

分类号: R71174

密 级:

学校代码: 10062

学 号: 20092642



天津医科大学
TIANJIN MEDICAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

论文题目: TLR3 及 HPV16 E6 变异在宫颈病变中的作用研究

TITLE Study on the effect of TLR3 and HPV16 E6
mutation in cervical lesions

一级学科: 临床医学

二级学科: 妇产科学

论文作者: 毕秋英

指导教师: 瞿全新

天津医科大学研究生院

二〇一二年五月

分类号: R711.74

密 级: 不保密

学位类别: 科学学位□

学校代码: 10062

学 号: 20092642

学科门类: 医学



天津医科大学
TIANJIN MEDICAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

论文题目: TLR3 及 HPV16 E6 变异在宫颈病变中的作
用研究

**T I T L E Study on the effect of TLR3 and HPV16 E6
mutation in cervical lesions**

一级学科: 临床医学

二级学科: 妇产科学

论文作者: 毕秋英

指导教师: 瞿全新

天津医科大学研究生院

二〇一二年五月

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是我个人在导师指导下独立进行研究工作取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容和致谢的地方外，论文中不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：毕秋英 日期：2012年5月31日

学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解天津医科大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文，并编入有关数据库。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本授权书。

本论文属于

不保密 ☒。

（请在相对应的方框内打“√”）

学位论文作者签名：毕秋英 日期：2012年5月31日

导师签名：10/1/2012 日期：2012年5月31日

中文摘要

目的

探讨 TLR3、HPV 病毒负荷量在宫颈病变进展过程中的作用；探讨 TLR3 与 HPV 感染调节的关系；了解本院检测的 HPV16 E6 基因突变在宫颈病变中的分布特征，探讨 HPV16 E6 基因突变与宫颈病变进展的关系。

方法

从 54 例 HPV16 阳性患者宫颈脱落细胞标本中提取 DNA 作为模版，设计对应的引物，用 PCR 方法扩增 TLR3 和 HPV16 E6 片段，对 TLR3 和 HPV16 E6 进行半定量检测，HPV16 E6 的 PCR 产物被纯化回收后送测序。测序结果和 GenBank 中的德国标准株比对，分析基因变异情况。

结果

1. 根据宫颈病变程度分为三组，其中 A 组（包括慢性宫颈炎 14 例、CIN I 4 例）18 例、B 组（包括 CIN II-III 12 例及宫颈原位癌 6 例）18 例及 C 组（包括宫颈浸润癌）18 例，3 组患者年龄之间差异无统计学意义。（ $p=0.506$ ）。
2. 各组 TLR3 的表达：在 A 组、B 组、C 组中，TLR3 DNA 表达量分别为（ 0.6676 ± 0.0226 ）、（ 0.6484 ± 0.0353 ）和（ 0.5652 ± 0.0330 ），其表达量逐渐减低，差异有统计学意义（ $p<0.001$ ）；其在 A 组及 B 组中的表达明显高于 C 组，差异均具有统计学意义（ $p<0.001$ ； $p<0.001$ ）；在 A 组中的表达略高于 B 组，差异无统计学意义（ $p=0.066$ ）。
3. 各组 HPV16 E6 DNA 表达情况：在 A 组、B 组及 C 组中，HPV16 E6 DNA 的含量分别为（ 0.3771 ± 0.0266 ）、（ 0.6600 ± 0.0401 ）和（ 0.7393 ± 0.0271 ），其含量逐渐增加，差异有统计学意义（ $p<0.001$ ）；其在 B 组及 C 组中表达均高于 A 组，差异均有统计学意义（ $p<0.001$ ； $p<0.001$ ）；在 C 组中表达高于 B 组，差异有统计学意义（ $p<0.001$ ）。
4. 在测序成功的 53 例样本中发现 HPV16 E6 DNA 在 26 例样本中（49.06%）存在 4 个位点突变，其余 27 例样本（50.94%）未发现突变，为 E6 野生型。在 3 组标本中，热突变点为 T178G（D25E），这种变体与 HPV16 亚洲型 As 相同，此点突变在 A 组中的分布低于在 B 组和 C 组中的分布，差异均具有统计学意义（ $p<0.05$ ； $p<0.025$ ），而在 B 组和 C 组中的分布差异无统计学意义（ $p>0.25$ ）。

有 2 例宫颈癌标本发生 T241G (3.77%)。另有 2 个单例标本点突变是 G188T (L30I, 1.89%) 和 G543A (L147F, 1.89%)。

5.3 组宫颈病变中 TLR3 表达水平与 HPV16 负荷量呈负相关, 相关系数 $r = -0.637$, $p < 0.001$ 。

结论:

1. TLR3 可能在 HPV 感染的调节过程中发挥重要作用, 其可能是机体应答 HPV 感染的主要免疫机制; TLR3 在宫颈病变中表达的异常可能与宫颈细胞由宫颈癌前病变向宫颈癌的进展过程密切相关。
2. HPV16 负荷量与宫颈病变的进展密切相关, HPV16 E6 基因突变可能是轻度宫颈病变向重度宫颈病变进展过程中的重要危险因素。
3. TLR3 可能在 HPV16 E6 表达的调节过程中发挥重要作用。

关键词: 宫颈癌 HPV16 E6 TLR3 基因突变

Abstract

Objective

To explore the role of TLR3 and high-risk type human papillomavirus (HR-HPV) load in progression of cervical lesions. To determine the association between TLR3 and regulation of HPV infection. To investigate distributional characteristics of mutations of HPV16 E6 oncogene in the patients with cervical lesions in this hospital and to explore the association between of HPV16 E6 variants and progression of cervical lesions.

Methods

Cervical exfoliated cells from 54 cases with positive HPV16 were subjected to regular DNA extraction procedure. We design corresponding primers to amplify TLR3 and HPV16 E6 in order to determine them semi-quantitatively by PCR. The products of HPV 16 E6 purified and sequenced, then were carried out blast analysis against standard strain in GenBank to evaluate the genetic mutation.

Results

1. We split 54 patients with different stages of cervical lesions into three groups, group A (including 14 chronic cervicitis, 4 CIN I) has 18 cases, group B (including 12 CIN II-III, 6 cervical carcinoma in situ) has 18 cases, group C (invasive cervical cancer) has 18 cases. The ages between 3 groups have no significant differences ($p=0.506$).
2. The expression of TLR3 in 3 groups reduced gradually and the difference was significant ($p<0.001$). The expression of TLR3 was (0.6676 ± 0.0226), (0.6484 ± 0.0353) and (0.5652 ± 0.0330) respectively in group A, B and C. It was significantly higher in group A and B than in group C and the differences were both significant ($p<0.001$; $p<0.001$). The expression of TLR3 in group A was little higher than group B and the difference was not significant ($p=0.066$).
3. The expression of HPV16 E6 in 3 groups raised gradually and the difference was significant ($p<0.001$). The expression of HPV16 E6 was (0.3771 ± 0.0266), (0.6600 ± 0.0401) and (0.7393 ± 0.0271) respectively in group A, B and C. It was significantly higher in group B and C than group A and the differences were both significant ($p<0.001$; $p<0.001$). The expression of HPV16 E6 in group C was much higher than group B and the difference was significant ($p<0.001$).
4. Among the 53 cases sequenced successfully, 4 mutation spots were identified

totally in 26 cases (49.06%). The most frequent sequence variation of HPV E6 was T178G (D25E, 43.40%), which is the same with type AS. The distribution of this sequence variation in group A (3/17) is lower than that in group B (9/18) and group C (11/18), the differences were significant ($p<0.05$; $p<0.025$). The distribution of this sequence variation was not significantly different between group B and group C ($p>0.25$). 2 cases in group B and C occurred sequence variation T241G (3.77%). There are other two only one case gene mutations in group C, G188T (L30I, 1.89%) and G543A (L147F, 1.89%).

5. The expression of TLR3 and HPV16 load was Negative correlated in cervical lesions ($r=-0.637$; $p<0.001$).

Conclusions

1. TLR3 may play an important role in the regulation of HPV infection, it may be the main Immune response mechanism of the host against infected HPV. There may be significant correlation between abnormal expression of TLR3 and progression of cervical lesions.
2. HPV (especially HR-HPV) load has significant correlation with progression of cervical lesions; the mutation of HPV16 E6 may be important risk factors during the progression of cervical lesions.
3. TLR3 may play an important role in the regulation of expression of HPV16 E6.

Keywords: Cervical carcinoma HPV16 TLR3 E6 Gene mutation

中文摘要.....	I
Abstract	III
目录.....	V
符号说明.....	VII
前言.....	1
研究现状、成果.....	1
研究目的、方法.....	2
材料和方法.....	4
1.1 实验材料	4
1.1.1 实验标本.....	4
1.1.2 实验器材.....	4
1.1.3 相关试剂及耗材.....	4
1.1.4 主要液体配制.....	5
1.2 实验方法	5
1.2.1 全基因组 DNA 抽提	5
1.2.2 PCR 扩增目的片段.....	5
1.2.3 琼脂糖凝胶电泳.....	6
1.2.4 阳性 PCR 产物胶回收.....	6
1.2.5 目的条带测序	7
1.2.6 统计学方法	7
结果	8
2.1 各组间患者的年龄比较.....	8
2.2 各组患者 TLR3 DNA 表达情况.....	8
2.3 各组标本 HPV16 E6 DNA 表达情况	9
2.4 HPV16 E6 回收纯化后琼脂糖凝胶电泳	11
2.5 HPV16 E6 测序结果	11
2.6 各组宫颈病变中 TLR3 表达水平与 HPV16 负荷量的相关性.....	15
讨论.....	17
3.1 Toll 样受体 3.....	17
3.1.1 TL3 结构、定位及其配体.....	17
3.1.2 TLR3 信号转导通路.....	18
3.1.3 TLR3 抗病毒作用.....	18

3.2 HPV16 与宫颈癌的关系	19
3.2.1 HPV16 导致宫颈病变的发病机制.....	19
3.2.1.1 HPV16 E6 蛋白与 p53 蛋白	19
3.2.1.2 HPV16 E6 蛋白与 PDZ 蛋白.....	19
3.2.1.3 HPV16 E6 与端粒酶	20
3.2.2 HPV16 持续感染及病毒负荷量与宫颈病变的关系	20
3.2.3 HPV16 E6 基因变异在宫颈病变发展中的作用.....	21
3.3 TLR3 在宫颈 HPV16 感染中的作用.....	22
结论.....	24
参考文献.....	25
发表论文和参加科研情况说明.....	30
综述.....	31
人乳头瘤病毒致癌机制研究进展.....	31
综述参考文献.....	39
致谢.....	43

符号说明

缩写	英文全称	中文译名
TLR3	Toll like receptor 3	Toll 样受体 3
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤变
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
Tris	3-hydroxymethylaminomethan	三羟甲基氨基甲烷
TAE	Tris - acetic acid	乙二胺四乙酸-乙酸
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
rpm	rotate per minute	每分钟转速
EB	Ethidium Bromide	溴化乙锭
SPSS	Statistical Package for the social Sciences	社会科学统计套装软件
polyI:C	Polyinosinic-polycytidylic acid	多聚肌苷酸-多聚胞苷酸

前言

研究现状、成果

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一，是继乳腺癌之后对妇女生命健康危害最大的恶性肿瘤^[1]。调查发现全球每年新增的宫颈癌患者约高达52万，多数位于发展中国家，约占80%。我国每年新发病例多于15万，约占全球新发病例总数的1/3，我国每年大约有2~3万妇女死于宫颈癌。近些年，随着人们生活方式的转变，我国宫颈癌的发病率有上升趋势，且呈现出年轻化特点。有调查显示宫颈原位癌的高发年龄为30~35岁。如何提高宫颈癌筛查、诊断和治疗水平，是我们面临的难题。目前国内外已公认，高危型人乳头瘤病毒（Human Papillomavirus, HPV）感染是导致宫颈癌的主要病因^[2]。

HPV为乳多空病毒科A属成员，其全基因组长7900-8000bp，有9个开放读码框（Open Reading Frame, ORF），其结构按功能可分为3个编码区：包括早期转录区（early region, ER）、晚期转录区（late region, LR）和长控制区（long control region, LCR），分别占基因组的50%，40%和10%。每区可分别编码具有不同功能的多种病毒蛋白。E区编码E1—7蛋白，分别参与病毒DNA复制、转录调控和细胞转化过程。其中E6和E7蛋白是HPV病毒最重要的致癌蛋白，E6蛋白约含有150个氨基酸，E7蛋白约含有100个氨基酸，两者结构中均包含锌指结构，参与病毒复制、细胞恶性转化过程。其中E6主要通过抑制p53蛋白形成复合物，抑制p53蛋白对细胞周期的负调节功能，从而使宿主细胞获得无限增殖能力。E7蛋白主要通过与人视网膜母细胞瘤抑制蛋白（pRB）结合，使pRB降解失活，造成细胞周期调控失控，宿主细胞发生恶性转化。

L区的L1和L2主要编码病毒的衣壳蛋白，其中L1蛋白是HPV的主要衣壳蛋白，形成95%以上的衣壳；L2蛋白是HPV的次要衣壳蛋白，形成不到5%的衣壳。LCR区又称上游调节区（upstream regulatory region, URR）为非编码区，位于E区和L区之间，URR有能与转录抑制剂和激活剂结合的重叠位点，从而调节早、晚期基因的转录以及病毒复制，控制病毒蛋白和感染颗粒的产生^[3]。

HPV具有嗜上皮细胞的特性，主要感染人皮肤和黏膜上皮细胞。根据HPV感染后引起恶性病变的危险性大小，将其分为低危型（Low Risk HPV, LR-HPV）和高危型（High Risk HPV, HR-HPV）两种。LR-HPV主要引起肛周皮肤和外生殖器尖锐湿疣等良性病变，主要包括HPV6、11型等。高危型主要包括HPV16、

18、31、33型等，主要引起高级别宫颈上皮内瘤变（CIN II，CIN III）、宫颈癌、外阴癌、肛门癌等恶性肿瘤。Corusić A等^[4]研究表明，超过99%的宫颈癌与HPV有关，McLaughlin-Drubin ME等^[5]研究结果显示与高危型HPV16，18，31，33，45有关的宫颈癌比例超过97%。在HR-HPV中，HPV16和HPV18是引起宫颈癌的最常见的两种类型^[6]，HPV16与宫颈鳞癌关系最为密切，HPV18最易导致宫颈腺癌^[7]。

通过对HPV16全基因组测序，与野生型德国标准株比对，发现感染宫颈的HPV16病毒存在多种突变模式，流行病学资料显示，不同的HPV16分支具有不同的致癌潜能，可能会对临床结局产生不同的影响^[8-9]。报道显示，各类变异株在世界各地间的分布有差异，各突变型别与宫颈癌的关系也不尽相同。

研究发现，HPV病毒负荷量与宫颈高度病变密切相关，HPV的病毒负荷量越高，患CIN II、CIN III的危险性就越高；宫颈病变程度越严重，感染HPV的型别越多，病毒负荷量就越高^[10,11]。

HPV在妇女宫颈中的感染率很高，但并不是每个感染者都发展为宫颈癌，约96%的宫颈HPV感染者的病情具有自限性，只有剩下的4%感染者体内病毒不能清除，感染呈持续性，导致CIN I持续存在或进一步发展为宫颈癌^[12]，这可能与不同机体的局部免疫作用有关。宫颈局部感染HPV后，如机体局部免疫功能良好，局部免疫可发挥抗病毒作用，清除病毒；而如果局部免疫失调后，无法正常发挥抗病毒作用，而使病毒得以长期持续存在，大量繁殖，增加患宫颈癌的风险。研究发现TLRs（Toll-like Receptors, TLRs）家族在局部免疫、抗病毒感染过程中具有重要功能，TLR3属于TLRs家族，是dsRNA病毒的模式识别受体，近年发现TLR3利用细胞信号转导机制诱导先天性免疫反应，同时可直接影响后续获得性免疫系统的作用。研究也证实TLR3介导的免疫应答促使树突状细胞高表达干扰素调节因子，高分泌I型干扰素，促使自身成熟的同时，发挥对病毒最原始的打击^[13]。

原琛利等^[14]研究发现胎盘表达TLR3对保护胎儿避免宫内感染乙肝病毒有重要作用，因此认为，女性生殖道粘膜上皮细胞表达TLR3，参与局部粘膜抗细菌、病毒等病原微生物感染的先天性免疫应答。本课题组前期研究认为，TLR3/PI3K信号转导通路在宫颈癌发生发展中起重要作用，推测该通路可能为HR-HPV E6E7另一致癌途径。

研究目的、方法

有研究者认为，HR-HPV病毒负荷量与宫颈癌病变程度有关，E6是HPV16主要致癌基因，其在不同程度宫颈病变中的表达是否一致？本地区E6基因突变情况是怎样的？TLR3与宫颈病变的关系怎样？TLR3与HPV感染的关系怎样，是否为其主要免疫机制？本研究通过检测不同程度宫颈病变中的HPV16 E6 DNA量来探讨HPV16病毒负荷量与宫颈病变的关系，通过分析本医院患者宫颈组织中HPV16 E6基因突变情况，来探讨E6突变与该地区宫颈病变的关系。通过检测不同程度宫颈病变中TLR3的表达水平来探讨其与宫颈病变的关系及其与HPV感染的关系。

材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验标本

本研究选取 2009 年 3 月-2011 年 12 月间在天津市第一中心医院妇产科门诊及住院患者中行宫颈 HPV 分型检测结果为 HPV16 阳性, 且同时病理结果(来自天津市第一中心医院病理科)证实为不同程度宫颈病变的患者共 54 例作为研究样本, 根据宫颈病变程度分为三组, 其中 A 组(包括慢性宫颈炎 14 例、CIN I 4 例) 18 例, 年龄为 26-66 岁, 平均 (37.5000 ± 9.8653) 岁; B 组(包括 CIN II-III 12 例及宫颈原位癌 6 例) 18 例, 年龄 22-50 岁, 平均 (36.9444 ± 8.5782) 岁; 及 C 组(宫颈浸润癌) 18 例, 年龄为 20-58 岁, 平均 (40.3889 ± 9.8228) 岁。A 组、B 组和 C 组患者年龄之间差异无统计学意义。 $(p=0.506)$ 。收集各标本行 HPV 检测后剩余的全基因组 DNA 进行检测。

1.1.2 实验器材

- (1) 超净工作台, 离心机, 水浴锅, 电炉, 移液器等(一中心医院妇科门诊遗传室): 凯普公司。
- (2) 常温离心机: eppendorf 公司。
- (3) 漩涡混合器: 上海精科实业有限公司。
- (4) Mili-Q 超纯水系统: 美国 Millipore 公司。
- (5) PCR 仪、琼脂糖水平电泳槽: 北京六一仪器厂。
- (6) 微量移液器: Thermo 公司。
- (7) EP 管等: 美国 Costar 公司。
- (8) 4℃ 冰箱、-20℃ 冰箱: 青岛海尔公司。
- (9) FA1104A 电子天平: 上海精天电子仪器有限公司。
- (10) 微量紫外/可见分光光度计: 美国赛默飞世尔公司。
- (11) 荧光和可见光凝胶成像系统: 美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 相关试剂及耗材

- (1) 全基因组 DNA 提取试剂盒、1.5ml 离心管、移液器枪头及(一中心医院妇科门诊遗传室): 凯普公司。
- (2) PCR 所需 ZymoTaq™ PreMix、DNase/RNase-Free H₂O: 美国 Zymo 公司。
- (3) 凝胶回收试剂盒、EDTA、Tris、EB: 上海生工生物工程有限公司。

- (4) 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide,DMSO): 天津大学科威公司。
- (5) 石蜡油、琼脂糖: Solarbio公司。
- (6) DNA maker,loading buffer: 北京全式金生物技术有限公司。
- (7) PCR引物及扩增片段由生工生物工程(上海)有限公司合成, 见表1。

表 1 PCR 引物序列

	引物序列	扩增片段长度
HPV16 E6	上游引物 5-atg cac caa aag aga act gca atg ttt cag gac-3	477bp
	下游引物 5-tta cag ctg ggt ttc tct acg tgt tct tga tg-3	
TLR3	上游引物 5-aaa atc tcc aag agc ttc tat tag caa-3	119bp
	下游引物 5-ttg tat ttg att tga tga caa ctc taa tct tt-3	
β -actin	上游引物 5-cct ggg cat gga gtc ctg tg-3	305bp
	下游引物 5-agg ggc cgg act cgt cat ac-3	

1.1.4 主要液体配制: 50×TAE 缓冲液: 称量 Tris 242g, Na₂EDTA.2H₂O 37.2g 于 1L 烧杯中。向烧杯中加入 800ml 去离子水, 充分搅拌均匀, 加入 57.1ml 冰乙酸, 充分溶解, 用 NaOH 溶液将 PH 值调至 8.3, 加去离子水定容至 1L 后, 室温保存。使用时按比例稀释。

1.2 试验方法

1.2.1 全基因组 DNA 抽提: 按照凯普公司试剂盒说明书操作, 详细步骤如下:

(1) 将各临床样本于震荡器上震荡30秒充分混匀, 取500 μ l混悬液加入1.5ml离心管中, 14000rpm离心1分钟, 弃上清液。

(2) 加入400 μ l溶液I(事先在45℃水浴中预热, 溶液I成份有: Tris、NaCl、Na₂EDTA、NaOH、SDS、H₂O), 混匀后在沸水中煮15分钟。

(3) 加入400 μ l溶液II(成份为异丙醇), 于振荡器上振荡15秒混匀后, 室温下放置2分钟, 14000rpm离心5分钟, 弃上清液(务必去净)。

(4) 室温放置2分钟, 加入 60 μ l溶液III(成份为灭菌注射用水)充分溶解, 将各样品标记清楚, 放入-20℃冰箱冻存, 以备后续试验使用。

(5) 在进行下一步实验前用分光光度测定每个标本DNA含量。

1.2.2 PCR 扩增目的片段

(1) 反应体系(共25 μ l): ZymoTaq™ PreMix 12.5 μ l; DNase/RNase-Free H₂O: 8.5 μ l; 上游引物: 1 μ l; 下游引物: 1 μ l; DNA: 2 μ l。

(3)反应条件: 94℃预变性10分钟, 之后94℃变性45秒、59℃退火1分钟、72℃延伸1分钟循环35次, 最后72℃附加延伸10分钟。产物立即进行琼脂糖凝胶电泳或于-20℃冰箱保存。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳

称取 0.45g 琼脂糖, 放入小烧瓶中, 加入 1×TAE (Tris-acetate) 缓冲液溶解琼脂糖, 配制成 30ml 含琼脂糖 1.5%的溶液, 微波炉高火加热 30 秒, 直至琼脂糖完全溶解、溶液清澈透明。用胶带封闭胶板两端, 插上梳子, 待凝胶液冷却至约 60-70℃加入 0.6μl EB 溶液混匀, 倒入胶板上, 水平放置于实验台等待溶液冷却, 约需 15 分钟。待凝胶液冷却凝固后解除胶板两端胶带, 将胶板置入电泳槽中, 向电泳槽中加入 1×TAE 缓冲溶液直至液面没过凝胶表面约 1 毫米, 拔掉梳子。将样品依次点入上样孔, 上样量为 5μl, 100V 电压下电泳大约 30 分钟结束。

电泳凝胶经凝胶成像分析系统扫描、成像, 将目的条带与DNA Maker相对比, 如HPV E6目的条带单一, 位置正确, 切胶回收目的DNA。用Bio-Rad成像分析软件Quantity One分析结果, 目的DNA的相对含量=目的条带灰度值/β-actin条带灰度值。实验重复3次, 各组所得数值求平均值。

1.2.4 阳性PCR产物胶回收

按照生工生物(上海)科技有限公司提供的 DNA 凝胶回收试剂盒说明书将阳性 PCR 产物进行回收, 详细步骤如下:

- (1)切胶:PCR 产物通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳分开, 在紫外灯下用清洁的刀片割下目的 DNA 所在的凝胶并放入 1.5ml 的离心管中, 切割动作尽量快, 避免长时间的紫外光照射使 DNA 片段降解。尽可能使用长波紫外线判定 DNA 片段位置时。
- (2)体积换算:将割下的凝胶称重并将其以 $1\text{mg}=1\mu\text{l}$ 将其换算为体积。
- (3)加入粘附缓冲液, 1.5%的凝胶中加入的量为 4 倍凝胶体积。
- (4)溶解:将盛有凝胶的 EP 管置于 55℃水浴箱中加热, 每隔 2-3 分钟震荡混匀一次, 使凝胶完全溶化。
- (5)在溶胶后加入 1 倍于凝胶体积的异丙醇, 混匀。
- (6)将 EP 管中已融化的凝胶移至套在 1.5ml 离心管中的吸附柱中, 室温放置 2 分钟后 12,000rpm 离心 1 分钟。
- (7)取下吸附柱, 弃去滤液后往柱中加入 500ul 冲洗液, 室温 12,000rpm 离心 1 分钟, 重复此步骤一次。

(8)再次将吸附柱室温 12,000rpm 离心 2 分钟,可将其室温放置 10 分钟或放入恒温箱中 50℃干燥 5 分钟,使其中的酒精充分挥发。

(9)将吸附柱放入新的 Ep 管中 (1.5ml),向柱中央加入 60 度水浴箱中预热好的 40ul 洗脱缓冲液,室温放置 5 分钟,有助于提高 DNA 的洗脱效率,也可以用氢氧化钠将 PH 值调节到 8.5 后再 60℃洗脱。

(10)室温 12,000rpm 离心 1 分钟,滤液即为所回收的 DNA 片段。

(11)将回收后的 DNA 重新经琼脂糖凝胶电泳分离,证实为目的条带,置于-20℃冰箱备用。

1.2.5 目的条带测序

将回收后的 HPV E6 产物送北京科瑞杰生物公司进行双向测序。参照文献,用 blast 方法对测序结果与 Gene bank 中的德国标准株,进行核苷酸序列比对分析,观察各标本 HPV16 E6 序列突变情况。

1.2.6 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料比较用单因素方差分析,组间差异行LSD检验。点突变在不同组别分布用Kruskal-Wallis H 秩和检验。TLR3表达与HPV16 E6负荷量相关性研究采用Pearson线性相关性分析。 $p < 0.05$ 作为有统计学意义的检验标准。

结果

2.1 各组间患者的年龄比较

A组（包括慢性宫颈炎、宫颈CIN I）、B组（包括CIN II-III、宫颈原位癌）及C组（宫颈浸润癌组）3组间患者年龄比较，差异无统计学意义（ $p=0.506$ ），见表2。

表2 3组患者年龄比较

组别	年龄（ $\bar{x}\pm s$ ）
A组	37.5000 $\pm$ 9.8653
B组	36.9444 $\pm$ 8.5782
C组	40.3889 $\pm$ 9.8228
F	0.691
p	0.506
A与B	$p=0.861$
A与C	$p=0.363$
B与C	$p=0.279$

2.2 各组患者TLR3 DNA表达情况

在A组、B组及C组中，TLR3 DNA的表达量逐渐减低，差异具有统计学意义（ $p<0.001$ ）；其在A组及B组中的表达明显高于C组，差异具有统计学意义（ $p<0.001$ ； $p<0.001$ ）；在A组中的表达略高于B组，但差异无统计学意义（ $p=0.066$ ）。见表3及图1-3。

表 3 各组标本 TLR3 DNA 含量

组别	年龄 ($\bar{x} \pm s$)
A 组	0.6676 $\pm$ 0.0226
B 组	0.6484 $\pm$ 0.0353
C 组	0.5652 $\pm$ 0.0330
F	56.362
<i>p</i>	<0.001
A 与 B	<i>p</i> = 0.066
A 与 C	<i>p</i> < 0.001
B 与 C	<i>p</i> < 0.001

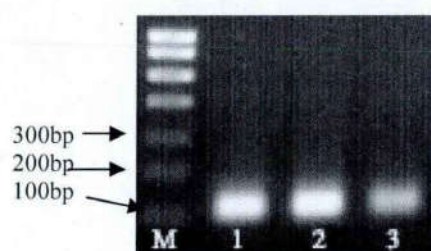


图1 为各组TLR3DNA含量

其中M: Maker; 1: A组; 2: B组; 3: C组

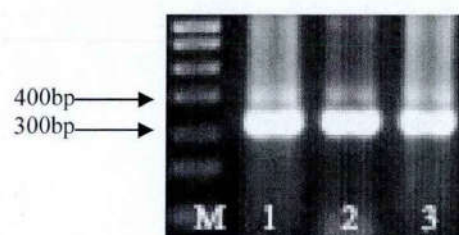


图2为各组β-actinDNA含量

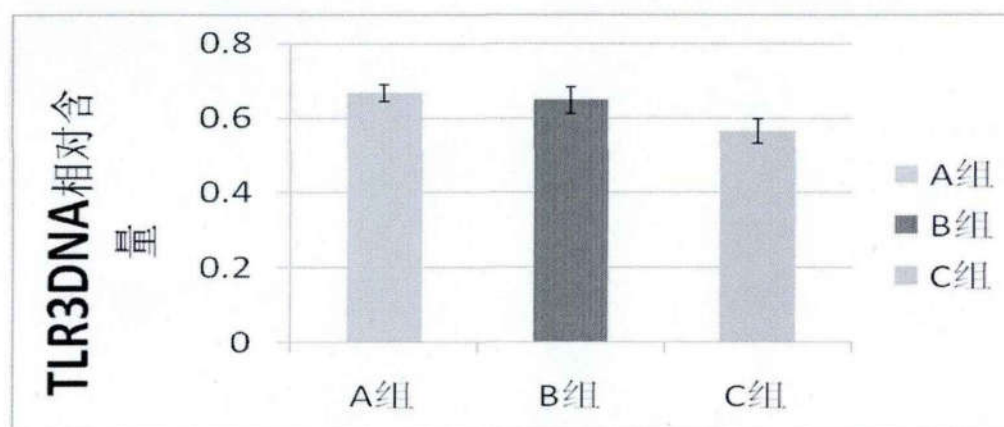


图 3 各组标本 TLR3DNA 含量

2.3 各组标本 HPV16 E6 DNA 表达情况

在3组中, HPV16 E6 DNA 的含量逐渐增加, 其在B组及C组中均高于A组, 差异均有统计学意义 ($p<0.001$; $p<0.001$); 在C组高于B组, 差异有统计学意义 ($p<0.001$); 说明 HPV16 E6 DNA 含量与宫颈病变严重程度密切相关。见表4及图4-6。

表4 各组标本 HPV16 E6 DNA 表达情况

组别	HPV E6 ($\bar{x}\pm s$)
A组	0.3771 $\pm$ 0.0266
B组	0.6600 $\pm$ 0.0401
C组	0.7393 $\pm$ 0.0271
<i>F</i>	642.123
<i>P</i>	<0.001
A与B	$P<0.001$
A与C	$P<0.001$
B与C	$P<0.001$

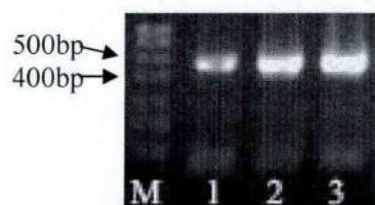
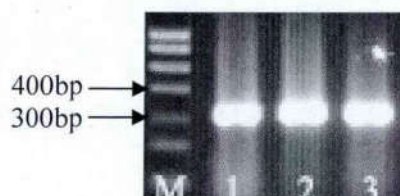


图4 为各组 HPV16E6 DNA 表达情况

图5 为各组 β -actinDNA 表达情况

其中M: Maker; 1: A组; 2: B组; 3: C组

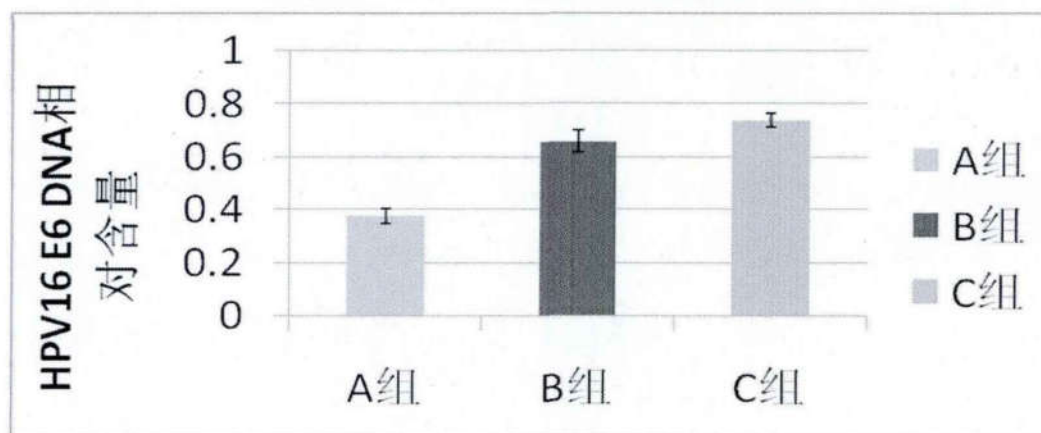


图6.各组标本 HPV16 E6 DNA 相对含量

2.4 HPV16 E6 回收纯化后琼脂糖凝胶电泳

按胶回收试剂盒说明书,将 HPV16 E6 表达阳性的标本进行回收纯化,所得纯化后 HPV16 E6 DNA 用琼脂糖凝胶电泳验证,可见条带清晰,位置正确,证明回收标本是 HPV16 E6 DNA。见图 7。

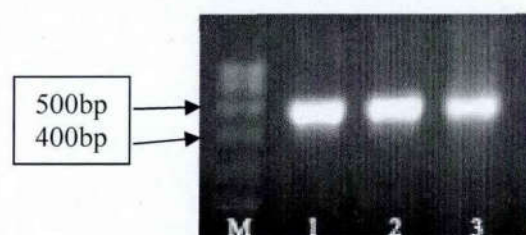
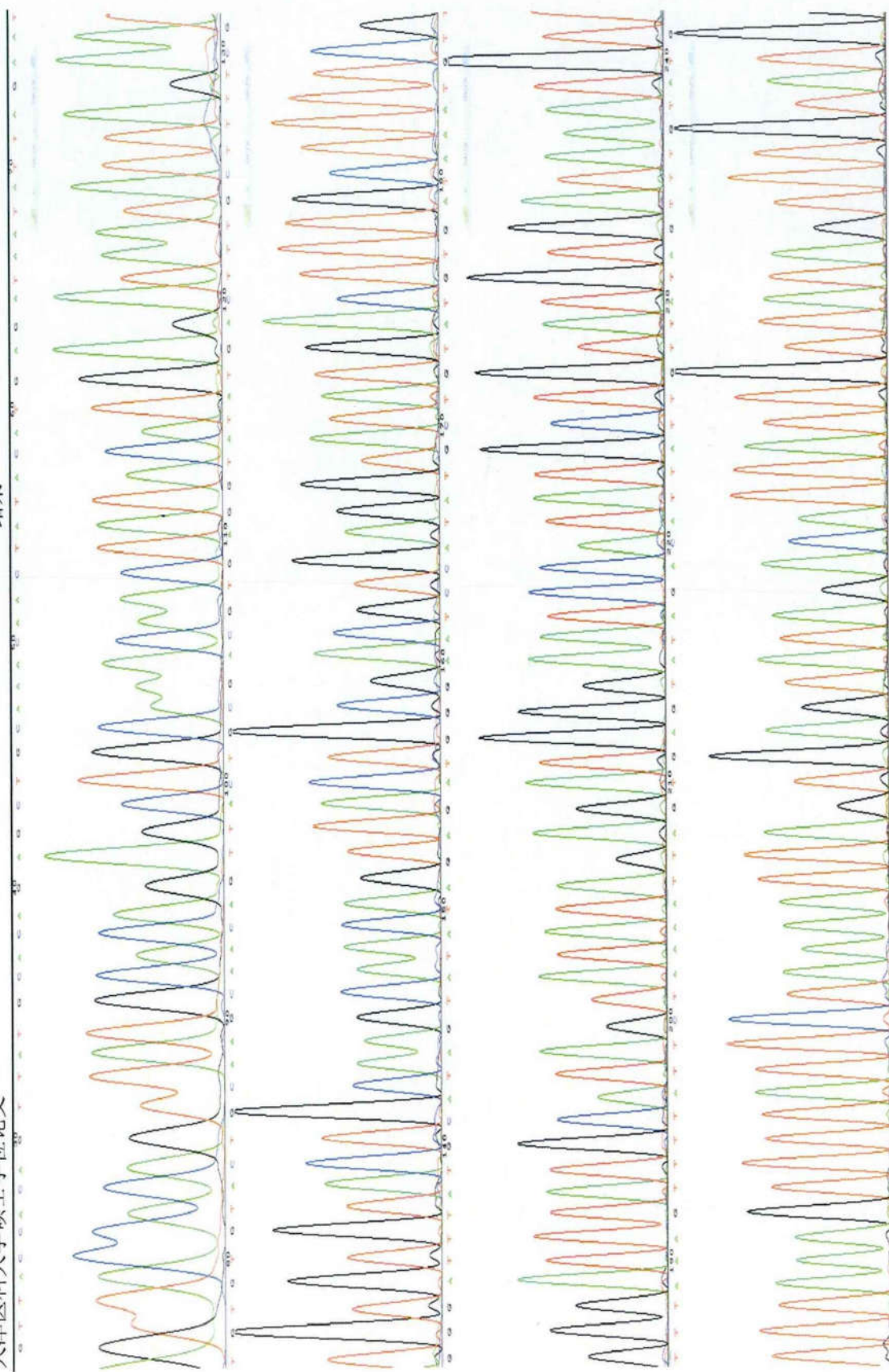


图 7.回收纯化后 HPV16 E6 DNA

其中M: Maker; 1: A组; 2: B组; 3: C组

2.5 HPV16 E6测序结果

HPV16 E6基因在HPV16基因的第83位到559位,全长477个核苷酸,编码151个氨基酸。测序结果显示54例标本扩增产物均为HPV16 E6基因片段,部分序列测序结果峰图,见图8,其中1例慢性宫颈炎标本测序失败,将其余53例标本E6 PCR产物测序结果与GenBank中德国标准株(登录号为K02718)序列进行比对分析。结果(见表5):53例样本中发现在26例样本中(49.06%)存在4个位点突变,其余27例样本(50.94%)未发现突变,为E6野生型。在A组、B组及C组中,均有发生HPV16 E6 DNA点突变,即HPV16全基因序列的第178位T→G,相应第25位氨基酸由D→E(D25E),这种变体与HPV16亚洲型As相同,此点突变在A组中的分布低于B组和C组中,差异均具有统计学意义($p<0.05$; $p<0.025$),而在B组和C组中的分布差异无统计学意义($p>0.25$),见表6、图9。有2例宫颈癌标本在HPV16全基因序列的第241位T→G,相应氨基酸残基未改变,即发生同义突变。另有2例标本分别发生了点突变,1例是一个B组标本在第188位G→T,相应第30位氨基酸由L→I;另1例是一个C组标本在第543位G→A,相应第147位氨基酸由L→F。



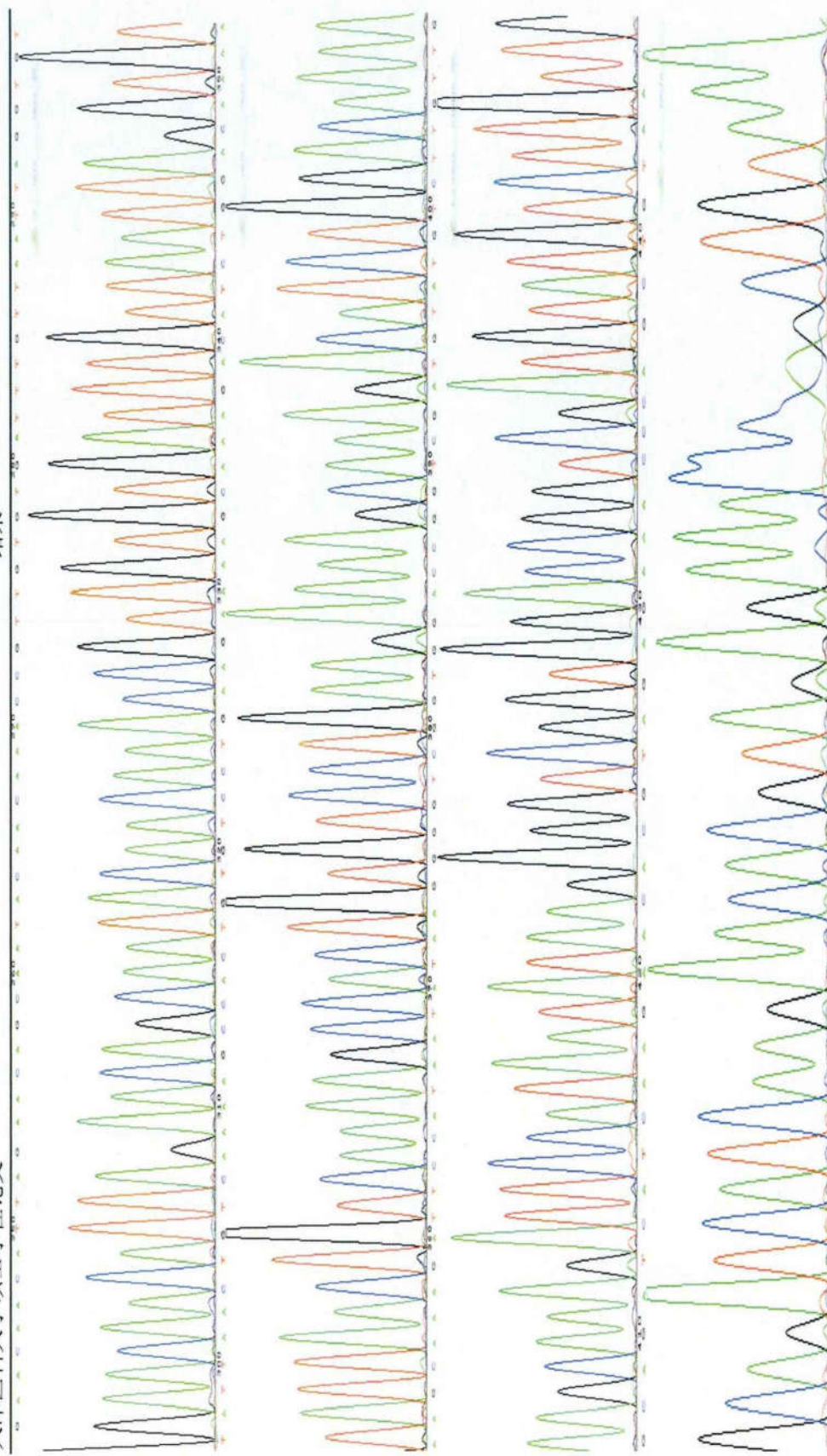


图8.部分HPV16E6测序结果。

注：此图从HPV16全基因序列第136位开始

表5 标本测序结果与德国标准株比对结果

野生株序列	E6			
	178	188	241	543
	T	G	T	G
1 宫颈炎	G	.	.	.
2 宫颈炎	G	.	.	.
3 CIN I	G	.	.	.
4 CIN II -III	G	.	.	.
5 CIN II -III	G	.	.	.
6 CIN II -III	.	T	.	.
7 CIN II -III	G	.	.	.
8 CIN II -III	G	.	.	.
9 CIN II -III	G	.	.	.
10 CIN II -III	G	.	.	.
11 CIN II -III	G	.	.	.
12 原位癌	G	.	.	.
13 原位癌	G	.	.	.
14 浸润癌	G	.	.	.
15 浸润癌	G	.	.	.
16 浸润癌	G	.	.	.
17 浸润癌	.	.	G	.
18 浸润癌	G	.	.	.
19 浸润癌	G	.	.	.
20 浸润癌	G	.	.	.
21 浸润癌	.	.	G	A
22 浸润癌	G	.	.	.
23 浸润癌	G	.	.	.
24 浸润癌	G	.	.	.
25 浸润癌	G	.	.	.
26 浸润癌	G	.	.	.
氨基酸改变	D25E	L30I	无	L147F
HPV16 亚洲 型 As	G(D25E)	.	.	.

注：·表示核苷酸无改变

表6. T178G点突变及相应氨基酸残基改变(D25E)的分布情况

组别	T178G(D25E)
A 组	3/17
B 组	9/18
C 组	11/18
H	7.072
<i>p</i>	0.029
A 与 B	$p < 0.05$
A 与 C	$p < 0.025$
B 与 C	$P > 0.25$

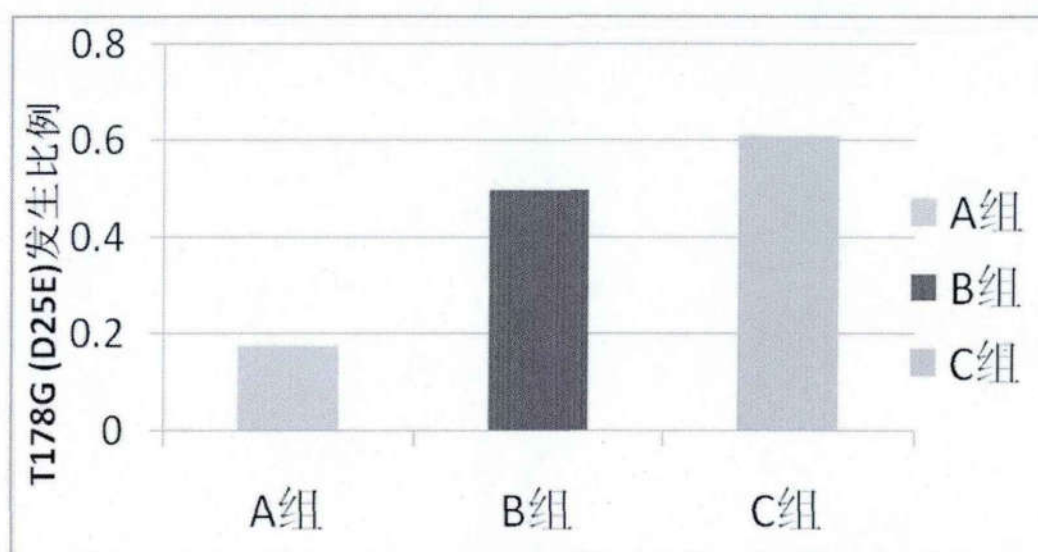


图9. T178G点突变及相应氨基酸残基改变 (D25E)的分布情况

2.6 各组宫颈病变中 TLR3 表达水平与 HPV16 负荷量的相关性

将各组宫颈病变中 TLR3 表达水平与 HPV16 负荷量作 Pearson 线性相关性分析, 结果为相关系数 $r = -0.637$, $P < 0.001$ 。故认为各组宫颈病变中 TLR3 表达水平与 HPV16 负荷量存在负相关。见图 10。

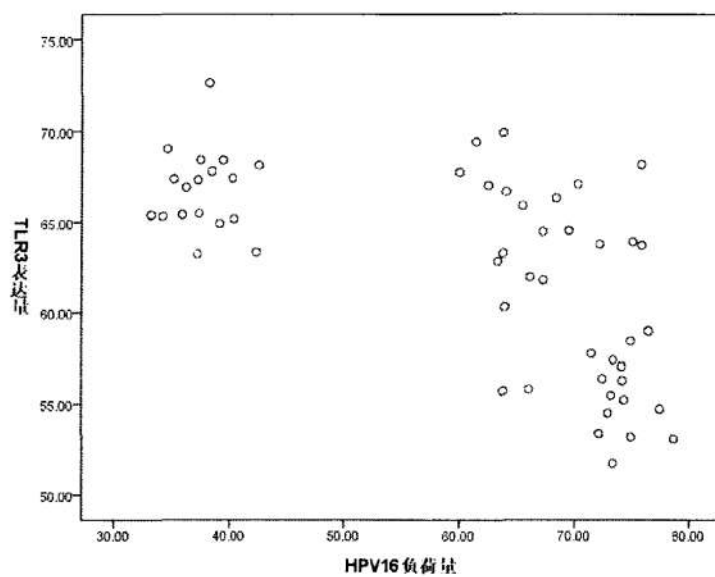


图 10 TLR3 表达量与 HPV16 负荷量相关性分析

讨论

3.1 Toll样受体3

Medzhitov等^[15]将天然免疫细胞所识别的主要靶分子称之为病原相关的分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 识别PAMPs的受体称为模式识别受体(PRRs), Toll样受体是一类重要的模式识别受体, 可以识别一种或多种特定的微生物病原体的PAMPs, 启动针对入侵病原体的早期应答, 诱发获得性免疫反应^[16], TLRs在抵抗病原微生物、保护机体中扮演重要角色。

TLR3是TLR家族的重要成员之一, 是dsRNA病毒的PRR, TLR3与其配体结合后, 通过MyD88(myeloid differentiation factor 88)依赖途径诱导炎症性细胞因子如IL-1、TNF- α 、IL-6和IL-12的表达, 参与非特异性抗病毒反应, 同时通过MyD88非依赖途径诱导共刺激分子CD80和CD86、IFN- β 及IP-10等抗病毒性细胞因子的表达, 参与诱导树突状细胞(Dendritic cells, DC)的分化成熟以及抗病毒免疫反应。

3.1.1 TLR3结构、定位及其配体

人TLR3基因定位于4q35^[17], 全长为3029bp, 含有5个外显子, TLR3结构蛋白由外显子2、3、4、5编码, 其他TLRs的结构蛋白只由1到2个外显子编码。研究表明TLR3可表达于机体多个脏器和部位, 如TLR3可表达于胎盘、胰腺、肺、肝脏、心脏、脑、肾、肌肉和皮肤角化组织或细胞, 在NK细胞中也可检测到TLR3的表达, TLR3也可表达于吞噬死亡细胞的一般树突状细胞^[18], TLR3还可以表达于上皮“屏障”细胞中, 例如: 气道、子宫、角膜、宫颈、胆囊、肠道上皮细胞^[18,19]。Gonzalez JM等^[20]研究发现宫颈细胞表达TLR3。Andersen JM等^[21]通过检测表达HPV16 E6E7的宫颈管内口、宫颈阴道部及阴道上皮细胞内的TLR3的表达量, 得出TLR3可能在调节上皮细胞促炎因子和在女性下生殖道局部环境抗病毒的过程中发挥重要作用。Elisabeth^[22]等的研究发现, 宫颈癌Hela细胞表达TLR3。最近发现, NK细胞、CHL细胞也表达TIR3, 并在抗肿瘤中发挥着极为重要的作用。TLR3在不同组织和细胞中的具体定位差别很大, 研究显示在人类纤维母细胞中TLR3只表达在细胞表面, 而在人类肺上皮细胞、头颈部鳞癌细胞、DC和CD11c+DC中只表达在细胞内^[23]。自然杀伤细胞的TLR3主要表达在细胞表面, 有少量位于细胞内, 而这种分布在肿瘤环境中或在人工合成的dsRNA(PolyI:C)刺激下会发生变化。

人类TLR3是I型跨膜蛋白,由904个氨基酸组成,相对分子质量约为125 000,由胞外区、跨膜区和胞内区组成,胞外区含有22个富含亮氨酸的重复序列(leucine rich repeat, LRR),跨膜区由21个氨基酸组成,胞内区包含一个保守的Toll/白介素1(IL-1)受体结构域(Toll/interleukin 1 receptor, TIR),该结构域与IL-1和胞浆内接头蛋白的相应结构域同源。TLR3没有其他TIRS中存在的保守脯氨酸残基,而含有5个重要的酪氨酸残基。

双链RNA(dsRNA)是TLR3的配体,dsRNA是某些病毒(包括HPV)的基因组成分,多种病毒在其复制期间都会合成dsRNA。此外,机体细胞坏死或凋亡后释放出来的mRNA或其他RNA形成的双链结构^[24],都可成为TLR3的配体与其结合,启动下游信号转导途径,从而在宿主抗病毒反应中起到关键作用。

3.1.2 TLR3信号转导通路

TLR3的信号转导通路有两条,一条是髓样细胞分化因子88(MyD88)依赖性信号转导通路,与多数其他TLRs信号转导通路相似;另一条是MyD88非依赖性途径,是其独特信号转导通路,在TLR3信号转导通路中可能占有更为重要的地位。

3.1.3 TLR3抗病毒作用

当机体感染病毒后,首先激活先天性免疫系统,TLR3是最主要的病毒核酸的模式识别受体之一,TLR3通过识别病毒复制过程中产生的dsRNA,激活特殊信号转导途径,诱导I型IFN(如IFN- β)产生,发挥抗病毒、抑制病毒增殖及免疫调节功能^[25]。

TLR3作为天然免疫中的重要模式识别受体,其在抗病毒过程中扮演重要角色,而其在肿瘤免疫过程的作用及机制仍有许多未知因素。为探索TLR3在宫颈癌进展过程中扮演怎样的角色,本研究通过检测TLR3 DNA在慢性宫颈炎、宫颈CIN I组、宫颈CIN II-III、宫颈原位癌组,宫颈浸润癌组中的含量,发现TLR3 DNA的表达量在宫颈良性病变、癌前病变及宫颈癌中的表达量逐渐减低,差异具有统计学意义($p<0.001$),其在慢性宫颈炎、宫颈CIN I组及宫颈CIN II-III、宫颈原位癌组中的表达明显高于宫颈浸润癌组,差异均具有统计学意义($p<0.001$),其在慢性宫颈炎、宫颈CIN I组中的表达略高于宫颈CIN II-III、宫颈原位癌组,差异无统计学意义($p=0.076$)。本研究显示TLR3 DNA的表达量随着宫颈病变程度的加重而逐渐降低,其在癌前病变中的表达明显高于其在宫颈癌中的表达,提示TLR3表达异常可能与宫颈癌前病变向宫颈癌的进展过程有关,

推断其机制可能为TLR3在癌前病变中高表达,一方面有助于机体清除HPV病毒,另一方面可诱导异常转化细胞凋亡;当TLR3表达异常时,宫颈局部的免疫能力下降,可能导致机体无法有效清除HPV病毒而发生持续感染,增加了患宫颈癌的风险,同时TLR3表达的异常也使诱导异常转化细胞凋亡的作用下降,最终导致宫颈癌的发生。

3.2 HPV 16与宫颈癌的关系

HPV 在妇女宫颈中的感染率很高,但并不是每个感染者都发展为宫颈癌,约 96%的宫颈 HPV 感染者的病情具有自限性,仅 4%感染者体内病毒不能及时清除,使感染呈持续状态,导致宫颈局部由 HR-HPV 持续感染发展到高级别宫颈上皮内瘤样病变,如果未能在宫颈癌筛查中被及时发现与有效治疗,则最终将发展为宫颈癌^[26]。

3.2.1 HPV16 导致宫颈病变的发病机制

HR-HPV E6 蛋白是由 E 区编码,其结构中含 2 个锌指结构 Cys-x-x-Cys,是 E6 与宿主细胞多种靶蛋白相互作用的结合位点,它们的完整性是维持 E6 恶性转化作用、转录激活等生物学功能的关键。HR-HPVs 整合入宿主细胞基因组后,E6、E7 蛋白持续的表达,是引起宿主细胞永生、恶性转化及恶性表型维持和病变进展的关键^[27]。

3.2.1.1 HPV16 E6 蛋白与 p53 蛋白

p53 是 E6 蛋白实现其生物学功能最重要的作用靶点。p53 是一种重要的肿瘤抑制基因,与控制细胞增生有关。E6 蛋白 N-端及第 1 锌指区是细胞转化及降解 p53 蛋白的关键区。E6 可通过募集 E6AP 来降解 p53。E6AP 属于泛素裂解酶的 HECT 结构域家族,其 N-端介导底物识别,C-端的 HECT 结构域催化结合底物泛素化。HR-HPV E6 可与 E6AP N-端底物识别结构域结合形成稳定的 E6-E6AP 复合物,再特异地结合并诱导 p53 泛素化降解而失去作用^[28]。

P53 降解后,p53 蛋白监测 G1/S 检查点失去控制,细胞周期失控,使基因突变及外源 DNA 整合到宿主染色体的机率增加,从而导致细胞增殖失控及肿瘤的发生。

3.2.1.2 HPV16 E6 蛋白与 PDZ 蛋白

HR-HPV E6 蛋白 C-端高度保守的区域内包含一个 PDZ 结合序列(XT/SXV),这个序列介导了 E6 和 PDZ 蛋白间的相互作用。PDZ 蛋白与细胞信号转导、细胞黏附、维持紧密接头的完整性以及蛋白复合组装的分子框架有

关,可能还有抑制肿瘤活性的作用^[29]。常见可与 HR-HPV E6 相互作用的 PDZ 蛋白有膜相关性鸟苷酸激酶(MAGUK)蛋白家族中的 Dlg、Scribble 和 MACI-1、-2、-3,还有囊型纤维病跨膜调节蛋白相关性配体(CAL)等。HR-HPV E6 蛋白 PDZ 结构域与宿主体内 PDZ 蛋白相互结合作用后,通过泛素-蛋白酶体系统将宿主体内 PDZ 蛋白加以降解,导致宿主细胞骨架、细胞间连接以及细胞极性的破坏,从而导致恶性肿瘤的发生、发展、浸润以及转移,而在低危型 HPV E6 蛋白不能与宿主体内 PDZ 蛋白结合^[30]。

3.2.1.3 HPV16 E6 与端粒酶

端粒酶由 RNA 和相关蛋白组成,其激活后,通过以其自身 RNA 为模版,逆转录合成端粒 DNA 并添加于染色体末端,防治端粒的丢失,维持端粒长度及细胞染色体的稳定性,使其发展成永生化细胞或癌细胞。端粒酶由三个亚单位组成:端粒酶 RNA(hTR),端粒酶结合蛋白(TP1)和人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT),其中 hTERT 为端粒酶活性的限速酶。hTERT 过度表达在细胞永生化、恶性肿瘤发生、发展中起重要作用。研究发现,HR-HPV E6 通过激活 c-Myc 和抑制 hTERT 转录抑制因子来激活 hTERT^[31],使其大量表达,从而导致端粒酶活性增高,使宿主细胞逃避衰老过程中的增殖限制而永生化。

3.2.2 HPV16 持续感染及病毒负荷量与宫颈病变的关系

HR-HPV 持续感染是宫颈癌发生的主要原因,从 HR-HPV 感染开始至发展为宫颈癌的时间间隔为 15 年,而从 CIN 进展为宫颈癌的时间间隔为 12.7 年^[32]。Cestero RM^[33]研究认为:HR-HPV 持续感染是低级别 CIN 发展为 CINIII、甚至宫颈浸润癌的关键因素,单独一种 HR-HPV 感染阳性妇女在 4 年内发展为 CIN III 的危险性为 4.3%,10 年的危险性>7%,而 HR-HPV 阴性妇女发展为 CINIII 的危险可以忽略不计。

在病毒转录活性高的 HPV 感染者或宿主细胞含有较高 HPV DNA 拷贝者,更容易成为 HPV 持续感染者而最终进展为宫颈病变^[34],持续高病毒负荷 HPV 感染是发生重度 CIN 的指标^[35],宫颈高级别病变组比宫颈炎组的病毒载量明显升高^[36]。HR-HPV 持续感染与病毒高负荷量之间存在相互促进的协同作用,其机理可能为:HR-HPV 通过上皮破损侵入基底细胞层后,持续存在并与宿主的免疫因素及环境因素相互作用,从而使 HPV 基因大量复制并整合到宿主细胞染色体中,导致病毒基因随着细胞增殖而大量表达,HPV 病毒复制越活跃,病毒越难以清

除干净, 导致病毒的长期持续感染, 增加宫颈病变的发生机率, 最终导致细胞癌变^[37]。

本研究结果证实, 在宫颈癌中, HPV16 E6 DNA 含量分别高于宫颈高级别病变及宫颈低级别病变与宫颈炎, 而在宫颈高级别病变中, HPV16 E6 DNA 含量高于宫颈炎及宫颈 CIN I, 差异均具有统计学意义($p<0.001$; $p<0.001$; $p<0.001$), 提示 HPV16 E6 含量随着宫颈病变程度的增加而显著提高, 说明 HPV16 E6 的含量与宫颈病变的发展关系密切, 此结果与 Howard M 等^[38]研究结果一致。Schlecht NF^[39]等报道子宫颈感染 HPV 含量与宫颈病变的严重程度有关, 可以作为子宫颈癌的初筛方法。Sun 等^[40]用半定量 PCR 的方法检测也发现宫颈病变程度越高, HPV 负荷量越大。Lai 等^[41]也认为宫颈 CIN 病变的 HPV 负荷量明显低于宫颈癌中 HPV 负荷量。然而也有学者得出的结论与此相反, Szoke 等^[42]认为 HPV 的病毒含量与 CIN 的程度无明显相关性。这可能与所选病例数小、研究方法不同有关, 今后可增加病例数、采用更精确的研究方法进一步探讨高危型 HPV 病毒负荷量与宫颈病变的关系, 为宫颈癌及癌前病变的筛查探索筛查指标。

3.2.3 HPV16 E6 基因变异在宫颈病变发展中的作用

Zehbe I 等^[8]研究了 CIN III 和宫颈浸润癌中 HPV16 E6 的表达情况及其基因序列的改变, 发现 CIN III 和宫颈浸润癌 HPV16 E6 基因结构变异达 56% 和 94%。因此推断 HPV16 E6 基因变异可能是发生宫颈浸润癌的一个重要高危因素。

不同地区多项研究通过对 HPV16 全基因组测序, 与野生型德国标准株比对, 发现感染宫颈的 HPV16 病毒存在多种突变模式, 根据这些突变位点的差异, 将 HPV16 分为六大类: 欧洲型 (European, E)、亚洲型 (Asian, AS)、亚美型 (Asian-American, AA)、非洲 1 型 (African-1, Af1)、非洲 2 型 (African-2, Af2)、北美型 (North-American, NA)。流行病学资料显示, 不同的 HPV16 分支具有不同的致癌潜能, 可能会对临床结局产生不同的影响^[8,9]。

各地区报道结果显示, 各类变异株在世界各地间的分布有差异。HPV16 E6 序列在欧洲地区的主要突变点为 E350G, 相应第 83 位氨基酸由亮氨酸变为缬氨酸 (即 L83V); 而亚洲地区的主要突变点为 T178G, 相应第 25 位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸 (即 D25E)。在墨西哥 HPV16 E6 基因 L83V 突变株在浸润性宫颈癌中占 93.5%^[43], 在日本其比例为 28%^[8], 在东南亚仅为 6%。

本研究结果显示: 与德国标准株相比, 所有标本中发生突变的标本比例为 49.06%, 共存在 4 个位点突变, 野生型 (德国标准株) 比例为 50.94%。最常见的

突变点为HPV16全基因序列的第178位T→G, 相应第25位氨基酸由D→E (D25E), 其在所有标本中发生的比例为43.40%, 这种变体与HPV16亚洲型As相同。有2例宫颈癌标本在HPV16全基因序列的第241位T→G, 相应氨基酸残基未改变, 即发生了同义突变。还有另有2例标本分别发生了点突变, 1例是一个宫颈CIN II-III标本在第188位G→T, 相应第30位氨基酸由亮氨酸变为异亮氨酸(即L→I); 另1例是一个宫颈浸润癌标本在第543位G→A, 相应第147位氨基酸由亮氨酸变为苯丙氨酸(即L→F)。

各突变型别与宫颈癌的关系也不尽相同, Mayrand MH等^[44,45]研究发现E6突变株E350G (L83V) 与HPV的持续感染和宫颈病变由低级向高级转化有关, 但Tu JJ等^[46]报道HPV16 E6 L83V与宫颈上皮内瘤样变1级向3级的转化有关。瑞典等研究认为L83V突变型与浸润性宫颈癌有关^[47,48]。也有文献报道, T350G位点的变异导致E6蛋白L83V氨基酸的替换, E6 L83V变异可能与CIN持久不愈有关, 而且这种变异似乎是宫颈病变由CIN I向CIN III及浸润性癌进展的标志^[49,50]。Cai等^[51]在对湖北宫颈病变妇女中的研究中发现, D25E是宫颈鳞状上皮癌最主要的突变, 且与宫颈鳞癌的发生有密切的关联。日本Matsumoto K等^[52]则认为该突变是癌前病变进展及癌症发生的主要诱因。

本研究结果显示, HPV16 E6 D25E 突变在慢性宫颈炎与宫颈 CIN I 组、宫颈 CIN II-III 与宫颈原位癌组、宫颈浸润癌组中的发生比例分别为 17.65%、50% 和 61.11%, 其在宫颈 CIN II-III 与宫颈原位癌组、宫颈浸润癌组中的分布显著高于其在慢性宫颈炎、宫颈 CIN I 组中的分布 ($p<0.05$; $p<0.025$), 而在宫颈 CIN II-III、宫颈原位癌组和宫颈浸润癌组组间的分布无显著性差异($p>0.25$), 故认为此变异与高级别宫颈病变及宫颈癌密切相关, 其可能是低级别宫颈病变向高级别宫颈病变、宫颈癌进展的重要危险因素。另外 2 个只发生在宫颈癌病例中的点突变 L30I、L147F, 其改变了 HPV16 E6 蛋白一级结构中的氨基酸构成, 可能增加了 E6 蛋白的致癌能力, 其具体机制尚待研究; 也可能是在 PCR 合成 HPV16 E6 DNA 过程中发生了错配, 需要进一步多样本验证。

总之, 本研究认为本医院患者 HPV16 E6 的基因突变类型主要是 D25E, 符合 HPV16 亚洲型, HPV16 E6 D25E 突变与宫颈病变关系密切, 其可能是低级别宫颈病变向高级别宫颈病变进展过程中的重要危险因素。

3.3 TLR3在宫颈HPV16感染中的作用

HPV 感染是宫颈癌的主要致病因素, 已知 TLR3 是机体重要的病毒识别受

体,在机体局部免疫反应过程中发挥重要作用,而研究也显示宫颈细胞可表达 TLR3^[20,21],那么 TLR3 在宫颈 HPV 病毒感染过程中究竟扮演怎样的角色?

Andersen JM 等^[21]通过检测表达 HPV16E6E7 的宫颈管内口、宫颈阴道部及阴道上皮细胞内的 TLR3 的表达量,得出 TLR3 可能在调节上皮细胞促炎因子和在女性下生殖道局部环境抗病毒的过程中发挥重要作用。Daud II 等^[53]研究发现在 HPV16 病毒随后被清除的宫颈标本中 TLR2、3、7、8、9 的表达是升高的,而在 HPV16 病毒持续感染的宫颈标本中这 5 种 TLR 的表达没有明显升高,通过随访发现,在后来 HPV 病毒被清除的妇女中这些 TLR 的表达量明显高于高于 HPV 病毒持续感染的妇女,因此认为 TLR 表达的增高对局部病毒的清除是必要的。另外,研究发现清除了 HPV16 的妇女体内 IFN- α 2 随着 TLR 的增高而增高,进一步证实了这一观点^[54-56]。体外及动物研究证实 HPV16 可以发生免疫逃逸,且这导致了它的持续存在^[57,58]。Daud II 等^[53]的研究发现 HPV16 的持续感染的标本中虽然没有 TLR 表达下调的趋势,但也没有伴随着 TLR 表达的升高,也间接证实了 HPV16 发生了免疫逃逸而导致了它的持续存在。

本研究结果显示 HPV16 E6 DNA 的含量随着宫颈病变程度的增加而显著提高,提示随着宫颈病变的加重,HPV16 病毒负荷量逐渐升高,而 TLR3 DNA 的表达量随着宫颈病变程度的加重而逐渐减少,将二者进行线性相关性分析,发现二者存在负相关关系($r = -0.637$, $p < 0.001$)。推断这可能是因为 TLR3 表达异常,宫颈局部免疫力低下,机体免疫系统不能及时清除感染的 HPV16,导致 HPV 在局部持续感染并大量增殖,增加患宫颈癌的风险。还可能是因为,HPV16 感染宫颈后通过与宿主免疫系统相互作用,使局部免疫功能受到抑制,造成 TLR3 表达下调,导致局部免疫功能异常降低,不能正常识别进而清除病毒,使 HPV16 的感染持续存在,增加宫颈病变进展的风险。由此推断 TLR3 可能参与宫颈局部免疫系统对 HPV16 的清除过程,TLR3 可能是机体应答 HPV 感染的主要免疫机制。其具体作用机制仍需进一步大样本、多方法探索。

结论

1. TLR3可能在HPV感染的调节过程中发挥重要作用，其可能是机体抗HPV感染的主要免疫机制；TLR3在宫颈病变中表达的异常可能与宫颈细胞由宫颈癌前病变向宫颈癌的进展过程密切相关。
2. HPV16 病毒负荷量与宫颈病变的进展密切相关，HPV16 E6 基因突变可能是低级别宫颈病变向高级别宫颈病变及宫颈癌进展过程中的重要危险因素。
3. TLR3可能在HPV16 E6表达的调节过程中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Jansen KU. Toward vaccines against cervical cancer [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 7(2):228-232.
- [2] 乐杰. 妇产科学[M]. 第7版, 北京:人民卫生出版社,2008:408.
- [3] Xu Y, Zhang H, Xu X. Enhancement of vaccine potency by fusing modified LTK63 into human papillomavirus type 16 chimeric virus-like particles [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, 52(1):99-109.
- [4] Corusić A, Skrgatić L, Mahovlić V, et al. Cervical cancer as a public health issue--what next? [J]. *Coll Antropol*, 2010, 34(1): 301-307.
- [5] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses [J]. *Virus Res*, 2009, 143(2): 195-208.
- [6] Park RB, Androphy EJ. Genetic analysis of high-risk e6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes [J]. *J Virol*, 2002, 76(22):11359-11364.
- [7] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(14):1072-1079.
- [8] Zehbe I, Wilander E, Delius H, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(4):829-833.
- [9] 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 [J]. *Int J Cancer*, 1999, 82(2):203-207.
- [10] Abba MC, Mouron SA. Association of human papillomavirus viral load with HPV16 and high-grade intraepithelial lesion[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2003, 13(2):154-158.
- [11] 肖克林,吴丽娟,郑有为,等.高危型人乳头瘤病毒载量与宫颈病变的关系[J].*中华检验医学杂志*,2008,31(11): 1273-1275.
- [12] Kuhn L, Denny L, Pollack A, et al. Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low-resource settings[J]. *J Natl Cancer Ins*, 2000, 92(10):818-825.
- [13] Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, et al. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and

- cytokines [J]. *J Immunol*, 2005, 174(6):3227-3236.
- [14] 原琛利, 王素平, 宋秀霞. 胎盘 HBV 感染的危险因素及与 TLR3 的关系研究 [J]. *山西医科大学学报*, 2006, 37 (5) : 514-516.
- [15] Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways [J]. *Immunol Rev*, 2000, 173:89-97.
- [16] 何晓霞, 白海. Toll样受体的研究进展[J]. *西北国防医学杂志*, 2010, 31(6): 445-446.
- [17] Datta SK, Redecke V, Prilliman KR, et al. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Immunol*, 2003, 170(8):4102-4210.
- [18] Testro AG, Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(6):943-954.
- [19] 杨再兴, 仲人前. Toll 样受体 3 与自身免疫性疾病[J]. *现代免疫学*, 2006, 26(6):520-522.
- [20] Gonzalez JM, Xu H, Ofori E, et al. Toll-like receptors in the uterus, cervix, and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state [J]? *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 197(3):296.e1-6.
- [21] Andersen JM, Al-Khairi D, Ingalls RR. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens [J]. *Biol Reprod*, 2006, 74(5):824-831.
- [22] Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3 [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(1):13-25.
- [23] Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2003, 171(6):3154-3162.
- [24] Kariko K, Ni H, Capodici J, et al. mRNA is an endogenous ligand for Toll like receptor 3[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(13):12542-12550.
- [25] Seth RB, Sun L, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways [J]. *Cell Res*, 2006, 16 (2): 141-147.
- [26] Kuhn L, Denny L, Pollack A, et al. Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low-resource settings[J]. *J Natl Cancer Ins*, 2000, 92(10):818-825.
- [27] DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, et al. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells [J]. *J Virol*, 2003, 77(2):1551-1563.

- [28] Thomison J 3rd, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(2):154-166.
- [29] 赵思成, 骆丹. HPV E6 蛋白及其在致癌过程中的作用的靶蛋白[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(3):225-228.
- [30] Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2002, 16(3):231-240.
- [31] Xu M, Luo W, Elzi DJ, et al. NFXI interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress Htert transcription in keratinocytes[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(15):4819-4828.
- [32] Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study [J]. *Lancet*, 2000, 355(9222):2189-2193.
- [33] Cestero RM. Risk of high -grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) or cancer during follow -up of human papillomavirus (HPV) infection or CIN1 [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 195 (5):1196-1197.
- [34] Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence--implications for cervical disease progression and monitoring [J]. *J Med Virol*, 2004, 73(1):65-70.
- [35] van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance [J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(4):590-595.
- [36] 张莉, 李小捷. HPV 基因分型检测在女性生殖道感染中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(5): 452-454.
- [37] Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia [J]. *Mol Biol Rev*, 2004, 68(2):362-372.
- [38] Howard M, Sellors J, Kaczorowski J. Optimizing the hybrid capture II human papillomavirus test to detect cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Obstet Gynecol*, 2002, 100(5 Pt 1):972-980.
- [39] Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Int J Cancer*, 2003, 103(4):519-524.
- [40] Sun CA, Liu JF, Wu DM, et al. Viral load of high-risk human Papillomavirus cervical squamous intraepithelial lesions [J]. *Int J Gynecol Obstet*, 2002, 76(1):41-47.
- [41] Sun CA, Lai HC, Chang CC, et al. The significance of human Papillomavirus

- viral load in Prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesion of uterine cervix [J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 83(1):95-99.
- [42] Szoke K, Sapy T, Krasznai Z, et al. Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities [J]. *J Med Virol*, 2003, 71(4):585-592.
- [43] Londesborough P, Ho L, Terry G, et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities [J]. *Int J Cancer*, 1996, 69(5):364-368.
- [44] Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9):3388-3393.
- [45] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16(HPV 16) variants in Japanese population [J]. *Cancer Lett*, 2000, 156(2):159-165.
- [46] Tu JJ, Kuhn L, Beattie KJ, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(2):736-742.
- [47] Sathishi N, Abraham P, Peedicayil A, et al. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia [J]. *Cancer Lett*, 2005, 229(1):93-99.
- [48] De Boer MA, Peters LA, Aziz MF, et al. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries [J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(3):422-425.
- [49] Grodzki M, Besson G, Clavel C, et al. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(4):820-822.
- [50] Sichero L, Ferriera S, Trottier H, et al. High-grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPV16 and 18[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(8):1763-1768.
- [51] Cai HB, Chen CC, Ding XH. Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2010, 36(2):160-163.
- [52] Matsumoto K, Yasugi T, Nakagawa S, et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(6):919-922.
- [53] Daud II, Scott ME, Ma Y, et al. Association between toll-like receptor

- expression and human papillomavirus type 16 persistence [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(4):879-886.
- [54] Brugnolo F, Sampognaro S, Liotta F, et al. The novel synthetic immune response modifier R-848 (Resiquimod) shifts human allergen-specific CD4⁺ TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(2):380-388.
- [55] Kaisho T, Akira S. Pleiotropic function of Toll-like receptors [J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(15):1388-1394.
- [56] Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(4):249-258.
- [57] Hasan UA, Bates E, Takeshita F, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16 [J]. *J Immunol*, 2007, 178(5):3186-3197.
- [58] Yang R, Murillo FM, Delannoy MJ, et al. B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88 [J]. *J Immunol*, 2005, 174:7912-7919.

发表论文和参加科研情况说明

发表论文

- [1]徐曼,瞿全新,毕秋英.恶性危险指数评价卵巢肿物性质的临床观察[J].天津医药,2011,39(2): 168-169.
- [2]毕秋英,张栋,瞿全新.调节TLR3/PI3K信号转导通路抑制宫颈癌细胞生长的体外研究[J].现代妇产科进展,2012, 21(2): 31-39.
- [3]刘微,毕秋英,瞿全新.带hTERT启动子的腺病毒干扰ERCC1基因表达逆转卵巢癌顺铂耐药的研究[J].现代妇产科进展,2012,21(4):246-254.

参加科研情况：无。

综述

人乳头瘤病毒致癌机制研究进展

宫颈癌是女性生殖系统中最常见的恶性肿瘤之一，是仅次于乳腺癌对女性生命健康危害最大的恶性肿瘤^[1]。近 40 年来随着宫颈细胞学筛查的普遍应用，有利于宫颈癌早期发现和治疗，使宫颈癌的发病率和死亡率已明显下降。但随着人们生活方式的改变，人乳头瘤病毒(human papilloma viruses,HPVs)感染增多，近些年我国宫颈癌发病率有所上升，且有年轻化趋势。自从 1976 年，zur Hausen 提出人乳头瘤病毒(HPV)可能是宫颈癌的致病因素以来，国内外许多学者对 HPV 感染与宫颈癌的关系做了大量研究工作，研究结果证实，HPV 感染是宫颈癌的主要致病因素。现就 HPV 在宫颈癌形成过程中的作用的研究现状做如下综述。

HPV 的结构及其分型

一 HPV 的结构

HPVs 为乳多空病毒科 A 属成员，是一类形态和基因结构相似的病毒，在电镜下观察病毒颗粒为球形、由 72 个病毒壳粒包被、无包膜、呈正 20 面体的结构，直径 50-55nm，其基因是一条长 7900-8000bp 环状、右手螺旋、嗜上皮性的双链 DNA^[2]。

HPV 全基因组有 9 个开放读码框(ORF)，其结构按功能可分为 3 个编码区：包括早期转录区(early region, ER)、晚期转录区(late region, LR)和长控制区(long control region, LCR)，分别占基因组的 50%，40%和 10%。每区可分别编码具有不同功能的多种病毒蛋白。E 区编码 E1—7 蛋白，分别参与病毒 DNA 复制、转录调控和细胞转化过程，其中 E1 参与病毒 DNA 的复制，E2 参与病毒 DNA 的转录和反式激活，E3、E4 与病毒的成熟有关，E5 的功能是通过提高丝裂原激活蛋白激酶(MAP)活性，增强细胞对生长分化因子的反应，E6 蛋白约含有 150 个氨基酸，E7 蛋白约含有 100 个氨基酸，两者结构中均包含的锌指结构参与病毒复制、细胞恶性转化过程，是病毒的主要致癌蛋白。L 区的 L1 和 L2 主要编码病毒的衣壳蛋白，其中 L1 蛋白是 HPV 的主要衣壳蛋白，形成 95%以上的衣壳，在 HPV 不同亚型中高度保守，它在真核细胞内具有自身组装成病毒样颗粒(virus like particle, VLP)的特性；L2 蛋白是 HPV 的次要衣壳蛋白，分子量为 70KD，形成不到 5%的衣壳，其 N-端 210 个氨基酸和 C-端 30 个氨基酸也高

度保守。LCR 区又称上游调节区 (upstream regulatory region, URR) 为非编码区, 位于 E 区和 L 区之间, 紧靠 E 区上游, URR 有能与转录抑制剂和激活剂结合的重叠位点, 从而调节早、晚期基因的转录以及病毒复制, 控制病毒蛋白和感染颗粒的产生^[3]。

二、HPV 分型

HPV 是一类具有嗜上皮细胞特性的病毒, 主要感染人皮肤和黏膜上皮细胞, 研究表明, 其最开始感染的部位是未分化的基底细胞, 而其复制过程则转移到上层分化至一定程度的上皮细胞内进行。HPV 病毒根据其基因组核酸序列的变异可分为不同的型, 根据新的分类方法, 不同型是指病毒的 DNA 与其他任何已知的 HPV 的 L1、E6 和 E7 开放阅读框 (ORFs) 的 DNA 序列同源性小于 90%, 而同源性位于 90% 到 98% 之间者为亚型。目前已发现 HPV 约有 200 种类型^[4]。

根据 HPV 感染后引起恶性病变的危险性大小, 将其分为低危型和高危型 (High Risk, HR-HPV) 两种。低危型 HPV 主要引起肛周皮肤和外生殖器尖锐湿疣等良性病变, 包括 HPV HPV6、11、30、39、42、43、44 型。高危型主要包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58 型, 主要引起高级别宫颈上皮内瘤变 (CIN II, CINIII)、宫颈癌、外阴癌、肛门癌等恶性肿瘤。Corusić A 等研究表明超过 99% 的宫颈癌与 HPV 有关^[5], 其中与高危型 HPV16, 18, 31, 33, 45 有关的宫颈癌比例超过 97%^[4]。各型 HR-HPV 中, HPV16 和 HPV18 是引起宫颈癌的最常见的两种类型, HPV16 与宫颈鳞癌关系最为密切, HPV18 最易导致宫颈腺癌^[6], 其中又以 HPV16 型最为常见。

HPV 与宫颈癌的关系

自从 1976 年 zur Hausen 发现 HPV 可能是宫颈癌致病因素开始, 国际和国内很多学者致力于探索 HPV 与宫颈癌的关系, 现 HPV 感染已被明确认定为宫颈癌及癌前病变最主要致病因素。Walboomers JM 等^[7]研究表明, 99.7% 的宫颈癌组织 HPV 阳性。研究结果显示, HPV 感染阳性检出率在 LGSIL、HGSIL 中分别为 64.4%~90.9% 和 73.3%~100%, 而在宫颈癌中检出率为 88.4%~99.7%^[8]。赵方辉等^[9]研究认为高危型 HPV 持续感染是宫颈癌发生的主要原因。张莉等^[10]通过探讨高危人乳头瘤病毒检测在宫颈病变诊断中的应用价值, 得出高级别上皮内瘤变 (CIN 2-3 级) 及宫颈癌患者 HPV DNA 阳性率高于低级别宫颈上皮内

瘤变及宫颈炎患者，宫颈高级别病变组比宫颈炎组的病毒载量明显升高。

HR-HPV 导致宫颈癌的作用机制

一、HR-HPV 持续感染和病毒高负荷量

HPV 在妇女宫颈中的感染率很高，但并不是每个感染者都发展为宫颈癌，约 96% 的宫颈 HPV 感染者的病情具有自限性，只有剩下的 4% 感染者体内病毒不能清除，感染呈持续性，导致 CIN I 持续存在或进一步发展为宫颈癌^[11]。

研究发现 HPV 持续感染是宫颈癌发生的主要原因^[9]，从 CIN I 进展为宫颈癌的时间间隔为 12.7 年，持续高危型 HPV 感染是 CIN 进一步发展为宫颈癌的必经过程，从高危型 HPV 感染开始至发展为宫颈癌的时间间隔为 15 年^[12]。

Cestero RM^[13]研究认为：高危型 HPV (HR-HPV) 持续感染是低级别 CIN 发展为 CIN III、甚至宫颈浸润癌的关键因素，单独一种 HR-HPV 感染阳性妇女在 4 年内发展为 CIN III 的危险性为 4.3%，10 年的危险性 > 7%，而 HR-HPV 感染阴性妇女发展为 CIN III 的危险可以忽略不计。

在病毒转录活性高的 HPV 感染者或宿主细胞含有较高 HPV DNA 拷贝者，更容易成为 HPV 持续感染者而最终进展为宫颈病变^[14]，持续的高病毒负荷 HPV 感染是发生重度 CIN 的指标^[15]，宫颈高级别病变组比宫颈炎组的病毒载量明显升高。

高危 HPV 持续感染与病毒高负荷量之间可能相互促进的协同作用，其机理可能为：高危型 HPV 通过上皮破损侵入基底细胞层后，持续存在并与宿主的免疫因素及环境因素相互作用，从而使 HPV 基因大量复制并整合到宿主细胞染色体中，导致病毒基因随着细胞增殖而大量表达，HPV 病毒复制越活跃，病毒越难以清除干净，导致病毒的长期持续感染，增加宫颈病变的发生机率。最终导致细胞癌变使细胞发生转化及永生化^[16]。

研究发现 HPV 病毒负荷量与宫颈高度病变密切相关，HPV 的病毒负荷量越高，患 CIN II、CIN III 的危险性就越高，宫颈病变程度越严重，感染 HPV 的型别越多，病毒负荷量就越高^[17]。Schlecht NF^[18]等报道子宫颈感染 HPV 含量与宫颈病变的严重程度有关，可以作为子宫颈癌的初筛方法。Sun 等^[19]用半定量 PCR 的方法检测也发现宫颈 CIN 病变的 HPV 负荷量明显低于宫颈癌中 HPV 负荷量，宫颈病变程度越高，HPV 负荷量越大。

高危型 HPV 的病毒负荷与发展为 HPV 相关肿瘤的危险性之间可能具有剂

量相关性, DNA 的含量可通过检测管家基因, 如 β -actin 的浓度进行定量。目前最常用的 HPV DNA 定量检测技术主要有杂交捕获二代(HC-II)试验和实时荧光定量 PCR, 其中 HC-II 不是检测 HPV-DNA 含量的精确定量方法, 至多是一种半定量检测^[20], 实时荧光定量 PCR 可以更加准确地测量 HPV DNA 负荷量, 可定量分析多个基因、多个 HPV 型别, 但费用昂贵, 且涉及许多复杂的技术^[21], 以上关于定量检测 HPV DNA 技术的各种问题限制了其在临床中的应用。尽管有些研究报道 HPV 病毒负荷量可能与宫颈病变严重程度相关, 但也有相反的结论产生, 高负荷 HPV-DNA 是否预示着 HPV 的持续性感染, 是否可以预测宫颈病变的严重程度, 还有待进一步研究。

二、HR-HPV DNA 整合到宿主细胞基因组

HPV 感染宿主后其 DNA 在宿主细胞中有两种存在方式, 在良性病变或癌前病变中, HPV 基因组常以游离的形式存在, 在 HPV 相关的恶性肿瘤中, 病毒 DNA 常整合到宿主染色体中^[22]。较之低危型, 高危型病毒基因更易整合于宿主细胞基因中, 尤其易整合在基因组不稳定区和转录活跃区, 导致宿主细胞基因发生变异, 从而发生癌变, 另病毒编码蛋白可与宿主蛋白相互作用, 引起细胞转化。研究表明, 病毒 DNA 以单拷贝或多拷贝串联方式整合于宿主细胞 DNA 中, 结果导致 HPV E2 基因对 E6、E7 基因启动的负相调节作用的缺失, 使 E6、E7 基因表达异常而导致细胞生长失控^[23]。

Kalantari M 等通过分析 42 例有 HPV DNA 整合入宿主细胞染色体和 HPV E2 基因破坏的患者, 发现 E2 破坏和预后差有关, 并能明显地缩短患者的无病生存期^[24]。

三、HR-HPV 致癌危险因子与宿主细胞相互作用

1. HR-HPV E6 蛋白致癌机制

E6 蛋白是 HPV 一种主要致癌蛋白, 由 E 区编码, 其结构中含两个锌指结构 Cys-x-x-Cys, 是 E6 与宿主细胞多种靶蛋白相互作用的结合位点, 它们的完整性是维持 E6 恶性转化作用、转录激活等生物学功能的关键。HR-HPVs 整合入宿主细胞基因组后, E6、E7 蛋白持续的表达, 是引起宿主细胞永生、恶性转化及恶性表型维持和病变进展的关键^[25]。

(1) HR-HPV E6 蛋白诱导 p53 蛋白降解失活

p53 是 E6 蛋白实现其生物学功能最重要的作用靶点。p53 是一种重要的肿

瘤抑制基因,与控制细胞增生有关。E6 蛋白 N-端及第 1 锌指区是细胞转化及降解 p53 蛋白的关键区。E6 可通过募集 E6AP 来降解 p53。E6AP 属于泛素裂解酶的 HECT 结构域家族,其 N-端介导底物识别,C-端的 HECT 结构域催化结合底物泛素化。HR-HPV E6 可与 E6AP 的 N-端底物识别结构域结合形成稳定的 E6-E6AP 复合物,再特异地结合并诱导 p53 泛素化降解而失去作用。P53 降解后,使 p53 蛋白监测的 G1/S 检查点失去控制,细胞周期失控,使基因突变及外源 DNA 整合到宿主染色体的机率增加,从而导致细胞增殖失控及肿瘤的发生。

(2) E6 蛋白与 PDZ 蛋白

高危 HPV E6 蛋白 C-端高度保守的区域内包含一个 PDZ 结合序列 (XT/SXV),这个序列介导了 E6 和 PDZ 蛋白间的相互作用。PDZ 蛋白与细胞信号转到、细胞黏附、维持紧密接头的完整性以及蛋白复合组装的分子框架有关,可能还有抑制肿瘤活性的作用^[26]。Sanclemente G 等^[27]研究显示:高危型 HPV 的 E6 蛋白的 PDZ 结构域与宿主体内 PDZ 蛋白相互结合作用后,通过泛素-蛋白酶体系统将宿主体内 PDZ 蛋白加以降解,而在低危型 HPV E6 蛋白不能与宿主体内 PDZ 蛋白结合。常见的可与 HR-HPV E6 相互作用的 PDZ 蛋白有膜相关性鸟苷酸激酶 (MAGUK) 蛋白家族中的 Dlg、Scribble 和 MACI-1、-2、-3^[28],还有囊型纤维病跨膜调节蛋白相关性配体 (CAL)^[29]等。HR-HPV E6 与这些 PDZ 蛋白结合后促使其降解,导致宿主细胞骨架、细胞间连接以及细胞极性的破坏,从而导致恶性肿瘤的发生、发展、浸润以及转移。

(3) E6 与端粒酶

端粒酶由 RNA 和相关蛋白组成,其激活后,通过以其自身 RNA 为模版,逆转录合成端粒 DNA 并添加于染色体末端,防治端粒的丢失,维持端粒长度及细胞染色体的稳定性,使其发展成永生化细胞或癌细胞。端粒酶由三个亚单位组成:端粒酶 RNA (hTR),端粒酶结合蛋白 (TP1) 和人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT),其中 hTERT 为端粒酶活性的限速酶。hTERT 的过度表达在细胞永生化、恶性肿瘤发生、发展中起重要作用。如研究发现,HR-HPV E6 通过激活 c-Myc 和抑制 hTERT 的转录抑制因子来激活 hTERT^[30],使其大量表达,从而导致端粒酶活性增高,使宿主细胞逃避衰老过程中的增殖限制而永生化。

(4) E6 基因突变

Zehbe I^[31] 等研究了 CIN III 和宫颈浸润癌中 HPV16E6 的表达情况及其基

因序列的改变,发现 CIN III和宫颈浸润癌 E6 基因的结构变异达 56%和 94%。因此推断 E6 基因变异可能是发生宫颈浸润癌的一个重要高危因素。

不同地区多项研究通过对 HPV16 全基因组测序,与野生型德国标准株比对,发现感染宫颈的 HPV16 病毒存在多种突变模式,根据这些突变位点的差异,将 HPV16 分为六大类:欧洲型 (European, E)、亚洲型 (Asian, AS)、亚美型 (Asian-American, AA)、非洲 1 型 (African-1, Af1)、非洲 2 型 (African-2, Af2)、北美型 (North-American, NA)。流行病学资料显示,不同的 HPV16 分支具有不同的致癌潜能,可能会对临床结局产生不同的影响^[31]。

各地区报道结果显示,各类变异株在世界各地间的分布有差异。HPV16 E6 序列在欧洲地区的主要突变点为 E350G,相应第 83 位氨基酸由缬氨酸变为亮氨酸 (即 L83V);而亚洲地区的主要突变点为 T178G,相应第 25 位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸 (即 D25E)。在墨西哥 HPV16 E6 基因 L83V 突变株在浸润性宫颈癌中占 93.5%^[32],在日本其比例为 28%^[31],在东南亚仅为 6%。

各突变型别与宫颈癌的关系也不尽相同,Mayrand MH 等^[33,34]研究发现 E6 突变株 E350G (L83V) 与 HPV 的持续感染和宫颈病变由低级向高级转化有关,但 Tu JJ 等^[35]报道 HPV16 E6 L83V 与宫颈上皮内瘤样变 1 级向 3 级的转化有关。瑞典等研究认为 L83V 突变型与浸润性宫颈癌有关^[36,37]。也有文献报道 T350G 位点的变异导致 E6 蛋白 L83V 氨基酸的替换, E6 L83V 变异可能与宫颈上皮内瘤样变 (CIN) 的持久不愈有关,而且这种变异似乎是宫颈病变由 CIN I 向 CIN III 及浸润性癌进展的标志^[38,39]。Cai 等^[40]在对湖北宫颈病变妇女中的研究中发现 D25E 是宫颈鳞状上皮癌最主要的突变,且与宫颈鳞癌的发生有密切的关联,日本 Matsumoto K 等^[41]则认为该突变是癌前病变进展及癌症发生的主要诱因。

2. E7 蛋白与宫颈癌

HPV E7 蛋白是 HPV 重要癌蛋白,共有 3 个功能区 (conserved regions, CR): CR1、CR2 和 CR3,具有锌指结构,其中 CR2 结构域可以结合转录因子 RB 相关的 pocket 蛋白 pRB 蛋白、p107、p130 等。

(1) HPV E7 与 pRb

pRb 是抑癌蛋白,正常情况下非磷酸化 pRb 与转录因子激活腺病毒 E2 (transcription factor activating adenovirus E2, E2F) 蛋白特异性结合,抑制 E2F 对靶基因的转录,使细胞停留在 G1 期,从而抑制细胞增殖。HR-HPV E7 蛋白通过 CR2 区的 LxCxE 结构可竞争性与 pRb 的口袋结构结合,诱导 pRB 泛素化降解,

同时释放转录因子 E2F, 诱发细胞从 G1 期进入 S 期, 细胞周期调控失控。研究发现高危型 HPV E7 蛋白同 pRb 的结合能力比低危型 HPV E7 蛋白高 5~10 倍, 这与 HPV E7 蛋白的转化能力有关, 同时这与 CR2 区的 LxCxE 结构附近的序列有关, HPV16E7 蛋白第 20 位氨基酸为天冬氨酸, 而 HPV6E7 蛋白在相应位置为甘氨酸。

(2) HPV E7 与其他致癌因子作用

C-Jun 属于介导早期有丝分裂的 AP-1 转录因子家族, 有研究发现, E7 蛋白锌指结构能与 C-Jun 的结合, 激活细胞周期早期进展基因, 在 E7 转化宿主细胞进程中起重要作用。另外 E7 的 LxCxE 结构与 pRb 结合, 抑制其对 C-Jun 转录的兴奋, 使细胞分化脱离正常细胞周期进展。E7 的转化作用还体现在使包括 p53 介导的 G1 生长停滞、TGF- β 介导的生长抑制、p16 介导的细胞周期停滞、p21 和 p27 介导 G1/S 其阻滞等细胞周期负性调控过程失效。E7 的 CR1 作用于 pRb 蛋白相关因子 p600, 导致细胞转化与增殖。

(3) HPV E7 基因变异

HPV E7 基因的错义突变造成其蛋白一级结构改变, 作用发生改变, 从而影响了其对宿主细胞的转化活性, E7 基因的起始突变、终止突变、无义突变可能影响其自身的转录和表达。HPV16 E7 基因第 29 密码子突变导致氨基酸由天门冬酰胺变为丝氨酸(A sn $\rightarrow$ Ser), 丝氨酸被磷酸化, 蛋白质构象和极性可能发生改变, 从而改变生物学功能如结合 pRb 的能力, 影响 HPV 的转化作用和免疫原性等生物学特性^[42]。在韩国妇女中 E7 N29S 变异会提高 E7 的致癌性^[43]。

3. URR 突变

URR 发生点突变或缺失突变后, 其调控功能可能发生改变, URR 的突变一方面可通过阻遏子结合位点的缺失和(或)激活因子结合能力的增强两方面增强其转录启动活性。目前研究认为 P97 是参与 E6、E7 表达水平最重要的调控序列, URR 可与其结合来调控 E6、E7 的表达水平, 当 URR 上 p97 结合区域发生突变后, 无法正常结合 p97, 使 E6、E7 过表达, 从而导致细胞过度增殖。Kämmer C 等^[44]报道称 URR 在 HPV 第 7729 位发生 A $\rightarrow$ C 突变后, 其转录活性是标准株的 2~4 倍, 而将该位点突变逆转后, 细胞内 E6 和 E7 的表达水平有明显的降低。Schmidt M 等^[45]研究认为波兰妇女宫颈癌组织中 HPV16 URR 片段 100%发生第 7520G $\rightarrow$ A 的突变, 认为这是宫颈癌病人与无症状带毒者的主要区别, 此处突变的毒株显示出更强的侵染活性, 其转录活性也略高于标准株。

4. HPV E6、E7、E2 协同作用

HPV E2 是另一个 HPV 另一个癌蛋白，其具有正、负双向调节功能，在病毒复制中起重要作用。E2 编码的蛋白主要起转录调节作用，可调控 E6、E7 的启动子，充当 E6、E7 的阻遏物，当病毒 DNA 整合入宿主细胞基因组时，E2 断裂，失去对 E6 和 E7 的表达调控，导致 E6 和 E7 持续表达，所以 E2 基因失活可能是 E6 和 E7 基因过度表达而致癌变的必要条件。有研究通过对宫颈病变组织中 HPV16 E6、E7 蛋白和端粒酶阳性表达进行相关性分析后发现在宫颈癌前病变早期，HPV16 E6、E7 蛋白和端粒酶即相互作用，促进细胞恶性转化，导致宫颈病变的进展。HPV E6 可以激活端粒酶、HPV E7 可以使端粒酶延长，二者协同作用促进细胞的永生。HPV E6 和 E7 蛋白协同作用可以通过诱导中心体异常，使正常上皮细胞产生有丝分裂缺陷和非整倍体，细胞基因组不稳定性升高^[46]。

问题与展望

近年来，HPV 检测技术迅速发展，其在宫颈癌及癌前病变的筛查及预测中发挥了重要作用，但同时其应用也存在一些局限性，HPV 感染率高，但大多数的感染是短暂的，短期内通过机体的免疫系统识别可被清除，只有少数人 HPV 感染长期持续存在，最终发展成为宫颈癌，故认为对 HPV 持续感染的监测，尤其是高危型 HPV，在预测宫颈病变的作用中比仅仅检测单次的 HPV 感染情况要大。有研究发现 HPV 病毒负荷量与宫颈病变的进展关系密切，但也有相反的结论产生，高负荷 HPV-DNA 是否预示着 HPV 的持续性感染，是否可以预测宫颈病变的严重程度，还有待进一步研究，但目前最常用的 HPV 病毒负荷量检测方法存在许多问题，如精确度不高、费用昂贵且涉及许多复杂的技术，难以在临床中的大范围应用，故需改进检测技术，为宫颈病变的筛查工作寻找新的辅助手段。另有研究发现高危型 HPV 基因序列的突变与宫颈病变的进展关系密切，但对其具体机制仍不了解，今后需进一步研究，为寻求宫颈癌新的防治方法提供思路。

综述参考文献

- [1] Jansen KU. Toward vaccines against cervical cancer [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 7(2):228-232.
- [2] Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, et al. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(12):4030-4035.
- [3] Xu Y, Zhang H, Xu X. Enhancement of vaccine potency by fusing modified LTK63 into human papillomavirus type 16 chimeric virus-like particles [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, 52(1):99-109.
- [4] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses [J]. *Virus Res*, 2009, 143(2): 195-208.
- [5] Corusić A, Skrgatić L, Mahovlić V, et al. Cervical cancer as a public health issue--what next [J]? *Coll Antropol*, 2010, 34(1): 301-307.
- [6] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT. et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(14):1072-1079.
- [7] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. *J Pathol*, 1999, 189(1):12-19.
- [8] 赵昀,崔淑慧,任丽华,等.细胞学、HPV 高危型检测在宫颈病变筛查中的应用[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2006, 7(2): 89-93.
- [9] 赵方辉,李楠,马俊飞,等.山西省襄县妇女人乳头瘤病毒感染与宫颈癌关系的研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2001,22(5): 375-378.
- [10] 张莉,李小捷. HPV 基因分型检测在女性生殖道感染中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(5): 452-454.
- [11] Kuhn L, Denny L, Pollack A, et al. Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low-resource settings[J]. *J Natl Cancer Ins*, 2000, 92(10):818-825.
- [12] Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study [J]. *Lancet*, 2000, 355(9222):2189-2193.
- [13] Cestero RM. Risk of high -grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) or cancer during follow -up of human papillomavirus (HPV) infection or CIN1 [J]. *Am J*

- Obstet Gynecol, 2006, 195 (5):1196-1197.
- [14] Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence--implications for cervical disease progression and monitoring [J]. J Med Virol, 2004, 73(1):65-70.
- [15] van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance [J]. Int J Cancer, 2002, 98(4):590-595.
- [16] Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia [J]. Mol Biol Rev, 2004, 68(2):362-372.
- [17] Abba MC, Mouron SA. Association of human papillomavirus viral load with HPV16 and high-grade intraepithelial lesion [J]. Int J Gynecol Cancer, 2003, 13(2):154-158.
- [18] Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia [J]. Int J Cancer, 2003, 103(4):519-524.
- [19] Sun CA, Lai HC, Chang CC, et al. The significance of human Papillomavirus viral load in Prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesion of uterine cervix [J]. Gynecol Oncol, 2001, 83(1):95-99.
- [20] Padilla-Paz LA. Emerging technology in cervical cancer screening: status of molecular markers. Clin Obstet Gynecol [J]. 2005, 48(1):218-225.
- [21] Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. J Clin Microbiol [J]. 2002, 40(3):886-891.
- [22] Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, et al. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas [J]. Diagn Mol Pathol, 2001, 10(1):46-54.
- [23] Horner SM, Dimaio D. The DNA binding domain of a papillomavirus E2 protein programs a chimeric nuclease to cleave integrated human papillomavirus DNA in HeLa cervical carcinoma cells [J]. J Virol, 2008, 8(12):6254-6264.
- [24] Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, et al. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis [J]. Int J Gynecol Pathol, 1998, 17(2):146-53.
- [25] DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, et al. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells [J]. J Virol, 2003, 77(2):1551-1563.
- [26] 赵思成, 骆丹. HPV E6 蛋白及其在致癌过程中的作用的靶蛋白 [J]. 中国生物化

学与分子生物学报,2009,25(3):225-228.

- [27] Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2002, 16(3):231-40.
- [28] Massimi P, Gammoh N, Thomas M, et al. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation[J]. *Oncogene*, 2004, 23(49):8033-8039.
- [29] Jeong KW, Kim HZ, Kim S, et al. Human papillomavirus type 16 E6 protein interacts with cystic fibrosis transmembrane regulator-associated ligand and promotes E6-associated protein-mediated ubiquitination and proteasomal degradation[J]. *Oncogene*, 2007, 26(4):487-499.
- [30] Xu M, Luo W, Elzi DJ, et al. NFXI interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress Htert transcription in keratinocytes[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(15):4819-4828.
- [31] Zehbe I, Wilander E, Delius H, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(4):829-833.
- [32] Londesborough P, Ho L, Terry G, et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities [J]. *Int J Cancer*, 1996, 69(5):364-368.
- [33] Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9):3388-3393.
- [34] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16(HPV 16) variants in Japanese population [J]. *Cancer Lett*, 2000, 156(2):159-165.
- [35] Tu JJ, Kuhn L, Beattie KJ, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(2):736-742.
- [36] Sathishi N, Abraham P, Peedicayil A, et al. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia [J]. *Cancer Lett*, 2005, 229(1):93-99.
- [37] De Boer MA, Peters LA, Aziz MF, et al. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries [J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(3):422-425.
- [38] Grodzki M, Besson G, Clavel C, et al. Increased risk for cervical disease

- progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant[J].Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006 ,15(4):820-822.
- [39]Sichero L, Ferriera S, Trottier H, et al. High-grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPV16 and 18[J]. Int J Cancer, 2007, 120(8):1763-1768.
- [40]Cai HB, Chen CC, Ding XH. Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population [J]. Eur J Surg Oncol, 2010, 36(2):160-163.
- [41]Matsumoto K, Yasugi T, Nakagawa S, et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer [J]. Int J Cancer, 2003, 106(6):919-922.
- [42] Edmonds C, Vousden KH. A point mutational analysis of human papillomavirus Type 16 E7 protein [J]. J Virol, 1989, 63(6): 2650- 2656.
- [43] 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 [J]. Gynecol Oncol, 1997, 66(2): 275- 281.
- [44] Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, et al. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity[J]. J Gen Virol, 2000,81(Pt 8):1975-1981.
- [45] Schmidt M, Kedzia W, Goździcka-Józefiak A. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers[J]. J Clin Viro, 2001,23(1-2):65-77.
- [46] Duensing A, Liu Y, Spardy N, et al. RNA polymerase II transcription is required for human papillomavirus type 16 E7 and hydroxyurea-induced centriole overduplication[J]. Oncogene, 2007, 26(2):215-223.

致谢

本课题是在导师瞿全新教授的悉心指导下完成的。导师实事求是的治学精神，渊博的专业知识，高超的临床技术，温文尔雅、淡泊名利的人格魅力，都深深地感染并激励着我。在老师的引导影响下，我更加热爱科研及临床工作，也更加懂得如何为人处世。在此，衷心地感谢老师传道授业的恩情。

感谢天津市第一中心医院妇产科全体医生、护士老师在我实习期间为我提供了宝贵的临床学习锻炼的机会以及给我的莫大的帮助和指导。

感谢天津医科大学免疫学教研室张灏老师，为我提供了良好的实验条件。

感谢张栋、徐曼两位师姐以及田静、胡晓明、冯姝等同学在实验上给予的大力地支持和无私的帮助。

感谢我的家人、朋友和宿舍同学在我研究生期间给予我的关心和帮助。

最后，向在百忙中抽出时间对本文进行评审并提出宝贵意见的各位专家表示衷心地感谢！