

黑龙江省地区尖锐湿疣组织病原感染趋势及序列分析

郭庆云¹ 庄敏^{2*} 李迪² 谷鸿喜²

(1. 牡丹江林业中心医院检验科 黑龙江 牡丹江 157011;

2. 哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江 哈尔滨 150081)

【摘要】 目的:分析黑龙江省尖锐湿疣组织中感染的人乳头瘤病毒(HPV)感染基因型分布趋势,并对 HPV18 L1 和 L2 序列进行分析,了解有无变异。**方法:**提取 56 例尖锐湿疣组织标本中 DNA,用 HPV L1 区通用引物及 HPV 6b、HPV11、HPV16、HPV18 型 L1 区特异引物进行 PCR 扩增,分析尖锐湿疣组织中感染的 HPV 型别分布并进一步将筛选出的 1 例 HPV18 型阳性标本中的 L1、L2 基因进行克隆,构建克隆质粒 pBluescript - HPV18 L1 和 pBluescript - HPV18 L2,测序分析其基因变异情况。**结果:**56 例标本中,HPV 6b 和 11 型感染例数分别为 15 和 28 例,各占 26.7% 和 50%; HPV 16 型感染 3 例,占总例数 5.4%; 有 2 例合并 HPV6b/11 型混合感染,占 3.6%; 1 例合并 HPV11/18 型的混合感染,占 1.8%; HPV6b/11/16 感染 2 例,占 3.6%; 其它型别 5 例,占 8.9%。HPV18 L1 开放读码框 PCR 扩增产物片段大小为 1.7kb,与预期结果相同。重组质粒 pBluescript - HPV18 L1 克隆片段 18 L1、基因测序后,与原始序列相比有一处点突变 G74A,为氨基酸第二位密码子,属错义突变,氨基酸由精氨酸变为谷氨酰胺,重组质粒 pBluescript - HPV18 L2 克隆片段 18 L1 基因测序后,与原始序列相比存在三处同义突变, A345C, C904A, G1260A。存在三处错义突变, T509C, 氨基酸由缬氨酸变为丙氨酸; G529T, 氨基酸由丙氨酸变为丝氨酸; T1115C, 氨基酸由苯丙氨酸变为丝氨酸。**结论:**黑龙江省地区尖锐湿疣组织 HPV DNA 检出率为 100%,以低危型别 11 和 6b 型为主,偶见高危型别 16、18 型感染,黑龙江省地区 HPV18 分离株晚期基因 L1 经克隆测序后确认存在一处错义突变, G74A, 氨基酸由精氨酸变为谷氨酰胺。HPV18 分离株晚期基因 L2 经克隆测序后确认存在三处同义突变, A345C, C904A, G1260A。存在三处错义突变, T509C, 氨基酸由缬氨酸变为丙氨酸; G529T, 氨基酸由丙氨酸变为丝氨酸; T1115C, 氨基酸由苯丙氨酸变为丝氨酸。

【关键词】 尖锐湿疣;人乳头瘤病毒;L1 区;L2 区**【中图分类号】** R 751 **【文献标识码】** AINFECTION TENDENCY AND SEQUENCE ANALYSIS OF
HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN ACUMINATE COMDYL
OMA BIOPSIES FROM PATIENTS IN HEILONGJIANG

Guo Qing - Yun et al

(Department of Test Mudanjiang Forestry Central Hospital, Mudanjiang, 157011, China)

[Abstract] Objective: To analyze distribution of human papillomavirus types (HPV) in acuminate condyloma biopsies in Heilongjiang province and sequencing of HPV18 L1 and L2 gene. **Methods:** Selection of HPV DNA positive samples in condyloma acuminate biopsies was carried out using HPV 6b, 11, 16, 18 type specific primers. The ratio of HPV genotypes in 56 samples was analyzed. Only one HPV18 positive sample was found among 56 biopsies. The open reading frame (ORF) of HPV 18 L1 gene and HPV 18 L1 gene was cloned into plasmid pBluescript after amplification by PCR and sequenced. **Results:** HPV 6b and HPV 11 were the most common types, 15 cases (26.7%) and 28 cases (50%), respectively; three were type 16 (5.4%); two were HPV 6b and HPV11 overlapped (3.6%); one biopsy was HPV 11 and HPV18 overlapped (1.8%); two were HPV 6b, HPV11 and HPV 16 overlapped (3.6%); others were other types overlapped (8.9%). It indicated the local type of HPV 11 represented the epidemic strain in Heilongjiang province. ORF of HPV18 L1 gene HPV18 L2 was obtained from one biopsy. Sequence analysis showed that there was the mutation of one nucleoside in HPV18 L1 gene and the mutation of three nucleoside in HPV18 L2 gene, G74A, comparing with original

【基金项目】 黑龙江省青年基金(QC03C04);黑龙江省卫生厅课题(2004-174)**【作者简介】** 郭庆云(1972-),女,硕士研究生,从事检验研究工作。*** 通讯作者:** 庄敏, E-mail: zhuangmin999@hotmail.com

isolate. The amino acid of Arginine was mutated into Glutamine. T509C, comparing with original isolate. aminoisovaleric acid was mutated into Alanine. G529T, comparing with original isolate, the amino acid of Alanine was mutated into Serine. T1115C, comparing with original isolate, the amino acid of Arginine was mutated into Glutamine. The amino acid of phenylalanine was mutated into Serine. **Conclusion:** All of these acuminate condyloma biopsies were HPV positive. The most common types in acuminate condyloma were HPV11 and HPV6b, whereas the high risk types HPV16 and HPV18 were also found. The HPV18 L1 and HPV18 L2 isolate contained the mutation of one nucleoside, G74A, comparing with original isolate. The amino acid of Arginine was mutated into Glutamine. T509C, comparing with original isolate. aminoisovaleric acid was mutated into Alanine. G529T, comparing with original isolate. The amino acid of Alanine was mutated into Serine. T1115C, comparing with original isolate. The amino acid of Arginine was mutated into Glutamine. The amino acid of phenylalanine was mutated into Serine.

[Key words] Human Papillomavirus, HPV; Acuminate condyloma; L1 gene; L2 gene

乳头瘤病毒(Papilloma Virus, PV)是一组无包膜的小 DNA 病毒,包括多种动物的乳头瘤病毒和人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus, HPV)。目前已被鉴定超过 100 多种型别,各型别之间无明显交叉保护存在。主要侵犯人的皮肤和粘膜,导致不同程度的增生性病变,属于 DNA 肿瘤病毒,大小约 8kb。HPV 基因组主要包括三个部分:早期区、晚期区、调控区。其中晚期区基因 L1 编码主要衣壳蛋白,免疫原性稳定,是制备基因工程疫苗较理想的候选基因。噬皮肤性 HPV 主要感染鳞状上皮,常引起青少年、儿童的扁平疣;手足部跖疣等。嗜粘膜性 HPV 则主要侵犯粘膜,其中 HPV 低危型别以 HPV6 型和 11 型别为主,可引起扁平疣和尖锐湿疣;HPV 高危型别 16 和 18 型等与宫颈癌、外阴癌、口腔癌、食管癌、皮肤癌等多种恶性肿瘤的发生有关。Warl-boomers 等用敏感的通用引物 PCR 系统对 22 个国家 39 所医院的 1035 例宫颈癌标本进行检测,发现 HPV 的检出率为 99.7%^[1]。本研究以尖锐湿疣组织 DNA 为模板,分别用 HPV6b、11、16、18 型特异引物进行 PCR 鉴定。对筛选出的 1 例 HPV18 阳性的临床尖锐湿疣组织标本选择高保真(Pfu)DNA 聚合酶用 PCR 法扩增,分别得到横跨 HPV18 L1 和 HPV18 L2 开放读码框的 L1、L2 全基因片段,并分别进行了克隆测序。

1 材料与方法

1.1 标本 尖锐湿疣组织标本采自牡丹江市妇产医院 26 例,哈尔滨医科大学第一临床医学院皮肤科 30 例,临床诊断为尖锐湿疣的患者,共 56 例。活检标本存入小离心管中,立即 -20℃ 冻存待用。

1.2 主要试剂 组织、细胞 DNA 提取试剂盒(Axygen 公司);Taq DNA 聚合酶,10 × PCR buffer, dNTP Mixture 购自 TakaRa 宝生物工程有限公司;D2000 Marker、λDNA/Hind III 和 200bp ladder 为 TIANGEN 公司产品。Pfu DNA 聚合酶(5U/μL),购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶 EcoR I、Hind

III(10U/μL),购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶(5U/μL),购自 Invitrogen 公司;小量柱离心式 DNA 胶回收试剂盒,购自上海华舜生物工程有限公司;核苷酸序列测定由北京英骏公司完成

1.3 仪器 PTC-200 BIO-RAD DNA 扩增仪;Tanon2010 天能凝胶图象处理系统。

1.4 实验方法(1) 标本组织 DNA 提取及 PCR 引物设计:按试剂盒说明书提取尖锐湿疣组织标本 DNA。PCR 扩增所用通用引物根据文献^[3]从 HPV L1 区中选取保守序列设计。HPV 6b 型、11 型、16 型和 18 型特异引物分别根据 GeneBank 中所查 L1 基因序列数据,比较后设计 HPV6b 和 11 横跨 L1 完整开放读码框架(ORF),HPV16 和 18 型引物扩增 L1 部分片段,引物序列见表 1。(2) HPV L1 基因扩增及型别鉴定:分别以提取的尖锐湿疣组织 DNA 为模板进行 PCR 扩增。每标本均首先用通用引物扩增,再分别以型特异引物进行扩增。型特异引物扩增反应参数为,95℃ 预变性 8min,95℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 1.5min,35 个循环,末次循环后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。(3) pBluescript-HPV18 L1 和 pBluescript-HPV18 L2 重组质粒的构建:(1) 酶切目的基因与载体:将回收的 PCR 产物 HPV18 L1 片段和 HPV18 L2 片段和 pBluescript 克隆质粒分别用 EcoR I 和 Hind III 进行双酶切,应用 Hind III 的 M buffer,37℃ 作用 3h,这样在一个体系中就完成了 EcoR I、Hind III 双酶切。(2) 酶切产物的回收:酶切完毕后,酶切产物分别用 DNA 凝胶回收试剂盒回收,按 PCR 产物回收步骤进行。(3) 克隆质粒与目的片段的连接 将酶切回收后的 HPV18 L1 和 HPV18 L2 片段与 pBluescript 质粒定量,分别按摩尔数载体与目的基因 1:3 的比例进行连接,转化感受态大肠杆菌 DH5α,筛选与鉴定。(4) pBluescript-HPV18 L1 和 pBluescript-HPV18 L2 重组质粒测序,利用 GeneRunner,BLAST 软件对 HPV18 L1 和 HPV18 L2 基因进行比较。

表 1 HPV L1 区型特异 PCR 引物
Table 2 type specific primers for HPV L1 gene

引物 序号	扩增 HPV 型别	序列 (5' ~ 3')	所加酶切 切位点	目的片段大小(bp)
P1	HPV6 型上游引物	5' - cagatgtggcggcctagcga - 3'		HPV6b L1 全长 1503
P2	HPV6 型下游引物	5' - attaccttttagttttggcgccg - 3'		
P3	HPV11 型上游引物	5' - cagatgtggcggcctagcga - 3'		HPV11 L1 全长 1506
P4	HPV11 型下游引物	5' - acacaacacactgacacatatattactt - 3'		
P5	HPV16 型上游引物	5' - cttatgcagcaaatgcaggtgt - 3'		HPV16 L1 区部分序列 460
P6	HPV16 型下游引物	5' - gctaaattgcagtagaccagag - 3'		
P7	HPV18 型上游引物	5' - aggggtcctgcaggtgggtg - 3'		HPV18 L1 区部分序列 711
P8	HPV18 型下游引物	5' - tgccaggtgaagcagcata - 3'		
P9	HPV18 型全长上游引物	5' - aagaattcatgtgcctgtatacagggtcc - 3'	EcoR I	HPV18 L1 区全长序列 1707
P10	HPV18 型全长下游引物	5' - ccaagcttttacttcctggcagctacag - 3'	Hind III	

2 结 果

2.1 序列特异引物进行 PCR 扩增的结果 提取 56 例尖锐湿疣组织标本的 DNA, 序列特异引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳及 EB 染色, 在紫外灯下观察 DNA 条带。将 56 例尖锐湿疣组织提取的 DNA 分别用 HPV 6b、11、16、18 型特异引物扩增, 结果 HPV 6b 和 HPV 11 型在 1500bp 处出现特异条带为阳性(图 1); HPV 16 型和 HPV 18 型分别在 460bp(图 2)和 711bp(图 3)处出现特异条带。本研究序列特异引物 PCR 鉴定 HPV 感染的检出率为 100%。

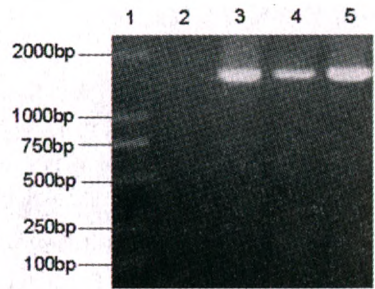


图 1 HPV6b 和 HPV11 型特异引物 PCR 鉴定尖锐湿疣组织中 HPV 感染
1: 标准分子量 D2000; 2: 阴性对照; 3, 4: 尖锐湿疣组织 HPV11 型特异引物 PCR 扩增产物, 约 1.5kb; 5: HPV6b 型特异引物 PCR 扩增产物, 约 1.5kb

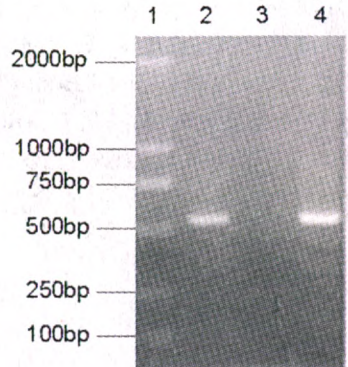


图 2 HPV16 型特异引物 PCR 鉴定尖锐湿疣组织中 HPV 感染

1: 标准分子量 D2000; 2: pBluescript - HPV - 16L1 质粒^[2] PCR 扩增产物; 3: 阴性对照; 4: 尖锐湿疣组织中 HPV16 型特异引物 PCR 扩增产物, 引物 PCR 扩增产物约 460bp

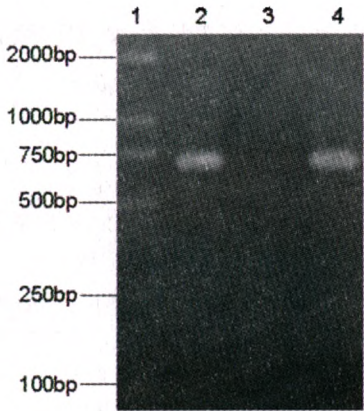


图 3 HPV18 型特异引物 PCR 鉴定尖锐湿疣组织中 HPV 感染

1: 标准分子量 D2000; 2: pUC19 - HPV18L1 质粒^[3] 扩增产物; 3: 阴性对照; 4: 尖锐湿疣组织中 HPV18 型特异物, 约 711bp

2.2 56 例标本中 HPV 型别检测结果 用 HPV 型特异引物对 56 例标本进行 PCR 扩增后, 分析其感染的 HPV 型别见表 2。在所检测的标本中 HPV11 和 6b 型检出率最高, 分别占总量的 26.7% 和 50%, 两者重叠感染占 2%, HPV11 型和 18 型重叠感染占 1.8%, HPV6b、HPV11 和 HPV16 型重叠感染占 3.6%, 其它感染占 8.9%。

表2 型特异性引物 PCR 鉴定尖锐湿疣组织中感染的 HPV 型别

HPV 型别	阳性例数	阳性率(%)
6b	15	26.7
11	28	50.0
16	3	5.4
6b + 11	2	3.6
11 + 18	1	
1.8		
6b + 11 + 16	2	3.6
其它型别	5	8.9
合 计	56	100%

2.3 pBluescript - HPV18 L1 和 pBluescript - HPV18 L2 质粒的克隆和鉴定 将 HPV18 型 L1 和 L2 的 PCR 扩增产物分别克隆入 PBluescript 质粒。筛选阳性克隆,分别提取重组质粒 PBluescript - HPV18 L1 和 PBluescript - HPV18 L2 及 PBluescript 质粒,分别用 EcoRI、HindIII 进行单酶切及双酶切鉴定,酶切产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳后紫外灯下观察。线状质粒 PBluescript 大小约 3.0kb,线状重组质粒 PBluescript - HPV18 L1 大小约为 4.7kb,双酶切后,可见大小为 1.7kb 的 HPV18 L1 基因和 3.0kb 的载体基因。说明重组质粒 pBluescript - HPV18L1 连接正确(图 4)。线状重组质粒 PBluescript - HPV18L2 大小约为 4.3kb,双酶切后可见大小为 1.4kb 的 HPV18 L1 基因和 3.0kb 的载体基因。说明重组质粒 pBluescript - HPV18L2 连接正确(图 5)。

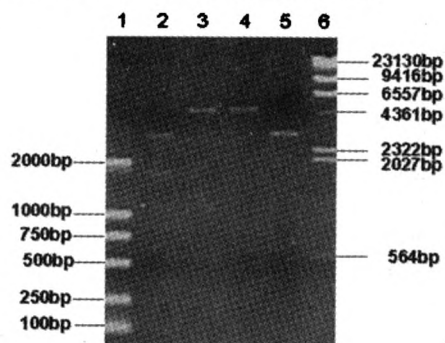


图4 PBluescript - HPV18 L1 重组质粒的酶切鉴定

1: D2000 标准分子量;2: pBluescript - HPV18 L1/ EcoRI + Hind III 双酶切 1.7kb + 3.0kb;3: pBluescript - HPV18 L1/ EcoRI 单酶切 4.7kb;4: pBluescript - HPV18 L1/ Hind III 单酶切 4.7kb;5: pBluescript 空载体 EcoRI 单酶切 3.0kb;6: λDNA/Hind III 标准分子量

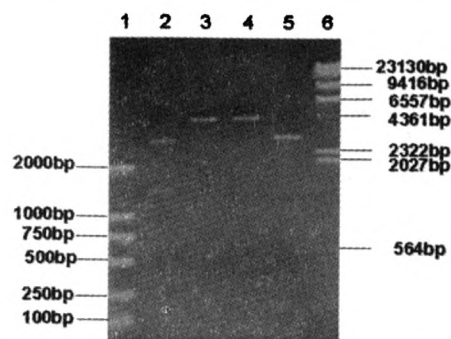


图5 PBluescript - HPV18 L2 重组质粒的酶切鉴定

1: D2000 标准分子量;2: pBluescript - HPV18 L2/ EcoRI + Hind III 双酶切 1.4kb + 3.0kb;3: pBluescript - HPV18 L1/ EcoRI 单酶切 4.4kb;4: pBluescript - HPV18 L1/ Hind III 单酶切 4.4kb;5: pBluescript 空载体 EcoRI 单酶切 3.0kb;6: λDNA/Hind III 标准分子量

2.4 HPV18 L1、L2 基因核苷酸序列测定 为了鉴定 PCR 产物的核苷酸序列,利用测序引物对 3 株连接阳性的克隆进行测序分析。pBluescript - HPV18 L1 重组质粒序列测定,分别从克隆片段两端接头处,进行全序列测定。测序结果用 GeneRunner、BLAST 软件进行分析。测序结果进一步确认克隆基因片段为 HPV18 L1 基因,克隆出的 3 株 HPV18 型 L1 基因的核苷酸序列一致,与原始序列^[4]相比较发现有一处碱基发生突变,是在第 74 位的碱基为 A,而原始序列为 G。这一处影响到所编码的氨基酸,为错义突变,氨基酸由精氨酸变为谷氨酰胺。HPV18 分离株晚期基因 L2 经克隆测序后确认存在三处同义突变, A345C, C904A, G1260A, 未影响到所编码的氨基酸。存在三处错义突变,影响到所编码的氨基酸,为错义突变, T509C, 氨基酸由缬氨酸变为丙氨酸; G529T, 氨基酸由丙氨酸变为丝氨酸; T1115C, 氨基酸由苯丙氨酸变为丝氨酸,无碱基缺失插入。

3 讨论

HPV 感染可引起宫颈癌和尖锐湿疣等多种疾病,主要通过性接触传播也可通过其它方式交叉感染。HPV 感染是引起宫颈癌的首要因素,有研究表明 99.7% 的宫颈癌组织中存在有 HPV DNA。HPV16 和 18 型属高危型别,由此两型病毒引起的宫颈癌占全部宫颈癌的 70% 以上。HPV16 型作为高危型别可以引起 50% 左右的宫颈癌发生,在过去的十年里被诊断的鳞状细胞癌病例中 HPV16 占 61.2%, HPV18 占 17.7%, HPV52 占 14.7%, and HPV58 占 9.9%, 而腺癌中 HPV18 占 56.3%, 腺鳞细胞癌 HPV16 占 50.0%^[5]。由此两型病毒引起的宫颈癌占全部宫颈癌的 70% 以上。由于大多数人对感染的了解有限,没有充分意识到感染的性质、危害与宫颈癌的关系,导致大规模检测难以开展,临床不能及时进行早期诊断,致使宫颈癌的发病率仍居高不下。宫颈癌不仅严重威胁妇女健康,还给社会、家庭带来沉重的经济负担,已经成为重大社会问题,而且近年来有年轻化的趋势,中国宫颈癌发生率及死亡率占全世界的 1/3。尖锐湿疣病变大部分由 HPV 的低危型别 6 和 11 型感染所致,少部分由高危型别 16、18 型感染引起, HPV11 型和 6 型,偶引起细胞癌变。生殖道 HPV 感染在许多国家中近 10 年间保持稳定,有的甚

至下降。而在我国目前已跃居性病的第二位^[6],感染率呈上升趋势。人乳头瘤病毒具有传染性强、潜伏期长和易复发等特点。HPV 持续感染取决于以下三方面因素:病毒因素、宿主因素和环境因素。高危型 HPV 感染的妇女宫颈病变的危险性高于低危型感染妇女,尤其是与 HPV16 型呈强相关性^[7,8],病毒可侵入受感染的鳞状细胞内,与细胞染色体整合,呈现整合状态或游离状态。

HPV 感染后,主要外膜蛋白抗体的滴度可以许多年维持在可检测水平,使血清学检测难以区分既往感染和现在感染。因此 HPV 检测主要依赖于病毒核酸的检测。本研究对 56 例尖锐湿疣临床标本进行了 HPV6b,11,16,18 型别特异的 PCR 鉴定,选取横跨 L1 区的 ORF 的 6 和 11 型别特异的引物,16 和 18 是在 L1 区内选取型特异的序列,从而将这四型 HPV 区分开来,在各标本中均有不同型别 HPV 被检出(表 2)。56 例标本中,低危型别 HPV11 型感染占 50%,HPV6b 型占 26.7%,与 Grc 等^[9]报道的 HPV6b 型占多数不太一致,可能由于地理位置及种族不同,感染 HPV 基因类型也有所不同。在检测的 56 例标本中,2 例是 HPV6b/11 的双重感染,2 例是 HPV6b/11/16 的多重感染,1 例是 HPV11/18 的双重感染,与 Panotopoulou E^[10]等报道的 HPV11/18 型常重叠感染相一致,混合感染的存在提示 HPV 具有型特异性,各型别之间无交叉保护。此种混合感染在宫颈病变中的作用也不可忽视,在一定程度上多型别感染对宫颈病变及宫颈癌的发展起促进作用^[11]。在本研究中我们发现 1 例 HPV18 感染阳性的标本,根据我们课题组以往的调查研究,在我省宫颈癌组织中 HPV18 型感染的检出率很低。国内外的相关调查中尖锐湿疣组织 HPV 高危型别的感染率差别较大,在 1%~20% 之间,少数报道没有检测出 HPV16,18 型感染^[12]。

HPV 型别有着明显的地区分布差异,国内外的相关调查中 HPV 高危型别的感染率差异较大。明确一个地区 HPV 流行的主要型别,可在预防性疫苗的设计上提供帮助。根据感染型别尤其对 HPV 高危型别感染可以跟踪感染者,监测病变发展情况,及时采取适当的治疗措施,评估预后。HPV 检测应用于 HPV 病毒学研究、流行病学研究和疫苗开发时,需要具有高度敏感性和重复性的方法评估 HPV 各基因型可能的分布,尽可能获得 HPV 在人群中流行状态的最大信息,同时弄清楚病毒感染过程的细节。本次通过对尖锐湿疣组织 HPV 的检测,反映出目前黑龙江省地区 HPV 感染的分子流型学特点,为研究 HPV 疫苗提供基础。

选择理想的目的基因是研制基因工程疫苗的关键环节。HPV 基因组中 L1 基因高度保守,在外界的筛选压力下变异幅度极小,核酸序列也相对稳定,L1 编码的病毒主要衣壳蛋白能自行组装成 VLP,同时刺激机体产生保护性免疫。为了分别构建 HPV18 L1 和 HPV18 L2 基因重组质粒,用于疫苗的生产,本研究中分别选用自行设计的 HPV18 型 L1 和 L2 基因的特异性引物,对筛选出的 1 例 HPV18 阳性的临床尖锐湿疣组织标本用 PCR 法扩增,为了降低 L1 和 L2 基因在 PCR 扩增中的碱基突变率,在实验中选择高保真(Pfu)DNA 聚合酶。分别得到横跨 HPV18 L1 和 L2 开放读码框的 L1 和

L2 全基因片段,并分别进行了克隆测序。筛选 3 个 HPV18 L1 阳性克隆进行测序,结果通过 GeneRunner,BLAST 软件分析,显示三株 HPV18 L1 序列一致,其序列与 1986 年 Dartmann^[4]发表的 HPV18 L1 原始序列相比较,发现了一处核苷酸序列的点突变,是在第 74 位的碱基为 A,而原始序列为 G,为氨基酸的第二位密码子,影响到蛋白序列,属错义突变,氨基酸由精氨酸变为谷氨酰胺。筛选 1 个 HPV18 L2 阳性克隆进行测序,结果通过 GeneRunner,BLAST 软件分析,其序列与原始序列相比较,存在三处同义突变,A345C,C904A,G1260A,未影响到所编码的氨基酸。存在三处错义突变,影响到所编码的氨基酸,为错义突变,T509C,氨基酸由缬氨酸变为丙氨酸;G529T,氨基酸由丙氨酸变为丝氨酸;T1115C,氨基酸由苯丙氨酸变为丝氨酸,无碱基缺失插入。国外报导 HPV18 基因组开放读码框架 HPV18 发生错义置换较 HPV45 和 HPV16 增加^[13]。这说明同型 HPV 不同分离株之间只有少数点突变造成差异,核酸序列很少发生插入、缺失和移码,否则可能会破坏病毒的活性。我们分离的 HPV18 L1 和 L2 基因地方株存在氨基酸的变异,这个变异是否影响到 VLP 的形成和其 VLP 组装效率,或者是否影响到 VLP 的构象依赖表位的形成都要在今后的实验中进行探讨。总之,我们分离的 HPV18L1 和 HPV18L2 地方株可以用于今后进一步构建 VLP 的真核表达系统,为进一步制备 HPV 单价及多价基因工程疫苗提供了实验基础。

参考文献

- [1] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189(1):12-19.
- [2] 庄敏,谷鸿喜,李迪,等. HPV-16-11 L1 双价重组杆状病毒的构建及 VLP 形成[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(9):771-774.
- [3] 李迪,谷鸿喜,庄敏,等. 人乳头瘤病毒重组质粒的构建及蛋白表达[J]. 中国公共卫生杂志,2004,20(4):433-435. 58.
- [4] Dartmann K, Schwarz E, Gissmann L, zur Hausen H. The nucleotide sequence and genome organization of human papillomavirus type 11. *Virology.* 1986; 151(1):124-130.
- [5] Chan PK, Ho WC, Yu MY, et al. Distribution of human papillomavirus types in cervical cancers in Hong Kong: current situation and changes over the last decades. *Int J Cancer.* 2009; 125(7):1671-7.
- [6] 叶顺章. 性病诊断与预防[M]. 第 1 版,北京:人民卫生出版社,2002;252.
- [7] Lee GY, Kim SM, Rim SY, Choi HS, Park CS, Nam JH. Human papillomavirus (HPV) genotyping by HPV DNA chip in cervical cancer and precancerous lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2005; 15(1):81-87.
- [8] Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities.

- J Natl Cancer Inst. 2005; 97(14):1066-1071.
- [9] Grce M, Husnjak K, Skerlev M, Lipozenci J, Paveli K. Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Res.* 2000; 20 (3B): 2097-2102.
- [10] Panotopoulou E, Tserkezoglou A, Kouvoussi M, Tsiaousi I, Chatzieleftheriou G, Daskalopoulou D, Magiakos G. Prevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, 18, 31, and 33 in a cohort of Greek women. *J Med Virol.* 2007; 79(12):1898-1905.
- [11] 苏光, 钱莉芸, 刘阳等. 多重乳头瘤病毒感染检测在宫颈病变诊断中的价值[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007; 23(9):706-707.
- [12] De Marco F, Di Carlo A, Poggiali F, Muller A, Marcante ML. Detection of HPV in genital condylomata: correlation between viral load and clinical outcome. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001; 20(3):377-383.
- [13] Chen Z, DeSalle R, Schiffman M, Herrero R, Burk RD. Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *J Virol.* 2009; Feb;83(3):1443-55.
- 收稿日期:2011-09-21

妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇肝功能变化与母儿预后关系的探讨

王彩波 张亚光

(昆山市第一人民医院妇产科 江苏 昆山 215300)

【摘要】目的:探讨妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)孕妇肝功能变化与母儿预后的关系。方法:对我院2005~2010年确诊为ICP的140例孕妇临床资料进行回顾性分析。结果:血清谷丙转氨酶(ALT) > 40 U/L、总胆红素(TBIL) > 28 μmol/L的孕妇,产后出血及早产、胎儿窘迫的发生率增高,且ALT水平越高,其发生率越高。结论:ICP孕妇肝功能的变化可预测母儿预后,ALT及TBIL水平升高者胎儿预后不佳,必须高度重视,严密监护,适时终止妊娠。

【关键词】妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP);肝功能;胆红素;母儿预后

【中图分类号】R 71 【文献标识码】A

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE PREGNANCY SERUM BILE ACID LEVEL OF INTRAHEPATIC CHOLESTASIS OF PREGNANCY AND PROGNOSIS OF MOTHER AND FETUS

Wang Cai-bo et al

(First People's Hospital, Kunshan, Jiangsu, 215300)

【Abstract】Objective: To investigate the relationship between the pregnancy serum bile acid level of intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) and prognosis of mother and fetus in intrahepatic cholestasis of pregnancy. Methods: Clinical data of 140 cases with complete history and delivery record were retrospectively analyzed between 2005 to 2010. Results: the pregnancy serum glutamic pyruvic transaminase (ALT) > 40 U/L, Total bilirubin (TBIL) > 28 μmol/L, the incidences of postpartum hemorrhage and premature birth and fetal distress in studying group were higher than those in control group. The higher ALT level is, the higher its incidence rate occurs. Conclusion: The maternal hepatic function can be used to prognosis of mother and fetus. The ALT of mothers with high level serum transaminase and bilirubin is bad, so they must be taken great attention and monitored closely, the pregnancy should be ended timely.

【Key words】 Intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP); liver function, bilirubin, prognosis of mother and fetus

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是由多种因素所致的妊娠中晚期胆汁淤积于肝细胞及肝内胆管,导致孕妇肝功能异常及血中胆汁酸水平升高,临床上出现瘙痒、黄疸等症状的妊娠特发性疾病^[1],对胎

儿危害严重,可致胎儿宫内窘迫、早产、突发胎死宫内、死产,妊娠妇女因皮肤瘙痒使生活质量下降、肝功能异常致产时、产后出血等。本文对2005-01~2010-01我院收治的140例ICP孕妇的临床资料进行了回顾性分析,现报道如下。

【作者简介】王彩波(1976-),主治医师,本科,从事妇产科学研究工作。

作者：[郭庆云](#)，[庄敏](#)，[李迪](#)，[谷鸿喜](#)
作者单位：[郭庆云\(牡丹江林业中心医院检验科 黑龙江牡丹江157011\)](#)，[庄敏,李迪,谷鸿喜\(哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江哈尔滨150081\)](#)
刊名：[牡丹江医学院学报](#)
英文刊名：[Journal of Mudanjiang Medical University](#)
年，卷(期)：2011, 32 (6)
被引用次数：1次

参考文献(13条)

1. [Walboomers JM;Jacobs MV;Manos MM;Bosch FX Kummer JA Shah KV Snijders PJ Peto J Meijer CJ Mu?oz N Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide](#)[外文期刊] 1999(01)
2. [庄敏;谷鸿喜;李迪 HPV-16-11 L1双价重组杆状病毒的构建及VLP形成](#)[期刊论文]-[中华微生物学和免疫学杂志](#) 2006(09)
3. [李迪;谷鸿喜;庄敏 人乳头瘤病毒重组质粒的构建及蛋白表达](#)[期刊论文]-[中国公共卫生](#) 2004(04)
4. [Dartmann K;Schwarz E;Gissmann L;zur Hausen H The nucleotide sequence and genome organization of human papillomavirus type 11](#)[外文期刊] 1986(01)
5. [Chan PK;Ho WC;Yu MY Distribution of human papillomavirus types in cervical cancers in Hong Kong:current situation and changes over the last decades](#)[外文期刊] 2009(07)
6. [叶顺章 性病诊断与预防](#) 2002
7. [Lee GY;Kim SM;Rim SY;Choi HS Park CS Nam JH Human papillomavirus \(HPV\) genotyping by HPV DNA chip in cervical cancer and precancerous lesions](#)[外文期刊] 2005(01)
8. [Castle PE;Solomon D;Schiffman M;Wheeler CM Human palillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in wuman with equivocal or mild cytologic abnormalities](#)[外文期刊] 2005(14)
9. [Grce M;Husnjak K;Skerlev M;Lipozenci?J Paveli?K Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions](#)[外文期刊] 2000(3B)
10. [Panotopoulou E;Tserkezoglou A;Kouvousi M;Tsiaousi I Chatzieleftheriou G Daskalopoulou D Magiakos G Prevalence of human papillomavirus types 6,11,16,18,31,and 33 in a cohort of Greek women](#)[外文期刊] 2007(12)
11. [苏光;钱莉芸;刘阳 多重人乳头瘤病毒感染检测在宫颈病变诊断中的价值](#)[期刊论文]-[中国实用妇科与产科杂志](#) 2007(09)
12. [De Marco F;Di Carlo A;Poggiali F;Muller A Marcante ML Detection of HPV in genital condylomata:correlation between viral load and clinical outcome](#) 2001(03)
13. [Chen Z;DeSalle R;Schiffman M;Herrero R Burk RD Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18,45,and 97](#)[外文期刊] 2009(03)

引证文献(1条)

1. [陈静宇.林新瑜. 蔺敏 尖锐湿疣组织中人乳头瘤病毒基因型的检测](#)[期刊论文]-[中国中西医结合皮肤性病学杂志](#) 2013(3)

引用本文格式：[郭庆云.庄敏.李迪.谷鸿喜 黑龙江省地区尖锐湿疣组织病原感染趋势及序列分析](#)[期刊论文]-[牡丹江医学院学报](#) 2011(6)