

# 中国内蒙古通辽地区和吉林长春地区 宫颈癌中 HPV16 型 E6 基因变异分析\*

乌恩奇<sup>1</sup>, 刘 微<sup>2</sup>, 王金花<sup>3</sup>, 冯丽华<sup>4</sup>, 查 晓<sup>5</sup>, 孔 维<sup>2</sup>

(1. 中央民族大学中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室, 北京 100081;  
2. 吉林大学生命科学学院, 长春 130023; 3. 内蒙古民族大学附属医院病理科, 内蒙古通辽 029100;  
4. 吉林大学第一医院妇产科, 长春 130021; 5. 四川省肿瘤医院, 成都 610041)

**摘要:** 为了解我国内蒙古通辽和吉林长春地区宫颈癌中 HPV16 亚型的分布情况, 对通辽和长春的 30 例 HPV16 阳性宫颈癌样品中的 HPV16 E6 基因进行序列分析. 结果在 30 例宫颈癌样品中的 E6 全长基因内发现 11 处位点突变, 形成了 14 种突变体, 其中突变 T459G 是本试验第一次发现的突变. 经系统进化分析发现, 所有突变体均属欧洲原型突变群. 结合之前我国 HPV16 亚型分布调查结果表明, 欧洲型和东亚型 HPV16 在我国不同地区, 分布不均一, 主要以欧洲原型突变群为主.

**关键词:** HPV16; 宫颈癌; E6 基因; 突变

**中图分类号:** Q319; R181 **文献标志码:** A

## 引 言

特定型别的人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 的感染是引发宫颈癌的主要因素<sup>[1]</sup>. 到目前已发现有 100 个型以上的 HPV 病毒, 其中至少 40 个型的 HPV 可以感染生殖部位<sup>[2]</sup>. 根据其与健康发生联系的程度, HPV 可分为低危型和高危型. 其中 HPV16 是与宫颈癌关系最为密切的高危型 HPV 型别.

HPV16 型在世界不同地区又有着不同的变异. 通常结合突变体所被发现的区域将 HPV16 突变体分为五个亚型: 亚美型 Asian-American (AA)、东亚型 East-Asian (As)、欧洲型 European (E)、非洲 1 型 African-1 (Af-1) 和非洲 2 型 African-2 (Af-2). 根据基因同源性关系这五个亚型还可分为欧洲原型突变群和非欧洲原型突变群, East-Asian 和 European 同源性与欧洲原型相近, 属于欧洲原型突变群 (E-Class); Asian-American、African-1 和 African-2 同源性与欧洲原型相对较远, 属于非欧洲原型突变群<sup>[3]</sup>.

已有证据指出, HPV16 不同的亚型及突变的致癌效力有差异<sup>[4]</sup>. 所以, 对特定地区宫颈癌中不同亚型 HPV16 基因序列的分析对于宫颈癌发生机理的研究及对该地区宫颈癌预防性和治疗性 HPV 疫苗的研制有这重要指导意义.

本实验对分离自我国内蒙古通辽地区和吉林长春地区的宫颈癌组织的 HPV16 的 E6 基因进行测序, 并根据其突变判定其所属亚型, 通过与世界范围内和我国其他地区的 HPV16 E6 突变研究的数据

\* 收稿日期: 2012-11-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20674029)

作者简介: 乌恩奇 (1981-), 男 (蒙古族), 内蒙古通辽人, 助理研究员, 博士. 从事民族公共卫生与遗传学研究. E-mail: w1n2q3@163.com.

通信作者: 孔 维 (1965-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 教授, 博士. 从事生物化学与分子生物学研究. E-mail: weikong@mail.jlu.edu.cn.

进行对比,讨论我国 HPV16 亚型和突变的分布特点.

## 1 实验

### 1.1 样品来源

本实验选取了 HPV16 阳性的来自内蒙古通辽地区的汉族宫颈癌患者,蒙古族宫颈癌患者样品及来自吉林长春宫颈癌患者样品各 10 例,对其所感染的 HPV16E6 基因进行扩增和序列分析.其中,内蒙古通辽地区的样品为自 2004 年 4 月到 2007 年 6 月间内蒙古民族大学附属医院病理科收集的被诊断为宫颈癌的样品.所有样品经福尔马林固定,石蜡包埋后保存于室温.吉林长春地区的样品为自 2006 年 10 月到 2008 年 10 月间吉林大学第一临床医院妇产科收治并诊断为宫颈癌的患者.所有宫颈组织经手术切除后立即保存于 $-40^{\circ}\text{C}$ 冰箱备检.

所有 30 例宫颈癌样品均经过 DNeasy Tissue Kit (Qiagen) 提取样品基因组,提取的基因组经过  $\beta$ -globin 球蛋白引物(上游 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 下游 5'-CAACTTCATCCACGTTACCC)<sup>[6]</sup> PCR 扩增进行质量验证.且经 HPV16 特异性引物 PCR 扩增检查为 HPV16 阳性的样品.

### 1.2 HPV16 E6 全基因扩增和测序

对所选择的样品进行 HPV16 E6 特异性引物 PCR(上游 5' TAAACTAAGGGCGTAACCG 下游 5' TCCTCCTCCTCTGAGCTGTC),具体反映条件:

在 50 $\mu\text{L}$  反应体系中包含 1 $\times$ PCR 缓冲液、2.5mM  $\text{MgCl}_2$ 、200 $\mu\text{M}$  dNTPs、1 $\mu\text{L}$  模板 DNA、引物各 0.5 $\mu\text{M}$  和 2.5U Taq DNA 聚合酶.反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  加热 3min 后进入循环,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 60s,55 $^{\circ}\text{C}$  退火 60s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 60s,共循环 30 次,最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5min.

取 3 $\mu\text{L}$  PCR 反应产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色检测,确定 PCR 扩增成功.

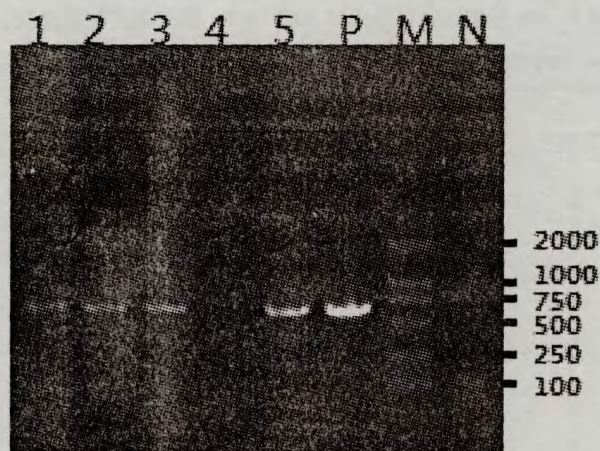
对 PCR 产物纯化后进行双向测序,以获得可靠的序列信息.出现测序信号杂,或者出现突变时,对该样品重新进行 PCR 后进行重复测序进行确认.为确保 PCR 质量,防止假阴性或假阳性的出现,每轮 PCR 检测均设有阳性和阴性对照;每次 PCR 反应结果中阴阳性对照均有效时方认定为有效实验.引物合成和测序工作由北京三博生物技术工程公司完成.

### 1.3 序列数据分析

所获得序列通过 BLAST 2.0 软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 与 Genbank 所收录的 HPV16 原型序列进行比较,确定其突变情况.利用 Mega4.0 软件对所获得的突变株序列与已知 HPV16 的 5 大亚型序列进行多重比对和进化树分析,并讨论其同源关系.

## 2 结果与讨论

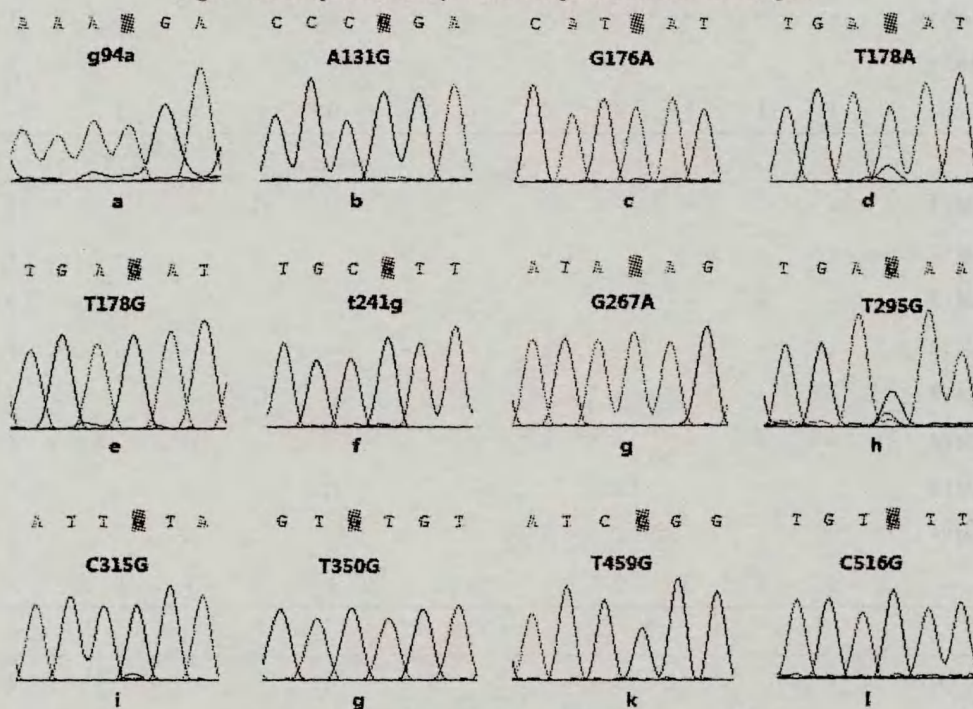
本实验对 30 例来自内蒙古通辽和吉林长春的 HPV16 阳性宫颈癌中的 E6 全长基因序列进行了扩增(图 1)和测序分析(图 2).测序结果中发现,在 30 例宫颈癌样品中 E6 全长基因内 11 处位点出现了 12 种突变,其中 10 种碱基突变引起氨基酸变化,30 例样品中共出现了包括 HPV16 欧洲原型和东亚型在内的 14 种突变体.在这些突变体中 HPV16 欧洲原型所占的比例最高,33.3% (10/30) 的样品属于该突变体;其次是亚洲型,16.7% (5/30) 的样品属于该突变体;其他突变体的具体突变及感染例数请见表 1.在所发现的 11 个突变中,突变 T178G(代表基因组第 178 为核酸从 T 突变成 G,大写字母代表有意突变,小写字母代表无意突变)出现的频率最高,占有所有样品的 26.7% (8/30);其次是 g94a, t241g 和 T350G,分别有 13.3% (4/30), 10% (3/30) 和 10% (3/30) 的样品产生了该突变.此外,突变 T459G 是本试验第一次发现的突变,国内外文献中未见报道.



1-5 道. 样品; P. 阳性对照; M. DL2000 DNA 标记物; N. 阴性对照

图1 HPV16 E6 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic analysis of PCR product of HPV16 E6 gene



灰色字符指示突变碱基位点

图2 HPV16 E6 基因内核酸突变位点测序波峰图

Fig. 2 Sequencing electropherogram showing detected nucleotide variations in HPV-16 E6 gene

在 10 例长春宫颈癌样品中, E6 全长基因内 4 处位点发生了突变, 其中 E6 基因第 96 位核酸出现了 T178A 和 T178G 两种突变, 但在氨基酸水平这两种突变均引起 D32E 的突变; 10 例样品中共出现了 5 种突变体, 其中 CCV5 (欧洲原型) 所占的比例最高, 40% (4/10) 的样品感染有该突变体. 在 10 例通辽汉族宫颈癌样品中, E6 全长基因内 7 处位点发生了突变; 在所发生的 7 个点突变中, 6 个涉及氨基酸变化; 10 例样品中共出现了 7 种突变体, 其中突变体 TLHANV3 (欧洲原型) 所占的比例最高, 30% (3/10) 的样品感染有该突变体. 在 10 例通辽蒙古族宫颈癌样品中, E6 全长基因内 8 处位点发生了突变, 其中突变 T459G 为本实验第一次发现, 在所发生的 8 个点突变中, 6 个涉及氨基酸变化; 10 例样品中共出现了 8 种突变体, 其中突变体 TLMV3 (欧洲原型) 所占的比例最高, 30% (3/10) 的样品感染有该突变体. 详细的氨基酸突变情况请见表 2.

表 1 30 例样品中检测出的 HPV16 E6 基因核酸碱基突变

Table 1 Nucleotide sequence variations in the E6 gene of HPV 16 detected in 30 specimens

| 突变核酸碱基位点    | HPV16 基因组 |   |   |     |   |   |   |   |   |   |   | 样品例数 |
|-------------|-----------|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|------|
|             | 1         | 1 | 1 | 2   | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 5 |   |      |
|             | 9         | 3 | 7 | 7   | 4 | 6 | 9 | 1 | 5 | 5 | 1 |      |
|             | 4         | 7 | 6 | 8   | 1 | 7 | 5 | 5 | 0 | 9 | 6 |      |
| HPV 16R     | g         | A | G | T   | t | G | T | C | T | T | C |      |
| TLHANV1     | -         | G | - | G   | - | - | - | - | - | - | - | 1    |
| TLHANV2     | a         | - | - | -   | - | - | - | - | G | - | - | 1    |
| TLHANV3     | -         | - | - | -   | - | - | - | - | - | - | - | 3    |
| TLHANV4     | -         | - | - | G   | - | A | - | - | - | - | - | 1    |
| TLHANV5     | -         | - | A | -   | - | - | - | - | - | - | - | 1    |
| TLHANV6     | -         | - | - | -   | - | - | - | - | - | - | G | 1    |
| TLHANV7     |           |   |   | G   |   |   |   |   |   |   |   | 2    |
| Cases       | 1         | 1 | 1 | 4   | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |      |
| TLMV1       | a         | G | - | -   | - | - | - | - | G | - | - | 1    |
| TLMV2       | a         | - | - | -   | - | - | - | - | - | - | - | 1    |
| TLMV3       | -         | - | - | -   | - | - | - | - | - | - | - | 3    |
| TLMV4       | -         | - | - | -   | g | - | - | - | - | - | - | 1    |
| TLMV5       | -         | - | - | -   | - | - | G |   | G | - | - | 1    |
| TLMV6       | -         | - | - | -   | - | - | - | - | - | G | - | 1    |
| TLMV7       | -         | - | - | G   | - | - | - | G | - | - | - | 1    |
| TLMV8       | -         | - | - | G   | - | - | - | - | - | - | - | 1    |
| Cases       | 2         | 1 | 0 | 2   | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |      |
| CCV1        | a         | - | - | A   | - | - | - | - | - | - | - | 1    |
| CCV2        | -         | - | - | -   | g | - | - | - | - | - | - | 2    |
| CCV3        | -         | - | A | -   | - | - | - | - | - | - | - | 1    |
| CCV4        | -         | - | - | G   | - | - | - | - | - | - | - | 2    |
| CCV5        | -         | - | - | -   | - | - | - | - | - | - | - | 4    |
| Cases       | 1         | 0 | 1 | 1;2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |      |
| Total cases | 2         | 1 | 0 | 2   | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |      |

-表示未发生突变位点;大写字母表示发生氨基酸变化的有意突变,小写字母表示未发生氨基酸变化的五一突变。

本实验对 30 例分离自我国内蒙古通辽地区和吉林长春地区的宫颈癌中 HPV16 的 E6 基因进行了序列分析.结果共检测出了 12 种核酸突变,其中突变 T459G 为本实验首次发现。

HPV 病毒的 E6 蛋白主要与细胞转化及致癌性有关,其致癌作用与细胞周期调控机制密切相关。

体外表达的 E6 蛋白:含有 151 个氨基酸.其主要结构特征是 2 个锌指结构,每个锌指结构的基础是两个 cys-x-x-cys,这种结构是所有 HPVE6 所共有,其结构根据功能不同可分为 5 个区,分别是:C 端,1-29 氨基酸;锌指 1 区,30-66 氨基酸;中央区(连接区),67-102 氨基酸;锌指 2 区,140-151 氨基酸;N 端,139 氨基酸.高危型 HPV E6 基因产物可与 P53 结合形成复合物,抑制 p53 蛋白对细胞周期的负调节功能,诱导细胞发生转化和永生<sup>[7]</sup>.

表 2 30 例样品中 HPV16 E6 基因内氨基酸变化情况  
Table 2 Amino acid variations in the E6 gene of HPV 16 detected in 30 specimens

| E6 sequence                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 |   |   |   |   |   |   |   | 1 | 1 |
| position of amino acid mutation | 1 | 2 | 2 | 4 | 5 | 7 | 8 | 1 | 3 |
|                                 | 0 | 5 | 5 | 7 | 5 | 1 | 3 | 9 | 8 |
| HPV 16R                         | R | D | D | A | R | S | L | L | S |
| AA mutation                     | G | K | E | G | K | C | V | R | C |

Kast WM 等的研究认为 HPV16E6 蛋白 3-11、22-31、26-34、45-53、52-58、61-68、73-81、80-88、119-127、146-150 残基均属于 T 细胞抗原决定簇区域<sup>[8]</sup>,Gao 等的研究认为 86-95、96-100、111-120、136-140、141-146 和 146-150 残基属于 B 细胞抗原决定簇区域.<sup>[9]</sup>本实验所发现的 11 处氨基酸变化中除 L71E 和 S138C 位突变外 9 处突变发生的残基都处在这些区域内;本实验新发现的 S138C 和 L119R 正处于 P53 结合区域.提示这些氨基酸突变都有可能影响机体对这些突变体的识别和应答.此外 Crook T 等<sup>[10]</sup>和 Foster SA 等<sup>[11]</sup>对 E6 蛋白对 P53 结合和抑制的机理的研究都认为 9-13 区域为 E6 蛋白 P53 结合区,本实验发现的 10 位的突变正处于 P53 结合区域,此突变可能造成此突变株 E6 蛋白与 P53 结合能力的改变,进而影响细胞恶性转化的进程.

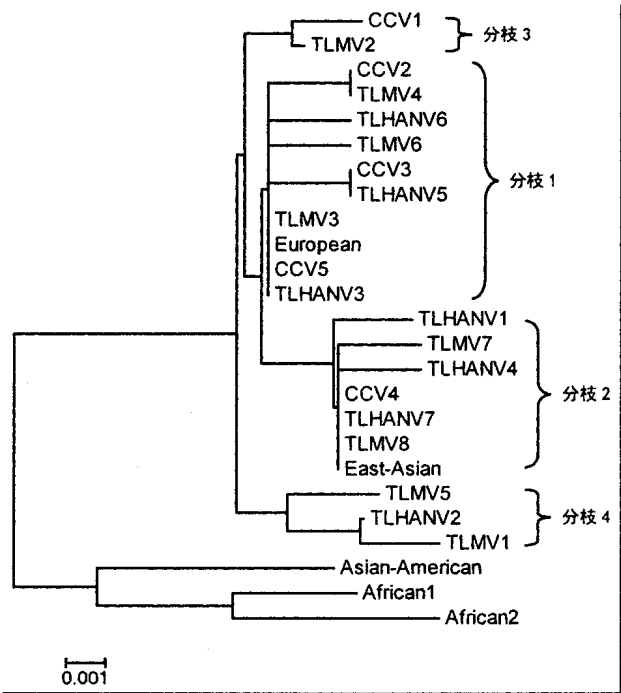


图 3 HPV 16 E6 基因突变体系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the E6 gene sequences of HPV16 variants

研究认为 HPV 病毒的进化是通过碱基点突变累积,而不是通过基因重排或基因重整(rearrangement or recombination)实现的,因此可以通过某一区段基因的突变情况判定病毒所属的世系<sup>[12]</sup>.对本

实验发现的 14 个突变体(包括欧洲原型(E)和东亚型(As))与 5 种主要 HPV16 亚型(亚美型 Asian-American(AA)、东亚型 East-Asian(As)、欧洲型 European(E)、非洲 1 型 African-1(Af-1)和非洲 2 型 African-2(Af-2))的 E6 基因序列进行了系统进化分析(图 3)。结果表明,14 种突变体形成了 4 个的分枝;其中 5 个突变体与欧洲原型同源性相近,位于另一个分化枝内(分枝 1);这 5 个突变体与欧洲原型一致,在 E6 96 位上均为 T。4 种突变体与东亚型同源性相近,位于同一分化枝内(分枝 2);这 4 种突变体均在 E6 基因内第 96 位发生了 T178G 的突变。另外两个分枝分别包括两种突变体(CCV1 和 TLMV2)(分枝 3)和三种突变体(TLMV5, TLMV1 和 TLMV2)(分枝 4);其中 CCV1 和 TLMV2 均在 94 位发生了 g 变 a 的无意突变;而 TLMV5, TLMV1 和 TLMV2 则均在 350 位发生了 T 变 G 的有意突变(L83V)。根据 Huertas-Salgado 等通过对世界范围内所发现的 HPV16E6 基因突变进行同源性分析所提出的 HPV16 亚型鉴别标准<sup>[13]</sup>。本研究中的分枝 1 和分枝 2 应属于欧洲原型的 E-G350 组和 E-T350 组,分枝 3 和分枝 4 内的所有突变体均属于东亚型的 As-G96 组和 As-A96。整体上看,本研究所发现的所有突变体均与欧洲原型和东亚型同源性相近,与非 1、非 2 和亚美型同源性相对较远,均属于欧洲原型突变群。

目前已有多篇研究对我国不同地区宫颈癌中的 HPV16 E6 基因变化情况进行了分析报道。从 HPV16 各突变体在不同地区和人群中宫颈癌的分布的角度分析,表 3 汇总了 HPV16 各亚型在我国不同地区人群中的分布情况欧洲亚型和东亚型在不同来源人群中分布的状况。

表 3 文献报道的 HPV16 亚型在中国各地分布情况

Table 3 Distribution of HPV16 subtypes in China based on the reference report

| 地区     | 样品类型     | 样本量 | 欧洲型/%     | 东亚型/%     | 非洲 1/% | 非洲 2/%  | 美洲/%   | 参考文献 |
|--------|----------|-----|-----------|-----------|--------|---------|--------|------|
| 香港     | ICC/CIN3 | 255 | 113(44.3) | 129(50.6) | 0      | 11(4.3) | 2(0.8) | [14] |
| 江西 广东  | SCC      | 55  | 15(27.3)  | 37(67.3)  | 3(5.5) | 0       | 0      | [15] |
| 浙江 温州  | SCC      | 55  | 14(25.5)  | 36(65.5)  | 5(9.1) | 0       | 0      | [16] |
| 浙江     | ICC      | 50  | 6(12)     | 42(84)    | 2(4)   | 0       | 0      | [17] |
| 湖北     | ICC      | 80  | 33(41.3)  | 47(58.8)  | 0      | 0       | 0      | [18] |
| 湖北     | SCC      | 58  | 22(37.9)  | 36(62.1)  | 0      | 0       | 0      | [19] |
| 四川     | SCC      | 21  | 16(76.2)  | 5(23.8)   | 0      | 0       | 0      | [20] |
| 四川     | CC       | 113 | 78(69)    | 35(31)    | 0      | 0       | 0      | [21] |
| 河南 安阳  | SCC      | 76  | 45(59.2)  | 31(40.8)  | 0      | 0       | 0      | [22] |
| 北京     | CC       | 31  | 15(48.4)  | 16(51.6)  | 0      | 0       | 0      | [23] |
| 辽宁     | CIS/CC   | 22  | 4(18.2)   | 18(81.8)  | 0      | 0       | 0      | [24] |
| 黑龙江    | SCC      | 52  | 30(57.7)  | 22(42.3)  | 0      | 0       | 0      | [25] |
| 吉林 长春  | CC       | 10  | 7(70)     | 3(30)     | 0      | 0       | 0      | 本文   |
| 内蒙古 通辽 | CC       | 20  | 14(70)    | 6(30)     | 0      | 0       | 0      | 本文   |
| 蒙古族    | CC       | 10  | 8(80)     | 2(20)     | 0      | 0       | 0      | 本文   |
| 汉族     | CC       | 10  | 6(60)     | 4(40)     | 0      | 0       | 0      | 本文   |

在我国有报告数据的所有地区的宫颈癌中的 HPV16 均以欧洲原型和东亚型为主,非洲 2 和美洲型仅在香港有报道出现,非洲 1 型仅在广东,江西和浙江的南方沿海地区有报道,且这些非欧洲原型突变组的突变体所占比例非常有限。通过地区间比较可以发现欧洲原型和东亚型在宫颈癌中的比例在不同地区有着明显差异。在广东,江西,浙江和湖北等南方地区东亚型相对欧洲型更为占优;四川和河南则是欧洲型更为常见;在北京等地区东亚型和欧洲型所占比例接近持平;东北地区的辽宁东亚型

明显多于欧洲原型,而黑龙江则是欧洲原型多于东亚型。本文的结果显示在东北长春地区,与黑龙江地区类似,欧洲原型多于东亚型。而与其相邻的内蒙古通辽地区也显示欧洲原型多于东亚型。通过对通辽地区蒙古族和汉族宫颈癌患者间的比较,可以发现,欧洲原型在蒙古族患者中的比率高于汉族,但是由于样本量过小,未能得出具有显著统计学意义的差距。不同亚型的 HPV16 在不同地区宫颈癌中分布的差异,可能是当地人群中 HPV16 亚型分布的一种体现,但也有可能是特定亚型的 HPV16 在特定基因背景人群中具有更强的致癌能力所致。本研究中由于缺乏相应的对照,未能对各亚型的致癌危险性进行评估。关于特定的 HPV16 亚型在特定人群中的致癌能力尚需大规模人群中的进一步分析。但本研究及我国其他地区的宫颈癌中 HPV16 亚型的研究均表明,在我国宫颈癌中的 HPV16 主要以欧洲原型突变群为主。因此在设计针对中国宫颈癌的 HPV 疫苗,特别是以 E6 基因为靶点的治疗性疫苗时应当优先考虑选择欧洲型突变组 HPV16 作为目标病原体。

## 参考文献:

- [1] Bosch F X, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2002, **55**(4): 244-265.
- [2] de Villiers E M, Fauquet C, Broker T R, et al. Classification of papillomaviruses[J]. *Virology*, 2004, **324**(1): 17-27.
- [3] Yamada T, Wheeler C M, Halpern A L, et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments[J]. *J Virol*, 1995, **69**(12): 7743-7753.
- [4] Xi L F, Koutsky L A, Galloway D A, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, **89**(11): 796-802.
- [5] Wheeler C M, Yamada T, Hildesheim A, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**(1): 11-19.
- [6] Stephen A L, Thompson C H, Tattersall M H, et al. Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of HPV cervical cancer isolates from central China[J]. *International Journal of Cancer*, 2000, **86**(5): 695-701.
- [7] Liu Y M, McKalip A, Herman B. Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: Roles of p53 and caspase activation[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2000, **78**(2): 334-349.
- [8] Kast W M, Brandt R M, Sidney J, et al. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins[J]. *J Immunol*, 1994, **152**(8): 3904-3912.
- [9] Gao L, Chain B, Sinclair C, et al. Immune response to human papillomavirus type 16 E6 gene in a live vaccinia vector[J]. *J Gen Virol*, 1994, **75**( Pt 1): 157-164.
- [10] Crook T, Tidy J A, Vousden K H. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation[J]. *Cell*, 1991, **67**(3): 547-556.
- [11] Foster S A, Demers G W, Etscheid B G, et al. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest[J]. *J Virol*, 1994, **68**(9): 5698-5705.
- [12] Chen Z, Terai M, Fu L, et al. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses[J]. *J Virol*, 2005, **79**(11): 7014-7023.
- [13] Huertas-Salgado A, Martin-Gamez DC, Moreno P, et al. E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: an updated and unified criterion for clustering and nomenclature[J]. *Virology*, 2011, **410**(1): 201-215.
- [14] Chan P K, Lam C W, Cheung T H, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China[J]. *J Infect Dis*, 2002, **186**(5): 696-700.
- [15] Wu Y, Chen Y, Li L, et al. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China[J]. *J Gen Virol*, 2006, **87**(Pt 5): 1181-1188.
- [16] Hu Y, Zhu Y Y, Zhang S H, et al. Human papillomavirus type 16 e6 gene variations in young Chinese women with cervical squamous cell carcinoma[J]. *Reprod Sci*, 2011, **18**(4): 406-412.

- [17] Ding T, Wang X, Ye F, et al. Distribution of human papillomavirus 16 E6/E7 variants in cervical cancer and intraepithelial neoplasia in Chinese women[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, **20**(8):1391-1398.
- [18] 丁晓华, 张帆, 蔡红斌, 等. 中国湖北地区 HPV16 型 E6 和 E7 基因变异和进化发生学研究[J]. *病毒学报*, 2010, **26**(5):368-371.
- [19] Cai H B, Chen C C, Ding X H. Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2010, **36**(2):160-163.
- [20] Stephen A L, Thompson CH, Tattersall M H, et al. Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of HPV 16 cervical cancer isolates from central China[J]. *Int J Cancer*, 2000, **86**(5):695-701.
- [21] Qiu A D, Wu E Q, Yu X H, et al. HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, **104**(1):77-85.
- [22] Sun M, Gao L, Liu Y, et al. Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human papillomavirus type 16 in central China[J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**(5):e36577.
- [23] 熊光武, 袁杨, 李萌, 等. 北京地区宫颈癌 HPV16 上游调控序列、E6、E7 癌基因序列初步分析[J]. *遗传*, 2010, **32**(4):339-347.
- [24] Sun Z, Ren G, Cui X, et al. Genetic diversity of HPV-16 E6, E7, and L1 genes in women with cervical lesions in Liaoning Province, China[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, **21**(3):551-558.
- [25] Shang Q, Wang Y, Fang Y, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 [corrected] genes and long control region in [corrected] cervical carcinomas in patients in northeast China[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, **49**(7):2656-2663.

## Genetic Variants of HPV16 E6 in Cervical Cancer from Tongliao Area in Inner Mongolia and Changchun City in Jilin Province of China

WU En-qi<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, WANG Jin-hua<sup>3</sup>, FENG Li-hua<sup>4</sup>, ZHAO Xiao<sup>5</sup>, KONG Wei<sup>2</sup>

(1. State Nationalities Affairs Commission and Department of Educational Key Lab of Minority Traditional Medicine, MINZU University of China, Beijing 100081, China; 2. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China; 3. Department of Pathology, Affiliated Hospital Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 029100, China; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China; 5. Department of Molecular Pharmacology, Sichuan Tumor Hospital, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** To investigate the prevalence of the HPV16 subtypes in Tongliao area in Inner Mongolia and Changchun city in Jilin province in China, the sequences of HPV16 E6 gene were amplified and sequenced from 30 HPV 16 positive cervical cancer samples isolated from Tongliao area in Inner Mongolia and Changchun city. A total of 14 variants were detected from 11 nucleotide sites in HPV16 E6 gene in 30 cervical cancer samples. The nucleotide variant T459G has not been reported previously. Phylogenetic analysis showed that all variants detected in this study belong to HPV16 E-Class. Together with the data from previous HPV16 subtype studies in China, the results indicate that HPV16 E-Class is the most predominant in China, European subtype and East-Asian subtype distributed unregularly in different areas in China.

**Key words:** HPV16; cervical cancer; E6 gene; variant