

石河子大学

硕士学位论文

HPV16E7及HLA-DQB1基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

姓名：夏小艳

申请学位级别：硕士

专业：医学妇产科学

指导教师：玛依努尔·尼牙孜

2011-04

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族子宫颈癌关系研究

姓 名: 夏 小 艳 (妇科肿瘤学)

指 导 教 师: 玛依努尔·尼牙孜 教 授

摘 要

目 的: 研究新疆维吾尔族妇女 HPV16 阳性子宫颈癌组织 HPV16E7 基因突变情况及子宫颈癌细胞表面 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族妇女子宫颈癌关系。

方 法: (1) 采用聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 方法对 160 例 (子宫颈癌组 80 例, 宫颈炎组 80 例) 新疆维吾尔族妇女宫颈组织标本进行 HPV16 E7 基因扩增, 电泳 PCR 产物确定扩增产物是否为 E7 片段, 回收 PCR 产物并进行碱基测序。(2) 采用反向膜杂交技术对 80 例宫颈鳞癌组织标本进行 HPV 分型。(3) 运用聚合酶链反应-直接测序分型 (Polymerase chain reaction-Sequencing Based Typing, PCR-SBT) 扩增宫颈鳞癌及宫颈炎组织中 HLA-DQB1 第二外显子, 回收扩增产物并进行碱基序列测定分型。

结 果: (1) 54 例宫颈鳞癌中共有 6 例发生 HPV16 E7 碱基突变, 突变位点为: A647G (2/54), T760C (2/54), G663A (1/54), G666A (1/54), C790T (1/54), T846C (1/54), 其中 A647G (2/54) 及 C790T (1/54) 为错义突变, 分别导致第 29 位氨基酸由天冬酰胺变为丝氨酸及第 77 位氨基酸由精氨酸变为半胱氨酸。宫颈炎组中有 2 例 HPV16 E7 PCR 扩增阳性, 测序未发现突变。(2) 160 个样本中共检测出 296 个等位基因, 其中杂合的等位基因型 136 人份, 纯合的等位基因型 24 人份。经过频率计算和统计分析发现 HLA-DQB1*0325 (OR:10.60, 1.341-83.81) HLA-DQB1*0332 (OR:12.59, 2.909-54.526) 在新疆维吾尔族妇女宫颈鳞癌中频率明显高于宫颈炎对照组 ($p < 0.05$), 而 HLA-DQB1*0317 (OR:0.49, 0.304-0.798) 和 HLA-DQB1*040302 (OR:0.40, 0.243-0.658) 明显低于宫颈炎对照组 ($p < 0.05$)。(3) 在 80 例宫颈鳞癌分型检测中, 共检出 15 种高危型 HPV (分别为 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 53, 73), 2 种低危型 HPV (分别为 HPV11, 42), 其中 HPV16 单一感染 33 例, 占 44%; HPV16 合并其他高危型感染 20 例, 占 26%, 合并高危型感染的型别中以 56 型为主, 占 14 例 (70%), 其次为 33 型、58 型; HPV16 合并其他低危型感染 7 例。80 例子宫颈癌中有 HPV16 型感染的为 62 例, 感染率为 77.5%。在混合感染中以双重感染为多, 其次为三重感染, 发现 1 例为五重感染。

结 论: (1) 新疆维吾尔族妇女子宫颈癌中 HPV 感染以 HPV16 感染率最高, 其次为 HPV56, 而 HPV18 型较少, 且重复感染相对较多, 与我国其他地区以 HPV16、18 型为主有差异, 这为 HPV 疫苗在新疆维吾尔族聚集地区的开发提供一定的理论依据。(2) 新疆维吾尔族妇女

子宫颈癌 HPV16 E7 相对于我国其他地区、民族子宫颈癌具有高度保守性,这可能是导致新疆维吾尔族聚集区子宫颈癌高发的重要原因之一。(3)HLA-DQB1*0325 和 HLA-DQB1*0332 可能是新疆维吾尔族妇女子宫颈癌的易感基因,而 HLA-DQB1*0317 和 HLA-DQB1*040302 可能为新疆维吾尔族妇女子宫颈癌的保护基因。(4) HPV16 E7 变异位点未发现 DQ2 抗原结合位点突变,这说明可能 E7 的变异并不是导致 HLA 抗原提呈能力下降的原因,某些 HLA 等位基因频率的升高和降低可能导致了 HLA 抗原提呈能力下降,这可能是新疆维吾尔族妇女子宫颈癌高发重要原因之一。

关键词:子宫颈癌;HLA-DQB1;人乳头瘤病毒(HPV);PCR-SBT;HPV 分型

论文类型:A(基础研究)

Abstract

Objective:To research the relationship of HPV16E7 gene mutation in HPV16-positive cervical cancer and its cell surface HLA-DQB1 gene polymorphism in Xinjiang Uigur women uterine cervix cancer.

Method:(1)To copy the HPV16 E gene for 160 cases (cervical cancer group 80 cases , cervicitis group 80 cases) of cervical tissue of Uygur women in Xinjiang by polymerase chain reaction method. By the use of gel electrophoresis, we determined whether the PCR amplification products were the E7 fragment. Then PCR products were recovered and its nucleotide sequences were detected. (2) The HPV of 80 cases Cervical cancer specimens were type by the reverse membrane hybridization. (3)Both the tissue specimens of cervical cancer and cervicitis second exon were copied by the Polymerase chain reaction-Sequencing Based Typing. The PCR products were recovered, sequenced and typed.

Result:(1)Among 54 cases of cervical cancer, 6 cases were mutated in HPV16 E7 gene. The mutation sites were A647G(2/54), T760C(2/54), G663A(1/54),G666A(1/54), C790T(1/54)and T846C(1/54) , A647G(2/54) and C790T(1/54) missense mutation. The mutation of A647G(2/54) lead the asparagine into serine at 29th site. The mutation of C790T(1/54) lead the arginine into cysteine at 77th site. Only 2 cases was not mutation in HPV16 E7 about cervicitis group. (2)296 alleles were found in 160 cases. 136 alleles were heterozygous alleles, 24 alleles were homozygous alleles. We found that HLA-DQB1*0325(OR:10.60,1.341-83.81) and HLA-DQB1*0332(OR:12.59, 2.909-54.526) in cervical cancer group were more high than cervicitis group by frequency calculation and statistical analysis($P<0.05$),but HLA-DQB1*0317(OR:0.49 ,0.304-0.798) and HLA-DQB1*040302(OR:0.40,0.243-0.658) in cervical cancer group were more low($P<0.05$).(3) We found 15 kinds of high-risk and 2 kinds of low-risk HPV by genotyping in 80 cases of cervical cancer. The high-risk were HPV16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,53,73.The low-risk were HPV(HPV11,42). In all infection cases, 33 cases were only HPV16 infection,the percentage is 44% of all cases. 20 cases were HPV16 combination with other high-risk HPVs infection, the percentage is 26% of all cases. The first high-risk is HPV56(70% of all high-risk),the second and third were HPV58 and HPV33. Only 7 cases were HPV16 combination with other low-risk HPVs infection. In cervicitis group,62 cases were infected by HPV16, the percentage is 77.5% of all cases. The main infection was dual infection in the mixed infection, the second was triple infection,1 case was five infected.

Conclusion:(1) In Xinjiang Uygur women cervical cancer, the highest HPV infection is HPV16, the second is HPV56, HPV18 infection is particularly low. This is different to the other area, where the main HPV infection are HPV16 and HPV18. The difference provide a theoretical basis for developing a new HPV vaccine in Xinjiang where uighur reside. Compared to women in other

parts of China or other national of China, Xinjiang Uygur cervical cancer women's HPV16 E7 is highly conserved. This was the most important cause which led cervical cancer is very high in Xinjiang Uygur women. (3) HLA-DQB1*0325 and HLA-DQB1*0332 probably are Xinjiang Uygur cervical cancer women's susceptibility gene. But HLA-DQB1*0317 and HLA-DQB1*040302 are protective genes possibly. (4) We found that antigen binding sites of DQ2 have not mutate in the variable sites of HPV16 E7. This reminds that the variation of E7 is not the cause which led the low antigen-presenting ability of HLA. The high and low frequency of HLA allele may led to the low antigen-presenting ability of HLA. This is the very important reason of high rate of cervical cancer in Xinjiang Uygur women.

Key Words:Cervical squamous carcinoma of cervix , HLA-DQB1, HPV, PCR-SBT,HPV type

Type of thesis:A (Basic Research)

英文缩略词表

英文缩写	英文全名	中文译名
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PCR-SBT	Polymerase chain reaction-Sequencing Based Typing	聚合酶链反应-直接测序分型
HLA	human leucocyte antigen	人类白细胞抗原
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
MHC	Human major histocompatibility complex	人类主要组织相容性复合物
ER	Early region	早期蛋白编码区
LR	Late region	晚期蛋白编码区
URR	Upstream regulatory region	上游调控区
CTL	cytotoxic t lymphocyte	细胞毒 T 淋巴细胞
TAP	Transporter associated with antigen	抗原加工相关转运体
SPSS	Statistical Package for the Social Science	社会科学统计软件包

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：时间： 年 月 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅。有权将学位论文的内容编入有关数据进行检索。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：时间： 年 月 日

导师签名：时间： 年 月 日

前 言

(Introduction)

2008 年一项有关肿瘤流行病学研究发现世界范围内子宫颈癌是仅次于皮肤癌和乳腺癌的女性第三大常见恶性肿瘤,居所有恶性肿瘤第七位,仅 2008 年子宫颈癌的新发病例就为 529,000 例,其中 85%以上都发生在发展中国家,占到了发展中国家女性肿瘤患者的 13%^[1]。在欧洲每年有 34000 例新发病例,每年至少有 16000 人死于子宫颈癌^[2,3],我国每年新发病例大约 13 万人,约占世界子宫颈癌新发病例的 28.8%,为我国妇女恶性肿瘤第一位^[4],高发区为山西、湖北、山西及新疆南部维吾尔族聚集区。

新疆南部维吾尔族聚集区是子宫颈癌高发区,2004 年姜淑清^[5]等在新疆子宫颈癌高发区和田的策勒县进行普查,结果显示当地维吾尔族妇女子宫颈癌的患病率为 526/10 万,是北京市妇女子宫颈癌患病率的 210 多倍。众所周知,子宫颈癌的发生与高危型 HPV 的持续感染密切相关,WHO 于 1992 年宣布 HPV 是引起子宫颈癌变的首要因素。虽然子宫颈癌的发病原因基本明确,然而其发病机制尚未清楚。目前对其发病机制的研究层出不穷,广为所知的是高危型 HPV 病毒所编码的 E6、E7 蛋白即原癌蛋白分别使抑癌基因 p53、Rb 等失活,继而诱发正常鳞状上皮细胞转化为上皮的不典型增生及病变进一步发展。研究表明 E7 蛋白在子宫颈癌形成的早期起重要作用,E7 蛋白在子宫颈癌患者的宫颈组织中呈高表达状态。马正海等^[6]对 35 例维吾尔族妇女子宫颈癌组织中 HPV16 型 E7 基因分析结果显示子宫颈癌组织中 HPV16E7 阳性率为 82.86%。

高危型 HPV 尤其是 HPV16 与子宫颈鳞状细胞癌的发生尤为密切,研究表明不同型别 HPV 感染所引起子宫颈癌的危险性不同^[7],其危险性由高到低依次为 HPV16, HPV18, HPV52, HPV45。在世界范围内,HPV 感染的型别分布不尽一致,但 HPV16 是主要的感染型别,有学者研究认为可能是 HPV16 更易于被机体免疫系统清除所致。既然 HPV 感染为子宫颈癌发病的首要原因,那么是否意味着高的 HPV 感染率就会伴随着高的子宫颈癌的发病率呢?中国癌症基金会组织的“中国妇女 HPV 感染和子宫颈癌流行病学调查”是一个覆盖了中国七个地区 19 家医院 1244 名子宫颈癌和宫颈高度病变病例的多中心研究,其研究结果显示:新疆维吾尔族妇女的 HPV 感染率相对较低,其高危型 HPV 感染率是 7.2%,低危型 HPV 感染率是 1.6%。新疆维吾尔族妇女子宫颈癌发病呈现出“高患病率,高病死率及低 HPV 感染率”的特点,这是否提示种族遗传易感性在其中起了一定的作用?

大量试验表明 HPV 感染在良性宫颈病变中起重要作用,但单靠 HPV 感染不足以使其进展为子宫颈癌,宿主的免疫监视对感染的控制及疾病的发展起着至

关重要的作用。人类白细胞抗原 (Human leukocyte antigen, HLA) 作为抗原提呈分子在机体对病毒的免疫监视中具有重要地位。HLA 分子将病毒肽提呈给 T 细胞的过程受到 HLA 及 HPV 基因多态性双重影响, HLA 分子能否正确将病毒肽提呈给人免疫细胞并引起相应的免疫应答对疾病的发生、发展及预后有重大影响。De Araujo Souza 等^[8]的研究也提示 HLA-II 类等位基因多态性影响 HPV 感染的清除与持续状态。HPV E7 蛋白对机体来说也是一种外源性抗原肽, HLA 分子对其的提呈作用对子宫颈癌的发生至关重要。Vander Burg^[9]等研究表明人群感染 HPV16 病毒后, 可以产生抗 HPV16 E7 的特异性免疫, E7 表面至少有 3 个 HLA II 表位: DR15/E7(50-62), DR3/E7(43-77), DQ2/E7(35-50))。

HLA 基因位于 6 号染色体短臂上, 长约 4000Kb。HLA 是目前所知人体最复杂的遗传多态性系统, 有几十个基因座位, 每个基因座位又有几十个等位基因, 且呈共显性表达。HLA II 类基因是目前所知最具多态性的蛋白分子。DR、DQ 和 DP 3 个亚区构成经典的 HLA-II 类基因, 3 个经典的 II 类基因亚区中 DPA1, DPB1, DQA1, DQB1, DRB1、B3、B4 和 B5 是功能基因, DPA2 和 DPB2 为伪基因, 其余的功能不清楚。正是因为 HLA 具有高度的多态性, 这就决定了携带不同的 HLA 等位基因型对外源性抗原提呈能力可能存在差异。有报道发现 DQB1*03(DQB1*0301, DQB1*0302, DQB1*0303)^[10]为子宫颈癌的易感基因, 而 DQB1*0603 为子宫颈癌的保护基因。孙琦等^[11]用 PCR-SSP 方法检测 HLA-II 等位基因发现 DRB1*1501 等位基因可能为新疆维吾尔族妇女 HPV16 易感基因 DQB1*0602 基因可能是新疆维吾尔族妇女子宫颈癌的保护基因。而林仲秋等^[12]对 140 例就诊于中山大学第二附属医院妇科确诊为子宫颈癌患者的宫颈组织采用 PCR-SBT 方法扩增 HLA-DQB1 第二外显子发现 DQB1*030302 和 DQB1*050301 可能为子宫颈癌的易感基因。

本研究拟通过检测新疆维吾尔族妇女炎症宫颈组织和浸润性子宫颈癌组织中 HPV 感染型别、HPV16E7 变异情况及 HLA-DQB1 等位基因型别特点, 明确 HPV16E7 基因有无 HLA-II 抗原表位所在碱基突变 (DQ2/E7(35-50)), 从而分析 HPV16E7 变异及 HLA-DQB1 基因多态性之间与子宫颈癌的发生是否存在相关性, 探索新疆维吾尔族妇女中是否存在子宫颈癌的易感基因, 为新疆维吾尔族子宫颈癌筛查及预防提供理论依据。

材 料 与 方 法

(Materials & Methods)

1 材 料

1.1 材料收集

收集 2009 年 8 月至 2010 年 4 月新疆维吾尔自治区人民医院妇科年龄在 20 岁至 60 岁维吾尔族患者 160 例，其中宫颈炎 80 例，子宫颈癌 80 例，宫颈炎及子宫颈癌组织均经病理学明确诊断。取新鲜宫颈组织，并将组织收集后装入冻存管中放入液氮中速冻，24 小时内转置-80℃冰箱中保存。

1.2 主要试剂

1.2.1 DNA 提取主要试剂

(1) 组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)详见表 1

表 1 基因组 DNA 抽提试剂盒（北京博迈德科技发展有限公司）

试剂盒组成	100 次 (DP1902)
缓冲液 TB	44 ml
裂解液 TL	22 ml
结合液 CB	22 ml
抑制物去除液 IR	50 ml
漂洗液 WB	25ml
洗脱缓冲液 EB	20 ml
异丙醇	15 m
蛋白酶 K (20mg/ml)	40mg 冻干粉
吸附柱 AC	100 个
收集管 (2ml)	100 个

1.2.2 HPV 分型主要试剂

表 2 人乳头瘤病毒(HPV)基因分型检测试剂盒组成

组成成分	25 人次
PCR Mix	25 管
膜条	25 张
POD母液	1 管
TMB 液 (2mg/ml)	1 瓶
裂解液	1 瓶
无菌纯水	1 管
矿物油	1 管

1.2.3 PCR 及其产物纯化主要试剂

(1) PCR 试剂盒成分：试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。

表 3 PCR 试剂盒

试剂盒组成	100 次 (SK2494)
Taq DNA Polymerase,5U/ul	50ul
10×PCR Buffer	600 ul
25mM MgCl ₂	1 ml
2mM dNTP	600 ul
Sterilized ddH ₂ O	4ml
Protocol	1

(2) 10×PCR Buffer(without Mg²⁺: 100 mM Tris-HCl pH 8.8 at 25℃; 500 mM KCl, 0.8%(v/v)Nonidet)(上海生工)

(3) DNA Marker(100-77bp) (上海生工)

(4) 6×DNA Loading Dye(上海生工)

(5) PCR 产物纯化回收试剂盒 (上海生工 SK1141)

表 4 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒

试剂盒组成	SK1131
UNIQ-10 Column	50
Collection Tube	50
Banding Buffer II	30 ml
Washing Solution	12ml
Elution Buffer	5ml
Protocol	1

(6) Chelex-100 (sigma)

(7) 10×TBE (500 ml): 加入 400ml 蒸馏水充分溶解, 使溶液为清亮后定容至 500ml 备用, 使用时将 10×TBE 与蒸馏水按 1: 9 稀释至 1×TBE.

(8) Golden ViewTM 核酸染料 (1ml)

(9) 琼脂糖凝胶

	琼脂糖(上海生工)	1×TBE	EB
1%琼脂糖凝胶	0.5g	50ml	3ul
1.5%琼脂糖凝胶	0.75g	50ml	3.5 ul

1.2.4 PCR 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列等详见表 5

表 5 实验所用引物序列

引物名称	引物序列	片断大小
β-globin	5'- TGACGTGGACATCCGCAAAG -3'	203 bp
	5'- CTGGAAGGTGGACAGCGAGG -3'	
HPV16L1	5'- TGCTAGTGCTTATGCAGCAA -3'	152 bp
	5'- ATTTACTGCAACATTGGTAC -3'	
HPV16 E7	5'- CGATGTATGTCTTGTTCAG -3'	106 bp
	5'- TTACATCCCGTACCCTCTTC -3'	
HLA-DQB1	5'- GCGGATCACAAGTCTGGAGC -3'	463 bp
	5'- CAAGGATGGGCCTCGCAGA -3'	

1.3 主要仪器设备

- (1) 超低温冰箱（日本）
- (2) -20℃低温保存箱（中国海尔）
- (3) 4℃药品保存箱（中国海尔）
- (4) 高压蒸汽灭菌器（美国 Thermo）
- (5) AW-120 电子分析天平（上海）
- (6) DK-8D 型电热恒温水槽（上海森信实验仪器有限公司）
- (7) YXJ-2 离心机（湘仪离心机仪器有限公司）
- (8) PCR 反应扩增仪（加拿大 BBI 公司）
- (9) DYY-8 型稳压稳流电泳仪（上海琪特分析仪器有限公司）
- (10) H6-1 微型电泳槽（上海精益有机玻璃制品仪器厂）
- (11) 凝胶成像系统（Gene Genius 公司）
- (12) 移液器（范围 100-1000 μ l, 20-200 μ l, 0.5-10 μ l）（加拿大 BBI 公司）
- (13) 3730 测序仪（美国 ABI 公司）
- (14) SW-CJ-1D 洁净工作台（江苏苏洁净化设备厂）

2. 方 法

2.1 实验标本留取

所有宫颈组织样本均做常规 HE 染色，由 2 名高年资病理医师对 HE 染色切片进行组织学观察和复诊，并进行病理分级。子宫颈癌病理诊断标准参照《妇产科学诊断病理学》（主编：陈乐真，人民军医出版社，2002 年第一版）。

子宫颈癌分为 3 型：大细胞角化型、大细胞非角化型和小细胞非角化型鳞癌，具体病理诊断标准如下。

大细胞角化型鳞状细胞癌：由表皮样细胞组成，有角化珠和角化细胞漩涡，可见细胞间桥，以及胞浆角化和透明角质颗粒等。核通常大而深染，染色质粗，核分裂象不是十分常见，常发生于癌巢边缘分化较差的肿瘤细胞。

大细胞非角化型鳞细胞癌：癌细胞呈多边形，无角化珠，角质形成且单个细胞角化也很少。癌细胞有一定的细胞和核多形性，核分裂较常见。有些大细胞非角化型鳞癌由胞浆丰富且透明的癌细胞组成。

小细胞非角化型鳞状细胞癌：癌细胞小，常较圆，有深染的核，除部位和生长方式，以及偶有鳞状样细胞漩涡和单个细胞角化外，很少有鳞状细胞起源肿瘤的组织学特征。

所有宫颈组织样本经病理学确诊后分为两组，慢性宫颈炎症为对照组；宫颈

浸润性癌为病例组。

2.2 组织 DNA 提取

新鲜宫颈组织:

(1)取新鲜宫颈组织 20-40ug 碾碎后置入 1.5ml 经高温灭菌 Ep 管内,加 200ul 细胞裂解液(TL),充分吹打混匀。

(2)各管加入蛋白酶 K20ul, Ep 管置于漩涡振荡器上充分震荡混匀。

(3)将各管置于 55℃ 恒温水浴温箱 1 小时(组织未完全消化则可适当延长时间以利消化),期间可以轻揉数次,帮助组织溶解。

(4)各管中加入 200ul 结合液 CB,漩涡振荡器混匀。

(5)冷却后加入 100ul 异丙醇,置于漩涡振荡器混匀。

(6)用规格为 1ml 的移液器吸取 Ep 管中的混合物,尽量弃去不溶物,将吸取的混合物加入吸附柱中,将吸附柱置于高速离心机中,10,000rpm 离心 30 秒,弃去管中离心出的废液。

(7)向吸附柱中加入 500ul 抑制物去除液,12,000rpm 离心 30 秒,弃去管中离心出的废液。

(8)向吸附柱中加入 700ul 漂洗液(漂洗液事先加入无水酒精调配好),12,000rpm 离心 30 秒,弃去管中离心出的废液。

(9)再次向离心柱中加入 500ul 漂洗液,12,000rpm 离心 30 秒,弃去管中离心出的废液。

(10)将吸附柱置于离心机中 13,000rpm 离心 2 分钟,尽量弃去废液,在空气中适当干燥,以利于酒精挥发,减少对后期的 PCR 干扰。

(11)去除吸附柱,置于新的经高温灭菌 Ep 管中,向吸附柱中央部位加入 100ul 洗脱缓冲液(洗脱缓冲液事先在 65-70 摄氏度水浴中预热),室温下放置 3-5 分钟后 12,000rpm 离心 1 分钟。

(12)将 Ep 管中的离心液重新加入吸附柱中,室温下放置 2 分钟,2,000rpm 离心 1 分钟,此次离心出的离心液中即含有宫颈组织的 DNA,将其置于-20 冰箱备用。洗脱体积越大,洗脱效率越高,但是如果需要的 DNA 浓度较高,则可适当的减少洗脱体积,但是最低不能少于 50ul,因体积过小可降低 DNA 的洗脱率,从而减少 DNA 的产量。

说明:用1%琼脂糖凝胶电泳判定所提取的基因组DNA的完整性。

组织细胞DNA提取注意事项:所有的离心步骤均在室温完成,使用转速可以达到13,000 rpm的台式离心机;开始试验前将需要的水浴预热到70℃备用;结合液和抑制物去除中含有刺激性化合物,操作时要戴乳胶手套,避免沾染皮肤,眼睛和衣物,若沾染皮肤和眼睛时要用大量清水或生理盐水冲洗。

2.3 聚合酶链反应

2.3.1 PCR 检测组织标本提取基因组 DNA 质量

反应体系：25ul 体系的配制

10×PCR Buffer (without Mg ²⁺)	2.5 μl
dNTP(2 mM)	2.0 μl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 μl
β-action For	0.5 μl
β-action Rev	0.5 μl
Taq DNA polymerase	0.2μl
Template DNA	2.0 μl
ddH ₂ O	15.8 μl
Total Volume	25.0 μl

反应条件：

PCR 起始：	95℃	5 分钟	
PCR 循环：	94℃	45 秒	} 35 个循环
	58℃	45 秒	
	72℃	45 秒	
PCR 延伸：	72℃	10 分钟	
	4℃	∞	

PCR 产物： 置-20℃冰箱备用

电泳鉴定：

取 5ul 所得的 PCR 产物于 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定(电压 100V，时间 30 分钟)，电泳后凝胶置于凝胶成像系统拍照分析。

2.3.2 PCR 检测宫颈组织标本中 HPV16 DNA

反应体系：25ul 体系的配制

10×PCR Buffer (without Mg ²⁺)	2.5 μl
dNTP(2 mM)	2.5 μl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 μl
HPV16 L1-P1	0.5 μl
HPV16 L1-P2	0.5 μl
Taq DNA polymerase	0.2μl
Template DNA	2.0 μl
ddH ₂ O	15.3 μl
Total Volume	25.0 μl

反应条件:

PCR 起始:	95℃	5 分钟	
PCR 循环:	94℃	45 秒	
	55℃	45 秒	} 35 个循环
	72℃	45 秒	
PCR 延伸:	72℃	10 分钟	
	4℃	∞	

PCR 产物置于-20℃冰箱备用。

电泳鉴定:

PCR 产物于 1.5%的琼脂糖凝胶电泳 (80V, 25 分钟), 电泳后置于凝胶成像系统拍照观察 PCR 扩增产物片段大小, 以 SiHa 细胞当阳性对照, 以 ddH₂O 当空白对照, 检测结果有出现目的片段则表示有 HPV16 感染。

2.3.3 PCR 扩增 HPV16E7 DNA

反应体系: 25ul 体系的配制

10×PCR Buffer (without Mg ²⁺)	2.5 μl
dNTP(2 mM)	2.5 μl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 μl
HPV16 E7-P1	0.5 μl
HPV16 E7-P1	0.5 μl
Taq DNA polymerase	0.2μl
Template DNA	2.0 μl
ddH ₂ O	15.3 μl
Total Volume	25.0 μl

反应条件:

PCR 起始:	95℃	5 分钟	
PCR 循环:	94℃	45 秒	
	55℃	45 秒	} 35 个循环
	72℃	45 秒	
PCR 延伸:	72℃	10 分钟	
	4℃	∞	

PCR 产物置于-20℃冰箱备用。

电泳鉴定:

取 5ul 的 PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 电泳后置于凝胶成像系统拍照观察 PCR 扩增产物片段大小。以 PCR 扩增产物经测序证实为 HPV16E7 的宫颈组织作为阳性对照, 以 ddH₂O 当空白对照。

2.3.4 PCR 扩增 HLA-DQB1 第二外显子基因片段

反应体系: 50ul 体系的配制

模板 DNA	1 ul
HLA-DQB1-F	1 ul
HLA-DQB1-R	1 ul
dNTP 10 mM	1 ul
Taq Buffer 10×PCR Buffer(without Mg ²⁺):	5 ul
100 mM Tris-HCl(pH 8.8 at 25°C),	
500 mM KCl, 0.8%(v/v)Nonidet P40	
25mM MgCl ₂	5 ul
Taq 酶 5U/μl	0.5 ul
ddH ₂ O	35.5 ul
Total Volume	50ul

反应条件:

第一阶段

PCR 起始:	95°C	3 分钟	35 个循环
PCR 循环:	94°C	45 秒	
	60°C	35 秒	
	72°C	90 秒	
PCR 延伸:	72°C	10 分钟	
	4°C	∞	

第二阶段

PCR 起始:	95°C	3 分钟	35 个循环
PCR 循环:	94°C	45 秒	
	58°C	35 秒	
	72°C	90 秒	
PCR 延伸:	72°C	10 分钟	
	4°C	∞	

电泳鉴定:

取 5ul 的第二阶段的 PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统中观察记录产物条带。

2.4 PCR 产物回收送生物公司测序

PCR 产物回收步骤如下:

(1) 割胶: 通过凝胶电泳将目的 DNA 片段与其他片段分开, 用清洁的一次性刀片割下目的 DNA 所在的凝胶并放入 1.5ml 的 Ep 管中, 切割动作尽量快, 避免长时间的紫外光照射导致 DNA 片段降解。判定 DNA 片段位置时, 要尽可能的使用长波紫外光。

(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 Binding Buffer II，1.5%的凝胶中加入的量为 4 倍凝胶体积。具体加入 Binding Buffer II 的比例按照下表进行。

表 6 Binding Buffer II 加入体积表

凝胶浓度	Binding Buffer II
小于或等于 1%	3 个胶体体积
小于或等于 1.5%	4 个胶体体积
小于或等于 2%	5 个胶体体积
大于 2%	6 个胶体体积

(4) 溶解：将盛有凝胶的 Ep 管置于 55°C 的水浴温箱中，使凝胶尽量溶化，在溶解过程中可适当混匀。

(5) 因所需要回收的 DNA 片段小于 500bp 时，需要在不同浓度的凝胶中，在溶胶后加入 2 倍于凝胶体积的浓度为 100%的异丙醇，混匀。

(6) 将 Ep 管中已融化的凝胶移至套在 2ml 离心管中的 NIQ-10 柱中，室温放置 2 分钟后 12,000rpm 离心 1 分钟。

(7) 取下 NIQ-10 柱，弃去离心废液后往柱中加入 500ul wash solution,室温 12,000rpm 离心 1 分钟，重复此步骤一次。

(8) 再次将 NIQ-10 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°C 干燥 5 分钟，使其中的酒精充分挥发。

(9) 将 NIQ-10 柱放入新的 Ep 管中 (1.5ml)，向柱子中央加入 60°C 水浴箱中预热好的 40ul Elution Buffer，室温放置 5 分钟，有助于提高 DNA 的洗脱效率；也可以用双蒸水，用 1M 的氢氧化钠将 PH 值调节到 8.5 后再 60°C 洗脱。

(10) 室温 12,000rpm 离心 1 分钟，离心液即为所回收的 DNA 片段，置于 -20°C 冰箱备用。

注意事项：Binding Buffer II 中含有刺激性化合物，操作时要戴好乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服，防止吸入口鼻，沾染皮肤和眼睛后，立即用清水或生理盐水冲洗。

2.5 人乳头瘤病毒 (HPV) 基因分型

分型步骤按照亚能生物有限公司提供的人乳头瘤病毒 (HPV) 基因分型试剂盒说明进行，具体如下：

(1) 加样：向 PCR Mix 反应管中加入已提取的宫颈组织细胞 DNA $5\mu\text{l}$ ，5000rpm 离心 2 秒钟。

(2) 扩增：将 PCR 管置于 PCR 仪中，按以下条件进行扩增： 50°C 15 分钟， 95°C 10 分钟变性； 94°C 30 秒→ 42°C 90 秒→ 72°C 30 秒，共 40 个循环，最后 72°C 延伸 5 分钟。

(3) 杂交：将杂交膜条放入 1.5ml Ep 管中，向管中加入 5ml A 液 ($2\times\text{SSC}$)

(转膜缓冲液)和 0.1% SDS 混合液)及对应的所有 PCR 扩增产物。将 Ep 管置于沸水中加热 10 分钟,将其取出置于杂交仪中杂交 3 小时(杂交仪温度为 51℃)。

(4)洗膜:将 Ep 管中的膜条取出放入 40ml 的提前 51℃中预热好的 B 液(pH 为 7.4 的 0.5×SSC (转膜缓冲液)和 0.1%SDS 混合液)中,将其放入杂交仪,51℃轻摇 15 分钟。

(5)显色:将膜条移至用 A 液配成 1:2000 的 POD (链霉抗生物素蛋白—辣根过氧化物酶结合物)溶液中,摇床上浸泡 30 分钟后弃去 POD 液;再用 A 液室温轻摇浸泡 2 次,每次 5 分钟,弃去 A 液;用 C 液(pH 为 5.0 的 0.1mol/L 柠檬酸钠)室温轻摇洗膜 2 分钟,弃掉 C 液;将膜条置于显色液(C 液 9.5ml, 甲氧苄啶(TMP 液)0.5ml,3% H_2O_2 5ul)中,室温轻摇显色 30 分钟,弃掉显色液。

(6)读取结果:取出膜条,用清水清洗 1 次,吸干膜条表面水分,为阴对照的杂交膜条会在 PC (阳性对照点)位置出现蓝色斑点,此时结果判为有效,如果膜条上对应的 HPV 型别处出现蓝色圆形斑点则表示该样本有该型别的 HPV 感染。

3 数据处理

采用 excel 对数据进行处理,使用 oracle 数据库及自行开发 HLA 分型软件 (Gene Typing Program)进行 HLA-DQB1 等位基因分型。用统计学软件 SPSS16.0 对结果采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法进行假设检验;采用直接计数法计算各等位基因的基因表型频率。组间等位基因表型频率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 有统计学差异。计算比值比(OR),估计相对危险度,并计算 OR 值的 95%可信区间(CI), $p<0.05$ 有统计学意义。

结 果

(Results)

1.年龄分布

病例组与对照组的平均年龄及标准差分别为 49.5 (7.87) 和 44.1 (8.81) 岁，两组年龄经统计学检验 $P=0.385$ ，差异无统计学意义。

2.病理学特点

本试验共分两组，分别为：①慢性宫颈炎症组 80 例，②宫颈鳞状细胞癌组 80 例；两组病理组织学特点分别如下：

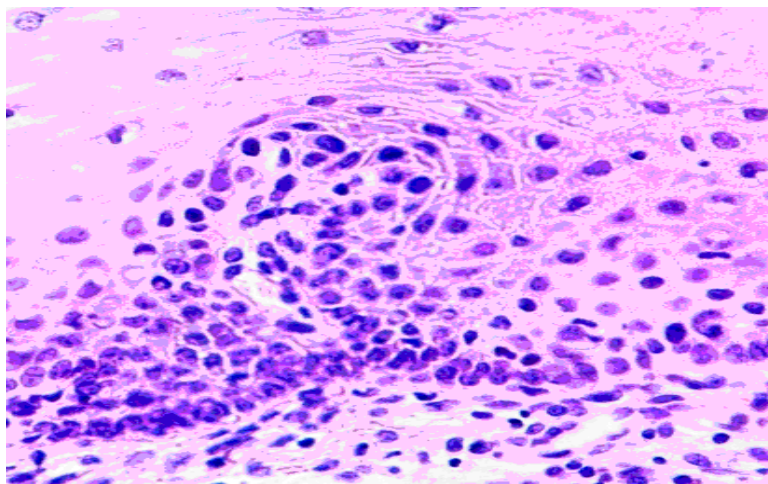


图 1 慢性子宫颈炎 (HE×400)

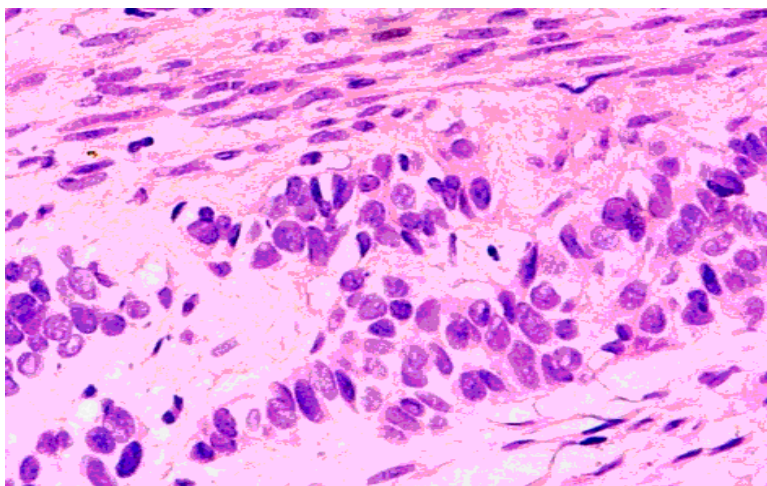


图 2 宫颈鳞状细胞癌 (低分化) (HE×400)

3. 宫颈组织中 HPV16 DNA 检测

80 例新疆维吾尔族妇女宫颈鳞癌组织中, HPV16 L1 扩增阳性共 60 例, 阳性率为 75%。80 例新疆维吾尔族妇女宫颈慢性炎组织中 HPV16 L1 扩增阳性共 2 例, 阳性率 2.5%。两组的 HPV16 感染率有明显差别。

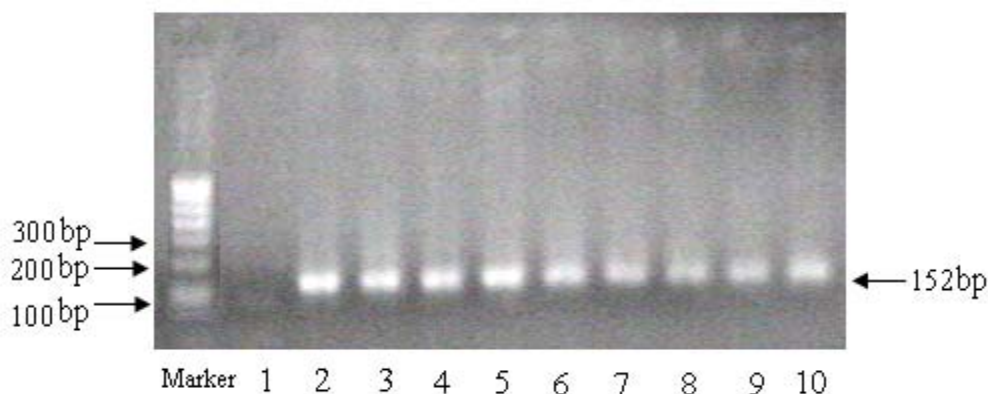


图 3 HPV16 L1 PCR 产物电泳结果

注: 1. 阴性对 2 阳性对照; 3-10 为宫颈鳞状细胞癌标本 marker 100bp;

4. 宫颈组织中 HPV16 E7 PCR 检测及其碱基序列测定

用 HPV16 E7 特异性引物 PCR 扩增 HPV16 阳性的宫颈组织的 HPV16 E7 DNA 片段, 结果 2 例 HPV16 阳性的慢性宫颈炎及 60 例 HPV16 阳性的子宫颈癌组织中 HPV16 E7 扩增均阳性。将扩增的 HPV16 E7 PCR 产物送至北京博迈德生物有限公司测序。2 例慢性宫颈炎及 54 例子宫颈癌的 HPV16 E7 成功测序, 2 例慢性宫颈炎 HPV16 E7 测序未发现突变, 54 例子宫颈癌中共有 6 例发生 E7 碱基突变, 突变位点为: A647G (2/54), T760C (2/54), G663A (1/54), G666A (1/54), C790T (1/54), T846C (1/54), 其中 A647G (2/54) 及 C790T (1/54) 为错义突变, 分别导致第 29 位氨基酸由天冬酰胺变为丝氨酸及第 77 位氨基酸由精氨酸变为半胱氨酸。

表 6 HPV16 E7 变异位点

编号	碱基（氨基酸）位点												分支 鉴定
	647（29）		663（34）		666（35）		760（67）		790（77）		846（95）		
德国标准株	A	天冬酰胺	G	谷氨酸	G	谷氨酸	T	亮氨酸	C	精氨酸	T	丝氨酸	—
CC10	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	E
CC17	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	E
CC21	G	丝氨酸	A	—	—	—	—	—	—	—	C	—	As
CC32	—	—	—	—	—	—	—	—	T	半胱氨酸	—	—	E
CC59	G	丝氨酸	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	As
CC80	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	E
变异例数	2	2	1	1	1	0	2	0	1	1	2	0	

注：“—”表示无突变。

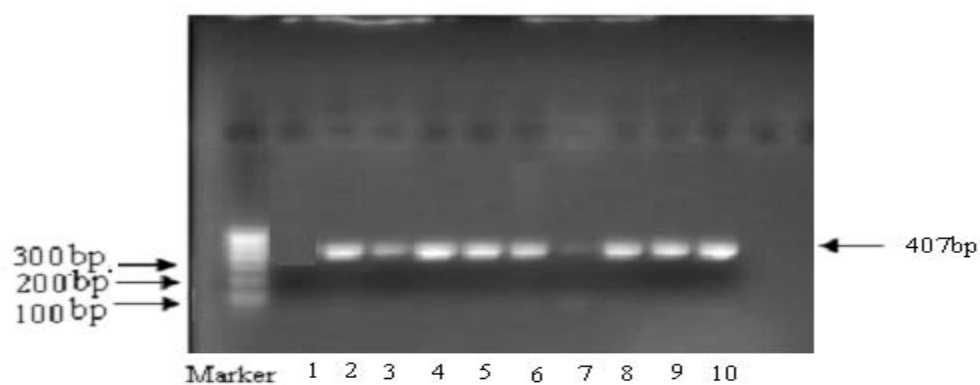
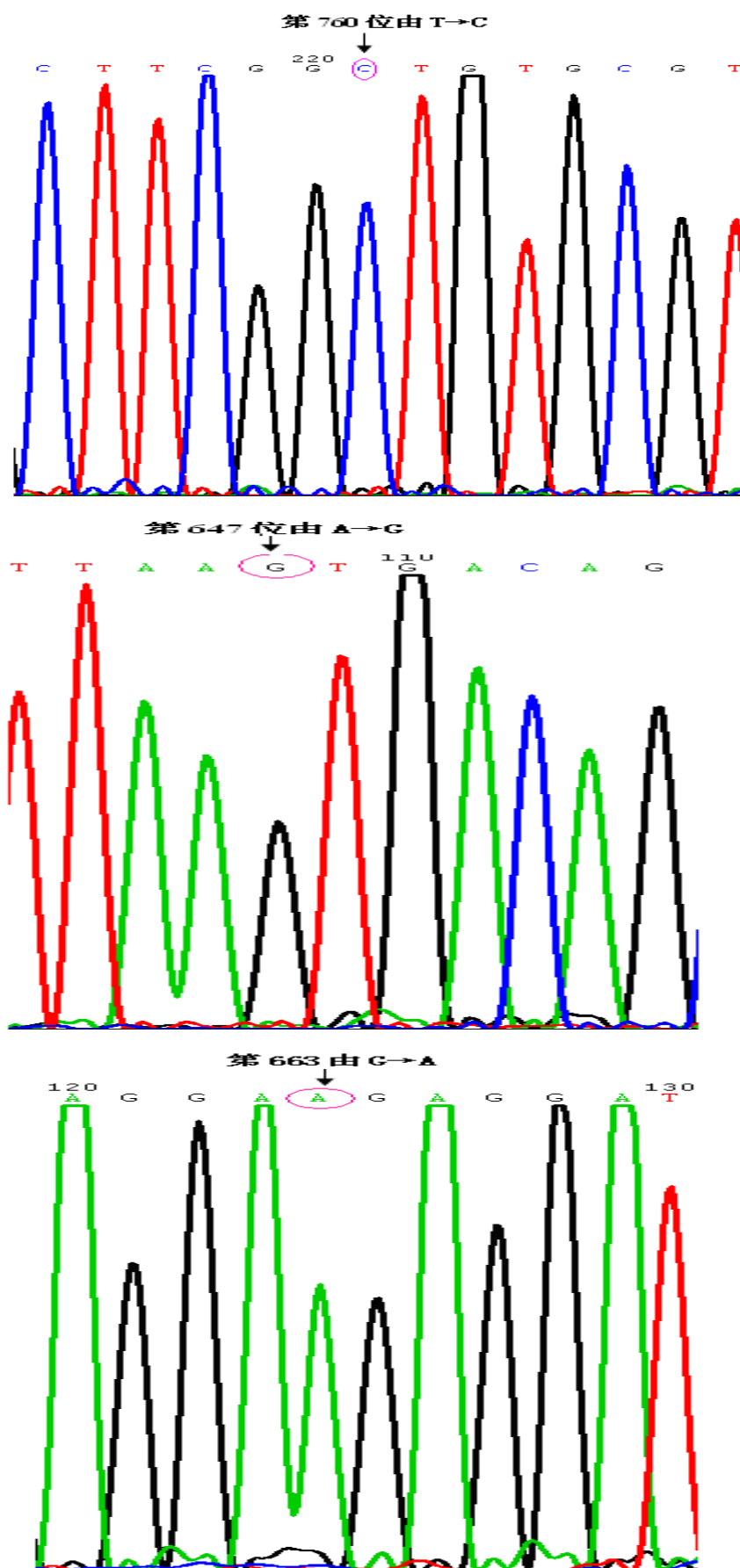


图 4 HPV16E7 基因 PCR 产物电泳结果

注: 1. 阴性对 2 阳性对照; 3-10 为宫颈鳞状细胞癌标本 marker 100bp;



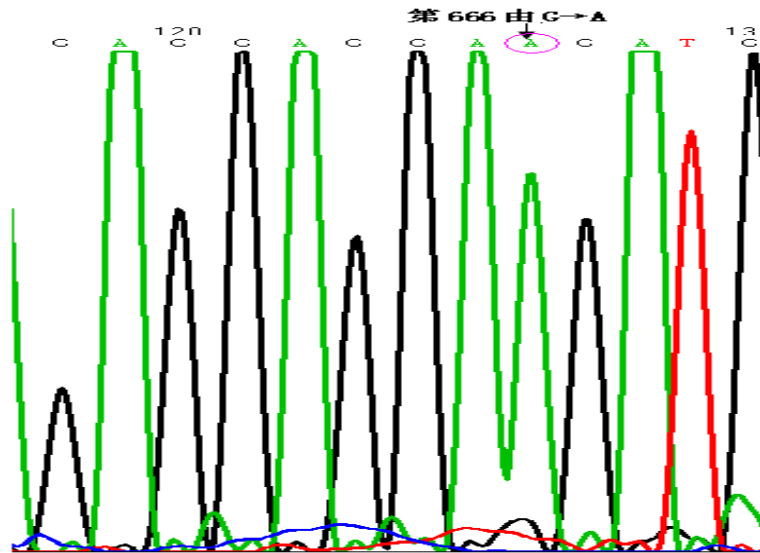


图 5 HPV16E7 基因碱基测序峰图

注：图中画圈的位置为突变碱基

5. 宫颈组织中 HLA-DQB1 PCR 扩增及其碱基序列测定

160 例（慢性宫颈炎 80 例，宫颈鳞状细胞癌 80 例）新疆维吾尔族妇女宫颈组织中均扩增出 HLA-DQB1 第二外显子基因片段。检测的 160 个样本中共含 296 个等位基因，其中杂合的等位基因型 136 人份，纯合的等位基因型 24 人份。测序结果如下。

表 7 160 例宫颈病变测序结果（宫颈炎、子宫颈鳞状细胞癌各 80 例）

样品 编号	SNP											
	P14	P51	P63	P64	P65	P102	P152	P155	P158	P174	P186	P187
1	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
2	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	G/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
3	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
4	A/A	C/G	T/T	C/C	T/T	A/A	G/G	C/T	A/A	C/T	A/A	G/G
5	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	G/G	C/T	A/A	C/C	A/A	G/G
6	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/C	C/T	A/C	A/G
7	A/T	G/G	T/T	C/C	T/T	A/G	G/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
8	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
9	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
10	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
11	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	G/G	C/T	A/A	C/T	A/A	G/G
12	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

13	A/T	C/G	T/T	C/C	T/T	A/G	C/C	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
14	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
15	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/C	C/T	A/C	A/G
16	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/C	C/T	A/C	A/G
17	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
18	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
19	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
20	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
21	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/G	C/T	A/A	T/T	A/A	G/G
22	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
23	A/A	C/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
24	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
25	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
26	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
27	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
28	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
29	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
30	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/C	C/T	A/C	A/G
31	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
32	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
33	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
34	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
35	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
36	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
37	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
38	T/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
39	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
40	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
41	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
42	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
43	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
44	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
45	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
46	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
47	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

48	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
49	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
50	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
51	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
52	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
53	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
54	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
55	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
56	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
57	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
58	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
59	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
60	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
61	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
62	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
63	A/A	C/G	T/T	C/C	T/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
64	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
65	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
66	A/T	C/G	T/T	C/C	T/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
67	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
68	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
69	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
70	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
71	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
72	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
73	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
74	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
75	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
76	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
77	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
78	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
79	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
80	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/C	A/C	A/G
81	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/C	C/C	A/C	A/G
82	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

83	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
84	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/C	C/T	A/C	A/G
85	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/C	C/T	A/C	A/G
86	A/A	G/G	G/T	C/G	G/T	A/A	C/G	C/T	A/C	C/C	A/A	G/G
87	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
88	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/C	C/C	A/A	G/G
89	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
90	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
91	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
92	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
93	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
94	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
95	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
96	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
97	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
98	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/C	C/T	A/C	A/G
99	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
100	T/T	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G	C/C	T/T	A/A	T/T	A/A	G/G
101	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
102	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
103	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/C	A/C	A/G
104	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
105	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
106	A/T	C/G	T/T	C/C	T/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
107	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/C	A/A	G/G
108	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/G	C/T	C/T	C/C	A/C	A/G
109	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
110	A/T	C/G	T/T	C/C	T/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
111	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
112	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/C	A/C	A/G
113	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/C	A/C	A/G
114	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
115	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
116	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
117	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/A	G/G

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

118	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
119	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/A	G/G
120	A/T	G/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/C	A/A	G/G
121	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
122	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
123	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
124	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
125	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
126	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
127	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
128	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
129	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
130	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
131	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
132	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
133	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A	G/G
134	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
135	A/A	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	A/A	T/T	C/C	A/A
136	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
137	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
138	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/A	G/G
139	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
140	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/C	A/A	G/G
141	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
142	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/G	C/C	C/T	A/A	C/C	A/A	G/G
143	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
144	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	G/G
145	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/G	C/T	A/C	C/C	A/A	G/G
146	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/A	C/G	C/T	A/A	C/C	A/C	A/G
147	A/A	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
148	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/C	C/T	A/C	C/C	A/A	G/G
149	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T	A/A	C/G	C/T	A/C	C/C	A/A	G/G
150	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/C	C/T	A/C	C/C	A/A	G/G
151	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
152	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

153	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
154	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
155	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
156	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
157	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
158	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
159	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G
160	A/T	C/G	G/T	C/G	G/T	A/G	C/G	C/T	A/A	C/T	A/C	A/G

样品	SNP								
编号	P196	P197	P199	P200	P208	P209	P211	P219	P222
1	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
2	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
3	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
4	A/G	A/G	A/G	A/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
5	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
6	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
7	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	G/G	G/G
8	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
9	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
10	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
11	A/G	A/G	A/G	A/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
12	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
13	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	G/G	G/G
14	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
15	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
16	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
17	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
18	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
19	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
20	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
21	A/G	A/G	A/G	A/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
22	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
23	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
24	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

25	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
26	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
27	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
28	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
29	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
30	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
31	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
32	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
33	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
34	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
35	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
36	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
37	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
38	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
39	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
40	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
41	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
42	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
43	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
44	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
45	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
46	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
47	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
48	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
49	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
50	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
51	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
52	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
53	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
54	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
55	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
56	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
57	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
58	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
59	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

60	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
61	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
62	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
63	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
64	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
65	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
66	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
67	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
68	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
69	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
70	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
71	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
72	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
73	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
74	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
75	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
76	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
77	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
78	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
79	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
80	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
81	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	G/G	G/G
82	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
83	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
84	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
85	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
86	A/A	G/G	A/A	C/C	G/T	A/C	G/T	G/G	G/G
87	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
88	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
89	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
90	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
91	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
92	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
93	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
94	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G

HPV16E7 及 HLA-DQB1 基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究

95	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
96	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
97	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
98	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
99	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
100	A/A	G/G	A/A	C/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
101	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
102	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
103	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
104	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
105	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
106	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
107	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	C/G	A/G
108	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
109	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
110	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
111	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
112	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	G/G	G/G
113	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
114	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
115	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
116	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
117	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
118	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
119	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
120	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
121	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
122	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
123	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
124	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
125	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
126	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
127	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
128	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
129	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G

130	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
131	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
132	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
133	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
134	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
135	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
136	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
137	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
138	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	G/G	G/G
139	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
140	A/A	G/G	A/A	C/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
141	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
142	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	C/G	A/G
143	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
144	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
145	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
146	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
147	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
148	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
149	A/A	G/G	A/A	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
150	A/G	A/G	A/G	A/C	G/G	A/A	T/T	G/G	G/G
151	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
152	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
153	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
154	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	G/G	G/G
155	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
156	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
157	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
158	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
159	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G
160	A/G	A/G	A/G	A/C	G/T	A/C	G/T	C/G	A/G

经过频率计算和统计学分析，HLA-DQB1*0325(OR:10.60,1.341-83.81)和 HLA-DQB1*0332(OR:12.59,2.909-54.526)在新疆维吾尔族妇女子宫颈癌中频率明显高于宫颈炎对照组，而 HLA-DQB1*0317(OR:0.49 ,0.304-0.798)和 HLA-DQB1*040302(OR:0.40,0.243-0.658)明显低于宫颈炎对照组，p 均小于 0.05。

结果见表 8。

表 8 HLA-DQB1 等位基因型在病例组及对照组中的分布

HLA-DQB1 等位基因型	病例组		对照组		卡 方 值	P 值	OR, 95%CI
	例数 N=80	等位基因 频率	例数 N=80	等位基因 频率			
DQB1*03:03:03	3	18.75%	0	0		NS	
DQB1*03:05	3	1.88%	4	2.5%		NS	
DQB1*03:05:01	1	6.25%	0	0		NS	
DQB1*03:05:04	1	0.63%	0	0		NS	
DQB1*03:17	38	23.75%	62	38.75%	8.378	0.004	0.49, 0.304-0.798
DQB1*03:25	10	6.25%	1	0.63%	7.626	0.006	10.60, 1.341-83.81
DQB1*03:30	1	0.63%	0	0		NS	
DQB1*03:32	22	13.75%	2	1.25%	18.018	0.000	12.59, 2.909-54.526
DQB1*03:33	33	20.63%	17	10.63%	6.068	0.14	2.17, 1.162-4.112
DQB1*04:02:01	2	1.25%	0	0		NS	
DQB1*04:03	3	1.88%	4	2.5%		NS	
DQB1*04:03:02	33	20.63%	63	39.38%	13.393	0.000	0.40, 0.243-0.658
DQB1*04:04	6	3.75%	4	2.5%		NS	
DQB1*05:03:02	2	1.25%	0	0		NS	

注：“NS”表示无统计学意义

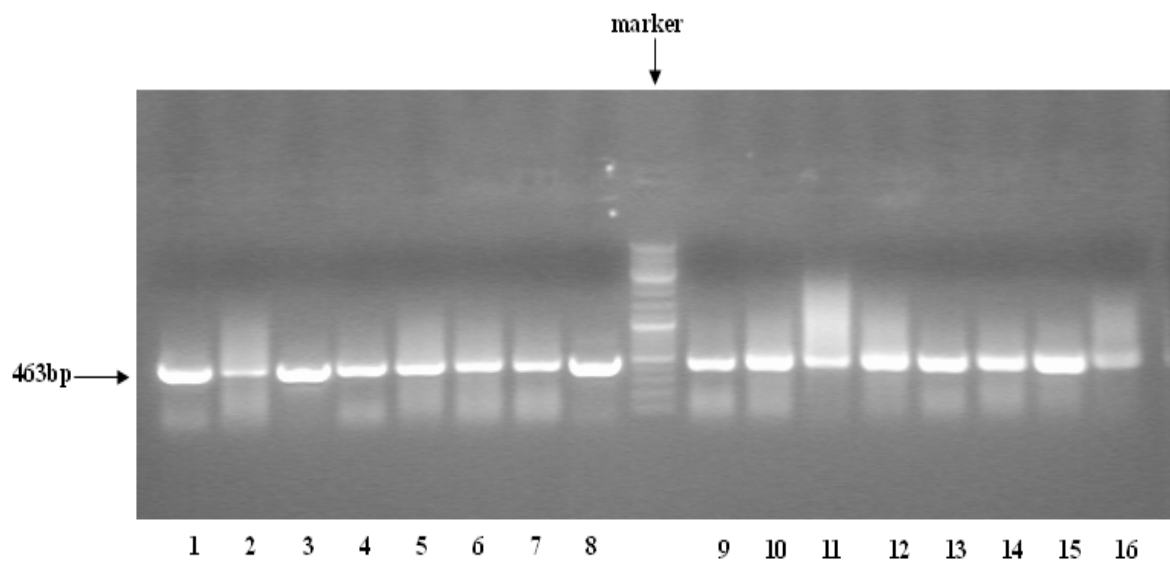


图 6 HLA-DQB1 第二外显子 PCR 扩增电泳图

注：所用的 marker 为 100-10000bp，1-16 均为扩增样本

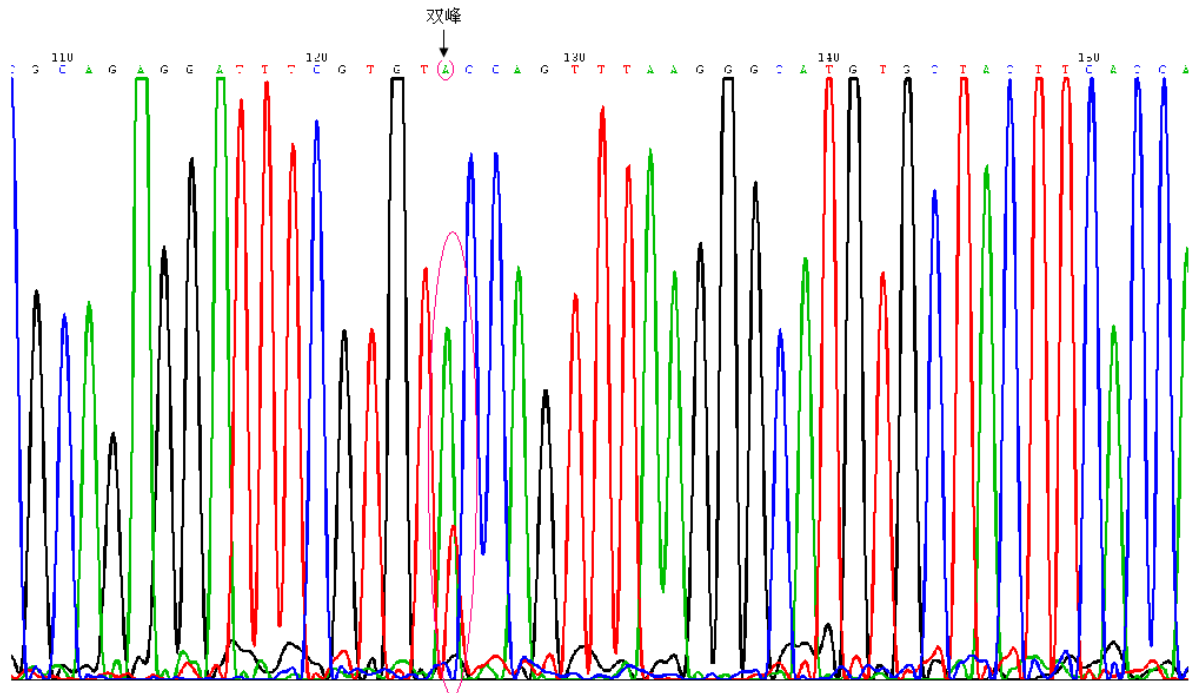


图 7 HLA-DQB1 第二外显子碱基测序峰图

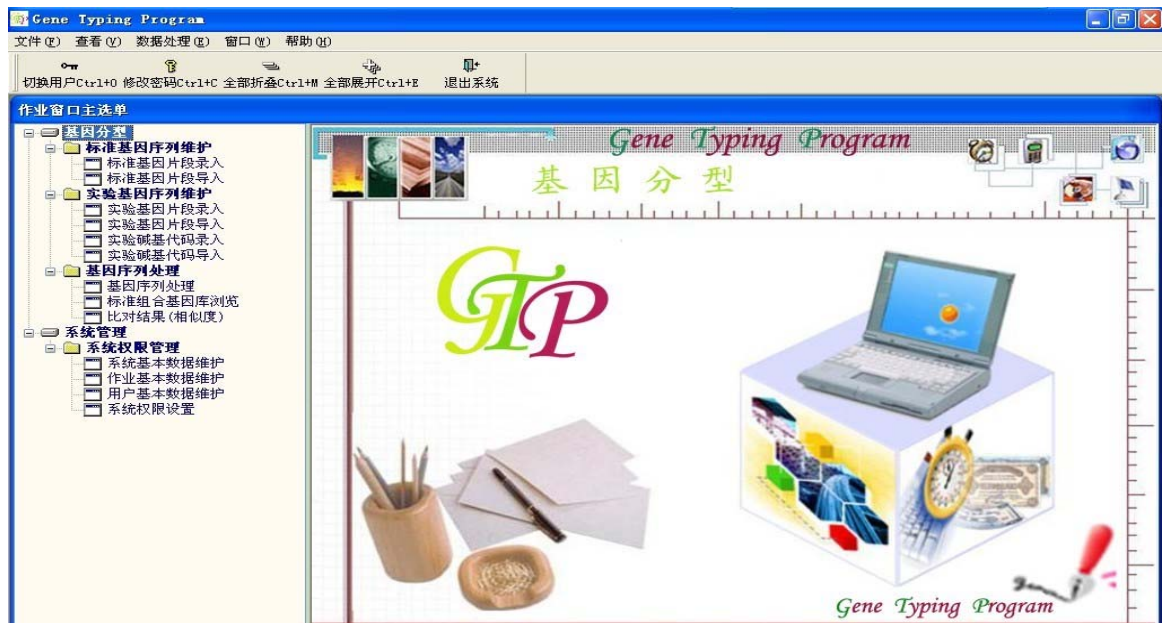


图 8 Gene Typing Program 操作界面

6. 宫颈组织中 HPV 感染型别分布情况

80 例宫颈鳞状细胞癌中 HPV 阳性 77 例，阳性率 96%，分型检测共检出 15 种高危型 HPV(HPV16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,53,73)，2 种低危型 HPV(HPV11,42)，其中 HPV16 单一感染 33 例，占 44%；HPV16 合并其他高危型感染 20 例，占 26%；合并高危型感染的型别中以 56 型为主，占 14 例 (70%)；其次为 33 型、58 型；HPV16 合并其他低危型感染 7 例。80 例子宫颈癌中有 HPV16

型感染的为 62 例，感染率为 77.5%。在混合感染中以双重感染，其次为三重感染，发现 1 例为五重感染。结果见表 9，表 10。

表 9 HPV 各亚型在子宫颈癌样本中分布情况

组别	HPV 型别	例数	HPV 型别	例数
HPV 型别 (高危型)	HPV16	62	HPV-56	17
	HPV-58	13	HPV-33	10
	HPV-31	10	HPV-51	8
	HPV-52	7	HPV-45	7
	HPV-53	6	HPV-18	4
	HPV-59	3	HPV-35	3
	HPV-39	3	HPV-68	2
	HPV-73	2		
HPV 型别 (低危型)	HPV11	2	HPV42	5

表 10 单一感染和多重感染比例

HPV 感染型别	阳性例数	阳性率
单一感染	50	64.93%
双重感染	15	19.48%
三重感染	8	10.39%
四重感染	3	3.89%
五重感染	1	1.31%

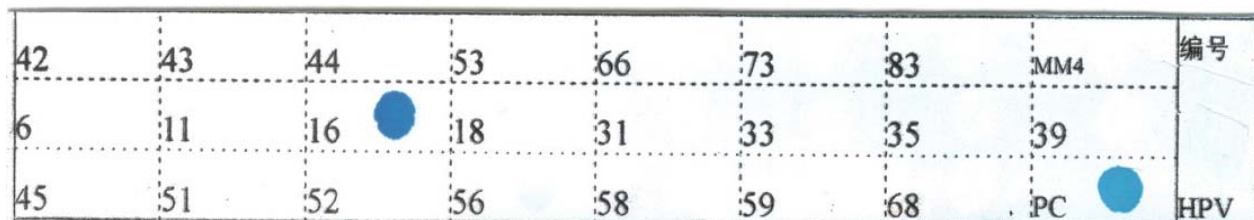


图 9 HPV16 单一感染

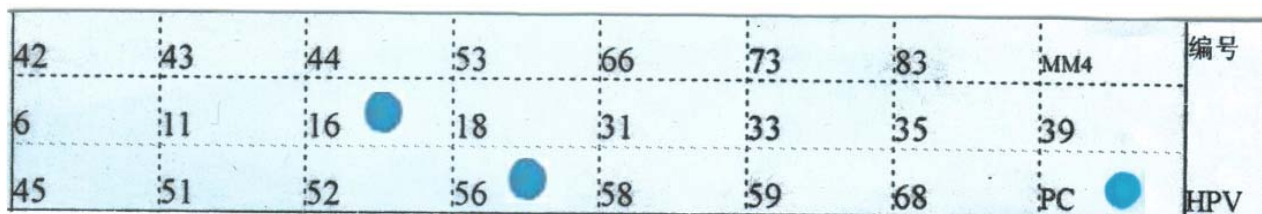


图 10 HPV16 混合高危感染

讨 论

(Discussion)

子宫颈癌的发生是一个多因素、多阶段的过程,随着研究的不断的深入,目前已明确持续的高危型 HPV 感染是导致子宫颈癌发生的首要原因,HPV 感染与子宫颈癌的联系远大于吸烟之与肺癌,也正是由于这一重大发现使得 HPV 的发现者德国的哈拉尔德·楚尔·豪森及两名法国科学家弗朗索瓦丝·巴尔·西诺西和克·蒙塔尼获 2008 年生理学诺贝尔奖^[13]。

1 人乳头瘤病毒 (HPV) 与子宫颈癌

1.1 HPV E7 与子宫颈癌

人乳头瘤病毒是一种无包膜的双链 DNA 病毒,它的感染是子宫颈癌发病的主要原因。到目前为止,已发现的 HPV 种类有 200 多种,然而只有 30 余种与生殖系统肿瘤有关,且不同型别的 HPV 的致癌能力不同,世界范围内有 70% 的子宫颈癌是由于 HPV16、18 型感染所致。HPV 感染以整合态或染色体外附加形式两种方式在宿主细胞内存在,在早期,HPV 病毒尚未整合到宿主细胞染色体中,而到进展期时病毒基因多整合到宿主细胞中,导致 E2 基因对 E6、E7 基因负向调控失控,从而使得 E6、E7 基因表达异常最终导致细胞生长失控。E7 蛋白是宫颈癌的原癌蛋白,其与抑癌蛋白即视网膜母细胞瘤蛋白 Rb 结合力极强,最终导致细胞周期调控失调。有研究表明病毒的型内变异可能导致病毒的持续感染及癌前病变的发生^[14]。HPV 变异体也可能影响病毒的组装、机体的免疫反应,致病性及 p53 蛋白的降解,细胞的永生生化以及转录的调节。这些变异直接影响不同的基于 PCR 反应的基因分型诊断^[15,16,17]。大量研究表明 HPV16 原癌蛋白 E7 较 E6 相对保守,E6 突变率明显高于 E7^[18,19]。然而也有几个相关研究,尤其是来自日本、韩国及印度尼西亚的报道发现当地的子宫颈癌患者 HPV16E7 的突变率较高 (65%-75%)^[20,21],吴玉平等^[22]等对我国江西南昌及广东珠海地区的 223 例住院子宫颈癌病例感染的 HPV16E7 变异分析发现其突变率为 100%。王华等^[23]对我国湖北地区 87 例住院子宫颈癌患者中 HPV16E7 基因序列分析发现其变异率为 85%。相比之下,本研究测序 54 例 HPV16E7,88.9% 的病例无碱基突变,发现 HPV16E7 相对保守,在 9 个突变位点中有 6 个为同义突变,对 E7 氨基酸序列无影响。本研究发现 HPV16E7 变异突变位点依次为: A647G (2/54), T760C (2/54), T846C (2/54), G663A (1/54), G666A (1/54), C790T (1/54) 突变位点在我国均有报道,以欧洲型为主,其次为亚洲型,与王华^[23]等研究的湖北地区 HPV16E7

突变以亚洲型为主,未见欧洲变异株的报道有别。新疆南部维吾尔族聚集区是子宫颈癌高发区,通过对本研究 80 例子宫颈癌患者中 HPV16E7 变异分析发现该地区的变异情况与我国其他子宫颈癌高发区差异较大。王华^[23]等对湖北地区 HPV16E7 变异分析发现该地区 HPV16E7 突变率高,且突变热点为 T846C 及 A647G (2/54);刘欣^[24]等对广东地区宫颈癌 HPV16E7 基因变异研究发现突变分别为: T846C(68%),A647G(68%),C666T(50%),G823A(4%),A844C(4%),杨英捷等^[25]研究北京地区子宫颈癌 HPV16E7 基因变异特点发现该地区的突变热点为 A647G(31.9%)。山西省是我国子宫颈癌的高发区,吴玉平等对山西及广东子宫颈癌 HPV16E7 变异分析发现突变位点及频率为: A647G(33/47),C749T(24/47),846(18/47),A646C(6/47),C790T(5/47),G606T(1/47),G666A(1/47),G724A(1/47),T730C(1/47),其中第 647 及 749 位碱基的突变导致的氨基酸的改变。本研究发现新疆南部地区维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌的突变以第 647 突变为主,与我国其他子宫颈癌高发地区不尽一致,而亚洲的香港、韩国、印度^[26,27,28]报道的 A647G 突变频率分别为 72%, 58.0%, 37.8%。该实验研究结果提示 HPV16E7 高度保守,与 Mahboobeh 的研究报道一致, Mahboobeh 将 296 例 HPV16E7 与 296 例高危型 HPV16 即 HPV31 与 HPV73 基因变异情况比较发现 HPV16 E7 有 4 处碱基突变,但均为同义突变,未导致氨基酸改变,而 HPV31 及 HPV73 的 E7 突变位点分别为 7、4 个,均为错义突变,导致氨基酸的改变,这就为 HPV16 的高度进化选择提供了证据,同时也提示了为什么 HPV16E7 有高度致癌性的原因。

1.2 HPV 基因型与子宫颈癌

本研究采用反相膜杂交技术进行 HPV 分型,检测结果发现 HPV16 是主要的感染型别,其次为 HPV56,与 IARC^[29]最新公布的 15 种最常见的 HPV 亚型中,以 HPV16 感染率最高相符。本研究中发现 HPV18 型感染甚少,与其他学者的研究结果差别大,可能原因是本研究所采纳的标本均为来自新疆南部地区的维吾尔族妇女,其次是因为所有实验样本均为子宫颈鳞状细胞癌,也可能这是新疆维吾尔族宫颈癌 HPV 感染的特征。在世界范围内,HPV 感染及其型别分布随地理区域有所差异。Clifford^[30]博士研究发现从西班牙的 1.4%到尼日利亚的 25.6%不等; HPV16 的流行从南非的 12.3%到欧洲的 25.5%不等。在我国, HPV 感染型别也有地区差异。一项多中心研究发现广州地区子宫颈癌中 HPV52 和 58 的阳性率分别为 3.8%和 4.5%^[31]。王英红^[32]等对新疆伽师县夏普吐勒乡维吾尔族妇女进行筛查发现 HPV 总的感染率为 9.1%,高危型中 HPV16 的感染率最高为 6.9%。本研究结果发现所选子宫颈癌样本中以 HPV16 感染率最高,其次为 HPV56。世界范围内对子宫颈癌中感染 HPV 型别研究均发现 HPV16 感染率最高,这可能由于 HPV16 更易于被机体免疫清除所致。Kulmala 等^[33]对 854 例 HPV DNA 阳性妇女

进行随访,平均随访时间 17 个月,发现 HPV-16 和 HPV-31 是病毒清除时间最长的两种病毒。G Hernandez-Suarez 等对 1728 名年龄在 15–85 之间细胞学正常的妇女进行为期 9 年的随访研究发现除了 HPV16 的清除率很低以外 HPV 的清除率与年龄及型别无关。本研究结果发现在宫颈癌中 HPV 混合感染为 27 例,占 35%,明显高于我国其他地区。浙江大学医学院吕卫国^[34]等对 1169 例子宫颈癌感染的 HPV 分型发现 HPV 混合感染为 14.46%。有关 HPV 混合感染的报道不尽一致,不少研究发现混合感染可以使 HPV 持续感染、感染其他型别 HPV 及宫颈细胞学异常的风险增加^[35,36]。赵爱华^[37]等对 483 例诊断有宫颈疾患的妇女进行 HPV 检测发现随着宫颈病变程度加重,HPV 多重感染率上升。本研究结果提示新疆维吾尔族妇女宫颈癌中 HPV 多重感染率相对我国其他地区较高,这在一定程度上解释了为什么新疆维吾尔族妇女宫颈癌高发,确切结论还需要大样本进一步的深入研究。

2.人白细胞抗原与子宫颈癌

大量试验表明 HPV 感染在良性宫颈病变中起重要作用,但单靠 HPV 感染不足以使其进展为子宫颈癌,宿主的免疫监视对感染的控制及疾病的发展起着至关重要的作用。人类白细胞抗原(Human leukocyte antigen, HLA)作为抗原提呈分子在机体对病毒的免疫监视中具有重要地位。根据 HLA 的生物学特性和结构将其分为 I,II,III 类基因区域,HLA-II 类基因位于着丝点位置,其编码的蛋白主要功能为将加工过的内源性或外源性抗原肽提呈给 CD4⁺T 辅助细胞。HLA 具有高度的多态性,是目前所知的等位基因数最多的基因,其高度的多态性在病毒感染中的识别、提呈、吞噬过程及参与调节机体免疫应答起着重要的作用。自 Wank 等于 1991 年报道了 HLA-II DQ3 抗原表达与子宫颈癌存在相关性之后,有关 HLA 与子宫颈癌的关系研究不断展开。研究表明 HLA-II 分子的某些等位基因与子宫颈癌存在一定的相关性^[22],其频率的增加可能增加了子宫颈癌的遗传易感性,而 HLA 的一些等位基因频率的减少可能是子宫颈癌的保护基因。可能由于 HLA 存在种族差异,国外研究发现 HLA 的某些等位基因可能与一些特定种族子宫颈癌高发有一定的关系,然而研究结果不尽一致,这就可能与遗传背景的不同有关。

2.1 HLA-DQB1 各等位基因与子宫颈癌

Madeleine,Cuzick,Sastre-Garau,Davidson,Wank,Maciag,Montoya^[38,39,40,41,42,43,44]等均发现 HLA-DQB1*03 基因型在美国、英国、法国、德国、西班牙妇女子宫颈癌中频率均较高。但也有些研究发现其与子宫颈癌无相关性,可能是由于不同地区、种族妇女的遗传背景差异或研究对象的入选标准不一样以及采用的研究方法差异所致。Paul^[45]等采用 PCR-SSO 方法检测 221 例威尔士妇女 CIN III-子宫颈癌

及 191 例正常香港妇女的 HLA-DQB1 等位基因发现 HLA-DQB1*03 与子宫颈癌呈负相关。我国有关 HLA 与子宫颈癌的关系研究报道也不尽一致。孙琦^[11]等报道 DQB1*0602 基因可能是新疆维族妇女子宫颈癌的保护基因。而林仲秋等对中山大学第二附属医院的 126 例子宫颈癌患者及 98 例正常对照者采用 PCR-SBT 方法进行 HLA-DQB1 等位基因检测发现 DQB1*030302 与 DQB1*050301 与子宫颈癌呈正相关, 可能为子宫颈癌的易感基因。本研究也采用 PCR-SBT 检测 HLA-DQB1 第二外显子并进行基因分型, 发现在新疆维吾尔族子宫颈鳞状细胞癌妇女中, DQB1*0325 与 DQB1*0332 频率明显高于正常对照组, 经统计检验表明 $p < 0.05$, 推测这两个等位基因型可能为新疆维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌的易感基因; 而 DQB1*0317 与 DQB1*040302 明显低于对照组, 经统计学检验显示 $p < 0.05$, 推测这两个等位基因型可能为新疆维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌的保护基因。本课题的研究结果与前述研究结果有所不同, 可能是由于地区、民族差异所致, 其次所采用的试验方法也可能导致研究结果存在较大的差异。由于 HLA 的等位基因最多, 个样本量不足也可以导致研究结果差异较大。

2.2 HLA 多态性与 HPV 的关系

机体免疫监视系统对肿瘤的发生至关重要, 子宫颈癌的主要病因是高危型 HPV 持续感染, 尤其以 HPV16 为主, 机体未能将其清除是子宫颈癌发生的根本原因。国外有研究发现由于 HLA 的等位基因繁多, 不同的等位基因型对外源性抗原肽提呈的能力是有差别的。有研究发现某些等位基因型的频率与 HPV 感染率呈正比。Beskow^[46]等对瑞典 HPV16 DNA 阳性的子宫颈癌妇女进行 HLA 有关等位基因检测发现 HLA-DQB1*0602 和 HLA-DRB1*1501 等位基因 HPV16 阳性与子宫颈癌成正相关。而本研究结果发现在该样本中未检测到 HLA-DQB1*0602 等位基因型, 也未发现有关 HLA-DQB1 等位基因型与 HPV16 阳性子宫颈癌有相关性, 与有关文献报道有差异, 可能这与种族遗传背景有一定的关系。

2.3 HLA-DQB1 等位基因在新疆维吾尔族妇女中分布情况

由于 HLA 等位基因频率在不同人种、不同民族、不同地域存在明显差异, 因此, HLA 系统在人类遗传学上成了一个极好的群体标志, 对研究人类起源、迁移、混杂及某些疾病的高发有很高的价值。本研究结果发现在新疆维吾尔族妇女中 HLA-DQB1 等位基因型相对较集中, 从血清型来看, 主要集中在 HLA-DQB1*03, DQB1*04 两大血清类型。王晖^[47]等对 700 份生活在我国华南地区和 320 份生活在华北地区的中国人全血进行 HLA-DQB1 等位基因型检测发现华北地区的 HLA-DQB1 等位基因型主要集中在 HLA-DQB1*02, DQB1*03, DQB1*05, 而华南地区的 HLA-DQB1 等位基因型主要集中在 HLA-DQB1*03,

DQB1*05, DQB1*06。将本研究的结果与其对比发现新疆维吾尔族妇女中 HLA-DQB1 等位基因型总体分布与之存在一定差异,但由于本研究的样本量偏小,可能存在一定的误差。

3. HLA 及 HPV 与子宫颈癌的关系

HPV 病毒的致癌性与其原癌蛋白 E6、E7 密切相关,原癌蛋白对机体来说是外源性抗原肽,其在进入机体后会被机体免疫监视系统识别。人体免疫监视系统主要是 HLA 即人类主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC),那么如果机体能正确的识别 HPV 的原癌蛋白并将其提呈给机体免疫细胞,这决定着疾病的发展及预后。HLA 提呈抗原是依靠其表面的抗原结合槽与外源性抗原肽结合而发挥呈递作用。近年来已经有一些研究试图探讨 HLA 多态性与 HPV16/18 E6,E7 变异在宫颈癌发生发展中是否存在着联合作用。VAN DER BURG 等研究表明人群感染 HPV16 病毒后,可以产生抗 HPV16E7 的特异性免疫,E7 表面 HLAII 表位其中一个即为 DQ2/E7(35-50))。本研究测序了 54 例 HPV16 E7 发现所有的变异位点都没有位于 E7(35-50)的碱基位点突变,自然没有氨基酸发生变异。在本研究中还发现 HLA-DQB1*0325 和 HLA-DQB1*0332 在新疆维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌中频率明显高于宫颈炎对照组,而 HLA-DQB1*0317 和 HLA-DQB1*040302 明显低于宫颈炎对照组,故从本研究可以推断并不是 E7 发生改变而导致 HLA 提呈抗原能力下降,而可能是某些 HLA 等位基因型频率的上升和下降导致了其对 HPV 外源性抗原肽提呈能力下降,进而使机体对 HPV 病毒清除能力下降最终导致了相对较高的子宫颈鳞状细胞癌发病率。

结 论

(Conclusions)

1. 新疆维吾尔族妇女子宫颈癌中 HPV 感染以 HPV16 感染率最高,其次为 HPV56,而 HPV18 型较少,且重复感染相对较多;与我国其他地区以 HPV16、18 型为主有差异,这就为 HPV 疫苗在新疆维吾尔族聚集地区的开发提供一定的理论依据。
2. 新疆维吾尔族妇女子宫颈癌 HPV16 E7 相对于与我国其他地区、民族子宫颈癌具有高度保守性,这可能是导致新疆维吾尔族聚集区子宫颈癌高发的重要原因之一。

3. 本实验结果发现新疆维吾尔族妇女子宫颈癌中 HPV 感染型别与 HPV16E7 变异及 HLA-DQB1 等位基因型无相关性。
4. HLA-DQB1*0325 和 HLA-DQB1*0332 可能是新疆维吾尔族妇女子宫颈癌的易感基因, 而 HLA-DQB1*0317 和 HLA-DQB1*040302 可能为维吾尔族妇女子宫颈癌的保护基因。
5. HPV16 E7 变异位点未发现 DQ2 抗原结合位点所在位置突变, 这可能说明并不是由于 E7 基因突变导致 HLA 抗原提呈能力下降, 某些 HLA 等位基因频率的升高和降低可能导致了 HLA 抗原提呈能力下降, 这可能是新疆维吾尔族妇女子宫颈癌高发重要原因之一, 由于 HLA 等位基因繁多, 故需进一步扩大样本深入研究。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. Epub 2010 Jun 17. DOI: 10.1002/ijc.25516.
- [2] Arbyn M, Raifu AO, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in Europe: estimates for 2004. *Ann Oncol* 2007; 18: 1708–1715.
- [3] Arbyn M, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in the 27 member states of the European Union: estimates for 2004. *Ann Oncol* 2007; 18:1423–1425.
- [4] Parkin DM; Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world burden: globocan 2000[J]. *Int J cancer*, 2001, 94:153-156.
- [5] 姜淑清, 土送爱, 周俊兰, 等. 新疆策勒县妇女病现状调查与分析[J]. *中国妇幼保健*, 2006, 21(4):524-526.
- [6] 余勤, 马正海. 35 例维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 E7 致癌基因突变分析地方病通报 2006, 21(3) 17-20.
- [7] Biedermann K, Dandachi N, Trathner M, et al. Human of real – PCR Singnal- Amplidied in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantificatin of human papillomavirus in archival carvical cancer[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:3758 - 3761.
- [8] De Araujo souza PS, Villa LL. Genetic Susceptibility to infection with human Papilloma-virus and development of cervical in women in Brazil[J]. *Mutat Res*, 2003, 544(2-3):375-383
- [9] Vander Burg SH, Kwappenberg KMC, O'Neill T, et al. Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16L2 E6 E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens[J]. *Vaccine*, 2001, 19 (1):3652-3660.
- [10] Madeleine MM, Brumback B, Cushing-Haugen KL, Schwartz SM, et al. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. *J Infect Dis* 2002; 186:1565-74.
- [11] 孙琦, 齐翠花. HLA DRB1*1501 和 DQB1*0602 与新疆维吾尔、汉族 HPV 感染及宫颈癌发生的相关性. *石河子大学学报(自然科学版)* 2009 27 (2): 133-137.
- [12] Linxiao Lianga, Anlong Xub, Yufen Xiec, et al. Some but not all of HLA-II alleles are associated with cervical cancer in Chinese women. [J]. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2008, 187:95-100.
- [13] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008 [press release]. Stockholm, Sweden: TheNobel Assembly at Karolinska Institutet; October 6, 2008 http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/press.html. Accessed November 20, 2009.
- [14] Shailja Pande, Neeraj Jain, Bhupesh K, Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North India clinical microbiology [J], 2008, 5 1060–1066
- [15] Hildesheim, A., M. Schiffman, C. Bromley, S. Wacholder, R. Herrero, A. Rodriguez, M. C. Bratti, M. E. Sherman, U. Scarpidis, Q. Q. Lin, M. Terai, R. L. Bromley, K. Buetow, R. J.

- Apple, and R. D. Burk. 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:315–318
- [16] Rastogi, T., A. Hildesheim, and R. Sinha. 2004. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nat. Rev. Cancer* 4:909–917.
- [17] Veress, G., M. Murvai, K. Szarka, A. Juhasz, J. Konya, and L. Gergely. 2001. Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur. J. Cancer* 37:1946–1952
- [18] Tornesello, M. L., M. L. Duraturo, I. Salatiello, L. Buonaguro, S. Losito, G. Botti, G. Stellato, S. Greggi, R. Piccoli, S. Pilotti, B. Stefanon, G. De Palo, S. Franceschi, and F. M. Buonaguro. 2004. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J. Med. Virol.* 74:117–126.
- [19] van Duin, M., P. J. Snijders, M. T. Vossen, E. Klaassen, F. Voorhorst, R. H. Verheijen, T. J. Helmerhorst, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers. 2000. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J. Gen. Virol.* 81:317–325.
- [20] de Boer, M. A., L. A. Peters, M. F. Aziz, B. Siregar, S. Cornain, M. A. Vrede, E. S. Jordanova, S. Kolkman-Uljee, and G. J. Fleuren. 2004. Human papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol. Oncol.* 94:488–494.
- [21] Song, Y. S., S. H. Kee, J. W. Kim, N. H. Park, S. B. Kang, W. H. Chang, and H. P. Lee. 1997. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol. Oncol.* 66:275–281.
- [22] Wu, Y., Y. Chen, L. Li, G. Yu, Y. He, and Y. Zhang. 2006. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J. Gen. Virol.* 87:1181–1188.
- [23] 王华, 蔡红兵, 丁晓华. 湖北地区宫颈癌组织 HPV16 E7 和 E5 转化基因变异分析[J]. 武汉大学学报(医学版) 2009, 30(6): 759-762.
- [24] 刘欣, 刘国炳, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16 E7 序列多态性分析[J]. 第一军医大学学报 2005, 20(10): 1272-1276.
- [25] 杨英捷, 赵健, 廖秦平. 北京地区人乳头瘤病毒 16 型感染及其 E6/E7 基因变异与宫颈病变的相关性研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 3(21): 32-34.
- [26] Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China[J]. *Infect Dis*, 2002, 186:696-700.
- [27] Choi BS, Kim SS, Yun H, et al. Distinctive distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S intratypic Asian variants in Korean commercial sex workers[J]. *Med Virol*, 2007, 79:426-430.
- [28] Pande S, Jain N, Prusty BK, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north

- India[J]. Clinical Microbiology, 2008,46:1 060-1 066.
- [29] Biedermann K,Dandachi N, Trathner M, et al. Human of real – PCR Singnal- Amplidied in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantificatin of human papillo-mavirus in archival carvical cancer[J]. J Clin Microbiol,2004,42:3758 - 3761.
- [30]Clifford GM,Gallus S,Herrero R,et al.Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys:a pooled analysis[J].Lancet. 2005,366(9490):991-998.
- [31]LoWK,Wong YF,Chan KM,et al.Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer:a multicenter study in China[J].Int J Cancer,2002,100:327-331.
- [32]郑义, 井明霞, 王英红等 新疆维族妇女感染的 HPV 型别分布的研究 现代生物医学[J]. 2009,9 (7) :1285-1287.
- [33]Kulmala SM,Shabalova IP,Petrovitchev N,et al.Type-specific persistence ofhigh-risk human papillomavirus infections in the New Independent States of the former Soviet Union Cohort Study[J] Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2007,16(1):17-22.
- [34]吕卫国, 陈仲波, 宫颈癌人乳头瘤病毒基因型分布及与临床病理关系的研究 中华医院感染学杂志 2010, 20(6) : 126-132.
- [35]Trottier H, Mahmud S, Prado JC, et al. Type-specific duration of human papillomavirus infection: implications for human papillomavirus screening and vaccination. J Infect Dis 2008;197:1436 – 1447.
- [36]钱德英.高危型人乳头瘤病毒 DNA 检测与细胞学联合检查对宫颈癌前病变筛查研究[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 2 (1) : 12- 14.
- [37] 赵爱华 , 张红华多重人乳头瘤病毒感染与宫颈癌及癌前病变的相关研究[J]. 宁夏医学杂志 2009, 31(8):684-686
- [38] Madeleine MM, Brumback B, Cushing-Haugen KL, Schwartz SM,Daling JR, Smith AG, Nelson JL, Porter P, Shera KA,McDougall JK, Galloway DA. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. J Infect Dis 2002;186:1565-74.
- [39]Cuzick J, Terry G, Ho L, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P, Duncan I. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1*and DQB1* alleles and cervical cancer in British women. Br J Cancer 2000;82:1348-1352.
- [40]Sastre-GarauX, Loste MN, Vincent-Salomon A, Favre M, Mouret E, de la Rochefordiere A, Durand JC, Tartour E, Lepage V, Charron D. Decreased frequency of HLA-DRB1 13 alleles in Frenchwomen with HPV-positive carcinoma of the cervix. Int J Cancer 1996;69:159-164.
- [41]Davidson EJ, Davidson JA, Sterling JC, Baldwin PJ, Kitchener HC,Stern PL. Association between human leukocyte antigen polymorphism and human papillomavirus 16-positive vulval intraepithelial neoplasia in British women. Cancer Res 2003;63:400-403.
- [42] Wank R, Thomssen C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. Nature 1991;352:723-725.

- [43]Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl Erler ML. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1183-1191.
- [44]Montoya L, Saiz I, Rey G, Vela F, Clerici-Larradet N. Cervical carcinoma: human papillomavirus infection and HLA-associated risk factors in the Spanish population. *Eur J Immunogenet* 1998;25:329-337.
- [45]Paul K.S. Chan, Jo L.K. Cheung, Tak-Hong Cheung HLA-DQB1 polymorphisms and risk for cervical cancer: A case-control study in a southern Chinese population *Gynecologic Oncology* 2007; 105: 736–741.
- [46]Beskow AH,Josefsson AM,Gyllensten UB.HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer insitu [J].*Int J Cancer*,2001;93(6):817-822.
- [47]王晖,武大林,申啊东等 华南、华北人群 HLA-DQB1 等位基因多态性. *中华医学遗传学杂志* 2006 23 (2): 238-239.

文 献 综 述

(Literature Review)

HPV 及 HLA 与宫颈癌关系研究进展

Analyses of The relationship between HPV and HLA in

uterine cervix cancer

夏小艳, 玛依努尔·尼牙孜

(石河子大学医学院, 新疆 石河子, 832000)

摘要: 宫颈癌是女性常见恶性肿瘤之一, HPV 几乎是所有的宫颈鳞癌(95-100%)的致病因素, 大量研究表明高危型 HPV 如 HPV16、18 的致癌性较低危型明显增高, E6、E7 原癌蛋白分别与细胞内肿瘤抑制物 p53 和 pRb 结合使其失活是高危型 HPV 致癌的重要机制。肿瘤细胞往往是通过多种途径逃避免疫系统对他的识别及破坏, 细胞表面 HLA I 类分子的表达尤为重要, 这使得肿瘤细胞避免了细胞毒性 T 淋巴细胞对其的识别及溶解。HPV 病毒 E6, E7, L1 基因突变的研究表明特定位点的突变会使病毒更易诱导产生癌变及增大再次感染或从宿主免疫系统逃逸的机会。

关键词: 宫颈癌; 人类乳头瘤病毒 (HPV); E7 蛋白

中图分类号: R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2010)

Progression of the relationship between HPV and HLA in uterine cervix cancer

Abstract: Cervical cancer is common cancer among women worldwide.almost all of squamous carcinoma of the cervix is caused by HPV infection. Many research find that the carcinogenicity of high-risk HPV such as HPV16、18 is obviously high than low-risk HPV. The carcinogenesis mechanism of E6、E7 is binding with tumor inhibitor p53 and pRb then made them lost fuction.tumor cell often escape the recoginition and solution of human immune system by mang ways, the expression of HLA I of cell surface is especially important.the defection expression of HLA lead tumor cell escape the recoginition and solution of cytotoxicity T lymphocyte The study of E6, E7, L1 gene mutation of HPV virus indicade that specified site gene mutation can more induce cancerization and augment second infetion or escape from human immune system.

Key words: Cervical cancer; HPV; Human leucocyte antigen ; E7 protein

Chinese Library Classification(CLC):R737.33 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2010)**前言**

全球范围内宫颈癌发病率居女性恶性肿瘤的第二位,每隔两分钟就有一位女性因子宫颈癌而丧生。由于医学水平的发展,人们对宫颈癌的认识越来越深,随着治疗手段的不断改进,近 20 年我国宫颈癌的病死率下降明显,然而在一些中西部地区宫颈癌的发病率和死亡率都远超过全国的平均水平。

1 HPV**1.1 HPV 病毒简介**

1949 年 Sttauss 首先在电镜下观察到人乳头瘤病毒(HPV)颗粒。人乳头瘤病毒(HPV)是一类特异感染人皮肤、粘膜的双链环状 DNA 病毒,属空病毒科多瘤病毒亚科,其分子量约为 8000bp,人是其唯一宿主,皮肤、黏膜上皮为 HPV 的易感部位。HPV 基因组编码 8 个参与病毒侵染、繁殖复制和包装的功能蛋白,有 8 个开放式阅读框。含 ORF 的编码 DNA 链,按功能可分为三个结构域,早期蛋白编码区(Early region, ER)、晚期蛋白编码区(Late region, LR)和上游调控区(Upstream regulatory region, URR),E 区分为 E1-E7 开放阅读框架,主要编码与病毒复制、转录、调控和细胞转化有关的蛋白。L 区分 L1 和 L2,分别编码主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白。URR 位于 E 区与 L 区之间,长约 1kb,含有病毒基因组 DNA 的复制起点和基因表达所必须的调控元件^[1]。HPV 的致癌作用与 HPV DNA 的整合有关。目前认为,整合后的 DNA 发生致癌作用的主要基因为 E6、E7 和 E2。E6、E7 原癌蛋白分别与细胞内肿瘤抑制物 p53 和 pRb 结合使其失活是高危型 HPV 致癌的重要机制。

1.2 HPV 与宫颈癌

目前已有 100 多种亚型被鉴定,其中约 40 余种与人类生殖器皮肤黏膜病变有关。根据其对系统的致癌性,可将其分为低危型和高危型,前者包括 HPV6, 11, 40, 42, 4, 54, 61, 70, 72, 81 等,以 HPV6, 11 最为常见,主要引起尖锐湿疣等良性病;后者包括 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 72, 82 等,其中以 16, 18 最为常见,常引起恶性病变,如宫颈癌^[2]。大约有 99.7%的宫颈癌和 HPV 感染有关,其中 HPV16 型感染率最高,约 50%的宫颈癌患者肿瘤组织的 DNA 为 HPV16 型。因 HPV 感染所致疾病多为具有难治性、复发性、潜在致癌性的疾病,所以对 HPV 病毒及其所导致疾病的研究逐渐引起人们的重视,而研制有效的 HPV 疫苗,预防 HPV 感染和进行免疫治疗已成为国内外学者研究的热点。

中国癌症基金会组织的“中国妇女 HPV 感染和宫颈癌流行病学调查”是一个覆盖了中国七个地区 19 家医院 1244 名子宫颈癌和宫颈高度病变病例的多中心研究,其研究结果显示:中国城市妇女高危型 HPV 感染率是 15.2%,低危型 HPV 感染率是 4.4%。农村妇女的高危型 HPV 感染率是 14.6%,低危型 HPV 感染率是 2.0%。维吾尔族妇女的 HPV 感染率相对较低,其高危型 HPV 感染率是 7.2%,

低危型 HPV 感染率是 1.6%。同时发现, HPV 感染的年龄组分布曲线呈现出两高峰, 分别是 20-24 岁和 40-44 岁两个年龄组, 有年轻化趋势。在中国癌症基金会领导的多中心调查研究显示: 我国妇女 83% 的子宫浸润癌由 HPV16/18 型引起, 而 84.6% 的子宫鳞癌由 HPV16/18 型引起。而且未发现宫颈癌中优势 HPV 型别有地区差异。

HPV 几乎是所有的宫颈鳞癌(95-100%)的致病因素, 尤其是高危型 HPV(16,18 型等)更是宫颈疾病癌变的重要因素。WHO 于 1992 年宣布 HPV 是引起宫颈癌变的首要因素。其他类型与宫颈癌相关甚少。ManoS 等^[3]的研究显示: 宫颈病变程度与 HPV 感染率成正相关。TSuda 等^[4]也认为高危型 HPV 导致宫颈癌的几率为 1%, 而低危型 HPV 则为 0.1%。张燕玲等^[5]对 832 例不同程度宫颈病变患者进行 HPV 检测, 同样发现 HPV 感染率随宫颈病变程度的加重而升高, 不同 CIN 级别患者中 HPV 感染率不同, 宫颈癌的 HPV 感染率明显高于癌前病变患者。HPV 负荷量是否与宫颈病变的严重程度成正比, 这在国际上尚存争议。Abba 等^[6]研究发现 HPV 的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 CINII、CINIII 的危险性就越高; 而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。Sun 等用半定量 PCR 的方法检测也发现宫颈病变程度越高, HPV 负荷量越大。他在另外一项研究中还认为, HPV 负荷量与宫颈病变的面积大小呈正相关^[7]。Lai 等^[8]也认为宫颈 CIN 病变的 HPV 负荷量明显低于宫颈癌中 HPV 的负荷量。

宫颈癌中 HPV 存在多重感染, 多重感染是否会导致增加宫颈癌发病危险国际上还存在争议。多数认为 HPV 多重感染并不会增加宫颈癌的发生危险^[9], 但有些研究认为多重感染可以增加宫颈癌的发生。国内古扎丽努尔·阿不力孜等对 300 名宫颈癌患者 HPV 感染情况研究发现 HPV 多重感染在宫颈癌中及 HPV 阳性的宫颈癌中出现的比例分别为 10.33% (31/300) 和 11.97% (31/259), 多重感染中以二重感染为主, 占多重感染的 90.32% (28/31)。多重感染基本上以 HPV16 与其他型别合并感染为主, 占多重感染的 96.77% (30/31)。与 HPV16 多重感染的其他类型依次为 HPV18, HPV68, HPV39, HPV58, HPV56, HPV45, HPV31, HPV53; 其他类型只有 HPV58、68 多重感染 1 例。而在对照组中多重感染只有 HPV58、43 一例, 占对照组阳性病例的 5.0% (1/20)。

1.3.1 HPV 致癌机制

到目前为止, 宫颈癌致癌机制尚未完全明确。HPV 病毒 DNA 以两种形式存在于感染细胞中: 一是游离于宿主细胞染色体外, 常见于低危型 HPV 感染; 二是与宿主细胞染色体相整合, 常见于高危型 HPV 感染。高危型 HPV DNA 整合到人宿主细胞基因组中, 这在 HPV 诱导形成子宫颈癌的过程中起了关键作用, 整合作用使 E2 不能再产生病毒调节蛋白, 从而阻遏了 E6、E7 的转录功能。E6、E7 蛋白是参与细胞恶性转化的重要因子, 在高危型 HPV 中, 它们可以分别抑制抑癌蛋白(p53)及视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)的功能, 还能和其他许多细胞内分子

相互作用,阻止细胞凋亡、改变细胞转录、扰乱正常的信号转导,从而使正常细胞发生恶性转化。另外,端粒酶的激活、HPV 病毒逃逸机制等也在高危型 HPV 致癌过程中发挥了很大的作用。

2 人类白细胞抗原(Human leucocyte antigen,HLA)

2.1 HLA 简介

自 1958 年 Jean Dausset 发现人类白细胞抗原(human leucocyte antigen,HLA)后,有关 HLA 与人类各种肿瘤关系备受关注。HLA 是人类的主要组织相容性复合体,位于人第 6 号染色体的短臂上,长约 3600kb。HLA 基因系统是已知最复杂的人类基因系统,到目前为止,已经在 HLA 区域发现 224 个基因座位,其中 128 个有功能基因,96 个为假基因。HLA 基因系统不仅具有多个基因座位,而且各基因座位均有众多的等位基因,已经发现的等位基因数目多达 2182 个,如仅 HLA-DRB 座位上就有 494 个等位基因。HLA 由一组具有高度多态性和连锁不平衡性的基因群体构成,主要参与机体递呈抗原,决定免疫细胞对病原体及肿瘤的识别和杀伤。HLA 复合体共有数十个基因座,每个基因座上的基因均为复等位基因。根据结构与功能的不同,可将这些基因座分 3 类:HLA-I 类基因区,位于染色体的端粒侧,含有经典的 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 基因。HLA-II 类基因区靠近染色体着丝点,主要有 DR、DQ 和 DP3 个亚区,HLA-II 类基因是目前所知最具多态性的蛋白分子。HLA-III 类基因编码一些免疫相关的细胞因子。HLA 分子的主要生物学功能是参与抗原加工、处理和提呈及免疫调控。其中 HLA-I 类分子主要参与提呈的抗原多数是在核和胞浆中内源性合成的蛋白质分子,即内源性抗原,包括肿瘤抗原、同种异型抗原等。内源性抗原在胞质中被蛋白酶降解,经剪接后递交给新合成的 I 类分子,形成抗原肽-HLA-I 类分子复合物,在转运至细胞表面,供 CD8⁺T 细胞的 TCR 识别,这一途径称为胞质溶胶途径。HLA-II 类分子主要参与外源性抗原的加工、处理。外源抗原经受体介导的内吞作用进入抗原提呈细胞(APC)后,内化形成吞噬小体与溶酶体融合成吞噬溶酶体或称内体,蛋白质在内体中被降解,所形成的免疫原性多肽与 II 类分子结合,被转运至 APC 表面供 CD4⁺T 细胞的 TCR 识别,这一途径称为溶酶体提呈途径。因此 HLA 在免疫应答中发挥的关键作用是 HLA 等位基因产物决定特定的抗原肽能否被有效提呈给 T 细胞。由于 HLA 具有高度多态性,能产生多数等位基因,每个个体所携带 HLA 等位基因型别不同,故其提呈抗原的能力各异。HLA-III 类基因则编码一些免疫相关的细胞因子参与机体的免疫调节,如肿瘤坏死因子等。

2.2 HLA 与宫颈癌

1991 年 Wank 等发现人宫颈癌与人类白细胞抗原 HLADQw3 相关^[10]以来,宫颈癌与 HLA 之间的研究逐渐增多。HLA 具有高度多态性,正是因为 HLA 等位基因多态性导致其编码的产物与抗原多肽结合的抗原决定簇不同,这意味着能够识别 HPV 抗原并与之具有高度亲和力的 HLA 基因可能是宫颈癌的保护性因素,而

不能识别 HPV 抗原并与之结合的 HLA 基因可能是宫颈癌的易感因素^[11]。

2.2.1 HLA-I 与宫颈癌

CD8⁺CTL 细胞在人体的控制病毒感染和肿瘤细胞生长方面的作用重要,靶细胞表面 HLA-I 类抗原通过递呈病毒和(或)肿瘤抗原多肽及共刺激受体/配体来介导 CD8⁺CTL 细胞对靶细胞的识别与杀伤。王传勤等对 467 名山东各级宫颈病变妇女 HLA-I 表达情况研究发现 HLA-I 类抗原表达随病情加重显著下降。有关研究表明^[12],绝大多数宫颈癌组织存在至少 1 种 HLA-I 类分子减弱或消失,而 HLA-II 类分子表达增高。Akash M 等^[13]对 109 例宫颈癌组织中 HLAI 表达缺失研究发现 HLAI 表达正常的宫颈癌患者 5 年生存率为 83%,而 HLAI 表达缺失组 5 年生存率为 61%,差异具有统计学意义。宫颈肿瘤中 HLA-I 类分子表达缺失在肿瘤细胞逃避免疫监视机制中起了决定性的作用,导致了肿瘤细胞更广泛的转移。转移细胞中 HLA-I 类表达缺乏也反应了这些细胞可能逃避 CD8⁺细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic t lymphocyte,CTL)介导的杀伤。抗原加工相关转运体(Transporter associated with antigen processing,TAP)主要将内源性合成的蛋白质多肽从胞浆内转移到内质网中,38%的 HLA-I 类表达下降的肿瘤中发现 TAP 表达异常。有研究发现宫颈癌细胞可能通过下调 TAP-1 元件来抑制 HLA-I 表达从而达到免疫逃逸的目的。

2.2.2 HLA-II 与宫颈癌

Beskow 等^[14]在长达 27 年期间对 440 名宫颈原位癌患者和 476 年龄相匹配的健康者的宫颈细胞涂片进行回顾性对照分析发现,DRBI*0801、*1501、DQBI*0402、*0602 在宫颈癌患者出现频率较高,而 DRBI*0101、*1301、DQBI*0501、*0603 则相对低,但经校正后发现只有 DRBI*1501 和 DQBI*0602 与 HPV16 感染的宫颈癌相关。为研究这些等位基因与 HPV 持续感染的关系,将短期感染的妇女与长期感染的妇女进行比较,发现 DRBI*1501 和 DQBI*0602 在长期感染组更常见,表明这两个等位基因与不能清除 HPV 感染有关。国内外研究最多的 HLA-II 类等位基因/单体型主要集中在:(1)DQB1* 03 等位基因(DQB1*0301,DQB1* 0302 和 DQBI* 0303)。(2)DRB1*1501 和 DQB1* 0602 等位基因(两等位基因存在连锁不平衡现象,因此常出现于同一单体型中)。(3)DRB1* 13 (由 DRB1* 1301-5 等位基因组成)和 DQB1* 0603(DRB1* 1301 和 DQB1* 0603 也存在连锁不平衡)。国内古扎丽努尔等对 300 例新疆维吾尔族宫颈癌患者和 300 例正常妇女宫颈组织的 HLA-II 基因多态性研究发现 HLA-DRB1*15 在宫颈癌组织中出现的频率明显高于对照组,从而推测其为维吾尔族妇女宫颈癌的易感基因,而 HLA-DRB1*03 在宫颈癌组织中出现频率明显低于对照组,从而推测该基因对维吾尔族妇女宫颈癌的易感性有保护作用。Yuh-Cheng Yang^[15]对比研究了 126 名宫颈鳞癌患者及 289 名健康女性的 HLA-DRB1 表达情况,并将此研究与其他 9 个此类研究结合进行 Meta 分析表明 HLA-DRB1 的表达在宫颈鳞癌、及 HPV16 阳性的宫颈鳞癌患者及健康妇女之间差别不显著。Meta 分析进一步证实了 4 个

HLA-DRB1 等位基因家族 (HLA-DRB*04,*07,*11and*05) 及 7 个等位基因 (*04003,*0405,*0407,*0701,*1501,*1502and*1503) 与宫颈癌发生成正相关, 2 个 HLA-DRB1 等位基因家族 (HLA-DRB*09 和 *13) 和 4 个等位基因 (HLA-DRB*0901,*1301,*1302and*0602)与宫颈癌发生成负相关。Meta 分析^[16]表明 HLA-DRB1 等位基因家族及其等位基因与宫颈癌发生有显著关系,从而表明宫颈癌的发生与免疫缺陷有关。

3 HPV 感染与 HLA 表达

SheuBC 等^[17]研究发现多数宫颈癌细胞存在 HLA 基因型突变,且在 70%HLA 突变位点检测到 HPVDNA 的整合。这说明 HPV 通过破坏 HLA 基因导致肿瘤发生及免疫逃逸。大量实验表明 HPV 感染在良性宫颈病变中起重要作用,但单靠 HPV 感染不足以使其进展为宫颈癌,宿主的免疫监视对感染的控制及疾病的发展起着至关重要的作用。研究表明 E7 蛋白内存在大量 CTL 表位,包括许多小鼠 H-Zb(C57BL/6)表位(其中以 E749-57 表位最受重视)和 3 个 HLA-A*0201 表位,位于 E711-20,E782-90,E786-93 以及 HLA- B18 表位 E744-52,另外还存在至少 3 个 HLA11 表位:DR15/E7(50-62), DR3/E7(43-77), DQ2/E7(35-50))^[18]以及 B 细胞表位。大量研究发现, E7 蛋白能够激发机体抗肿瘤的细胞毒性淋巴细胞(CTL)应答。因此,可将其视为肿瘤特异性抗原及研究开发 HPV 治疗性疫苗的理想靶抗原。近年来已经有一些研究试图探讨 HLA 多态性与 HPV16/18 E6,E7 变异在宫颈癌发生发展中是否存在着联合作用。Zehbe 等^[19]通过对瑞典、意大利和捷克 3 组宫颈癌妇女的研究发现,在瑞典妇女中 HPV16-E6L83V 变异与宫颈癌成正相关,3 组中 HLA-DR04-DQ03 单体型突变 HPV16-E6L83V 变异成正相关。

4 展望

高危型 HPV 是宫颈癌的首要致病因素已经得到世界范围内的公认, HPV16、18 型的感染是最常见的,其中 E6、E7 起了关键作用。然而并不是所有感染 HPV 女性都会发展为宫颈癌,免疫因素在宫颈癌中起了重要作用。清除 HPV 致癌成分有赖于机体的免疫系统,尤其是宫颈局部免疫状况。大量研究表明 E6、E7 蛋白变异及 HLA 基因多态性与宫颈癌发生密切相关,我国维吾尔族妇女宫颈癌 HPV 感染率并不是最高,但宫颈癌的发病率及病死率较我国其他民族明显高,这可能与 HPV 变异及 HLA 种族特异性有一定关系。

参考文献

- [1] Joel M. Palefsky and Elizabeth A. Holly. Molecular virology and epidemiology Of human Papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epi, Bio&Pre*, 1995, 1:415-428
- [2] Senior K. Cervical cancer research focuses on the HPV E7 gene [J]. *Lancet*, 2002, 3(10):585
- [3] Mano S MM, Kinney WK, Hurley LB, et al. Identifying women with cervical neoplasia: using human Papillomavirus DNA testing for equivocal Pap smear results. *JAMA*, 1999, 281:1605-1610.
- [4] Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, et al. Relationship between HPV typing and abnormality of G1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol*, 2003, 91:476-485.
- [5] 张燕玲, 乔志强, 李隆玉, 等. 宫颈癌及癌前病变患者人乳头瘤病毒感染率的临床分析. *实用癌症杂志*, 2005, 20(2):161-163.
- [6] 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.
- [7] Sun CA, Liu J F, Wu DM, et al. Viral load of high-risk human Papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet*, 2002, 76(1):41-47
- [8] 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. *Gynecol Oncol*, 2001, 83(1):95-99.
- [9] AN HJ, Cho NH, Lee SY, et al. Correlation of cervical carcinoma and Precancerous lesions with human Papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method. *Cancer*, 2003, 97(7):1672-1680.
- [10] Wank R, Thomssen C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3 [J]. *Nature*, 1991, 352(6337): 723-725
- [11] Rensing M, Sette A, Brandt RM, et al. Human CTL presented by human Papillomavirus type 16E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol*, 154(11):5934-43, 1995
- [12] Konya J, Diliner J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res* 2001; 82:205-238.
- [13] Akash M. Mehta, Ekaterina S. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma *Cancer Immunol Immunother* (2008) 57:197-206
- [14] Beskow AH, Josefsson AM, Gyllenstein UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ. *Int J Cancer*. 2001; 93:817-822
- [15] Yuh-Cheng Yang, Tzu-Yang Chang. HLA-DRB Alleles and Cervical Squamous Cell Carcinoma: Experimental Study and Meta-Analysis *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, 2006. 67, 331-340

- [16] Yuh-Cheng Yang, Tzu-Yang Chang, HLA-DRB Alleles and Cervical Squamous Cell Carcinoma: Experimental Study and Meta-Analysis American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2006. 67, 331–340
- [17] Heu BC, Chiou SH, Chang WC, et al. Integration of high-risk human Papillomavirus DNA correlates with HLA genotype aberration and reduced HLA class I molecule expression in human cervical carcinoma. Clin Immunol 2005; 115(3): 295-301.
- [18] Van der Bur SH, Messing ME, Kwappenberg KM, et al. Natural T helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes Int J Cancer 2001; 91(5): 612-618.
- [19] Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, et al. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. Int J Cancer, 2002, 94(5): 711-716

致 谢

(ACKNOWLEDGMENTS)

三年的研究生学习生活匆匆而过，这段经历是我人生中值得回忆的一段时光。很多爱护、关心我的老师和同学给予我极大的帮助，谨向他们表示真挚的谢意。

衷心感谢我尊敬的导师玛依努尔教授，三年来不仅在我的学习过程中悉心指教，而且在生活中给予我莫大的支持。论文从选题、实验设计到实施、写作，无不倾注她的大量心血。她严谨求实的科学态度、超常的工作热情和渊博的学识是我终生的学习榜样。玛依努尔教授在百忙中始终关心课题进展，随时解决遇到的困难和问题，使我顺利完成学业。对科学，她以敏锐的洞察力和精益求精的科学态度，令人钦佩；对工作，她热情和积极的态度感染着身边的每一个人，研究生期间从她身上所学到的思维方法和处事态度将使我终生受益。

感谢新疆维吾尔自治区人民医院妇科阿也提主任在研究生临床实习期间为我提供了良好的学习环境；感谢自治区人民医院妇科全体老师的热心帮助，不仅使我较成功地完成了论文的撰写，而且在很大程度上提升了我在临床实践技能。

感谢新疆维吾尔自治区人民医院妇产科研究生朱开春及全体老师在分子生物学试验方面给予的指导和帮助，正是由于他们的大力支持、无私帮助，使得试验可以顺利进行，并如期完成，在实验过程中学习到的诸多分子生物学方面的知识，使我的知识体系更加完善。

感谢石河子大学研究生处及医学院各位领导及老师提供的支持和帮助，使我的学业得以顺利进行。

感谢 2008 级研究生全体同学，难忘我们共同走过人生中短暂却不平凡的三年学习生活，感谢妇产科专业全体研究生同学的支持。

衷心感谢我的家人给予我学业上始终如一的支持、温暖的鼓励，生活上莫大的关心！最后对所有关心、爱护和帮助我的老师、同学、朋友以及我的家人一并以衷心的感谢和诚挚的敬意！

研究生：夏小艳

2011 年 5 月

作者简历

夏小艳，女，生于 1983 年 10 月，籍贯湖南。2006 年毕业于新疆医科大学，获医学学士学位。2006 年至 2008 年在新疆心脑血管病医院工作。2008 年就读石河子大学医学院妇产专业，研究方向为妇科肿瘤与内镜。

研究生期间参与的主要研究项目

- 1.参加了 HPV 疫苗 III 期临床试验前期认知度调查。
- 2.申请新疆维吾尔自治区人民医院院内课题项目（课题号：2010001），参加了全部研究工作。

研究生期间发表的论文

- 1.夏小艳，玛依努尔·尼牙孜。HPV 及 HLA 与子宫颈癌研究关系研究进展[A].现代生物学进展，2009, 5(8):176-179.
- 2.夏小艳，玛依努尔·尼牙孜，朱开春等。新疆维吾尔族妇女子宫颈癌高危型 HPV 病毒载量与分型相关性研究 [J].中国肿瘤，2011，19(3):203-206.

HPV16E7及HLA-DQB1基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究



作者：[夏小艳](#)
学位授予单位：[石河子大学](#)

引用本文格式：[夏小艳](#) HPV16E7及HLA-DQB1基因多态性与新疆维吾尔族宫颈癌关系研究[学位论文]硕士 2011