cancer tissue was amplified by HPV-specific PCR. The intratypic nucleotide and amino acid sequence variations was found by DNAsis identify. The changes in antigenicity was identified by Antigenicity ValueX10.

ABSTRACT

RESULTS: (1) The positive rates of high-risk HPV types in 50 cases of cervical cancer is 78%. And the mixed infection with HPV16 and HPV18 was the most common, accounts for 48%. Additionally, type 58 HPV was detected in one case. Sequencing results showed no difference of L1 sequence between the sample and German standard strain. (2) The detection rates of high-risk HPV types in 50 cases of cervical cancers is 78%. And the mixed infection of HPV16 and HPV18 is most common, accounts for 48%. Additionally, type 18 HPV was detected in 2 patients, and type 16 HPV in 1 case, while mixed infection with HPV16/18 seen in 2 cases. (3) The positive rate of HPV-DNA detection in the pelvis lymph node from 40 cases of cervical cancer was 40%. HPV-DNA was detected in each of the 10 cases of cervical cancer with pathological changes in pelvis lymphatic node. Additionally, HPV18 was detected in both of cervical and pelvis lymphatic node in some cases. (4) The positive rate of high-risk HPV types in 50 cases of cervical cancers was 78%. And the mixed infection with HPV16 and HPV18 was found in 18 cases. The infection with HPV16 only was seen in 15 cases. HPV16E6 and E7 sequences were amplified from 25 cases of total 33 HPV-positive cases. The 178th nucleotide in the viral DNA sequence "A" was changed into "C", which caused a Asp codon of E6 gene to be replaced by a Glu codon. The 647th nucleotide in the viral nucleotide sequence "T" was changed into "C", and that caused a Asn codon of E7 gene to be replaced by a Ser codon.

CONCLUSIONS: (1) PCR-Direct sequencing approach was an effective way for the detection and typing of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissue, through which we could find the rare special types. At the same time, it can also showed the mutation of HPV DNA sequence. (2) The mixed infection of HPV16 and HPV18 might more easily induce the pathogenesis of cervical cancer. The type of HPV18 might be more dangerous than the type of HPV16. (3) HPV-DNA could be detected earlier than the pathological changes. The detection of HPV-DNA could be helpful in finding the pelvis lymph node metastases in cervical cancer. It is a sign for bad precaution. HPV18 is the poor type for it was found metastases early. (4) By sequencing and phylogenetic analysis, the most frequently observed substitution in HPV16E6 ORF was

distributed in the discrete regions:94-241. Some substitutions resulted in non-silent mutation. The mutation hot-spot of HPV16E6 in cervical cancers from Guangdong was found at neolertide 178 in the DNA sequence. The most frequently observed substitution in HPV16E7 ORF was distributed in the discrete regions:647-846. Some substitutions resulted in non-silent mutation. The mutation hot-spot of HPV16E7 in cervical cancers from Guangdong was found at neolertide 647 and 846 in the DNA sequence.

Keywords: Human papillomavirus; Polymerase chain reaction; Sequence analysis; Cervical cancer

前 言

宫颈癌是世界第二大女性肿瘤，每年新发病例 50 万，并造成 30 万患者死亡。20 世纪 90 年代，分子流行病学的研究确立了人乳头瘤病毒（HPV）感染在宫颈癌发生机制中的重要地位^[1]。HPV 是第一个被确认的与人类癌症发生必然相关的因素，即若非 HPV DNA 持续存在，宫颈癌将不会发生^[2,3]。这一观点，引发了设计和开发针对 HPV 的宫颈癌防治疫苗的革命。

HPV 是一种小 DNA 病毒，其基因组为一双链共价闭环 DNA，全长约 7.9kb，按功能分为 E 区、L 区和非编码区(NCR)。E 区含 E1-E8 八个开放读框(ORF)，其中早期基因 E6、E7 是导致细胞转化和恶性表型维持所必需的主要转化基因。HPV 诱发宫颈癌的主要机制，是其 E6 和 E7 基因在宫颈细胞中的表达增加，产生的 E6 和 E7 两个癌蛋白分别与抑癌蛋白 p53 和 pRb（磷酸化的 Rb 蛋白）结合而诱导后两者降解，p53、pRb 的失活可能是细胞永生化的重要原因。HPV DNA 在恶性肿瘤中以单拷贝或多拷贝与宿主细胞基因整合为主。病毒癌基因 E6 和 E7 在肿瘤细胞中常见表达，因此可作为免疫治疗的靶。

目前已进入 III 期临床试验的 HPV 疫苗包括：病毒样颗粒（VLPs）、不含 DNA 的病毒 L1 壳蛋白及嵌合性病毒样颗粒（CVLP）（含病毒早期蛋白与 L1 或 L2 壳蛋白）。实验表明^[4]，作为治疗性疫苗，CVLP 可以肯定地用于 HPV 阳性的宫颈癌的治疗。肿瘤内普遍表达的 HPV E6 及 E7 癌基因产物，已被认为是肿瘤特异性杀伤（T 淋巴）细胞（CTL）介导的免疫治疗的有吸引力的靶分子。通过一些疫苗设计策略，在宫颈癌患者体内诱导 HPV 特异性的 CTL 应答是可行的。这一事实清楚地提示：存在一种可能，研制针对 HPV 病毒的疫苗可用于治疗早期及晚期宫颈癌病人。然而，HPV 病毒疫苗具有型特异性，不同 HPV 类型或型内变种之间在免疫原性上存在差异，从而为 HPV 疫苗的研制增加了难度。

HPV 家族包含 100 多种类型，近 95%的宫颈癌病例涉及 15 种 HPV，包括 HPV-16、18、31、33、35、45、51、52、58、59。宫颈癌组织中 4 种最常见的 HPV 类型为：16、18、45 和 31 型。HPV 类型和型内变种在人群及宫颈癌病例中的分布呈现明显的地域特征。例如，流行病学分析表明，

HPV-16 感染广泛分布于四大洲,通过对世界不同地域 HPV-16 基因组变异分析,发现 HPV-16 型变异株具有地域特征^[5],已被分为 E 系(欧洲)、AA 系(亚洲和美洲)、Af-1 系(非洲)、Af-2 系(非洲)和 NA 系(北美洲)。近年来,HPV 感染率急剧上升,抗病毒药物应用十分频繁,大大增加了 HPV 耐药性和变异发生的机会。此外,不同区域人群的流动加速,也使得特定区域固有的 HPV 流行病学特征发生改变。因此,有必要对特定地区的宫颈癌 HPV 行进一步分类,其意义在于:鉴定出特定地域或人群中的型内变异株的序列特点,以便设计出特异的寡核苷酸探针用于流行病学调查及诊断,同时为 HPV 型特异性疫苗的研究策略提供理论基础。目前报道的对宫颈癌 HPV 型变异株的分析缺乏我国的相关资料,而我国又是 HPV 感染性疾病尤其是宫颈癌的高发区,因此分析中国地区 HPV 型变异株的序列特点具有重要意义。

此外,HPV 不同变种的致癌能力也存在重要差异。HPV 致癌力的差别主要是由 E7 和 E6 控制^[6],而 E6 和 E7 基因常发生型内变异,E7 基因在宫颈癌中的变异频率为 60%-90%,E6 的变异频率为 20%-90%^[7]。在单核苷酸水平上的 E 基因变异将影响 HPV 株的危险性。例如,HPV-45 的某种 E7 变种具有更强的转化活性。另有研究显示^[8],在宫颈癌组织中 HPV E6 基因具有一定的变异性,基因变异株可通过不同机制逃避机体体液和细胞免疫的攻击,这都给相应于 E6 或 E7 蛋白的宫颈癌疫苗的研究带来了困难。

目前国内尚缺乏对我国宫颈癌 HPV 主要类型鉴定的研究报告,对 HPV 型内变种及早期基因变异的研究也仅见于对山东、浙江及湖北省的零星报道^[9-12],报告例数均较少(约 10—20 例),且仅限于 HPV-16,研究并未涉及其它宫颈癌高危类型的 HPV,远不能反映我国各省市宫颈癌 HPV 的主要类型分布情况。就广东省而言,对该地区宫颈癌 HPV 主要型别的鉴定及其变异研究尚未见开展,这给相应于本地区宫颈癌主要 HPV 类型的肿瘤疫苗的研制带来困难。

本项目的创新之处在于,拟采用先进的分子生物学技术,对广东地区大样本宫颈癌组织进行 HPV 型别鉴定,从而筛选出与广东地区宫颈癌发生关系最为密切的 HPV 类型,并通过对宫颈癌活检组织中 HPV E6、E7 基因的克隆及一级结构序列分析,探讨广东地区地方株与标准株核苷酸序列的差异,建立用于检测广东地区宫颈癌组织中 HPV DNA 类型及 E6/E7 变异的便捷方法,为相应于广东地区的宫颈癌 HPV E6、E7 相关疫苗的研制打下基础。

本课题分四部分进行:第一部分探索检测宫颈癌组织中 HPV-DNA 的有

效手段；第二部分分析宫颈癌组织 HPV 各高危型的检出率与临床的关系；第三部分探讨宫颈癌患者盆腔淋巴结 HPV-DNA 检测的临床意义；第四部分探索广东地区宫颈癌组织中 HPV16 肿瘤相关性抗原 E6 及 E7 基因序列的多态性及同源性。

第一部分 PCR 直接测序法检测宫颈癌组织中的 HPV-DNA

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 家族包含 100 多种类型, 近 95% 的宫颈癌病例涉及 15 种 HPV, 包括 HPV-16、18、31、33、35、45、51、52、58、59。宫颈癌组织中 4 种最常见的高危 HPV 类型为: 16、18、45 和 31 型。HPV 类型在人群及宫颈癌病例中的分布呈现明显的地域特征^[5]。来自世界各国的宫颈组织标本的研究发现, HPV16 和 HPV18 型检出率最高, 没有明显的地区差别^[13]。而有些特殊的 HPV 型别则有明显地理位置的差异^[14], 如 HPV45 在非洲西部常见, HPV39 和 59 型仅在美洲的中部及南部宫颈癌组织中出现, HPV52 和 58 型在中国妇女中检出率较高。但我国除了 HPV16 和 HPV18 型以外的特殊 HPV 类型检出率极低, 相关研究的文献报道也极少。本研究采用 PCR 直接测序法检测出宫颈癌组织中高危 HPV58 型 1 例, 为这方面的研究提供了一个有效的途径。

材 料 和 方 法

一、研究对象

收集南方医院 2003 年 1 月至 2004 年 5 月共 50 例宫颈癌患者手术切除的病变宫颈组织。患者均为广东籍, 出生并长期生活在广东, 无在外地的长期居住史。病理学诊断其中 45 例为宫颈鳞状上皮癌, 5 例为宫颈腺癌, 留取手术切除的病变组织, 投入液氮速冻。

二、试剂和引物

动物基因组 DNA 提取试剂盒购于北京鼎国生物技术的发展中心。TaKaRa Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、dNTP Mixture、6×Loading Buffer、marker DL2000 均购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 产物纯化试剂盒购自申能博彩生物科技有限公司。

引物设计参考国外文献^[15]中的 HPV PCR 通用引物:

GP5 5' -TTTGT TACTGTGGTAGATAC YAC- 3' , Y=T or C ,

GP6 5' -GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC- 3'

引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

三、实验方法

(一) 宫颈癌组织中总 DNA 的提取

取 300mg 的宫颈癌变组织，液氮研磨成粉末，将粉末移入 1.5ml 离心管中，加入 1ml 5N 异硫氰酸胍，震荡混匀，室温放置 5 分钟。12000rpm 离心 5 分钟。将上清移入 5ml 离心管中，加入 2.5ml 4N NaClO₄、20 μl RNase A(10mg/ml)、50 μl Resin,充分混匀，室温放置 20 分钟。≥8000rpm 离心 5 分钟，弃上清。加入 1 ml 4N NaClO₄充分混匀，≥8000rpm 离心 1 分钟，弃上清。加入 1 ml 无水酒精洗液，充分混匀，≥8000rpm 离心 1 分钟，弃上清。重复 1 次。≥12000rpm 离心 1 分钟，吸干上清，室温晾干约 5 分钟，使乙醇挥发殆尽。加入 TE buffer 300μl 混匀，50℃水浴 5 分钟。≥12000rpm 离心 1 分钟，上清液即为提取的总 DNA。

(二) 目的基因片段的 GP-PCR(general primers-PCR)扩增

取各例宫颈癌组织总 DNA 为模板，用上述通用引物 GP5、GP6 进行 HPV-DNA L1 区基因序列的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μl，其中含样品宫颈癌组织 DNA 3 μl 约 3ng，浓度为 1 U / ml 的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶 10 μl，dNTP 5pmol、引物 GP5、GP6 各 1 μl (20 pmol)、双蒸水 5 μl，以 2ng 的 HPV18 (德国标准株) 质粒为阳性对照。94℃预变性 5min，95℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 45s，33 个循环后再延伸 7min。进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

(三) PCR 产物的纯化

按照 PCR 产物纯化试剂盒使用说明的方法操作，将 PCR 反应液移至 1.5ml Eppendorf 离心管中，加入 400 μl Sloution B，将 3S 柱放入收集管，把混合液转移到柱内，不要盖上离心管盖，室温放置 2 分钟，1000rpm 离心 1 分钟。倒掉离心管中的废液，将 3S 柱放入同一收集管中，加入 600μl Wash Solution, 1000rpm 离心 1 分钟，并重复一次。倒掉离心管中的废液，将 3S 柱放入同一收集管中，1000rpm 离心 2 分钟。将 3S 柱放入一根新的离心管中，在 3S 柱膜中央加三蒸水 15 μl，不要盖上离心管盖，室温放置 2 分钟，1000rpm 离心 1 分钟。离心管中的

液体即为纯化后的 DNA。

(四) PCR 产物的序列测定

分别用 GP5、GP6 两引物，将 PCR 产物在 DNA 序列自动分析仪（3730 型）上测序。通过正反两个方向对目的基因的正链及负链进行测序，可排除不足 800bp 长待测基因内的核苷酸错配的可能。本课题实验及测序部分均在第一军医大学分子生物学研究所完成。

(五) HPV 型别鉴定

将测出的 DNA 序列与基因库中相应序列进行 Blast 序列比对进而对 HPV 分型。

结 果

一、 宫颈癌组织中 HPV-DNA 的检测阳性率

宫颈癌组织经 GP-PCR(general primers PCR)扩增结果见图 1-1，阳性对照 HPV18 质粒经扩增后在 140bp 处出现 DNA 带。50 例宫颈癌组织中共检测出 HPV DNA39 例，检出率为 78%。

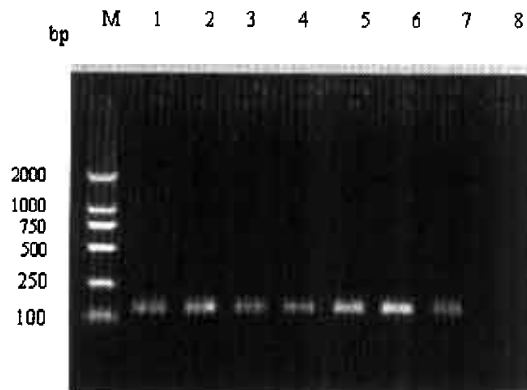


图 1-1 HPV-DNA PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1-1 2% agarose gel electrophoresis of the HPV-DNA PCR products

M: DNA marker LD-2000; Lane1: HPV18 positive control; Lane2-7: DNA samples of cervical cancer tissue; Lanes8: negative control

二、宫颈癌组织中各型别 HPV-DNA 的检出率

在所有 50 例宫颈癌组织中，检测出 HPV DNA 情况如下： HPV16、18 混合感染型最多 18 例，占 36%，其部分测序图见图 1-2，单纯 HPV16 型感染 15 例，占 30 %，单纯 HPV18 型感染 5 例，占 10%，检出 HPV58 型感染 1 例，占 2 %。

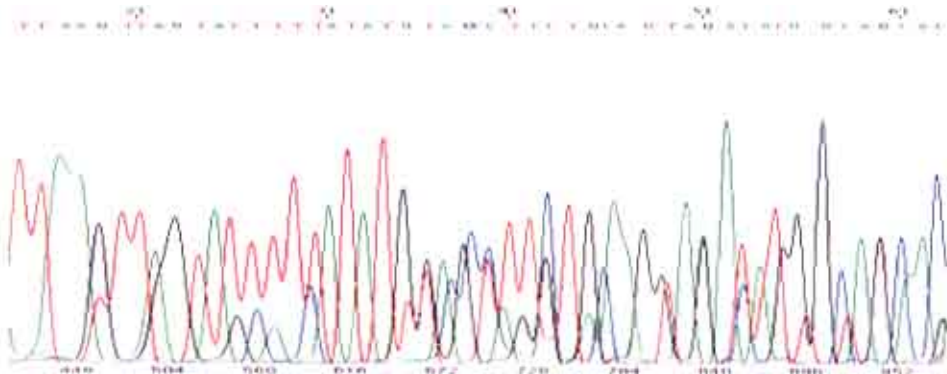


图 1-2 HPV16、18 混合感染型病例部分 DNA 序列测序图

Fig.1-2 Part sequence analysis results of the PCR product of type 16 and 18 HPV

三、宫颈癌组织中检测到少见的特殊类型 HPV58 型 1 例

通过扩增出的 L1 序列与基因库中相应型别的 HPV L1 段进行 Blast 序列比较，在广东地区的 50 例宫颈癌组织中检测到少见的特殊类型 HPV58 型 1 例。其 PCR 产物部分测序结果见图 1-3。

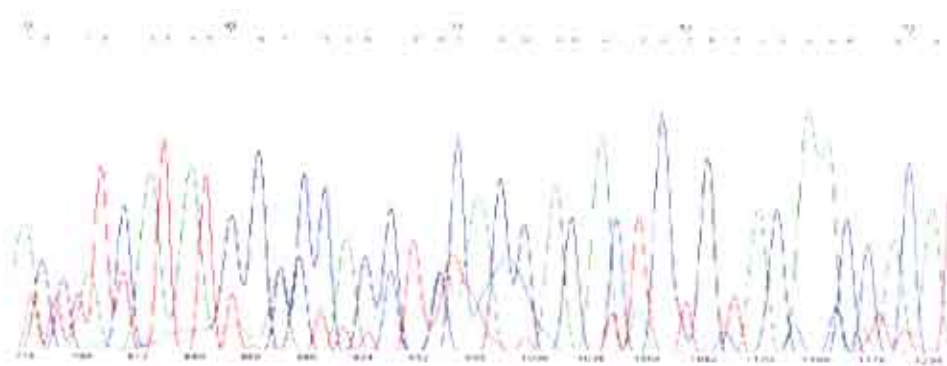


图 1-3 HPV58 型的 PCR 产物部分测序图

Fig.1-3 Part sequence analysis results of the PCR product of type 58 HPV

讨 论

目前的流行病学和生物学资料已经证明 HPV 感染是宫颈癌及其癌前病变的最主要病因^[16], HPV 尚不能在体外培养, 所以检测它就需严格的依赖对其 DNA 序列的分子水平检查^[17], 随着 HPV 的相关研究越来越深入, 现在已经有了很多用于 HPV 的检测甚至是定量检测的方法。材料也可以是石蜡标本、新鲜标本或者是宫颈管分泌物。由于研究方法的不同, 患者所处地区不同, 所得的结果也不尽相同, 有的差异很大, 有的甚至得出相反的结论。

最初使用的细胞学法操作容易且较便宜, 但所需标本量大而且敏感性及特异性都低, 已淘汰不用了。斑点印迹法虽然有中度敏感性及特异性, 因使用放射性同位素其应用受到极大限制。Southern 杂交法因不能定位, 操作麻烦, 不易大规模临床使用。也有学者采用非同位素原位杂交法对宫颈细胞系进行特定位点表达的研究^[18], 通过确认特定基因的表达来证实宫颈 HPV 感染的存在, 但因程序较复杂、易脱片和特异度低而较少应用。

聚合酶链反应 (PCR) 因具有快速、灵敏和特异性强的优点得到了广泛的应用, 因此我们采用 PCR 直接测序法检测宫颈癌组织中 HPV-DNA, 通过一次通用引物的 PCR 扩增反应可以做大范围临床标本的基因筛查。PCR 直接测序法使用的可扩增出 L1 基因片段的引物是位于多态性、特异型序列两侧的保守序列, 通过扩增出的 L1 序列与基因库中相应型别的 HPV L1 段进行 Blast 序列比较, 可以同时检测到组织中的同源性很差的多种 HPV 类型, 有利于 HPV 少见的特殊类型的检测。本研究采用该方法分析广东地区新鲜宫颈癌组织中 HPV-DNA 的类型, 高危型 HPV-DNA 的检出率为 78%, 其中 HPV16、18 混合感染型最多 18 例, 占 36%。同时发现了少见的 HPV58 型 1 例, 根据其 L1 区基因序列与德国标准株 58 型比对, 未发现碱基变异, 判定为标准株 HPV58 型。根据序列比对发现碱基变异有助于判定 HPV 的亚型及型内变异, 在探讨不同地区 HPV 型别与宫颈癌发病率的关系及宫颈癌的疫苗研制方面起到指导性的作用^[19]。PCR 直接测序法也可以进行多重 PCR 扩增, 同时分析多个 DNA 序列。在取材方式相同的情况下实施定量 PCR (RQ-PCR) 则可以通过监测 PCR 的反应动力曲线得知病毒的含量。近年来有学者将 PCR 方法与 Bioanalyzer 芯片分析系统结合在 HPV 的早期检测和分型中具有重要的应用价值^[20]。分型中具有重要的应用价值^[20]。

随着 PCR 技术的发展，人们发现它的优点也正是缺点，由于灵敏度高，因而假阳性率偏高，可能是引物或标本的 DNA 污染造成的，认真处理所有 DNA 标本，同时采用尿嘧啶-N-糖基化酶这种方法防止污染可有效地克服这一缺点。

第二部分 HPV 高危类型检出率与宫颈癌临床的关系

宫颈癌是世界第二大女性肿瘤,每年新发病例 50 万,并造成 30 万患者死亡。1995 年 WHO 和 IARC 确立了人乳头瘤病毒(HPV)感染在宫颈癌发生机制中的重要地位^[3],即若非 HPV DNA 持续存在,宫颈癌将不会发生。大量研究发现 HPV 的类型在人群及宫颈癌病例中的分布有明显的地域特征^[5]。因此,有必要对特定地区的宫颈癌组织中的 HPV 行进一步分类,鉴定出特定地区或人群中常见的类型,有针对性地进行流行病学调查及诊断,同时为 HPV 特异性疫苗的研究策略提供基础。

材 料 和 方 法

一、研究对象

50 例宫颈癌组织均来自南方医院妇科住院手术病人,术后病理检查确诊为宫颈癌。病理学诊断其中 45 例为宫颈鳞状上皮癌,5 例为宫颈腺癌。患者均为广东籍,出生并长期生活在广东,无在外地的长期居住史。留取手术切除的新鲜病变组织,投入液氮速冻。

二、实验试剂与方法

试剂、仪器设备和耗材与第一部分实验基本相同。

三、统计学处理

本试验因分组较多,采用统计描述法描述数据分布情况。

结 果

1、宫颈癌组织中 HPV-DNA 的检测率

宫颈癌组织经 GP-PCR 扩增,阳性对照 HPV18 质粒在 140bp 处出现 DNA 带。HPV-DNA 的检出率为:78%(共 39 例)。HPV16、18 混合感染型最多 18 例,占 36%,单纯 HPV16 型感染 15 例,占 30%,单纯 HPV18 型感染 5

例，占 10%，HPV58 型感染 1 例，占 2%。

2、宫颈癌病理类型与 HPV 型别的关系

宫颈鳞癌中 HPV16 型感染占 39%， HPV18 型感染占 9%， HPV16、18 混合感染型占 48%。宫颈腺癌中 HPV18 型感染占 40%， HPV16、18 混合感染型占 40%， HPV16 型感染占 20%。具体例数见表 2-1。

表 2-1 病理类型与 HPV 型别的关系

	HPV16 型 (例数)	HPV18 型 (例数)	HPV16、18 混合型 (例数)
宫颈鳞癌	14	3	16
宫颈腺癌	1	2	2

3、宫颈癌临床分期与 HPV 型别的关系

在检测的 50 例宫颈癌中，感染 HPV18 型的患者一经发现，其临床分期即为 IIa 期以上。在临床分期较晚的病例中感染 HPV16、HPV18 混合型比单纯 HPV16 型多见。具体例数见表 2-2。

表 2-2 临床分期与 HPV 型别的关系

	HPV16 型 (例数)	HPV18 型 (例数)	HPV16、18 混合型 (例数)
原位癌	3	-	6
I a 期	1	-	-
I b 期	7	-	6
II a 期	2	3	5
II b 期	2	2	1

4、宫颈癌分化程度与 HPV 型别的关系

HPV16、18 混合感染型在低分化宫颈癌组织中的检出率为 50%，HPV18 型阳性的病例均为中-低分化。具体例数见表 2-3。

表 2-3 分化程度与 HPV 型别的关系

	HPV16 型 (例数)	HPV18 型 (例数)	HPV16、18 混合型 (例数)
低分化	6	4	9
中分化	6	1	6
高分化	3	-	3

5、宫颈癌淋巴转移与 HPV 型别的关系

HPV18 型的淋巴转移率最高,达到 20%。HPV18 型和 HPV16、18 混合感染型淋巴转移率显著高于单纯 HPV16 型。具体例数见表 2-4。

表 2-4 淋巴转移与 HPV 型别的关系

	HPV16 型 (例数)	HPV18 型 (例数)	HPV16、18 混合型 (例数)
有淋巴转移	1	1	3
无淋巴转移	14	4	15

6、宫颈癌患者孕产次与 HPV 型别的关系

随着患者孕产次的增加 HPV 混合感染的机率增大。具体例数见表 2-5。

表 2-5 患者孕产次与 HPV 型别的关系

	HPV16 型 (平均次数)	HPV18 型 (平均次数)	HPV16、18 混合型 (平均次数)
孕次	3. 47	3. 40	3. 83
产次	2. 20	2. 40	2. 83

讨 论

人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)感染已被流行病学和生物学证明是引起宫颈癌及其癌前病变的必要因素^[16], Bosch 和 Manos 等通过收集来自 2 个国家的 1008 份宫颈癌活检标本作 PCR 检测,发现 93%的宫颈肿瘤中都可检测到 HPV-DNA^[17], 新近 Manos 等又重新分析了该研究中的

HPV 阴性病例, 结合先前的数据, 排除样本量不足的因素, 发现在世界范围内宫颈癌的 HPV 检出率超过 99.7%。我国目前宫颈癌的 HPV 检出率为 73%^[21], 本研究的 HPV 检出率 78%。与国外的差距考虑与取材的部位、试验试剂质量和实验器材的先进程度有关。

宫颈癌的危险因素主要包括行为因素、生物学因素和遗传易感性。近年来行为因素的改变表现在初次性生活年龄的提前、性伴侣个数的增加及人口流动性的增加等, 生物学因素主要是感染 HPV 的类型也发生了变化。除了单纯 HPV16 或 HPV18 型感染多见, 出现大量高危型尤其是 HPV16 和 HPV18 型混合感染, 甚至超过了多见的单纯 HPV16 型感染, 这一现象一直以来被人们忽略。广东地区 2000 年曾有报道^[22] 尖锐湿疣患者中高危型混合感染比例为 17.08%, 本研究显示 HPV16、18 混合感染型占 36%, 这个比例的明显增高是否是近年来宫颈癌发病率增高的重要原因是值得研究人员注意的问题。这种混合高危型 HPV 感染较单纯型 HPV16 或 HPV18 型感染的危险性是否更大呢? 本研究将两者从临床分期、分化程度等方面进行比较。

国外学者的相关研究显示^[23], HPV16、HPV18 型感染普遍, 没有明显的地区差别。有些 HPV 型别则有明显地理位置的差异^[14], 如 HPV45 在非洲西部常见, HPV39 和 59 型仅在美洲的中部及南部宫颈癌组织中出现, HPV52 和 58 型在中国妇女中检出率较高。但我国文献报道的 HPV58 型病例却极少。本研究就在广东地区检出 1 例 HPV58 型。因 HPV58 型例数少其相关的研究有待及一步积累资料。

宫颈癌的病理类型分为鳞状细胞癌和腺癌, 鳞状细胞癌多见占 95%。腺癌中还有一种病理类型为鳞腺癌, 具有同时向鳞癌及腺癌鳞腺癌方向分化的特点。本研究鳞癌 33 例中 HPV16、18 混合感染型 16 例, 单纯 HPV16 型 14 例, 无明显差异, 但均明显多于单纯 HPV18 型, 仅 3 例。腺癌 5 例中 HPV16、18 混合感染型 2 例, 单纯 HPV18 型 2 例, 单纯 HPV16 型 1 例 (病理类型为鳞腺癌)。与文献报道^[24] 鳞状细胞癌主要以 HPV16 型多见, 腺癌以 HPV18 型多见的观点相吻合, 不同点在于 HPV16、18 混合感染型在鳞状细胞癌和腺癌中均占相当大的比例。

宫颈癌目前采用国际妇产科联盟 (FIGO, 2000 年) 修订的临床分期, 本研究的标本均采集自住院手术或介入治疗后手术的病人, 因此临床分期集中 IIb 期之前。单纯 HPV16 型患者临床各分期近呈正态分布, 符合一般疾病的发病规律。单纯 HPV18 型 5 例患者均为 IIa 或 IIb 期, 说明 HPV18 型患者

临床分期均较晚。从这个角度分析单纯 HPV18 型感染的患者较单纯 HPV16 型患者风险高。

宫颈浸润癌根据细胞分化程度分为 3 级：I 级 高分化型，即角化性大细胞型。II 级 中分化型，即非角化性大细胞型。III 级 低分化型，即小细胞型。本研究提示 HPV16、18 混合感染型患者低分化的占 50%，高分化的仅占 17%。单纯 18 型感染 5 例均为中-低分化型，其中低分化的占 80%。结果显示，HPV18 型患者在细胞分化程度方面危险度高，HPV16、18 混合感染型患者风险较单纯感染 HPV16 的患者高。

本研究显示，宫颈癌淋巴转移与 HPV 型别也存在关系，在手术后经细胞学检查证明有肿瘤细胞转移的 5 例病例中，HPV16、18 混合感染型患者有 3 例，单纯 HPV16 和 18 型各 1 例。HPV16、18 混合感染型淋巴结转移率为 17%，单纯 HPV18 淋巴结转移率为 20%，单纯 HPV16 淋巴结转移率为 7%，说明单纯或混合感染有 HPV18 型的患者更易早期出现淋巴转移，是预后不良的表现。

另外，本研究显示 HPV16、18 混合感染型患者的平均孕产次均高于单纯 HPV16 或 18 型，而单纯 HPV16 和 18 型之间无明显差别。这说明随着孕产次的增加，性伴侣数的增加，各高危型 HPV 混合感染的机会越大，易患宫颈癌的机率也就越大。

第三部分 宫颈癌患者盆腔淋巴结 HPV-DNA 检测的

临床意义

1995 年 WHO 和 IARC 确立了人乳头瘤病毒 (HPV) 感染在宫颈癌发生机制中的重要地位^[3]。近年来分子生物学研究发现, 高危型 HPV-DNA 多以整合形式存在于宿主细胞基因中^[25]。因此, 检测宫颈癌患者盆腔淋巴结中的 HPV-DNA 并进行型别鉴定是否有助于发现淋巴结早期隐匿转移并提示预后不良值得关注。本研究采用 PCR 直接测序法检测宫颈癌患者盆腔淋巴结中的 HPV-DNA 并与组织病理结果对比, 进而探讨宫颈癌患者盆腔淋巴结中检测到 HPV-DNA 的临床意义。

材 料 和 方 法

一、研究对象

40 例宫颈癌组织及盆腔淋巴结组织均来自南方医院的妇科住院手术患者。患者均为广东籍, 出生并长期生活在广东, 无在外地的长期居住史。宫颈癌患者临床分期分别为 I b 13 例、II a 22 例及 II b 期介入治疗后手术 5 例。所有病例均行广泛性全子宫切除加盆腔淋巴清扫术, 留取手术切除的病变宫颈组织及肉眼可见的盆腔肿大淋巴结, 投入液氮速冻。

二、实验试剂与方法

试剂、仪器设备和耗材与第一部分实验基本相同。

三、统计学处理

本试验因分组较多, 采用统计描述法描述数据分布情况。

结 果

1、宫颈癌组织中 HPV-DNA 的检出率: 宫颈癌患者癌变组织中均检测到 HPV-DNA。宫颈癌组织经 GP-PCR 扩增结果 (图 3-1), 阳性对照 HPV18

质粒经扩增后在 140bp 处出现 DNA 带。

bp M 1 2 3 4 5 6 7 8

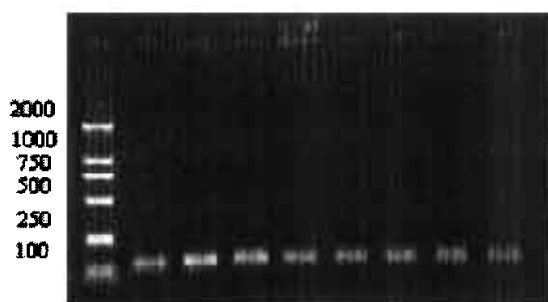


图 3-1 宫颈癌组织 HPV-DNA PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3-1 2% agarose gel electrophoresis of the HPV-DNA PCR products in cervical cancer tissue

M: DNA marker LD-2000; Lane1: positive control; Lane2-8: DNA samples of cervical cancer tissue.

2、盆腔淋巴结组织中 HPV-DNA 的检出率：盆腔淋巴结 HPV-DNA 的检出率为 40%（共 16 例），GP-PCR 扩增结果见图 3-2，亦在 140bp 处出现 DNA 带。

bp M 1 2 3 4

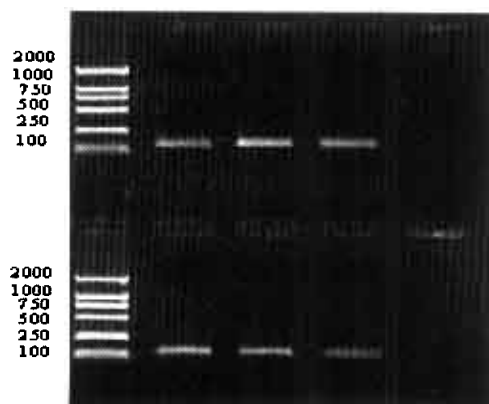


图 3-2 盆腔淋巴结 HPV-DNA PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3-2 2% agarose gel electrophoresis of the HPV-DNA PCR products in pelvis

lymph node
M: DNA marker LD-2000; Lane1-3: DNA samples of cervical cancer tissue; Lanes4:
negative control

3、HPV-DNA 的测序与分型：宫颈癌组织和盆腔淋巴结中检出的 HPV-DNA 分型情况，见表 3-1。宫颈癌病灶中分离出 HPV16、18 混合感染型的 24 例患者中，盆腔淋巴结中检测到 HPV 的有 10 例，其中 8 例为 HPV16、18 型混合感染，而另外 2 例只检测到 HPV18 型。

经过临床组织病理学检查发现淋巴结癌转移的 10 例患者淋巴结 HPV-DNA 检测均为阳性，其中 6 例为 HPV16、HPV18 混合感染型，2 例为单纯 HPV18 型感染，另外 2 例为单纯 HPV16 型感染。盆腔淋巴结中检测出 HPV16、18 混合感染型病例的测序图，见图 3-3。

表 3-1 各组织中 HPV-DNA 的检出例数

	HPV16 型 (例数)	HPV18 型 (例数)	HPV16、18 混合型 (例数)
宫颈癌组织检出			
HPV DNA	14	2	24
盆腔淋巴结检出			
HPV DNA	4	4	8
组织病理学发现			
淋巴转移	2	2	6

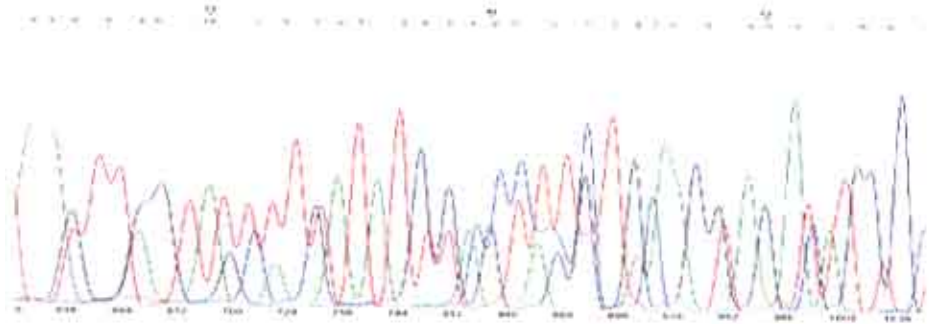


图 3-3 盆腔淋巴结中检测出 HPV16、18 混合感染型病例的测序图

Fig.3-3 Part sequence analysis of the PCR product of type 16 and 18 HPV

讨 论

宫颈癌的主要扩散方式是局部浸润和盆腔淋巴结转移,后者又是重要的预后影响因素,盆腔淋巴结的转移与否不仅决定了手术范围,而且也是术后辅助治疗的依据。临床发现手术中肉眼见到淋巴结肿大,组织病理学有肿瘤细胞转移的却很少。日前组织病理学检查淋巴结转移主要根据 HE 染色后组织切片的病理形态特点(即癌细胞的异型性)进行判断,主要存在以下问题:1、假阴性结果 $\geq 10\sim 20\%$ 甚至更高,这取决于不同国家不同医院的阅片水平,有一定的局限性和主观性。2、部分病例组织病理学结果不明确或处于“边界”状态。这部分患者手术后如不进行辅助放、化疗病情可能加重,不能明确转移的患者进行放、化疗给病人带来很大痛苦。因此除了组织病理学以外我们希望找到一些辅助诊断盆腔淋巴结转移的方法,能在一定程度上提高淋巴结转移的发现率,并有助于对患者预后的判断。

本研究采用一种新的方法即检测宫颈癌患者盆腔淋巴结 HPV 并进行型别鉴定,其理论基础在于近年来分子生物学研究发现,高危型 HPV-DNA 多以整合形式存在于宿主细胞基因中^[15],癌细胞侵入淋巴管后形成栓子,随淋巴液转移至全身淋巴结。宫颈癌淋巴转移有一定的规律,一般是沿宫颈旁淋巴管先转移至闭孔、髂内及髂外等区域淋巴结,而后再转移至髂总、骶前及腹主动脉旁淋巴结,晚期患者可远处转移至锁骨上淋巴结或深浅腹股沟淋巴结。经过临床组织病理学检查发现淋巴转移的 10 例患者,经本研究检测盆腔淋巴结 HPV 均为阳性。由此可见盆腔淋巴结中检出 HPV 早于组织病理学发现淋巴转移。另有研究显示宫颈癌患者外周血中也可检测到 HPV-DNA^[26],检出率为 20.19%(104 例中检出 21 例),低于本研究发现的盆腔淋巴结中 HPV-DNA 的检出率 40%,也正符合淋巴转移是宫颈癌主要转移方式的一个证明。至于盆腔淋巴结中的 HPV-DNA 是 HPV 直接感染淋巴结所形成的病灶,还是宫颈癌病灶脱落的肿瘤细胞随淋巴循环至淋巴结处形成的继发病灶还有待进一步研究。本研究中盆腔淋巴结 HPV 检测为阳性的部分患者临床组织病理学检查未发现淋巴转移,可能与以上提到的组织病理学检查存在的问题有关。Guterson 等发现^[27]通过免疫组化的方法来寻找淋巴结隐匿性转移,再反复进行细致的组织形态学观察,有 8-30%常规淋巴结组织病理检查“阴性”的乳腺癌患者可以被检出有隐匿性淋巴结转移。由此可

见,如果将这一部分患者的组织病理学切片进行反复的研究及会诊,也很有可能发现隐匿性淋巴结转移。本研究中的两名该类患者在术后 1 年内经 CT 证实出现远处的淋巴转移。这说明即使当时未能找到组织病理学检查阳性的淋巴结,盆腔淋巴结 HPV 检测为阳性的部分患者在术后一段时间内出现转移的可能性还是大于盆腔淋巴结 HPV 检测为阴性的患者。因此,盆腔淋巴结中检出 HPV-DNA 对盆腔淋巴结转移有提示作用,有助于发现组织病理学不易发现的淋巴结隐匿性转移,是判断预后不良的指标。

宫颈癌病灶中 HPV-DNA 的类型与盆腔淋巴结转移也存在一定的关系。宫颈癌病灶中分离出 HPV16、18 混合感染型的 24 例患者中,盆腔淋巴结中检测到 HPV 的有 10 例,其中 8 例仍为 HPV16、18 混合感染型。但另外两例只检测到 HPV18 型。宫颈癌病灶中感染单纯 HPV18 型的 2 例患者都在盆腔淋巴结中检测到 HPV18 型的 DNA。而 14 例单纯 HPV16 型的患者仅 4 例盆腔淋巴结 HPV 阳性。可见感染有 HPV18 型的患者不论是单纯感染还是与其他类型的 HPV 混合感染,都较单纯 HPV16 型感染的患者更易发生淋巴转移,是预后不良的一种高危类型。盆腔淋巴结中 HPV-DNA 的检测相关研究少,要探究 HPV 的淋巴转移与组织病理学的淋巴转移之间的关系,明确其在宫颈癌淋巴转移中的价值尚需进一步大样本量的相关研究。

第四部分 宫颈癌组织中 HPV16 E6 及 E7 序列多态性 分析

我国是一个宫颈癌患病人数和死亡人数均占世界 1/3 的发病大国,近年来随着应用细胞学、阴道镜与组织学即三阶梯技术(“three-step”technique)规范化管理女性下生殖道的癌前期病变,宫颈癌特别是浸润癌的发生下降了,但早期宫颈癌的发生,特别是年轻化的趋势十分明显,这和 HPV 感染有明显关系^[3]。迄今为止,至少发现了 100 余种 HPV,其中 20 余种已证实与人类的宫颈肿瘤相关联^[28],其中最常见 HPV 类型为 16、18、45 和 31 型。流行病学分析表明,HPV16 感染广泛分布于四大洲,通过对世界不同地域 HPV16 基因组变异分析,发现 HPV16 型变异株具有地域特征,及种族人群特异性^[5]。本研究拟对广东地区大样本宫颈癌组织进行 HPV 型别鉴定,并通过对 HPV16 E6 及 E7 基因的克隆及一级结构序列分析,鉴定出广东地区人群中的型内变异株的序列特点,以便设计出特异的寡核苷酸探针用于流行病学调查及诊断,同时为 HPV 型特异性疫苗的研究策略提供理论基础。

材 料 和 方 法

一、研究对象

50 例宫颈癌组织均取自南方医院住院手术病人。患者均为广东籍,出生并长期生活在广东,无在外地的长期居住史。病理学诊断其中 45 例为宫颈鳞状上皮癌,5 例为宫颈腺癌。留取手术切除的病变组织,投入液氮速冻。

二、试剂和引物

动物基因组 DNA 提取试剂盒购于北京鼎国生物技术发展中心。TaKaRa Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、dNTP Mixture、6×Loading Buffer、marker DL2000 均购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 产物纯化试剂盒购自申能博彩生物科技有限公司。

HPV PCR 通用引物参考国外文献^[15]中的 GP5、GP6 序列用以扩增出 HPV

L1基因组片段。

GP5 5' -TTTGTACTGTGGTAGATACYAC- 3' , Y=T or C ,

GP6 5' -GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC- 3'

参照HPV各常见型别、HPV16 E6及E7基因序列及引物设计原则, 采用引物设计软件自行设计HPV16 E6及E7基因巢式PCR引物, 序列如下:

E6外侧引物 OS 5'-TCATGTATAAACTAAGGGCGT- 3',

OIS 5'-TTGTAATGGGCTCTGTCCGGTTC - 3'

E6内侧引物 IS 5'-TAAGGGCGTAACCGAAAT - 3',

IIS 5'-GTTGTCTCTGGTTGCAAATCT - 3'

E7外侧引物 OX 5'-CATAATATAAGGGGTCGGTGGA- 3',

OIX 5'-CTGCATCTCTCGGATGTTTTG - 3'

E7内侧引物 IX 5'-GCAGATCATCAAGAACACG - 3',

IIX 5'-CAAATCTTCACCTGTATCACTG - 3'

引物由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR扩增产物的DNA测序由第一军医大学分子生物学研究所完成。

三、实验方法

(一) PCR直接测序法对宫颈癌组织中 HPV-DNA 分型

取 300mg 的宫颈癌变组织, 根据动物基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取总 DNA。以各例宫颈癌组织 DNA 为模板, 用上述通用引物 GP5、GP6 进行 HPV-DNA L1 区基因序列的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μ l, 其中含样品宫颈癌组织 DNA 3 μ l 约 3ng, 浓度为 1 U / ml 的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶 10 μ l, dNTP 5pmol、引物 GP5、GP6 各 20 pmol、双蒸水 5 μ l, 以 2ng 的 HPV18 (德国标准株) 质粒为阳性对照。94℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 45s, 33 个循环后再延伸 7min。进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。挑选出在 140bp 处出现 DNA 带者, 将 PCR 产物纯化。分别用 GP5、GP6 两引物, 将 PCR 产物在 DNA 序列自动分析仪 (3730 型) 上测序。用 BLAST 软件将测出的碱基序列与基因库中的各种 HPV 碱基序列进行比对, 与某种已知 HPV 序列符合率达 90% 以上, 可确定为该型 HPV。

(二) 巢式 PCR 扩增 HPV16E6 及 E7 基因序列及 DNA 序列测定

选取含有 HPV16 型的各例宫颈癌组织 DNA 为模板,用上述 E6 外侧引物 OS、OIS 进行 HPV-DNA E6 区基因序列的第一次 PCR 扩增。用上述 E7 外侧引物 OX、OIX 进行 HPV-DNA E7 区基因序列的第一次 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ l,其中含样品宫颈癌组织 DNA 3 μ l 约 3ng,浓度为 1 U / ml 的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶 25 μ l, dNTP 5pmol、引物 OS、OIS、OX、OIX 各 20pmol (2 μ l)、双蒸水 20 μ l,以 2ng 的 HPV16 (德国标准株)质粒为阳性对照。94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 30 个循环后再延伸 7min。进行 2%琼脂糖凝胶电泳。挑选出在 540bp 处出现 DNA 带者,分别用 E6 内侧引物 IS、IIS 两引物进行第二次 PCR 扩增,分别用 E7 内侧引物 IX、IIX 两引物进行第二次 PCR 扩增,PCR 反应体系为 50 μ l,其中第一次 PCR 产物 0.5 μ l,浓度为 1 U / ml 的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶 25 μ l, dNTP 5pmol、引物 IS、IIS、IX、IIX 各 20 pmol (2 μ l)、双蒸水 23 μ l,以 2ng 的 HPV16 (德国标准株)质粒为阳性对照。94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 30 个循环后再延伸 7min。进行 2%琼脂糖凝胶电泳。在 520bp 处出现 DNA 带者为扩增出的 HPV16E6 基因序列。在 400bp 处出现 DNA 带者为扩增出的 HPV16E7 基因序列。将 PCR 产物纯化后,分别用引物 IS、IIS 及 IX、IIX 通过正反两个方向对目的基因的正链及负链进行测序。

(三) HPV16 E6 及 E7 多态性分析

比较基因库中的 HPV16 (德国标准株)与测出的各临床病例的基因序列和蛋白序列,通过 DNAsis 分析临床病例分离株 HPV16E6 及 E7 区的基因多态性和氨基酸变异。通过文献^[29]报道的 Antigenicity ValueX10 方法进行抗原性分析。

结 果

1、宫颈癌组织经巢式 PCR 扩增 HPV16 E6 基因序列: 50 例宫颈癌组织中含有 HPV16 型的 33 例标本中共扩增出 25 例 HPV16 E6 基因序列。经巢式 PCR 扩增的产物进行凝胶电泳在 520bp 处出现 DNA 带如图 4-1, 扩增出的 HPV16E6 基因序列部分核苷酸序列图, 如图 4-2。



图 4-1 HPV16E6 巢式 PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.4-1 2% agarose gel electrophorphoresis of the HPV-DNA PCR products in cervical cancer tissue

M: DNA marker LD-2000; Lane1: positive control; Lane2-7: DNA samples of cervical cancer tissue; Lanes8: negative control

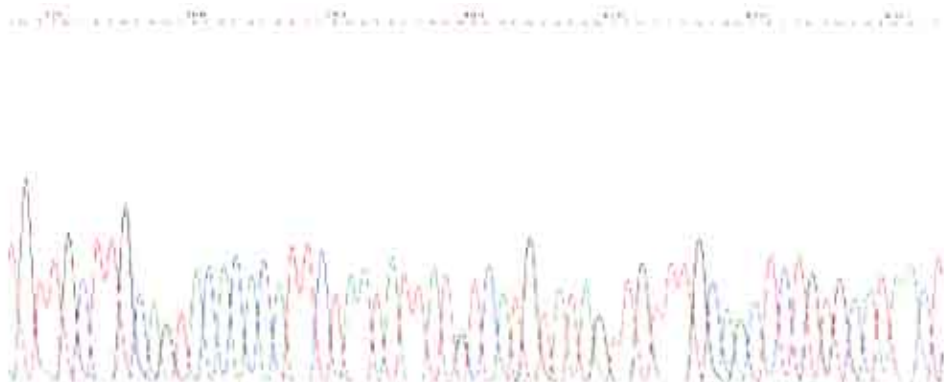


图 4-2 HPV16 E6 部分核苷酸序列图

Fig.4-2 Part sequence analysis results of the PCR product of type HPV 16 E6

2、HPV16 E6 基因多态性分析：各临床分离株 HPV16E6 基因序列和蛋白序列与基因库中的 HPV16（德国标准株）比对，变异如表 4-1。各临床病例与 HPV16 德国标准株的核苷酸及蛋白质系统发生比较分别见图 4-3、图 4-4。临床病例 nt17 与 HPV16 德国标准株的 Antigenicity ValueX10 抗原指数对比见图 4-5。

表 4-1 HPV16 E6 基因和蛋白序列的变异

核苷酸位置	病例序号	密码子	蛋白位置	蛋白质
Nt94、95	36、51	TC-CT	Nt 5	Arg-Gly
Nt 131	27、29	T-G	Nt 17	Arg-Arg
Nt 173	14、21、44	G-A	Nt 31	His-Tyr
Nt 178	1、6、10、 17、18、19、 20、22、27、 29、32、39、 40、42、47、 49	A-C	Nt 32	Asp-Glu
Nt 385	7、8、9、 12	A-C	Nt 101	Lys-Asn

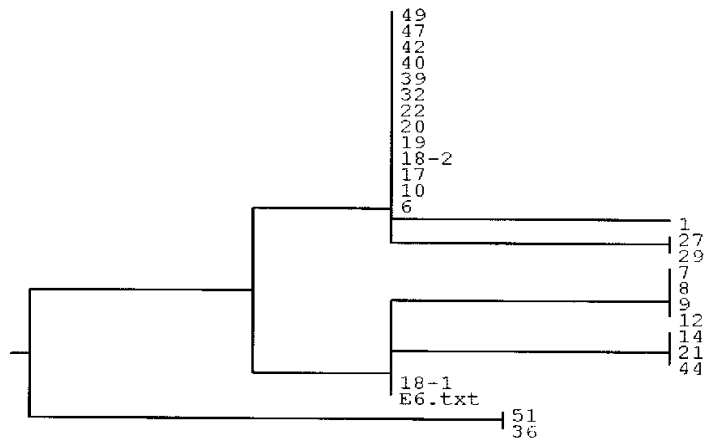


图 4-3 比较 25 例临床分离株与 HPV16E6 德国标准株的核苷酸系统发生树状结构图

Fig.4-3 Phylogenetic tree analysis of the 25 cases isolates developed from nucleotide sequence compared with the standard HPV 16 E6 strain

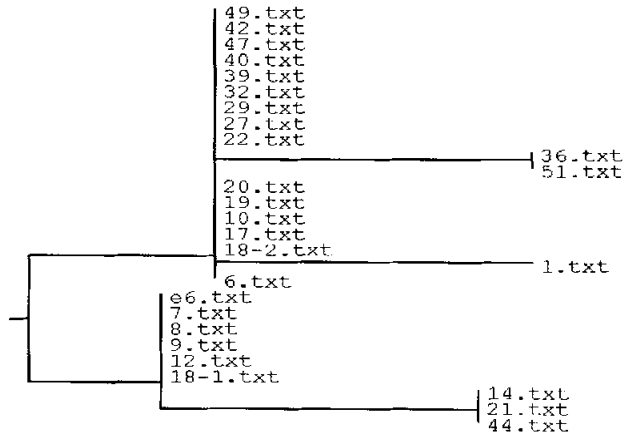


图 4-4 比较 25 例临床分离株与 HPV16 E6 德国标准株的蛋白质系统发生树状结构图
Fig.4-4 Phylogenetic tree analysis of the 25 cases isolates developed from protein sequence compared with the standard HPV 16 E6 strain

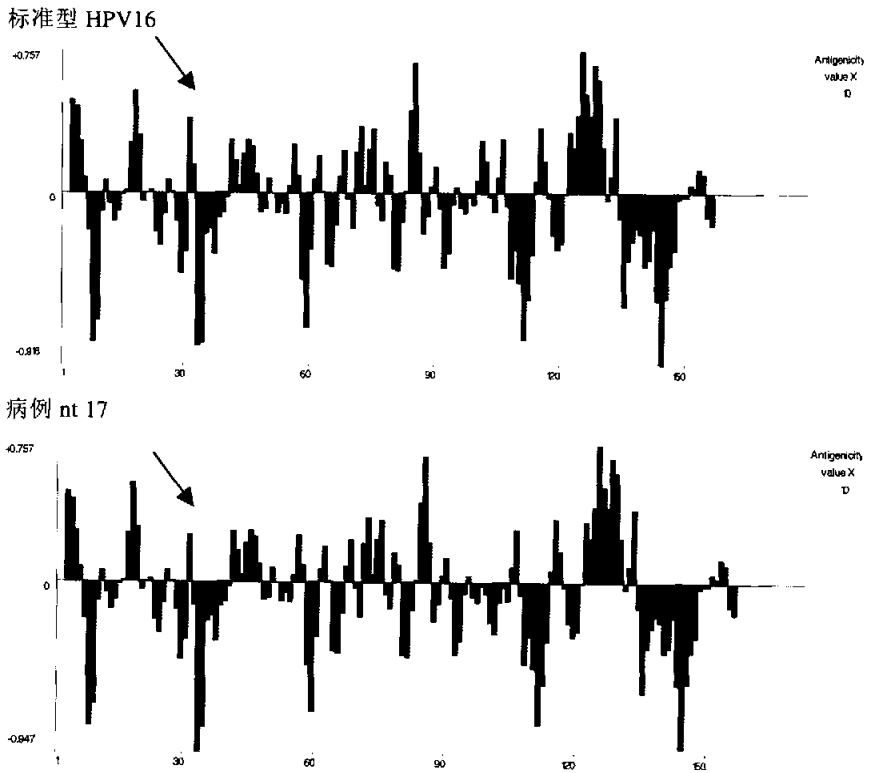


图 4-5 标本 17 与 HPV16E6 德国标准株的 Antigenicity ValueX10 抗原指数对比图

Fig.4-5 Comparing antigenic index plot of the 17th cases isolates strain with the standard HPV 16 E6 strain

3、宫颈癌组织经巢式 PCR 扩增 HPV16 E7 基因序列：50 例宫颈癌组织中含有 HPV16 型的 33 例标本中共扩增出 25 例 HPV16 E7 基因序列。经巢式 PCR 扩增出的产物进行凝胶电泳在 400bp 处出现 DNA 带如图 4-6，扩增出的 HPV16E7 基因序列部分核苷酸序列图（反意链）如图 4-7。



图 4-6 HPV16E7 巢式 PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.4-6 2% agarose gel electrophoresis of the HPV-DNA PCR amplified products in cervical cancer tissue

M: DNA marker LD-2000; Lane1: positive control; Lane2-7: DNA samples of cervical cancer tissue; Lanes8: negative control

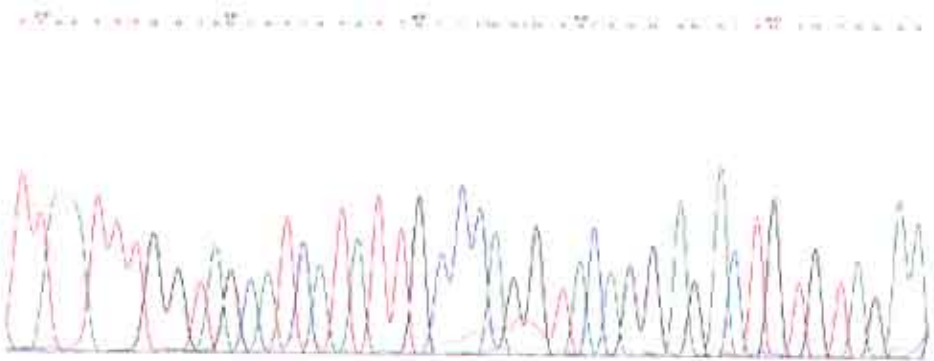


图 4-7 HPV16 E7 部分核苷酸序列图

Fig.4-7 Part sequence analysis results of the PCR product of type HPV 16 E7

4、HPV16 E6 基因多态性分析：HPV16E7 基因序列和蛋白序列与基因库中的 HPV16 德国标准株基因序列比对，变异如表 4-2。各临床病例与 HPV16 德国标准株的核苷酸及蛋白质系统发生比较分别见图 4-8、图 4-9。临床病例 n27 与 HPV16 德国标准株的 Antigenicity ValueX10 抗原指数对比见图 4-10。

表 4-2 HPV16 E7 基因和蛋白序列的变异

核苷酸位置	病例序号	密码子	蛋白位置	蛋白质
Nt647	6、10、12、17、 18、19、20、21、 22、27、29、32、 39、40、42、47、 49	T-C	Nt 212	Asn-Ser
Nt 666	7、8、9、14、16、 36、44、51	C-T	Nt 218	无变异
Nt 823	27	G-A	Nt 271	无变异
Nt 844	6、	A-C	Nt 278	无变异
Nt 846	6、10、12、17、 18、19、20、21、 22、27、29、32、 39、40、42、47、 49	A-G	Nt 279	无变异

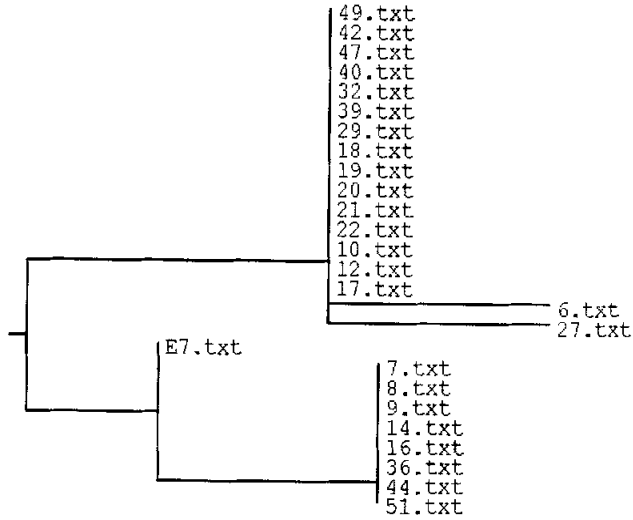


图 4-8 比较 25 例临床分离株与 HPV16 E7 德国标准株的核苷酸系统发生树状结构图
Fig.4-8 Phylogenetic tree analysis of the 25 cases isolates developed from nucleotide sequence compared with the standard HPV 16 E7 strain

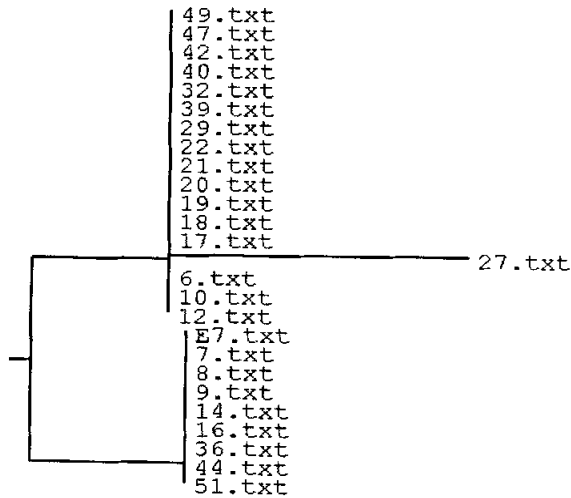


图 4-9 比较 25 例临床分离株与 HPV16 E7 德国标准株的蛋白质系统发生树状结构图
Fig.4-9 Phylogenetic tree analysis of the 25 cases isolates developed from protein sequence compared with the standard HPV 16 E7 strain

标准型 HPV16 E7



病例 nt 27 HPV16 E7



图 4-10 标本 27 与 HPV16E7 德国标准株的 Antigenicity ValueX10 抗原指数对比图

Fig.4-10 Comparing antigenic index plot of the 27th cases isolates strain with the standard HPV 16 E7 strain

讨 论

HPV 是一种小 DNA 病毒，其基因组为一双链共价闭环 DNA，全长约 7.9kb，按功能分为 E 区、L 区和非编码区(NCR)。E 区含 E1-E8 八个开放读框(ORF)，其中早期基因 E6、E7 是导致细胞转化和恶性表型维持所必需的主要转化基因。HPV16 E6 位于 65-559 核苷酸，编码含 151 个氨基酸的小分子量核磷蛋白，含 4 个 cys-x-x-cys 框，形成两个锌指结构，可增强 E7 基因

的转化能力。HPV 诱发宫颈癌的主要机制, 是其 E6 和 E7 基因在宫颈细胞中的表达增加, 产生的 E6 和 E7 两个癌蛋白分别与抑癌蛋白 p53 和 pRb (磷酸化的 Rb 蛋白) 结合而诱导后两者降解, p53、pRb 的失活可能是细胞永生化的重要原因。

HPV 致癌力的差别主要是由 E6 和 E7 控制, 而 E6 和 E7 基因常发生型内变异, 在单核苷酸水平上的 E6 基因变异将影响 HPV 株的危险性^[30]。本研究显示 HPV16E6 的碱基变异主要集中在氨基端, 羧基端未发现变异。这与文献报道^[31]的 HPV16E6 羧基端变异率低, 氨基端相对变异相吻合。我国赵蔚明等关于 HPV16E6C 端基因变异的研究^[10]也未发现变异。C 端变异可丧失与 p53 结合的能力, 说明 C 端是 p53 蛋白的结合位点^[32], E6 与 p53 结合后通过泛蛋白途径引起 p53 的降解。HPV16 氨基端相对变异, 通过 E6 突变体的功能研究发现: E6 氨基端突变体降解 p53 的活性丧失殆尽, 说明氨基端对 p53 的降解是必需的^[33]。因此, 我们从中得到启示, 可以设计 HPV16E6C 端 PCR 引物, 得到 N 端缺失的 E6C 端基因片段, 以此作为疫苗的抗原基因, 期望在消灭完整 E6 蛋白潜在致癌性的前提下研究其激活肿瘤特异性免疫反应的作用。此设计方案对于进一步研制安全有效的 HPV 疫苗是有益的尝试。

近年来, HPV 感染率急剧上升, 抗病毒药物应用十分频繁, 大大增加了 HPV 耐药性和变异发生的机会。此外, 不同区域人群的流动加速, 也使得特定区域固有的 HPV16 基因组产生变异^[34]。目前国内尚缺乏对我国宫颈癌 HPV 主要类型鉴定的研究报告, 对 HPV 型内变种及早期基因变异的研究也仅见于对山东、新疆及湖北省的零星报道, 报告例数均较少 (约 10—20 例), 远不能反映我国各省市宫颈癌 HPV 的主要类型分布情况。

本研究发现 HPV16 E6 的碱基变异主要位于几个较集中的位点, 核苷酸反义链中 nt178 位 “A” 变为 “C” 变异率为 72%。nt385 位 “A” 变为 “C” 变异率为 16%。nt173 位 “G” 变为 “A” 变异率为 12%。nt131 位 “T” 变为 “G” 变异率为 8%。另外, 同时有两例临床分离株在 nt94 和 nt95 位出现 “TC” 倒位成 “CT” 的现象。其中 nt131 位的变异导致无意义突变, 其余位点均导致错义突变。Yamada 曾在他的研究中发现宫颈癌组织中的 HPV16E6 的碱基变异热点位点为 nt109 和 nt145, 变异率分别为 83% 和 91%^[31]。我国一些其它的文献也曾报道过一些 HPV16 E6 的碱基变异的位点, 例如山东地区 nt172 位 “A” 变为 “T”。nt176 “G” 变为 “A”^[12]。新疆地

区 nt247 位“T”变为“G”。因为病例过少，不具有统计学分析意义。本研究通过较大样本的检测发现了广东地区宫颈癌组织中的 HPV16 E6 的碱基变异热点为 nt178 位，变异率为 72%，导致错义突变，相应蛋白质由天冬氨酸变为谷氨酸，其脂肪族氨基酸的基本化学结构未发生改变，但由于其 R 基改变，由不带电荷的极性氨基酸变为带有负电荷的酸性氨基酸。根据 Antigenicity ValueX10 抗原性分析，该处变异导致相应分离株与 HPV16 德国标准株的抗原指数稍增强。

HPV16 E7 自 544-855，编码 98 个氨基酸组成的蛋白。其分子两端为保守区，羧基端有 2 个锌指结构，氨基端保守区为 37 个氨基酸残基与 Ad E1 A 和 S V40 T 抗原蛋白相似，可以与抑癌蛋白 Rb 结合^[35]。这些结构的完整性对 E7 蛋白的转化和反式激活功能十分重要。E7 基因是 HPV16 的主要转化基因，是 HPV16 型相关性宫颈癌恶性表现型维持所必需，承受的选择性环境压力较强。变异的 E7 基因可能在两个方面发挥作用：E7 基因的错义突变造成其蛋白水平的作用发生改变而影响其转化活性。E7 基因某些位点无义突变、起始突变、终止突变可能影响 E7 基因的转录与表达^[36]。

在以往的研究中比较各地区 E7 基因及氨基酸序列同源性都在 99% 以上，可见人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因较为保守，特别是 5' 端具有重要功能的 PRb 结合区域，这与 E7 蛋白的重要作用是一致的。但国内外均发现 HPV16 E7 基因存在一些微小变异，Fujnaga 等^[37]通过 PCR 法测序分析发现大多数侵袭性宫颈癌及癌前病变都检出了 HPV16 E7 序列变异株。Icenogle 等^[38]的研究表明，世界不同地区，如美国乔治亚州、亚拉巴马州、密苏里州及巴拿马地区的宫颈癌组织都普遍存在 HPV16 E7 变异株。Esche 等^[39]研究也证实存在 HPV16 E7 变异株，通过进一步与对照组德国患者宫颈癌组织中病毒序列的比较分析，认为坦桑尼亚变异株具有地域特点。本研究发现广东地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 基因序列 nt647、666、823、844、846 五个位点存在变异，其中 nt647 和 nt846 两个位点变异率高。但除了 nt647 由“T”变为“C”，导致相应的蛋白质由天冬氨酸（Asn）变异为丝氨酸（Ser），其脂肪族氨基酸的基本化学结构未发生改变，而且由于其 R 基的极性性质未发生改变，其为不带电荷的极性氨基酸的化学性质也未发生改变。根据 Antigenicity ValueX10 抗原性分析，该处变异导致相应分离株较 HPV16 德国标准株的抗原指数稍增强。但该处变异是否影响 E7 编码蛋白二聚体、多聚体的形成，是否增加蛋白质的稳定性及其金属结合能力、细胞转化能力，与

其他宫颈癌高发地区人乳头瘤病毒的感染率和致癌能力的差异是否有关,应作进一步研究。

在实验方法上,首先,本研究采用巢式 PCR 方法对临床病例样品进行检测,通过外侧及内侧引物两次扩增出 HPV16E7 段基因序列,提高了检测的灵敏度,一定程度上克服了假阴性的问题,同时也增加了 PCR 反应的特异性及严格性,降低了假阳性。其次,为排除 DNA 聚合酶可能造成的各种碱基错配,本实验在测序时通过在正反两个方向对目的基因的正链及负链进行测序,最大限度地减少了测序中可能存在的错配模板,且双向测序具有一定的校对功能,变异处 G 峰(反意链)清晰,单一背景无杂峰,因此消除了由实验造成的核苷酸序列改变的可能性,表明本研究发现的病毒核苷酸序列的变异是由广东地区 HPV16 E7 基因与德国标准株病毒基因之间本身存在差异引起的。

肿瘤内普遍表达的 HPV E6 及 E7 癌基因产物,已被认为是肿瘤特异性杀伤(T 淋巴)细胞(CTL)介导的免疫治疗的有吸引力的靶分子。然而,HPV 病毒疫苗具有型特异性,基因变异株可通过不同机制逃避机体体液和细胞免疫的攻击,这给相应于 E6 蛋白的宫颈癌疫苗的研究带来了困难。本研究通过各临床病例与 HPV16 德国标准株的核苷酸及蛋白质系统发生比较发现各临床分离株的系统起源,希望从这方面找寻到不同地区的流行株的来源,为设计特异性强的肿瘤疫苗提供指导。

全文小结

1. PCR 直接测序法是对宫颈癌组织中 HPV 检测和分型的一种有效方法,并可检测到 HPV 少见的特殊类型,同时也能提供已知的 HPV 型别的突变信息。

2. 广东地区宫颈癌组织中检出 HPV16、18 混合感染型最多见。宫颈鳞状细胞癌以 HPV16 型多见,腺癌以 HPV18 型多见,HPV16、18 混合感染型在鳞状细胞癌和腺癌中均占相当大的比例。单纯或混合感染 HPV18 型的患者临床分期均较晚,细胞分化程度多为中、低分化,而且更易早期出现淋巴转移,是较单纯 HPV16 型患者风险高的一种高危类型。

3. 盆腔淋巴结中检出 HPV-DNA 对盆腔淋巴结转移有提示作用,有助于发现组织病理学不易发现的淋巴结隐匿性转移,是判断预后不良的指标。宫颈检测到感染有 HPV18 型的患者不论是单纯感染还是与其他类型的 HPV 混合感染,都较单纯 HPV16 型感染的患者更易发生淋巴转移,是预后不良的一种高危类型。

4. HPV16 E6 DNA 序列发生碱基替换的区域主要在氨基端 94 位至 241 位,羧基端相对保守,未见变异。广东地区宫颈癌组织中 HPV16 E6 的热点突变为 Nt178。HPV16 E7 DNA 序列发生碱基替换的区域主要在 647 位至 846 位。广东地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 的热点突变为 Nt647 位和 Nt846。

参 考 文 献

1. Lehtinen M, Dillner J. Preventive human papillomavirus vaccination. *Sex Trans Infect* 2002; 78(1): 4.
2. Bosch Fx, Rohan T, Schnieder A, et al. Papillomavirus research update: Highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol* 2001; 54(3): 163.
3. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J of Clin Pathol* 2002; 55(4): 244.
4. Kaufmann AM, Nieland J, Schinz M, et al. HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination. *Int J Cancer* 2001; 92(2): 285.
5. Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, et al. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. *Vaccine* 2001; 19(17-19): 2549.
6. Da-Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, et al. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 2001; 186(2): 169.
7. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71(3): 2463.
8. Pang T, Hu X, Mazurenko N, et al. Multiple variants of HPV16 E6 gene in cervical invasive squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22(2A): 1011.
9. 许雪梅, 宁国兴, 司静懿, 等. 人乳头瘤病毒 16 型转换基因的序列分析. *基础医学与临床* 2000; 20(5): 34.
10. 赵蔚明, 周亚滨, 权衡, 等. 宫颈癌组织中 HPV 16 E6C 基因变异的研究. 1999; 37(4): 280.
11. 丁晓华, 伍欣星, 苏应斌, 等. 子宫颈癌中人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因检测及变异分析. *基础医学与临床* 1996; 16(5): 51.
12. 许雪梅, 司静懿, 刘世德, 等. 中国山东地区妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16E6E7 基因的分离、克隆和序列分析. *中国医学科学院学报*

- 1999; 21(3): 185.
13. Lobbard I, Vincent Salomon A, Validire P, et al. Human Papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer[J]. Clin Oncol 1998, 169(7): 2613-9.
 14. McLachlin C M. Human Papillomavirus in cervical nerplasia. Role, risk factors and implications[J].Clin Lab Med 2000, 20(2): 257-70.
 15. Juan Carlos Feoli-Fonseca, Luc L, Pierre Brochu, et al. human papillomavirus study of 691 Pathological Specimens From Quebec by PCR-Direct Sequencing Approach[J]. J Med Virol 2001, 63(4): 284-92.
 16. Walboomers J M, Jacbs M V, Manos M M, et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J].J Pathol 1999,189(1):12-19.
 17. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer a World Perspective. J of the National Cancer Institute.1995;87:796-802.
 18. 丁守怡, 吴荣. 原位杂交测肿瘤坏死因子 mRNA 在宫颈细胞及子宫内膜组织的定位表达[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 244-6.
 19. Rower D, Lacey C. Toward a human papilloma virus vaccine[J]. Dermatol Clin, 1998, 16 (4) : 835-838.
 20. 刘翠华, 马文丽, 石嵘,等. Agilent 2100 Bioanalyzer 在人乳头瘤病毒检测中的应用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 213-5.
 21. 李西启、徐廷香、王剑波等 应用原位 PCR 和原位杂交技术检测宫颈癌及癌前病变组织中 HPVDNA, 临床与实验病理学杂志. 2001, 17 : 87
 22. 曾仁山、王建琴等广州地区尖锐湿疣患者皮损中 HPV-DNA 的检测及分型, 中国皮肤性病杂志 2000;14(3)159-160.
 23. Lobbard I, Vincent-Salomon A, Validire P, et al. Human Papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer.J Clin Oncol 1998L;16:2613-2619.
 24. Marielle A E, Nobbenhuis, Jan M M Walboomers, Theo JM Helmerhorst, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening. Lancet 1999; 354 :20-25.
 25. Melchers W JC, Clars H CJ, Quint W GV. Use of the polynerase chain

- reaction to study the relationship between human papillomavirus infections and cervical cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991; 10: 714-717.
26. 彭小平, 李孟达等, 宫颈癌患者外周血中 HPV6\11, HPV16\18, HSV II 及 HCMV DNA 的检测. *中国肿瘤临床*, 2002, 29: 282-284.
27. 邵永胜, 彭开勤, 张彤等, 细胞角蛋白免疫组化染色在乳腺癌淋巴转移检测中的价值. *中国实用外科杂志*, 1997, 17: 89-90.
28. Lehtinen M, Dillner J. Preventive human papillomavirus vaccination. *Sex Trans Infect* 2002; 78(1): 4.
29. Welling GW, Weijer WJ, Van eler Zeer, et al. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett*, 1985, 188(2): 215-218.
30. Nakagawa S, Watanabe S, Yoshikawa H, et al. Mutation analysis of Human Papillomavirus type16E6 protein: transforming function for human cells and degradation of p53 in vitro. *Virol*, 1995, 212(2): 535.
31. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human Papillomavirus type16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J virol*, 1997, 71(3): 2463-2472.
32. Gao L, Walter J, T ravers P, et al. Tumor-associated E6 protein of Human Papillomavirus type16 contains an unusual H-2Kb restricted cytotoxic T cell epitope. *J Immunol*, 1995, 155(12): 5519.
33. Nakagawa S, Watanabe S, Yoshikawa H, et al. Mutation analysis of Human Papillomavirus type16E6 protein: transforming function for human cells and degradation of p53 in vitro[J]. *Virol*, 1995, 212(2): 535.
34. Saiki R K, Gelfand D H, Erlich H A, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA polymerase[J]. *Science*, 1988, 239: 487-492.
35. Vousden K H, J Doniger J A Dipaolo. The E7 ORF of HPV16 encode a transforming gene[J]. *Oncogene Res*, 1988, 167-175.
36. Barbosa M S, Lowy D R, Schiller J T. papilloma virus polypeptides E6 E7 are zinc-binding proteins[J]. *J Virol*, 1998, 63: 1404-1407.
37. Fuinage Y, Kazawa K, Nishikawa A, et al. Sequence variation of Human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias[J]. *Virus Genes*, 1994, 9: 85-92.
38. Icenogle J, Sathya P, Miller D, et al. Nucleotide and amino acid sequence

- variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and 16[J]. Virology, 1991,184:101-107.
39. Eschl D, Durst M, Meulen J, et al. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus 16[J]. General Virol, 1992, 73:1829-1832.

综述:

我国宫颈癌组织中的 HPV16E 基因变异的研究进展

第一军医大学南方医院妇产科 刘 欣综述 刘国炳审校

摘要 流行病学分析表明, HPV16 感染广泛分布于四大洲, 通过对世界不同地域 HPV16 基因组变异分析, 发现 HPV16 型变异株具有地域特征, 及种族人群特异性。近年来, HPV 感染率急剧上升, 抗病毒药物应用十分频繁, 大大增加了 HPV 耐药性和变异发生的机会。此外, 不同区域人群的流动加速, 也使得特定区域固有的 HPV16 基因组产生变异, 本文仅就近年我国宫颈癌组织中的 HPV16 变异性的研究进展及其生物学特性作一简单综述。

关键词 人乳头瘤病毒 基因组变异 生物学特性

宫颈癌是世界第二大女性肿瘤, 每年新发病例 50 万, 并造成 30 万患者死亡。1995 年 WHO 和 IARC 已将 HPV 确定为是宫颈癌的病因。HPV 类型在人群及宫颈癌病例中的分布呈现明显的地域特征^[1]。例如, 流行病学分析表明, HPV-16 感染广泛分布于四大洲, 通过对世界不同地域 HPV-16 基因组变异分析, 发现 HPV-16 型变异株具有地域特征, 已被分为 E 系(欧洲)、AA 系(亚洲和美洲)、Af-1 系(非洲)、Af-2 系(非洲)和 NA 系(北美洲)^[2]。近年来, HPV 感染率急剧上升, 抗病毒药物应用十分频繁, 大大增加了 HPV 耐药性和变异发生的机会。此外, 不同区域人群的流动加速, 也使得特定区域固有的 HPV 流行病学特征发生改变。因此, 有必要对特定地区的宫颈癌 HPV 行进一步分类, 其意义在于: 鉴定出特定地域或人群中的型内变异株的序列特点, 以便设计出特异的寡核苷酸探针用于流行病学调查及诊断, 同时为 HPV 特异性疫苗的研究策略提供理论基础。我国目前报道的对宫颈癌 HPV 变异株的分析的相关资料较少, 而我国又是 HPV 感染性疾病尤其是宫颈癌的高发区, 因此分析中国各地区 HPV 型变异株的序列特点具有重要意义。

HPV 的分子结构和功能概述

HPV 是一组病毒的总称, 分类上属乳多空病毒科, 其病毒形态类似, 基

因组为一双链共价闭环 DNA,全长约 7.8-8.0kb,其在电镜下观察为球形、无包膜的 20 面体立体对称结构,直径 45-55nm。HPV 目前仍不能在体外细胞中进行培养。根据 DNA 限制性内切酶图谱各异,核壳体蛋白质的抗原性不同,目前已经确定的 HPV 型别大约有 80 余种,其中大约 35 种可感染妇女生殖道。HPV 按功能分为三个编码区:早期区(E 区)、晚期区(L 区)和上游调节区(URR)。E 区含 E1-E8 八个开放读框(ORF),大约由 4500 kb 组成,含有负责病毒复制、转录和细胞转化活性基因。晚期区 L1、L2 大约有 2500bp 组成,分别编码主要和次要衣壳蛋白。上游调节区(URR)位于 E 区和 L 区之间,它的功能尚不清楚,可能与病毒的复制和转录有关。

依据不同型别 HPV 与肿瘤发生的危险性高低分为低危型别和高危型别 HPV,低危型别 HPV 包括 HPV6、11、42、43、44 等型别,常引起外生殖器湿疣等良性病变包括宫颈上皮内低度病变(CIN I),高危型 HPV 包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 等型别,与宫颈癌及宫颈上皮内高度病变(CIN II/III)的发生相关。来自世界各国的宫颈癌组织标本的研究发现^[3], HPV16 和 18 型感染率最高,在检出的所有型别中, HPV16 占 50%, HPV18 占 14%, HPV45 占 8%, HPV31 占 5%,其它型别的 HPV 占 23%。HPV 的型别与宫颈癌的病理类型有关^[4],在宫颈鳞状上皮细胞癌中 HPV16 占主要地位(51%的鳞状上皮细胞癌标本),而在宫颈腺状上皮细胞癌(56%腺状上皮细胞癌标本)和宫颈腺鳞细胞癌(39%腺鳞细胞癌标本)中 HPV18 占主要地位。HPV 的类型与宫颈癌的临床分期及病理分级等的相关性研究缺乏我国的相关资料。

我国宫颈癌组织中的 HPV16E 基因变异的相关报道

1985 年 Seedorf 等^[5]首先从德国人宫颈癌组织中克隆了 HPV16(标准株),相继的研究发现,许多地区都有 HPV16 变异株的存在^[6-7]。我国学者相继构建的 HPV16E6 及 E7 基因克隆多来源于标准株的 HPV16 质粒^[8-10],我国宫颈癌组织中的 HPV16 变异株克隆的相关报道较少,现总结如下:

地区	部位	标本例数	变异例数	碱基序号	碱基改变	蛋白改变
山东	E6	10	2	172	A-T	ile-ile
				176	G-A	Asn-Asp
				350	T-G	Leu-Val
				557	T-C	Terminal-Gln
	E7	10	0			未见变异
北京	E6C	18	0			未见变异
新疆	E6	6	2	247	T-G	Leu-Val
	E7	2	0			未见变异
浙江	L1					插入 1 个碱基
西安	E5	15	6			
						无义突变
湖北	E7					引起表达中断
武汉	E7	1	1			同义突变
						Arg-Cys
五峰县	E7	2	2	靠近 3'端		Glu-Arg
						同义突变

因为病例数过少,不具有统计学分析意义,但为鉴定出特定地域或人群中的型内变异株的序列特点提供指导,以便设计出特异的寡核苷酸探针用于流行病学调查及诊断,同时为 HPV 型特异性疫苗的研究策略提供理论基础。

HPV16E 基因变异的生物学意义

一、HPV16E6 变异的生物学意义

HPV16E6 位于 65-559 核苷酸,编码含 151 个氨基酸的小分子量核磷蛋白,含 4 个 cys-x-x-cys 框,形成两个锌指结构,可增强 E7 基因的转化能力。HPV16E6 羧基端变异率低^[11],C 端变异可丧失与 p53 结合的能力,说明 C 端是 p53 蛋白的结合位点,E6 与 p53 结合后通过泛蛋白途径引起 p53 的降

解。HPV16 氨基端相对变异^[11]，通过 E6 突变体的功能研究发现：E6 氨基端突变体降解 p53 的活性丧失殆尽，说明氨基端对 p53 的降解是必需的^[12]。E6 蛋白的两个锌指结构是 E6 与 p53 结合并实现其生物学功能的区域，如果发生突变则可能影响其转化能力^[14]。尽管 HPV16E6E7 可以使人细胞永生化，尚没有获得一完全转化的表型，加上近一小部分 HPV16 感染的妇女发展为宫颈癌，说明 HPV16 感染的细胞发生恶变还需要其他基因的协同作用。变异的 E6 可能一方面影响与 p53 的结合和降解而影响其转化特性；另一方面可能影响 E6 与钙调蛋白的相互作用，细胞周期调控，p53 蛋白其他功能及机体免疫功能而影响其生物行为。因此，我们从中得到启示，设计了 HPV16E6C 端 PCR 引物，得到 N 端缺失的 E6C 端基因片段，以此作为疫苗的抗原基因，期望在消灭完整 E6 蛋白潜在致癌性的前提下研究其激活肿瘤特异性免疫反应的作用。此设计方案对于进一步研制安全有效的 HPV 疫苗是有益的尝试。

二、HPV16E7 变异的生物学意义

HPV16E7 自 544-855，编码 98 个氨基酸组成的蛋白。其分子两端为保守区，羧基端有一锌指结构，氨基端保守区为抑癌蛋白 RB 的结合部位，这些结构的完整性对 E7 蛋白的转化和反式激活功能十分重要。E7 基因是 HPV16 的主要转化基因^[13]，是 HPV16 型相关性宫颈癌恶性表现型维持所必需，承受的选择性环境压力较强。变异的 E7 基因可能在两个方面发挥作用^[14]：E7 基因的错义突变造成其蛋白水平的作用发生改变而影响其转化活性。E7 基因某些位点无义突变、起始突变、终止突变可能影响 E7 基因的转录与表达。

三、HPV16E5 区变异的生物学意义

高危 HPV 能编码具有生长刺激和转化功能的癌蛋白，其中，早期基因 E6、E7 基因是主要转化基因，但是 HPV 全基因组的转化活性明显高于仅使用 E6、E7 的转化活性。有理由推测，HPV 基因组中还有其他癌基因存在，由于在 HPV16 DNA 整合于细胞染色体 DNA 时，E5 基因经常被打断，故 E5 在晚期宫颈癌中的检出率不高，很长一段时间以来，对 E5 的研究甚少。但后来随着研究的深入，E5 基因的致癌作用逐渐受到重视。目前研究认为^[15]，HPV E5 是一种具有转化作用的癌基因，能干预生长因子受体，促进病毒癌基因的转化功能，抑制抑癌基因的表达，反式激活基因组启动子，从而促

进病毒增殖并通过多种机制促使损伤细胞通过细胞周期,在宫颈癌的发生过程中有着极其重要的作用。但宫颈癌中 HPV16 E5 基因是否有一定的改变,这种改变对其致癌性有何影响,国内外较少研究。综合本研究结果及以往资料,我们认为 HPV16 E5 基因的变异是宫颈癌多基因损伤的一部分,变异的 E5 基因可使病毒的转录活性增加^[16],并可造成其蛋白水平的作用发生改变,从而影响其与原癌基因、抑癌基因、凋亡基因的相互作用。在核酸水平, E5 基因的突变可能导致产生了新的酶切位点、起始密码子或终止密码子,从而在一定程度上影响了 E5 基因的转录和表达。基因变异意味着功能有可能改变,可能改变机体或细胞对病毒变异株的免疫能力,与宫颈癌的发生和 HPV 的嗜上皮性有关,因此对 HPV16E5 基因变异的研究对于 HPV16 在宫颈癌发病中的作用有着不可忽视的意义。目前 HPV E5 基因的研究远远落后于 E6、E7, E5 对于 HPV 的增殖以及其在宫颈癌各发展阶段中的作用,其转化细胞的机理,仍需进一步深入探讨, E5 在 HPV 自然感染中起何种作用至今仍不清楚。因此,对 HPV16E5 的生物学特性进行广泛深入研究非常必要。

结 语

近年来,我国的学者在 HPV 变异、克隆、体外表达及疫苗的研究等方面作了大量的工作,尽管我国有一些资料表明 HPV16 核苷酸序列与标准株(德国株)存在一些变异,但对该变异引起的相应蛋白功能的改变及其他生物学行为的改变研究较少。目前的研究多数存在样本较小的问题,在宫颈癌高发地区发现的一些变异对于宫颈癌高发的机制是否起到作用尚待研究。另外, HPV 的分型及变异与宫颈癌的病理分型、临床分期尚缺乏研究。这都是我们下一步的研究的方向,并且要在大量人群研究中证实。

参考文献:

1. Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, et al. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. Vaccine 2001; 19(17-19): 2549.
2. Stewart A, Eriksson A, Manos M, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective[J]. Journal

- of Virology 1997, 71(3):2463-2472.
3. Hol S, Chans Y, Chow V, et al. Sequence variants of human papilloma virus type 16 clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. Clin Microbiol, 1991,(Sept):1765~1772
 4. Da-Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, et al. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. J Cell Physiol 2001; 186(2): 169.
 5. Lcempgle J, Sathya P, Miller D, et al. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papilloma virus type 6 and 16. Virology, 1991, 184:101~1076.
 6. Luism AS, Sharonp W, Robera B, et al. Polymorphism of the HPV16 E6 gene of cervical carcinomas. Int J Oncol, 1995, 7(2):261~2668.
 7. Fujinaga Y, Kazawa K, Nishikawa A, et al. Sequence variation of human papilloma virus type HPV16 E7 in preinvasive and in invasive cervical neoplasias. Virus Genes, 1994, 9(1):85~92.
 8. 袁育康, 楚雍烈, 刘延娜, 等. 应用PCR技术克隆人乳头瘤病毒16型E6基因. 西安医科大学学报, 1995, 16(3):235~237.
 9. 苏应斌, 赵文先, 伍欣星, 等. 人乳头瘤病毒16型E7基因的体外扩增及其克隆和序列分析. 中国病毒学, 1995, 10(4):303~308.
 10. 伍欣星, 赵文先, 丁晓华, 等. 湖北地区宫颈癌组织中人乳头瘤病毒16型E7基因的分离、克隆和序列分析. 中国病毒学, 1996, 11(3):220~224.
 11. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, et al. Human papilloma virus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6 L2 and L1 coding segments[J]. Journal of Virology, 1995, 69:127743-7753.
 12. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human Papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. J virol, 1997, 71(3): 2463-2472.

13. Vousden K H, J Doniger J A Dipaolo. The E7 ORF of HPV16 encode a transforming gene[J]. Oncogene Res, 1988, 167-175.
14. Barbosa M S, Lowy D R, Schiller J T. papilloma virus polypeptides E6 E7 are zine-binging proteins[J]. J Virol, 1998, 63:1404-1407.
15. yang E, Eirilsson A et al. Human papilloma virus 16 E5 gene mutation in cervical cancer. Gen Virol. 1999, 80:595-600.
16. Eschl D, Durst M, Meulen JT, et al. Geographical dependence of sequence variationin the E5 gene of human papilloma virus 16. General Virol, 1992, 73:1829~18329

研究生在读期间撰写文章

1. 刘欣, 刘国炳, 庞战军, 等. PCR 直接测序法检测宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 DNA. 第一军医大学学报, 2005, 25(2):201-3.
2. 刘国炳, 刘欣, 庞战军, 等. HPV 高危类型检出率与宫颈癌临床的关系. 广东医学杂志, 2005, 26 (5): 64-66.
3. 刘欣, 刘国炳, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16E7 序列多态性及同源性分析 第一军医大学学报, 2005, 25(10)
4. 刘国炳, 刘欣, 庞战军, 等. 宫颈癌患者盆腔淋巴结 HPV DNA 检测的临床意义 中华肿瘤防治杂志, 2005, 6
5. 刘国炳, 刘欣, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16E6 序列多态性及同源性分析 中华肿瘤防治杂志
6. 刘欣, 刘国炳. 我国宫颈癌组织中的 HPV16E 基因变异的研究进展 医学综述

第一军医大学学报, 2005, 25 (2): 201-203

PCR 直接测序法检测宫颈癌组织中 HPV-DNA

刘欣¹, 刘国炳¹, 庞战军¹, 邢福祺¹, 郭遂群¹, 马文丽², 郑文岭² (第一军医大学¹ 南方医院妇产科, ² 分子生物学研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 探索检测宫颈癌组织中 HPV-DNA 的有效手段。方法 采用 HPV 通用引物对宫颈癌标本中的 HPV L1 区基因序列进行 PCR 扩增, 根据 PCR 产物序列分析对 HPV 分型。结果 50 例宫颈癌组织 HPV-DNA 的检出率为 78%, 其中 HPV16 和 HPV18 型混合感染最多见, 检测出 1 例 HPV58 型, 其 L1 区基因序列与德国标准株 58 型比对, 未发现碱基变异。结论 PCR 直接测序法是对宫颈癌组织中 HPV 检测和分型的一种有效方法, 并可检测到 HPV 少见的特殊类型, 同时也能提供已知的 HPV 型别的突变信息。

关键词: 人类乳头瘤病毒; 聚合酶链反应; 测序分析; 宫颈癌

中图分类号: R373.9 文献标识码: A

Detection of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissue by PCR-Direct sequencing approach

LIU Xin¹, LIU Guo-bing¹, PANG Zhan-jun¹, XING Fu-qi¹, GUO Sui-qun¹, MA Wen-li², ZHENG Wen-ling²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, ²Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore an effective method for the detection of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissue. **Methods** HPV L1 gene fragment in cervical cancer tissue was amplified by HPV-specific PCR with general consensus primers. The types of HPV was identified by PCR product sequencing. **Results** The positive rates of high-risk HPV types in 50 cases of cervical cancer is 78%. And the

mixed infection with HPV16 and HPV18 was the most common, accounts for 48%. Additionally, type 58 HPV was detected in one case. Sequencing results showed no difference of L1 sequence between the sample and German standard strain. **Conclusions** PCR-Direct sequencing approach was an effective way for the detection and typing of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissue, through which we could find the rare special types. At the same time, it can also showed the mutation of HPV DNA sequence.

Key words: Human papillomavirus; Polymerase chain reaction; Sequence analysis; Cervical cancer

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)家族包含 100 多种类型,近 95% 的宫颈癌病例涉及 15 种 HPV, 包括 HPV-16、18、31、33、35、45、51、52、58、59。宫颈癌组织中 4 种最常见的高危 HPV 类型为: 16、18、45 和 31 型^[1]。HPV 类型在人群及宫颈癌病例中的分布呈现明显的地域特征^[2]。来自世界各国的宫颈组织标本的研究发现, HPV16 和 HPV18 型检出率最高, 没有明显的地区差别^[3]。而有些特殊的 HPV 型别则有明显地理位置的差异, 如 HPV45 在非洲西部常见, HPV39 和 59 型仅在美洲的中部及南部宫颈癌组织中出现, HPV52 和 58 型在中国妇女中检出率较高^[4]。但我国除了 HPV16 和 HPV18 型以外的特殊 HPV 类型检出率极低, 相关研究的文献报道也极少。本研究采用 PCR 直接测序法检测出宫颈癌组织中高危 HPV58 型 1 例, 为这方面的研究提供了一个有效的途径。

1. 材料与方法

1.1 材料

收集南方医院 2003 年 1 月至 2004 年 5 月共 50 例宫颈癌患者手术切除的病变宫颈组织。病理学诊断其中 45 例为宫颈鳞状上皮癌, 5 例为宫颈腺癌, 留取手术切除的病变组织, 投入液氮速冻。

1.2 试剂和引物

动物基因组 DNA 提取试剂盒购于北京鼎国生物技术的发展中心。TaKaRa Taq

DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、dNTP Mixture、6×Loading Buffer、marker DL2000 均购自宝生物工程（大连）有限公司。PCR 产物纯化试剂盒购自申能博彩生物科技有限公司。

引物设计参考国外文献^[5]中的HPV PCR通用引物：

GP5 5' -TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC- 3' , Y=T or C ,

GP6 5' -GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC- 3'

引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 宫颈癌组织中总 DNA 的提取 取 300mg 的宫颈组织，液氮研磨成粉末，将粉末移入 1.5ml 离心管中，加入 1ml 5N 异硫氰酸胍，震荡混匀，室温放置 5 分钟。12000rpm 离心 5 分钟。将上清移入 5ml 离心管中，加入 2.5ml 4N NaClO₄、20 μl RNase A(10mg/ml)、50 μl Resin,充分混匀，室温放置 20 分钟。≥8000rpm 离心 5 分钟，弃上清。加入 1 ml 4N NaClO₄充分混匀，≥8000rpm 离心 1 分钟，弃上清。加入 1 ml 无水酒精洗液，充分混匀，≥8000rpm 离心 1 分钟，弃上清。重复 1 次。≥12000rpm 离心 1 分钟，吸干上清，室温晾干约 5 分钟，使乙醇挥发殆尽。加入 TE buffer 300μl 混匀,50℃水浴 5 分钟。≥12000rpm 离心 1 分钟，上清液即为 DNA。

1.3.2 目的基因片段的 GP-PCR(general primers-PCR)扩增 取各例宫颈癌组织 DNA 为模板，用上述通用引物 GP5、GP6 进行 HPV-DNA L1 区基因序列的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μl，其中含样品宫颈癌组织 DNA 3 μl 约 3ng，浓度为 1 U / ml 的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶 10 μl, dNTP 5pmol、引物 GP5、GP6 各 20 pmol 、双蒸水 5 μl，以 2ng 的 HPV18（德国标准株）质粒为阳性对照。94℃预变性 5min，95℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 45s，33 个循环后再延伸 7min。进行 2%琼脂糖凝胶电泳。

1.3.3 PCR 产物的纯化 按照 PCR 产物纯化试剂盒使用说明的方法操作，将 PCR 反应液移至 1.5ml Eppendorf 离心管中，加入 400 μl Sloution B,将 3S 柱放入收集管，把混合液转移到柱内，不要盖上离心管盖，室温放置 2 分钟，1000rpm

离心 1 分钟。倒掉离心管中的废液，将 3S 柱放入同一收集管中，加入 600 μ l Wash Solution, 1000rpm 离心 1 分钟,并重复一次。倒掉离心管中的废液，将 3S 柱放入同一收集管中，1000rpm 离心 2 分钟。将 3S 柱放入一根新的离心管中，在 3S 柱膜中央加三蒸水 15 μ l, 不要盖上离心管盖，室温放置 2 分钟，1000rpm 离心 1 分钟。离心管中的液体即为纯化后的 DNA。

1.3.4 PCR 产物的序列测定 分别用 GP5、GP6 两引物，将 PCR 产物在 DNA 序列自动分析仪（3730 型）上测序。通过正反两个方向对目的基因的正链及负链进行测序，可排除不足 800bp 长待测基因内的核苷酸错配的可能。本课题实验及测序部分均在第一军医大学分子生物学研究所完成。

1.3.5. HPV 型别鉴定 将测出的序列进行 Blast 序列比对进而对 HPV 分型。

2 结 果

2.1 宫颈癌组织 HPV-DNA 的检测阳性率

宫颈癌组织经 GP-PCR(general primers PCR)扩增结果（图 1），阳性对照 HPV18 质粒经扩增后在 140bp 处出现 DNA 带。



图 1 HPV-DNA PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 2% agarose gel electrophoresis of the HPV-DNA PCR products

M: DNA marker LD-2000; Lane1: .HPV18 positive control; Lanes2-7: DNA samples of cervical cancer tissue; Lanes8: negative control

2.2 宫颈癌组织中各型别 HPV-DNA 的检出率

在所有 50 例宫颈癌组织中,检测出 HPV DNA 情况如下: 检测出 HPV-DNA 情况如下: HPV16 和 HPV18 型混合感染最多 18 例, 占 36%, 单纯 HPV16 型感染 15 例, 占 30 %, 单纯 HPV18 型感染 5 例, 占 10%, 检出 HPV58 型感染 1 例, 占 2 %。

2.3 宫颈癌组织中检测到少见的特殊类型 HPV58 型 1 例

通过扩增出的 L1 序列与基因库中相应型别的 HPV L1 段进行 Blast 序列比较, 在广东地区的 50 例宫颈癌组织中检测到少见的特殊类型 HPV58 型 1 例。其 PCR 产物部分测序结果 (图 2)

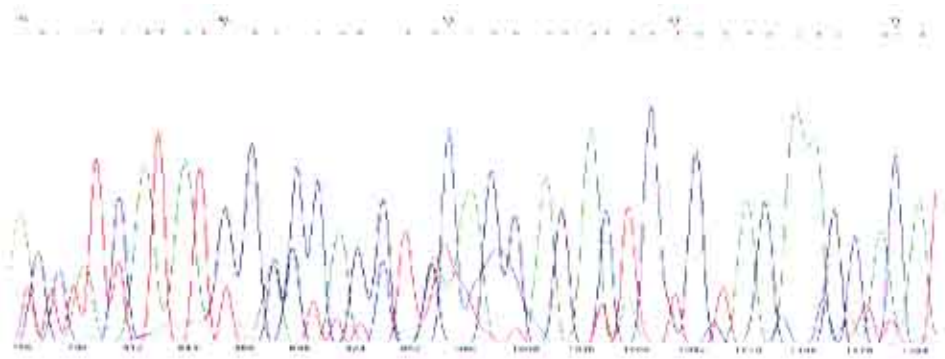


图 2 HPV58 型的 PCR 产物部分测序图

Fig.2 Part sequence analysis of the PCR product of type 58 HPV

3 讨 论

目前的流行病学和生物学资料已经证明 HPV 感染是宫颈癌及其癌前病变的最主要病因^[6]。因此检测 HPV-DNA 可能有以下 3 方面的作用: 对难以定性的不典型鳞状上皮细胞 (ASCUS) 和低级别宫颈脱落细胞涂片结果作进一步判断; 对高级别宫颈上皮内瘤样病变和局限性 (微小) 浸润癌进行治疗后监控; 宫颈癌的初步筛查——单独应用或与细胞学方法相结合。HPV 尚不能在

体外培养, 所以检测它就需严格的依赖对其 DNA 序列的分子水平检查^[7], 随着 HPV 的相关研究越来越深入, 现在已经有了很多用于 HPV 的检测甚至是定量检测的方主要有细胞学法、斑点印迹法、Southern 杂交、原位杂交、PCR 直接分型法、PCR-杂交法和 PCR-RFLP(限制性片断多态分析)。材料也可以是石蜡标本、新鲜标本或者是宫颈管分泌物。由于研究方法的不同, 患者所处地区不同, 所得的结果也不尽相同, 有的差异很大, 有的甚至得出相反的结论。

最初使用的细胞学法操作容易且较便宜, 但所需标本量大而且敏感性及特异性都低, 已淘汰不用了。斑点印迹法虽然有中度敏感性及特异性, 因使用放射性同位素其应用受到极大限制。Southern 杂交法因不能定位, 操作麻烦, 不易大规模临床使用。也有学者采用非同位素原位杂交法对宫颈细胞系进行特定位点表达的研究^[8], 通过确认特定基因的表达来证实宫颈 HPV 感染的存在, 但因程序较复杂、易脱片和特异度低而较少应用。

聚合酶链反应 (PCR) 因具有快速、灵敏和特异性强的优点得到了广泛的应用, 因此我们采用 PCR 直接测序法检测宫颈癌组织中 HPV-DNA, 通过一次通用引物的 PCR 扩增反应可以做大范围临床标本的 HPV 基因筛查。PCR 直接测序法使用的可扩增出 L1 基因片段的引物是位于多态性、特异型序列两侧的保守序列, 通过扩增出的 L1 序列与基因库中相应型别的 HPV L1 段进行 Blast 序列比较, 可以同时检测到组织中的同源性很差的多种 HPV 类型, 有利于 HPV 少见的特殊类型的检测。本研究采用该方法分析广东地区新鲜宫颈癌组织中 HPV-DNA 的类型, 高危型 HPV-DNA 的检出率为 78%, 其中 HPV16 和 HPV18 型混合感染最多 18 例, 占 36%。同时发现了少见的 HPV58 型 1 例, 根据其 L1 区基因序列与德国标准株 58 型比对, 未发现碱基变异, 判定为标准株 HPV58 型。根据序列比对发现碱基变异有助于判定 HPV 的亚型及型内变异, 在探讨不同地区 HPV 型别与宫颈癌发病率的关系及宫颈癌的疫苗研制方面起到指导性的作用^[9]。PCR 直接测序法也可以进行多重 PCR 扩增, 同时分析多个 DNA 序列。在取材方式相同的情况下实施定量 PCR (RQ-PCR) 则可以通过监测 PCR 的反应动力曲线得知病毒的含量。近年来有学者将 PCR 方法与

Bioanalyzer 芯片分析系统结合在 HPV 的早期检测和分型中具有重要的应用价值^[10]。

随着 PCR 的发展,人们发现它的优点也正是缺点,由于灵敏度高,因而假阳性率偏高,可能是引物或标本的 DNA 污染造成的,认真处理所有 DNA 标本,同时采用尿嘧啶-N-糖基化酶这种方法防止污染可有效地克服这一缺点。

参考文献:

- [1] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J of Clin Pathol. 2002, 55(4): 244-246.
 - [2] Bosch FX, Rohan T, Schnieder A, et al. Papillomavirus research update: Highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. J Clin Pathol 2001; 54(3): 163.
 - [3] Lobbard I, Vincent Salomon A, Validire P, et al. Human Papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer[J]. Clin Oncol 1998, 169(7): 2613-9.
 - [4] McLachlin C M. Human Papillomavirus in cervical nerplasia. Role, risk factors and implications[J].Clin Lab Med 2000, 20(2): 257-70.
 - [5] Juan Carlos Feoli-Fonseca, Luc L, Pierre Brochu, et al. human papillomavirus study of 691 Pathological Specimens From Quebec by PCR-Direct Sequencing Approach[J]. J Med Virol 2001, 63(4): 284-92.
 - [6] Walboomers J M, Jaclbs M V, Manos M M, et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J].J Pathol 1999,189(1):12-19.
 - [7] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer a World Perspective. J of the National Cancer Institute.1995;87:796-802.
 - [8] 丁守怡, 吴荣. 原位杂交测肿瘤坏死因子 mRNA 在宫颈细胞及子宫内膜组织的定位表达[J] 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 244-6.
- DING Shou-yi, WU Rong. Detection of tumor necrosis factor mRNA expression in human cervix and endometrium by in situ hybridization[J]. J First Mil Med

Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(3): 244-6.

[9] Rower D, Lacey C. Toward a human papilloma virus vaccine[J]. Dermatol Clin, 1998, 16 (4) : 835-838.

[10]刘翠华, 马文丽, 石嵘,等. Agilent 2100 Bioanalyzer 在人乳头瘤病毒检测中的应用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 213-5.

LIU Cui-hua, MA Wen-li, SHI Rong, et al. Application of Agilent 2100 Bioanalyzer in detection of human papilloma virus[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 213-5.

致 谢

衷心感谢我的导师邢福祺教授、刘国炳副教授三年来对我学业上、生活上无微不至的关怀和教导。导师渊博的专业知识、崇高的人格品德、严谨的治学态度、丰富的临床经验、无私的敬业精神以及敏锐的科研洞察力都将使我终身受益，是我一生为人从医的楷模。我将永远珍惜和怀念这三年的师生情谊和共度的美好时光。

衷心感谢南方医院妇产科庞战军博士在课题设计、论文撰写方面的指导，以及对我的耐心教诲和严格要求，从试验研究到论文的写作无不渗透着他的心血。

衷心感谢南方医院生殖中心陈士岭教授对我学业上、生活上无微不至的关怀和教导，并给我机会在妇科领域进一步学习深造。感谢南方医院妇产科郭遂群副教授、张军护士长及全体医护人员对我的实验取材和临床工作无私的帮助和大力支持，使我的专业理论知识和临床技能方面都有了很大的提高。

衷心感谢分子生物学教研室马文丽主任对我的课题设计、科研实验等方面的指导和帮助，感谢分子生物学教研室张宝博士在实验方法和实验技术方面的指导和帮助，正是有了他们无私的帮助和鼓励，使我能够最终顺利地完成任务。

感谢师兄孔令红、师姐李红、张曦倩，同学李劲、王剑莉、邵紫韞、李军、彭毅同学在学习和生活上对我的热情帮助。

感谢学校研究生处、南方医院医教部和研究生管理大队的各位领导三年来对我的教育以及无私的关怀和支持。

由衷的感谢我的家人特别是爱人对我学业的全力支持，没有他们的支持和鼓励就没有今日的万言文章。搁笔之时，对亲人的感激之情已不能言表。

感谢所有曾经鼓励和帮助过我的人们。

第一军医大学

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。除与外单位合作项目将予以明确方式规定外，本研究已发表与未发表成果的知识产权均归属第一军医大学。

本人承诺承担本声明的法律效果。

作者签名：刘欣

日期：2005年 5月 2/日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权第一军医大学可以将本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和汇编本学位论文。

本学位论文属于（请在以下相应方框内打“√”）：

1、保密□，在___年解密后适用本授权书。

2、不保密□。

作者签名：刘欣

日期：2005年 5月 2/日

导师签名：刘国栋

日期：2005年 5月 2/日

作者: [刘欣](#)
学位授予单位: [第一军医大学](#)
被引用次数: 1次

参考文献(62条)

1. [Lehtinen M, Dillner J Preventive human papillomavirus vaccination](#) 2002(01)
2. [Bosch Fx, Rohan T, Schnieder A Papillomavirus research update:Highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference](#) 2001(03)
3. [Bosch FX, Lorincz A, Munoz N The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer](#) 2002(04)
4. [Kaufmann AM, Nieland J, Schinz M HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination](#) 2001(02)
5. [Adams M, Borysiewicz L, Fiander A Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer](#)[外文期刊] 2001(17-19)
6. [Da-Silva DM, Eiben GL, Fausch SC Cervical cancer vaccines:emerging concepts and developments](#) 2001(02)
7. [Yamada T, Manos MM, Peto J Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers:a worldwide perspective](#) 1997(03)
8. [Pang T, Hu X, Mazurenko N Multiple variants of HPV16 E6 gene in crvical invasive squamous cell carcinoma](#) 2002(2A)
9. [许雪梅, 宋国兴, 司静懿, 刘世德, 李昆 人乳头瘤病毒16型转换基因的序列分析](#)[期刊论文]-[基础医学与临床](#) 2000(5)
10. [赵蔚明, 周亚滨, 权衡 宫颈癌组织中HPV 16 E6C基因变异的研究](#) 1999(04)
11. [丁晓华, 伍欣星, 苏应斌 子宫颈癌中人乳头瘤病毒16型E7基因检测及变异分析](#) 1996(05)
12. [许雪梅, 司静懿, 刘世德 中国山东地区妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒16E6E7基因的分离、克隆和序列分析](#)[期刊论文]-[中国医学科学院学报](#) 1999(3)
13. [Lobbard I, Vincent Salomon A, Validire P Human Papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer](#) 1998(07)
14. [McLachlin C M Human Papillomavirus in cervical nerplasia. Role, risk factors and implications](#) 2000(02)
15. [Juan Carlos Feoli-Fonseca, Luc L, Pierre Brochu human papillomavirus study of 691 Pathological Specimens From Quebec by PCR-Direct Sequencing Approach](#) 2001(04)
16. [Walboomers J M, Jaclbs M V, Manos M M Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide](#) 1999(01)
17. [Bosch FX, Manos MM, Munoz N Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer a World Perspective](#) 1995
18. [丁守怡, 吴荣 原位杂交测肿瘤坏死因子mRNA在宫颈细胞及子宫内膜组织的定位表达](#)[期刊论文]-[第一军医大学学报](#) 2002(3)

19. [Rower D, Lacey C Toward a human papilloma virus vaccine 1998\(04\)](#)
20. [刘翠华, 马文丽, 石嵘, 欧阳谦, 彭翼飞, 郑文岭 Agilent 2100 Bioanalyzer在人乳头瘤病毒检测中的应用\[期刊论文\]-第一军医大学学报 2003\(3\)](#)
21. [李西启, 徐廷香, 赵秀娥, 王涛, 王剑波, 刘彦仿 应用原位PCR和原位杂交技术检测宫颈癌及癌前病变组织中HPV DNA\[期刊论文\]-临床与实验病理学杂志 2001\(1\)](#)
22. [曾仁山, 王建琴, 黎志刚, 唐绍生, 刘衍彬, 许剑荣 广州地区尖锐湿疣患者皮损中HPV-DNA的检测与分型\[期刊论文\]-中国皮肤性病杂志 2000\(3\)](#)
23. [Lobbard I, Vincent-Salomon A, Validire P Human Papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer 1998](#)
24. [Marielle A E, Nobbenhuis, Jan M, M Walboomers Theo JM Helmerhorst Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening 1999](#)
25. [Melchers W JC, Clars H C J, Quint W GV Use of the polynerease chain reaction to study the relationship between human papillomavirus infections and cervical cancer 1991](#)
26. [彭小萍, 李孟达, 李俊东, 李经略, 叶永照, 林妙卿 宫颈癌患者外周血中HPV6. 11、HPV16. 18、HSV II及HCMV DNA的检测\[期刊论文\]-中国肿瘤临床 2002\(4\)](#)
27. [邵永胜, 彭开勤, 张彤, 刘丽江, 龚少敏, 张应天 细胞角蛋白免疫组化染色在乳癌淋巴结转移检测中的价值\[期刊论文\]-中国实用外科杂志 1997\(2\)](#)
28. [Lehtinen M, Dillner J Preventive human papillomavirus vaccination 2002\(01\)](#)
29. [Welling GW, Weijer WJ, Van eler Zeer Pediction of sequential antigenic regions in proteins 1985\(02\)](#)
30. [Nakagawa S, Watanabe S, Yoshikawa H Mutation analysis of Human Papillomavirus typel6E6 protein:transforming function for human cells and degradation of p53 in vitro 1995\(02\)](#)
31. [Yamada T, Manos MM, Peto J Human Papillomavirus typel6 sequence variation in cervical cancers:a worldwide perspective 1997\(03\)](#)
32. [Gao L, Walter J, T ravers P Tumor-associated E6 protein of Human Papillomavirus type 16 contains an unusual H-2Kb restricted cytotoxic T cell epitope 1995\(12\)](#)
33. [Nakagawa S, Watanabe S, Yoshikawa H Mutation analysis of Human Papillomavirus typel6E6 protein:transforming function for human cells and degradation of p53 in vitro 1995\(02\)](#)
34. [Saiki R K, Gelfand D H, Erlich H A Primer directed enzymatic amplification of DNA polymerase 1988](#)
35. [Vousden K H, J Doniger, J A Dipaolo The E7ORF of HPV16 encode a ransforming gene 1988](#)
36. [Barbosa M S, Lowy D R, Schiller J T papilloma virus polypeptides E6 E7 are zine-binding proteins 1998](#)
37. [Fuinage Y, Kazawa K, Nishikawa A Sequence variation of Human papillomavirus type 16 E7 in preinasive and invasive cervicasl neoplasias 1994](#)
38. [Icenogle J, Sathya P, Miller D Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and 16 1991](#)
39. [Eschl D, Durst M, Meulen J Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus 16 1992](#)
40. [Stewart A, Eriksson A, Manos M Human papillomabvirus type 16 sequence variation in cervi-cal](#)

[cancers:a worldwide perspective](#) 1997(03)

41. [Hol S, Chans Y, Chow V](#) [Sequenc evariants of human papillomo virus type 16 clinical samples permit verification and extension of epide miological studies and construction of aphylogenetic tree](#) 1991(09)

42. [Da-Silva DM, Eiben GL, Fausch SC](#) [Cervical cancer vaccines:emerging concepts and developments](#) 2001(02)

43. [Lcempgle J, Sathya P, Miller D](#) [Nucleotide and aminoacid sequence variationin the Lland E7 open reading frames of human papilloma virus type 6 and 16](#) 1991

44. [Luism AS, Sharonp W, Robera B](#) [Polymorphism of the HPV16 E6 gene of cervical carcinomas](#) 1995(02)

45. [Fujinaga Y, kazawa K, Nishikawa A](#) [Sequence variation of human papilloma virus type HPV16 E7 in preinvasive and in vasive cervical neoplasias](#) 1994(01)

46. [袁育康, 楚雍烈, 刘延娜](#) [应用PCR技术克隆人乳头瘤病毒16型E6基因](#) 1995(03)

47. [苏应斌, 赵文先, 伍欣星](#) [人乳头瘤病毒16型E7基因的体外扩增及其克隆和序列分析](#)[期刊论文]-[中国病毒学](#) 1995(4)

48. [伍欣星, 赵文先, 丁晓华](#) [湖北地区宫颈癌组织中人乳头瘤病毒16型E7基因的分离、克隆和序列分析](#)[期刊论文]-[中国病毒学](#) 1996(3)

49. [Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL](#) [Human papilloma virus type 16 variant lineages in United States popu-lations characterized by nucleotide sequence analysis of theE6 L2and L1 coding segments](#) 1995

50. [Yamada T, Manos MM, Peto J](#) [Human Papillomavirus typel6 sequence variation in cervical cancers:a worldwide perspective](#) 1997(03)

51. [Vousden K H, J Doniger, J A Dipaolo](#) [The E7ORF of HPV16 encode a transforming gene](#) 1988

52. [Barbosa M S, Lowy D R, Schiller J T](#) [papilloma virus polypeptides E6 E7 are zine-binding proteins](#) 1998

53. [yang E, Eirilsson A](#) [Human papilloma virus 16 E5 gene mutation in cervical cancer](#) 1999

54. [Eschl D, Durst M, Meulen JT](#) [Geographical dependence of sequence variationin the E5 gene of human papilloma virus 16](#) 1992

55. [Bosch FX, Lorincz A, Munoz N](#) [The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer](#) 2002(04)

56. [Bosch FX, Rohan T, Schnieder A](#) [Papillomavirus research update:Highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference](#) 2001(03)

57. [Lobbard I, Vincent Salomon A, Validire P](#) [Human Papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer](#) 1998(07)

58. [McLachlin C M](#) [Human Papillomavirus in cervical nerplasia. Role, risk factors and implications](#) 2000(02)

59. [Juan Carlos Feoli-Fonseca, Luc L, Pierre Brochu](#) [human papillomavirus study of 691 Pathological Specimens From Quebec by PCR-Direct Sequencing Approach](#) 2001(04)

60. [Walboomers J M, Jacobs M V, Manos M M](#) [Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide](#) 1999(01)

61. [Bosch FX, Manos MM, Munoz N](#) [Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer a World Perspective](#) 1995
62. [Rower D, Lacey C](#) [Toward a human papilloma virus vaccine](#) 1998(04)

本文读者也读过(10条)

1. [龙颖颖](#) [外周血hnRNA2/B1基因检测对非小细胞肺癌的诊断意义](#)[学位论文]2007
2. [曾桂胜, 黄少浩, 李志刚, 陈肇杰, 张艳芳](#) [农村妇女HPV基因检测联合液基细胞学检查结果分析403例](#)[期刊论文]-[中国社区医师\(医学专业\)](#) 2011, 13(14)
3. [陆品红](#) [子宫内膜异位症生物治疗的基础研究](#)[学位论文]2005
4. [孙洁](#) [白血相关基因检测及横纹肌肉瘤治疗研究](#)[学位论文]2007
5. [杨兵](#) [鸡传染性贫血病毒PCR检测试剂盒的研制及应用](#)[学位论文]2004
6. [覃艳红](#) [PML/RAR α 融合基因检测及与RAR α 基因发生断裂融合的新伙伴基因的筛选方法的建立](#)[学位论文]2007
7. [许本健](#) [交通事故司法鉴定案例分析](#)[会议论文]-2006
8. [谢芳, 黎云, 彭秀红, 李洁明, XIE Fang, LI Yun, PENG Xiu-hong, LI Jie-ming](#) [人乳头瘤病毒分型基因检测和液基细胞学检查在宫颈癌前病变中的诊断作用](#)[期刊论文]-[国际医药卫生导报](#)2011, 17(11)
9. [冯旺琴](#) [SLP-2基因在子宫内膜癌组织中的表达及其功能研究](#)[学位论文]2005
10. [臧永宏](#) [CD44v6、C-myc在宫颈鳞癌中的表达及意义](#)[学位论文]2005

引证文献(1条)

1. [王瑜敏, 张文辉, 陈洁, 丁鸿燕, 余方友, 洪万东, 潘钦石, 诸海燕, 林晓梅, 温秀姝](#) [宫颈癌妇女人乳头瘤病毒16 E6/E7基因变异分析](#)[期刊论文]-[现代实用医学](#) 2012(8)

引用本文格式: [刘欣](#) [宫颈癌组织中人乳头瘤病毒基因检测及其E基因变异的研究](#)[学位论文]硕士 2005