

摘 要

目的

HPV16 基因多态性在不同的地区存在着差异, 并可能导致 HPV 的致病性发生改变。本实验拟分析宫颈上皮内瘤变Ⅲ级组织中, HPV16 主要的致癌基因 E6、E7 的突变情况, 以探讨山东青岛地区癌前病患中 HPV16 E6 和 E7 基因的主要突变特征与突变型别, 为防治宫颈癌提供新的研究思路。

方法与材料

1. 收集 51 例于青岛大学医学院附属医院妇科行宫颈冷刀锥切治疗的石蜡组织标本, 病理诊断均为宫颈上皮内瘤变Ⅲ级。这些患者均首次于妇科门诊就诊时通过高危型 HPV 分型检测。
2. 用蛋白酶 K 法和 OMEGA 试剂盒提取 Siha 细胞与 HPV16 阳性石蜡组织中 DNA。
3. 把提取得到的 DNA 作为模版, 进行 PCR 扩增, 获得 E6 和 E7 完整基因片段。
4. 纯化得到的基因产物, 并进行碱基测序, 与 Genbank 中 HPV16 E6、E7 标准序列进行比对分析, 寻找 HPV16 E6 和 E7 的改变。

结果

1. 宫颈上皮内瘤变Ⅲ级中 HPV16 阳性者共 33 例, 共有 32 例扩增出 E6、E7 全基因片段, 其中 30 例 (93.75%) 存在碱基突变。
2. 本实验中共检测到 3 种 HPV16 变异亚型, 按比例顺序分别为 AS 型 (21/32)、E-P (9/32) 型和 E(2/32) 型。
3. 32 例扩增出 E6、E7 基因片段的组织中, E6 基因共发现 7 个突变位点, 其中 6 种有义突变, 其中发生 T178G 突变的共有 21 例。E7 基因有 11 种碱基突变, 有 7 种突变可导致氨基酸改变; 其中常见的突变位点及发生例数分别为 A647G (22 例), T846C (19 例), T843C (7 例), G666A (6 例); 只有 A647G 可以引起氨基酸置换。
4. E6 T178G 和 E7 T846C、A647G 是常见的联合突变位点。

结论

山东青岛地区 HPV16 E6、E7 基因碱基序列跟 Genbank 中标准株比较存在多种突变。

硕士研究生 王玉洁 (妇产科)

指导教师 车艳辞 副教授

关键词: 宫颈上皮内瘤变; 人乳头瘤病毒 16; E6; E7 ; 基因多态性



ABSTRACT

Objective

HPV16 gene polymorphism differed between regions, and it would increase the risk of cervical carcinoma. We analyzed the mutation of oncogenes E6 and E7 during cervical intraepithelial neoplasia III lesions, and try to investigate the polymorphism of HPV16 E6/E7 genes and the relation between the mutations and different stages of cervical lesions in Qingdao.

Methods

1. 51 conization paraffin samples diagnosed as cervical intraepithelial neoplasia III(CINIII) were collected. These patients' HPV genotyping showed HPV16 positive at Gynecology clinic, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University from May. 2010 to Des. 2011.
2. DNA samples were extracted from the CINIII tissues with .
3. E6 and E7 genes was collected from amplified HPV16 positive samples.
4. The PCR products were purified, sequenced and analyzed.

Results

1. During CINIII lesions, HPV16 was positive in 33 women. E6/E7 sequence was taken from 32samples.
2. As(21/32) and E-prototype(9/32)were the most widespread branches of HPV16 in Qingdao. There was only 2 samples E positive.
3. There were 7 mutation points in E6 gene, 6 of which amino acids changed. The hot spot of variant was at nt 178 from T to G (T178G, 21/32). In E7 gene, it was discovered 11 points, and 7 of them would produce another amino acid.A647G (22/32) , T846C (19/32) , T843G (7/32) , G666A (6/32) was the most frequent mutations.
4. Joint mutation among E6 T178G , E7 T846C and E7 A647G were detected frequently.

Conclusion

As and prototype of HPV 16 were the major branches of CIN III in Qingdao, and the mutational hot spots T178G, A647G and T846C may play an important role in high grade cervical lesion infected HPV 16.

Postgraduate Wang Yujie
(Gynecology)

Directed by Associated Prof. Che Yanci

Key words: cervical intraepithelial neoplasia; human papillomavirus 16; E6; E7; polymorphism

目 录

引言	1
第一章 材料与方法	2
1.1 材料	2
1.1.1 主要仪器	2
1.1.2 主要试剂	2
1.1.3 石蜡标本来源	2
1.1.4 阳性对照	3
1.2 方法	3
1.2.1 HPV 分型检测	3
1.2.2 石蜡标本 DNA 的提取	4
1.2.3 细胞 DNA 提取及溶解	6
1.2.4 聚合酶链反应 (PCR)	6
1.2.5 扩增产物电泳分析	7
1.2.6 核苷酸序列的碱基测序	8
第二章 结果	9
2.1 HPV16 E6/E7 基因扩增情况	9
2.2 基因扩增情况及基因型分布	9
2.3 E6 基因突变情况	9
2.4 E7 基因突变情况	10
第三章 讨论	13
3.1 高危型 HPV16 及其亚型的感染情况	13
3.2 HPV16 E6、E7 结构及功能	13
3.3 HPV16 E6 和 E7 基因突变情况	15
第四章 结论	18
参考文献	19
综述	23
综述参考文献	27

攻读学位期间的研究成果.....31

致谢.....32

学位论文独创性声明、学位论文知识产权权属声明.....33

引 言

女性生殖系统恶性肿瘤中，宫颈癌（cervical cancer）乃较常见的一种。全球每年新发病例 50 万，高达 27 万患者死亡。我国每年有 13 万人以上为新发的宫颈癌，占世界总数的 1/4-1/3，每年约有 2.3 万名女性死于该恶性肿瘤，并且近几年有年轻化趋势^[1]。德国学者 Zur Hausen 首先在 20 世纪 70 年代提出人乳头瘤病毒（human papillomavirus, HPV）是引起宫颈癌的病原体^[2]。之后针对 HPV 的探索在全世界进一步展开，并且已经明确 HPV 是引发宫颈癌的首要因素。但感染了 HPV 并不意味着患者宫颈已发生癌变。80%女性一生中都会受到 HPV 感染^[3]，其中 70%感染是一过性的，可依靠自身免疫力清除，25%可为持续性感染，10%可发展至宫颈上皮内瘤变Ⅲ级（CINⅢ），只有 1%可进展为浸润性宫颈癌^[4, 5]。

HPV 属于乳多空病毒科多瘤病毒亚科，广泛分布于周围自然环境中；是小双链环状 DNA 病毒，具有嗜上皮组织性，核无包膜。其遗传物质中，开放读码框架（ORF）分别为早期转录区（Early region, E, 8 个）和晚期转录区（Late region, L, 2 个），依次分别为 E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8 和 L1、L2，还有一个长调控区（long control region, LCR）。其中，抑癌蛋白 p53 与 pRb 分别被诱导癌基因 E6 和 E7 诱导发生降解，逐渐使宫颈细胞发生永生化和恶变^[6]。在 HPV 感染过程中，会发生宿主细胞 DNA 被整合入病毒基因。在这个过程中，病毒基因组常先发生断裂由环形变成链状，因此导致病毒部分基因改变或丢失，而使抑制癌基因 E6、E7 表达的功能减弱。整合入宿主细胞基因后导致宫颈癌的发生。

目前 HPV 已发现上百个亚型，其中 1/5 生殖系统疾病有关，1/10 与宫颈肿瘤相关（约 20 种）。对于 HPV 基因型分布特征，世界各地（欧洲、美洲、亚洲、非洲、大洋洲等）均有研究报道。且绝大部分的研究结果均显示 HPV16 型为女性感染宫颈的优势基因型，其次多为 18 型、33 型、58 型不等。即使是同一型 HPV，也存在多种突变，且具有地区差异性。以标准 E6、E7 和 L1 作为对比，国际上统一认为，开放读码序列差距大于 10%者划分为新的 HPV 型别，差别在 2%-10%间者划为亚型，编码区差异小于 2%，非编码区差异不超过 5%者归为型别突变^[7]。研究表明，HPV 在不同地区的突变特点，可能会导致病毒致癌性发生变化^[8]。

本实验分析了青岛地区宫颈上皮内瘤变Ⅲ级组织中 HPV16 E6 E7 基因的突变情况，探讨其与宫颈病变的相关性，为本地区宫颈癌的防治探索新的路线。

第一章 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器

- 1) PCR 扩增仪: 美国 PE 公司
- 2) 高速低温台式离心机: 德国 Eppendorf 公司
- 3) 水平电泳仪及电泳槽: 美国 Bio. Rad 公司
- 4) 凝胶成像系统: 美国 PE 公司
- 5) 分子杂交仪: 北京瑞科源科技有限公司
- 6) 电子天平: 上海天平仪器厂
- 7) 可调式微量移液器: 德国 Eppendorf 公司
- 8) 紫外分光光度仪: 德国 Eppendorf 公司
- 9) 微波炉: 顺德革兰仕电器厂
- 10) 宫颈标本采集器: 亚能生物技术有限公司

1.1.2 主要试剂

- 11) 人乳头瘤病毒基因分型 (23 型) 检测试剂盒: 亚能生物技术有限公司
- 12) 二甲苯: 天津巴期 夫化工有限公司
- 13) 蛋白酶 K: Takara 公司
- 14) Tris 饱和酚: 北京索莱宝科技有限公司
- 15) 氯仿: 烟台三 和化学试剂有限公司
- 16) PBS: 美国 Gibco 公司
- 17) 琼脂糖: Spanish 分装
- 18) Marker: Takara 公司
- 19) PCR 引物: 上海生工生物技术公司
- 20) PCR 试剂盒: Tiangen 公司
- 21) 无水乙醇: 烟台三和化学 试剂有限公司

1.1.3 石蜡标本来源

本实验收集 2009.1 至 2011.12 于青岛大学医学院附属医院妇科住院行宫颈冷刀锥切治疗的石蜡组织标本共 51 例。这些患者均已于门诊初诊时行 HPV 分型检测。这些患者年龄范围 23-69 岁, 平均年龄 42 ± 8.3 岁, 术前均未做任何治疗, 并且术后

病理结果均由本院病理科再次阅片确诊。

1.1.4 阳性对照

Siha 细胞株(HPV16 阳性)1 瓶。

1.2 方法

1.2.1 HPV 分型检测

1.2.1.1 样本要求

- 1) 检查前准备：生育期女性，月经来潮后 10-18 天为检测时间；绝经期女性无此限制；
- 2) 检查前 3 天内不能阴道内用药，不能做阴道冲洗；
- 3) 检查前 24 小时内未有过性行为；
- 4) 检查前不需要进行碘液或醋酸试验。

1.2.1.2 采样方法

以专门的宫颈细胞刷进行宫颈上皮脱落细胞采集。阴道窥器使宫颈后暴露完全，如宫颈口处有过多的分泌物，可用棉拭子擦去。将宫颈标本采集器前端刷头置于宫颈口，逆时针旋转 5 周，以脱落的宫颈上皮细胞，然后将宫颈刷头放入盛有专用保存液的洗脱管中，折断宫颈刷柄自折痕处，拧紧洗脱管的盖，保持洗脱管直立放并做标记标清样本。

1.2.1.3 操作方法

1.2.1.3.1 提取宫颈脱落细胞 HPV DNA

- 1) 充分洗脱宫颈刷上的标本，每个标本取 1ml 前述洗脱液，13000rpm 离心 10min，留取细胞沉淀。
- 2) 加 50 μ l 裂解液于上述沉淀后，沸水浴 10 分钟。同样方法离心后，留取上清液备用。

1.2.1.3.2 PCR 扩增

- 1) 将 PCR 的反应管取出，并做好标识，低速离心数秒后，加入提取的待测样品各 DNA 5 μ l（反应的总体积是 25 μ l），再上述条件离心数秒。每批检测分别按照试剂盒说明设置质控（阴阳、阳性）。
- 2) 条件要求：预变性为 50℃ 15min，95℃ 10min；变性为 94℃，30s；复性为 42℃，90 s；延伸为 72℃，30s；共 40 个循环；热循环结束后再延伸，

条件为 72℃, 5min。

1.2.1.3.3 杂交

- 1) 取干净的 15ml 塑料离心管 1 支, 放入标有样本编号的膜条, 加入 5ml A 液和 25 μ l 的 PCR 产物, 放入沸水浴中加热 10 分钟, 确保管内液体完全浸入沸水浴液中 (将盖拧紧后再将盖稍拧松, 避免受热后管盖爆开)。取出后放入杂交箱杂交 2 小时 (51℃, 且此时须拧紧管口)。
- 2) 准备一支 50ml 离心管, 倒入 B 液至满刻度, 预热至上述杂交温度后备用。

1.2.1.3.4 洗膜

将膜条取出, 放入已经预热好的上述装有 B 液离心管中, 轻摇洗涤 5 分钟, 51℃ (每 50ml B 液可同时洗 4 张膜)。

1.2.1.3.5 显色

- 1) 按 A 液: POD=2000: 1 配置孵育液 (2 张膜需用 4 μ l POD, 配成 8ml 孵育液, 4 张膜可 6 μ l POD 母液, 配成 12ml 孵育液);
- 2) 室温下反应 30 分钟, 可轻摇孵育液。再重复孵育 2 次, 但每次持续 5 分钟即可。
- 3) 用 C 液漂洗上述反应中的膜条, 每批 1-2 分钟, 室温下即可, 并按说明书配好显色液备用。
- 4) 避光显色: 置膜条于上述刚配好的显色液中约 2 刻钟, 再将膜条转移至去离子水中即可显示检测结果。

1.2.2 石蜡标本 DNA 的提取

1.2.2.1 平衡 HiBindDNA 结合柱

- 1) 在收集管中放入 HiBindDNA 结合柱, 向其中加入 Buffer GPS 缓冲液约 200 μ l;
- 2) 室温下放置 3-5min 后, 12000rpm 离心 2min;
- 3) 弃去滤液后, 在收集管中把柱子重新放回, 然后再吸取 700 μ l 无菌水至柱子中;
- 4) 按照前面述及的方法在室温下再次离心;
- 5) 把滤液从收集管中倒掉, 把 HiBind DNA 柱子再次重新放到收集管中 (可保存 1-2 周备用)。

1.2.2.2 试剂准备

- 1) 以 1.5ml 的 10mM. pH8Tris-HCl 将 OB 蛋白酶 (22-25℃ 存放) 稀释, 可以保存在 -20℃ 条件下;
- 2) 以纯度 95% 以上的乙醇把 DNA Wash Buffer 稀释后备用;
- 3) 除外 Elution Buffer, 另外的试剂均在使用前先放至室温;
- 4) Buffer BL 中如果发现沉淀物, 可以加热小瓶至 37℃ 使其消融。

1.2.2.3 组织 DNA 提取

- 1) 切片 10 μ m 厚, 仔细去掉组织周围的石蜡组织, 面积 $\leq 250\text{mm}^2$, 并弃掉前 2-3 张切片 (组织暴露空气氧化);
- 2) 每个标本切 8 张切片, 切好后马上放进 1.5ml EP 管里边, 并加入 1ml 二甲苯, 盖紧盖后震荡 10s;
- 3) 在室温条件下, 10000rpm, 离心 2min, 勿触动底层沉淀, 弃去上清;
- 4) 把 1ml 无水乙醇加到沉淀物里, 去除残留在其中的二甲苯;
- 5) 室温条件下, 再次 10000rpm, 离心 2min, 弃去上清, 尽量去净, 勿触动底层沉淀;
- 6) 37℃ 情况下, 开盖放置, 直到挥发掉残留的全部乙醇 (约 15 分钟);
- 7) 把 200 μ l Buffer TL 加入 6) 中, 于 90℃ 水浴 10min 孵育;
- 8) 将样品室温放置待其冷却;
- 9) 加入 OB 蛋白酶 20 μ l, 震荡混匀后, 于 55℃ 条件下过夜孵育;
- 10) 再吸取 Buffer BL 200 μ l 加入其中并混匀;
- 11) 更换移液器吸头, 吸取无水乙醇并加入 250 μ l 至反应体系中, 混匀;
- 12) 把包括沉淀物在内的样品全部转移放到之前步骤已经准备好的结合柱中, 注意勿将其边缘沾湿; 室温下 10000rpm 离心 1min, 弃去收集管及其中的液体 (如有需要, 可调整离心速度直到完全滤完结合柱里的裂解液);
- 13) 另取 1 个 2ml 的收集管, 放入 HiBind DNA 结合柱, 再加入 500 μ l Buffer HB, 室温下 10000rpm 离心 1min, 弃去含有液体的收集管;
- 14) 重复 13) 的操作 1 次;
- 15) 更换放置 HiBind DNA 结合柱的收集管, 将之前已经乙醇稀释的 DNA Wash Buffer 吸取 500 μ l 加入其中, 室温 10000rpm 离心 1min, 弃去含液体的收集管;
- 16) 重复操作一次 15) 步骤;
- 17) 高速离心数分钟至结合柱干燥完全;
- 18) 在无菌的 1.5ml EP 管中放入 HiBind DNA 结合柱, 加入 20-100 μ l Elution Buffer (已预热至 70℃), 静置 5min, 室温下;

19) 10000rpm×1min 离心, 取上清液保存于 4℃ 备用;

20) 重复步骤 18), 19)。

1.2.3 细胞 DNA 提取及溶解

1.2.3.1 制备裂解缓冲液

1.2.3.1.2 制备 1×HMWbuffer

表 1.1 1×HMbuffer 的配置方法

	起始浓度	配制体积 (ml)	质量 (g)	终浓度 (mM)
NaCl	5M	30	0.753	150
ddH ₂ O	910	200		
Tris 碱	1M	10	0.242	10
EDTA	250mM	40	0.7445	10
总体积		990	200ml	

1.2.3.1.2 制备 4ml 裂解液

蛋白酶 K 20 μl, 1×HMbuffer 3.94ml, 10%SDS 40 μl

1.2.3.2 细胞 DNA 的提取

- 1) 先加入胰酶培养瓶中的细胞分散, 1500rpm×5min 离心后, 留取沉淀物, 用 12ml 冷 D-Hanks 液分 3 次清洗后, 再次离心, 沉淀备用;
- 2) 吸取 4ml 的裂解缓冲液放入离心沉淀中, 充分混匀, 并摇床震荡过夜 (37℃);
- 3) 移液器吸取并加入饱和酚 4ml, 充分混匀半小时, 进行抽提。3000rpm, 15min 离心;
- 4) 吸取上层水相转移至新离心管, 加入 4ml 氯仿: 饱和酚=1 的混合液, 摇匀后, 再 3000rpm 离心 15min, 弃去沉淀;
- 5) 加入两倍半体积无水乙醇, 摇匀后置于 -20℃ 条件下过夜 (可将絮状沉淀直接加入无菌 EP 管中, 并加入 70%乙醇 1ml);
- 6) 给予 3000rpm 离心 10min, 絮状沉淀物如上述步骤直接处理, 并保存于 -20℃ 条件下;
- 7) 使用时取少量的沉淀物, 彻底晾干, 移入 PCR 水溶液, 在 4℃ 条件下保存备用。

1.2.4 聚合酶链式反应 (PCR)

1.2.4.1 引物设计及合成

通过 Primer Premier5.0 分别设计扩增 HPV16 E6/E7 和 β -globin 编码基因的两对引物（见表 1.2）。参考文献^[9, 10]并通过 BLAST 分析已经验证设计的引物序列和人类的其它基因编码序列没有同源性，即对相应 HPV 目的基因具有特异性。实验引物的合成者为上海生工生物工程技术有限公司。

表 1.2 对应序列及其扩增产物

引物名称	上游引物序列	下游引物序列	产物长度
E6	5'-gaaacggtagtataaaagcagac-3'	5'-atgtgggttctctacgtgttct-3'	503bp
E7	5'-agaaaccagctgtaatcat-3'	5'-ttatggtttctgagaacaga-3'	315bp
β -globin	5'-gaagagccaaggacaggtac-3'	5'-caactcatccacgttcacc-3'	268bp

1.2.4.2 25 μ l PCR 反应体系

- 去离子水 14.3 μ l
- 10 $\times$ buffer 2.5 μ l
- MgCl₂ (25mM/L) 2.5 μ l
- dNTP 0.5 μ l
- 上游引物 0.5 μ l
- 下游引物 0.5 μ l
- TaqDNA 聚合酶 0.2 μ l
- DNA 4 μ l

1.2.4.3 反应要求

- 1) 将全部试剂按照要求的剂量加入到反应体系中，摇匀，离心数秒；
- 2) 吸取石蜡油并加入 20 μ l 至反应体系中，以覆盖液面，离心数秒，之后再 PCR 的扩增。每次扩增分别设置阳性基因型对照，其中阳性的对照为 Siha 阳性标本，阴性的对照为 25 μ l 双蒸水。
- 3) 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min，95 $^{\circ}$ C 变性，时间为 30s，55 $^{\circ}$ C 复性 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸，时间为 30s，共进行 35 次循环；之后在 72 $^{\circ}$ C 条件下再延伸，时间为 10min。

1.2.4.4 实验步骤

β -globin 用于 DNA 提取物的质检。用 PCR 扩增 HPV16 阳性标本组织中 E6 和 E7 两个基因的基因的完整序列。

1.2.5 扩增产物电泳分析

1.2.5.1 配制 0.5 $\times$ TBE 缓冲液

- Tris 碱 13.5g

硼酸 6.875g

EDTA 0.93g

双蒸水 2500ml

1.2.5.2 制作 1.6%琼脂糖凝胶

- 1) 称取琼脂糖 0.32g, 量筒量取 $0.5 \times$ TBE 缓冲液 20ml, 置于小烧瓶内, 混匀, 遮蔽瓶口;
- 2) 微波炉加热琼脂糖至完全溶解;
- 3) 室温下, 待小烧瓶降温至 50—60℃时加入 EB $1 \mu\text{l}$, 震荡摇匀;
- 4) 将上述液体倒入 11 孔模型中, 待其自然凝成固体 (约半小时);
- 5) 将模型梳小心拔出即可, 胶可在 4℃下保存 2 周。

1.2.5.3 电泳分析

- 1) 吸取扩增产物 $5 \mu\text{l}$ (石蜡液面下取), 与 $0.5 \mu\text{l}$ 上样缓冲液混匀, 加液体至至胶孔被 TBE 液盖过, 但不能外溢。
- 2) 直流电压下 (100V) 至缓冲液达胶的一半的时候可以断电, 分光光度仪和成像系统可以分别检测结果和采集图像。

1.2.6 核苷酸序列的碱基测序

条带结果清晰的样本, 每例取 $50 \mu\text{l}$ PCR 产物, 需要进行纯化, 可进一步测碱基对顺序, 测序跟纯化工作由深圳华大基因研究院提供, 碱基对排列顺序用 DNAMAN 软件比较分析。

第二章 结果

2.1 基因扩增情况及基因型分布

收集的 51 例 CINIII 石蜡组织中，有 33 例患者的 HPV 分型检测结果提示 HPV16 阳性，约占 64.71%。其中共有 32 例扩增获得了 E6 和 E7 全基因片段。与 Genbank 中 HPV16 E6、E7 标准序列相比，共有 30 例（93.75%）存在基因位点突变。在本实验中，共发现 3 种 HPV16 的变异分支，分别为 AS 型 21 例，E-P 型 9 例，E 型 2 例。

2.2 HPV16 E6/E7 基因扩增情况

以 HPV16 阳性标本 DNA 为模板，利用跨基因完整阅读框分别扩增 E6、E7 基因，阳性结果分别在 503bp、315bp 处观察到扩增条带（图 2.1、图 2.2）。

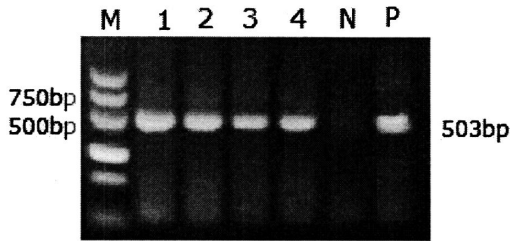


图 2.1 HPV E6 扩增结果
(M: Marker, 1-4 为 HPV16 阳性标本, N: 阴性对照: 25 μ l 双蒸水, P: 阳性对照: Siha 细胞 DNA)

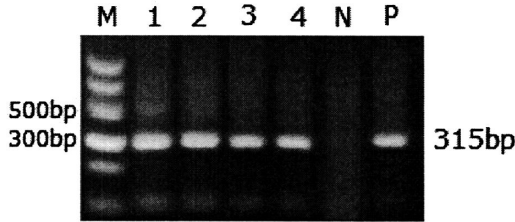


图 2.2 HPV E7 扩增结果
(M: Marker, 1-4 为 HPV16 阳性标本, N: 阴性对照: 25 μ l 双蒸水, P: 阳性对照: Siha 细胞 DNA)

2.3 E6 基因突变情况

共检测到 7 个碱基突变位点，其中只有 1 种为同义突变 nt193T→C (T193C)；其他 6 种为有义突变（见表 2.1）。E6 各碱基突变位点中，T178G（见图 2.3）21 例，T193C 2 例，其余突变位点分别只有 1 例（见表 2.2）。

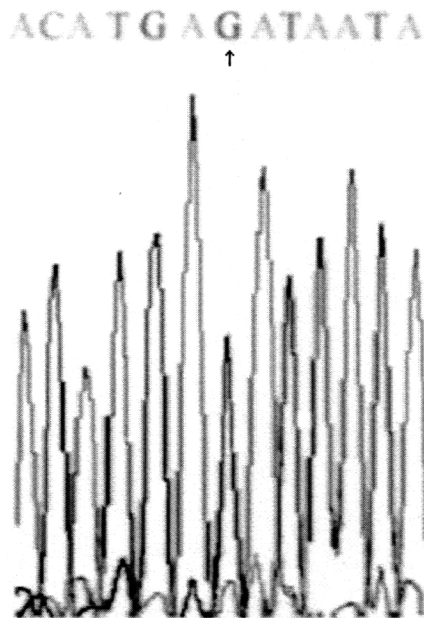


图 2.3 E6 T178G 峰图

表 2.1 HPV16 E6 基因突变位点及相应氨基酸置换情况

序号	碱基突变			氨基酸置换		
	碱基位点	突变前	突变后	氨基酸位点	突变前	突变后
1	178	T	G	25	天冬氨酸	谷氨酸
2	256	G	T	51	谷氨酸	天冬氨酸
3	278	C	T	59	脯氨酸	丝氨酸
4	298	A	C	65	赖氨酸	天冬酰胺
5	335	C	T	78	组氨酸	酪氨酸
6	350	T	G	83	亮氨酸	缬氨酸

表 2.2 HPV16 E6 基因突变情况

基因型	碱基突变位点							合计
	178	193	256	278	298	335	350	
E-P ^a	T	T	G	C	A	C	T	6
E-P	—	—	T	—	—	—	—	1
E-P	—	—	—	—	—	—	G	1
E-P	—	—	—	T	C	—	—	1
E	A	—	—	—	—	T	—	1
E	A	—	—	—	—	—	—	1
As	G	—	—	—	—	—	—	18
As	G	C	—	—	—	—	—	2
As	G	—	—	—	—	—	—	1
合计	23	2	1	1	1	1	1	32

注：a. E-P 表示 European prototype（标准株）

2.4 E7 基因突变情况

E7 基因共检测到 11 种碱基突变，有 4 种为同义突变，另外 7 种突变可导致氨基酸发生改变（见表 2.3）。其中，T596A、G597A 发生于同一患者组织中，可使该处氨基酸由蛋氨酸置换为赖氨酸（M12K）；同样 C607G、A609G 亦发生于同一患者，可使谷氨酰胺置换为谷氨酸（Q16E）；突变率较高位点依次是 A647G（见图 2.4）（68.75%，22/32），T846C（59.38%，19/32），T843C（21.88%，7/32），G666A（18.75%，6/32）（见表 2.4）；只有 A647G 可以引起氨基酸改变。

表 2.3 E7 碱基突变及相应位点氨基酸置换情况

序号	碱基突变			氨基酸置换		
	碱基位点	突变前	突变后	氨基酸位点	突变前	突变后
1	596	T	A	12	甲硫氨酸	赖氨酸
2	597	G	A	12	甲硫氨酸	赖氨酸
3	598	T	A	13	亮氨酸	异亮氨酸
4	607	C	G	16	谷氨酰胺	谷氨酸
5	609	A	G	16	谷氨酰胺	谷氨酸
6	647	A	G	29	天冬酰胺	丝氨酸
7	790	C	T	77	精氨酸	半胱氨酸

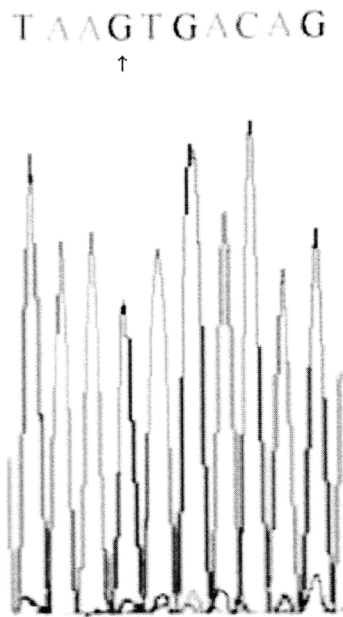


图 2.4 E7 A647G 峰图

表 2.4 HPV16 E7 基因突变情况

基 因 型	碱基突变位点											合 计
	596	597	598	607	609	647	666	760	790	843	846	
E-P	T	G	T	C	A	A	G	T	C	T	T	2
E-P	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	1
E-P	A	A	A	—	—	—	—	—	T	—	—	1
E-P	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	—	2
E-P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	1
E-P	—	—	—	G	G	G	A	—	—	—	C	1
E-P	—	—	—	—	—	G	A	—	—	—	C	1
E	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	—	2
As	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
As	—	—	—	—	—	G	—	C	—	—	—	1
As	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	—	3
As	—	—	—	—	—	G	—	—	—	C	C	7
As	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	C	9
合 计	1	1	1	1	1	22	6	2	1	7	19	32

第三章 讨论

HPV 是目前唯一明确的能导致发生宫颈癌的病毒。高危型 HPV 检测和宫颈薄层液基涂片在宫颈癌前筛查中的应用推广,使宫颈癌发病率已经明显下降^[11],但仍有许多患者初次就诊时即已发生宫颈重度不典型增生甚至更重的病变。

3.1 高危型 HPV16 及其亚型的感染情况

结合宫颈恶性病变风险与感染人病毒类型的相关程度,把已发现的上百种 HPV 分成两大类,分别为低危型 (Low-oncogenicrisk, LR) 和高危型 (High-oncogenicrisk, HR)。其中,低危型 HPV (LR-HPV): 包括 6、42、11、43 和部分新发现的 HPV, HPV-DNA 常为二倍体和多倍体,可导致宫颈上皮内瘤变 I 级 (CIN I) 和部分 CIN II,但多数可以自行消退,几乎未见到 LR-HPV 感染导致 CIN III 或者宫颈癌;高危型 HPV (HR-HPV): 包括 HPV16、18、35、31、33、39、45、51、52、56、58、59、68 等。遗传物质常为非整倍体,感染后引起的宫颈病变上皮内瘤变多不能自行恢复正常,极少逆转,与 CIN III 和浸润性癌相关^[12]。

相关研究发现,几乎在所有浸润性宫颈癌患者中均能检测到高危型 HPV (HR-HPV) DNA^[13]。21 世纪初,国际组织分析了上万例宫颈癌前病变和宫颈癌病例,发现 60% 以上的 CIN III 级及宫颈癌病例与 HPV16 或 HPV18 密切相关^[14]。在本研究的 51 例 CIN III 患者中,共有 33 例为 HPV16 阳性,可见本地区高级别病变中 HPV16 也比较流行,这与世界各地的大多数研究数据一致。进一步研究结果还发现^[15-17],多数高度宫颈病变者 HPV16 感染阳性,可能是单一感染,也可能是伴随其他高危型或低危型的多重感染;并且只有存在 HPV16 的情况下,才检测到 HPV18 的存在,可见 HPV16 是致宫颈癌的最主要类型。

通过对 HPV16 突变地区性不同的研究,Yamada 等^[18]将 HPV16 突变型别分为 6 个分支,分别为:欧洲株 (E),亚洲株 (As),非洲株 1 (AF1),非洲株 2 (AF2),北美株 (NA),亚美株 (AA) 等。在本实验中,共发现 3 种 HPV16 的变异分支,依次为 AS 型 (21 例)、E-P 型 (9 例)、E 型 (2 例),未发现其他类型。在我们的研究中,最常见的亚型为 As 型,这与我国南方地区、北京地区的研究结果^[19, 20]一致。但他们还发现除 As 型之外,E 型也比较常见,而本研究中 E 型少见,只有 2 例,E-P 原型却比较常见。

3.2 HPV16 E6、E7 结构及功能

HPV 的遗传物质主要由长调控区 (LCR, 1 个), 晚期转录基因 (L, 2 个) 和早期转录基因 (E, 6 个) 组成。其中促使宫颈上皮细胞周期失控、发生癌变的主要是 E6、E7 基因。

HPV 侵入宫颈组织导致宿主感染病毒后, E6 蛋白通常首先开始合成表达。其存在于细膜和细胞核上, 编码区可以翻译合成小蛋白, 约由 150 个左右氨基酸组成, 分子量为 17KD。E6 蛋白主要功能结构之一——锌指结构色氨酸-x-x-色氨酸 (C-x-x-C) 共有四个, 它们与细胞的转录激活, 恶性转化等密切相关, 并能影响蛋白质及其功能。在致癌风险高的 HPV 中, E6 的羧基端可以影响 PDZ 区域活性, 进而影响含有该区域的底物正常功能^[21]。E6 相关蛋白 (E6-AP) 是由 E6 基因编码区指导合成的, 它可以改变抑癌蛋白 p53 空间构象, 使其正常功能丧失, 失去原有的细胞周期抑制作用; E6-AP 还可以诱导 p53 产生泛素化, 进而发生降解, 并使其下游 mdm2, p21 和 bax 等靶基因的抑制细胞增殖作用减弱甚至丧失, DNA 损伤不断积累, 细胞跨过周期启动检验点, 导致 G1 期跨入 S 期, 对细胞周期的调控丧失, 而促进细胞的分裂增生。

SRC 家族激酶的降解会受到 E6-AP 和 E6 的共同影响, 能够增加对细胞分裂增殖的促进作用; E6 还可激活端粒酶, 使细胞分化成熟障碍^[22]; E6 也能和 PDZ 区域相互作用, 使相应蛋白质功能障碍, 进一步导致感染病毒的细胞周期失调控; E6 还可以抑制干扰素 β (IFN- β), 使宿主免疫系统不能正常识别病毒抗原; E6 也可与肿瘤坏死因子 (TNF) 发生黏附, 阻断其诱导的细胞凋亡发生。

癌基因 HPV16 E7 翻译出的是低分子量蛋白, 大约由上百氨基酸组成。E7 翻译蛋白的保守区 (conserved regions, CR) 一共有三个, 分别为 CR1 区 (-NH₂ 侧), CR2 区和 CR3 区 (-COOH 侧)。CR1 主要在 pRb 消化和细胞恶性变中起作用。CR2 的中心序列相对保守, 能结合与 pRb, 即 1 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (CK II) 和 LxCxE。CR3 有 2 个 C-x-x-C 序列, 两个基序之间由氨基酸 29/30 个间隔。CR3 与二聚体 E7 蛋白的形成相关, 还可以结合于 pRb 及宿主细胞的其他相关蛋白, 还可以结合于金属^[23]。

在正常情况下, E2F 结合 pRb 后, 活性明显降低。HPV 感染细胞后, E7 可以竞争性结合 pRb, 与 pRb 亲和力更强, 能将与 pRb 结合的 E2F 解离, 使其作用持续存在, 促进细胞跨过细胞周期。

E7 也可以经过泛素蛋白酶体通路直接诱导 pRb 发生降解, 使 E2F 转录活性增强^[21]。E7 还可以与 pRb 家族的其他成分如 p130、p107 相互作用, 亦可以使 E2F 处于游离状态。此外, 调节蛋白 A 和 E 可以被 E7 激活激活, 解除了 p53 介导的抑制细胞生长, 影响细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKIs) 抑制细胞分裂的作用^[24]。

在诱导宿主细胞发生永生化的过程中, E6、E7 不仅有其独特的作用途径, 他们还可以相互协同, 促进细胞恶性转化的效率。CKI INK4A 有抑制 E6 的作用, 而 E7 可通过影响细胞周期调节蛋白 A 和 E 的激活从而解除 CKI INK4A 对 E6 的作用。相反地, E7 的高表达可诱导细胞进入程序性凋亡状态, 而 E6 又对此过程有负调节作用,

同样促进细胞永生^[23]。

E2 相关蛋白属于一种凋亡前体蛋白，它可通过抑制病毒的 E6、E7 癌蛋白的复制，并诱导细胞启动凋亡程序而表现出较强的抑制细胞增殖的作用。LCR 是 E6、E7 启动子的相邻基序，其中的重复序列（ACCN6GGT）可以和 E2 蛋白结合，通过抑制 HPV16，18 的 p97 和 p105 等基因启动子的转录功能等多条途径共同调节 E6 和 E7 的表达^[25]。

研究发现，无临床症状的 HPV 感染，病变组织中的病毒均以混合形式存在，分别为游离和整合。但在较高的整合率多见于 CINIII 及宫颈癌，而游离状态为主的病变主要是 CIN I 和 CIN II，由此可见，宫颈病变程度逐渐加重可能与病毒整合相关^[26-29]。E2 基因多在整合过程中损伤，失去对主要癌基因的调控，从而促进宫颈细胞的增殖，使病情逐渐加重^[30, 31]。

3. 3HPV16 E6 和 E7 基因突变情况

HPV16 各个基因都可能发生型内变异，可以发生在编码区域，或发生在非编码区。可能会造成相应位置氨基酸发生置换，可能会引起指导合成的蛋白质功能和空间结构异常。

在体内的 HPV 病毒的特异性抗原经免疫细胞提呈给宿主免疫细胞，诱导人体免疫系统产生特异性，其中体液免疫可清除已侵入机体内的病毒，细胞免疫则可以产生永久免疫，避免再次感染同种免疫原性病毒。基因改变的病毒抗原决定簇的性质及表达量可能也发生改变，当再次感染时，已致敏的 B 细胞不能即时将之清除。突变株 HPV 可以表达各种蛋白诱导细胞从 G1 期进入 S 期，使集体自身细胞周期调控机制失调，引发细胞不断增殖。

有研究发现，HPV 突变株可能会与 HPV 的持续感染密切相关，并可能介导宫颈癌前病变转化为宫颈浸润癌^[32, 33]；HPV 遗传物质改变后，可能会加快 p53 降解，促使细胞向永生转化^[34-37]；HPV 突变株还可能会影响 PCR 的敏感性及特异性。Seedorf 等^[38]于 1985 年首先在德国一名女性宫颈癌组织中测序得到了 E6 碱基序列（标准序列）。以德国标准株细胞作为参考，Zehbe I^[39]等的最新研究显示，感染 16 型人乳头瘤病毒且突变位点在 E6 的患者，尤其是亚型 Q14H/H78Y/L83V，可以阻止细胞凋亡。

研究显示，HPV 突变株在世界各地的宫颈癌组织中流行趋势也各不相同。欧美地区 E6 基因主要以 T350G 突变为主，该位点可引起氨基酸发生改变，即 L83V^[40]。其中在日本 T350G/L83V 突变也较常见，仅次于 T178G^[41]。东亚地区人群中 T178G 分布频率要显著高于其他地区，尤其是在中国和日本突变率较高^[42]。我国也有试验者发现，T178G 在中国地区的突变率可高达 41.94%–62%^[20, 43]。研究发现，广东地区突

变的碱基热点在 T178G, 即 D25E^[44]。而中国的宫颈癌患者中, 新疆维吾尔族地区的主要突变位点与欧美地区类似, 为 T350G, 约占 50%, 其他的依次为标准株(40%), T178G(4%)^[45]。我国学者研究四川省宫颈浸润癌患者认为, 其流行的突变型以欧洲株(23%)和东亚株为主, 碱基突变以 T178G/D25E(30.1%)为主, 且发现了一些未曾报道的基因突变, 如 A464G, G94A, A203G, C173T, C240G 和 T511C^[46]。本实验中, E6 突变率最高的位点为 T178G, 占 65.63%, 与其他东亚地区研究相似。而西方最具代表性的 T350G 突变, 本实验中只发现 1 例, 占 3.13%。此外, T193C、G256T、C278T、A298C 未见有文献报道过, 属于首次发现的突变位点。

很多西方学者一直认为 HPV16 E7 基因相对保守, 较少发生突变。但东亚一些国家的研究结果发现 E7 突变频率约占 70%左右, 相对较高^[47, 48]。本研究结果显示 E7 基因的常见突变位点发生在 A647G, 这跟上述研究结果相似。E7 基因的抑癌蛋白 Rb 相互作用被广泛认为是导致宫颈癌的主要原因之一, E7 蛋白第 21-34 位氨基酸为结合抑癌蛋白 Rb 的区域^[49], A647G 变异可能会阻断了 Rb 生理功能, 从而维持 HPV 在宿主体内长期感染存在。但全球多个地区对 A647G 位点突变和宫颈癌的相互影响的研究结果不尽相同, 甚至是相互矛盾的。对于 A647G 突变的意义存在争议, 有的学者^[50]认为该突变与宫颈病变程度并无明显相关性, 也有研究^[51]持反对意见, 认为该突变使浸润性宫颈癌的发病率明显高于 CIN 和慢性宫颈炎组织者。本实验中 32 例 CINIII 中 A647G 突变频率高达 68.75%, 可见该位点在高级别宫颈癌前病变中较常见, 但对于该位点是否能增加病毒侵蚀力促进病变发展, 有待进一步研究。另外, A647G 突变大多数发生于 As 亚型, 该突变是否导致 As 亚型具有更高致癌性的原因, 亦有待进一步研究。我国很多地区还检测到高频突变位点 T846C (无义突变)^[26, 28, 30], 在本实验中也检测到该位点突变, 突变频率仅次于 A647G。另有研究发现, A645C (L28F) 在韩国女性的宫颈癌组织中, 可达到 19%的发生率^[55], 且在意大利也有该突变的存在^[56, 57], 但是本实验并未发现该位点突变, 进一步提示 HPV 突变存在地域特点。

另外, 多数研究只针对个别基因内部有无联合突变, 而多个基因之间是否有联合突变的报道相对较少。有文献报道^[42], E6 T350G 和 E7 A647G 联合突变可能是中国特有类型。与文献报道不同, 我们只发现 1 例发生 T350G, 并且该例标本没有上述联合位点突变。本实验发现, 在 E6 T178G 和 E7 T846C、A647G 任何一处有突变的 24 例中有 16 例(66.67%)同时合并上述 3 个位点突变; 另外, 发生 E7 T843C 突变的 7 例标本, 也均同时合并上述 3 个位点联合突变。此外, 发生 E7 G666A 均不伴有 E6 T178G 突变, 但是 2 例发生 T178A 突变的均同时伴有 E7 G666A 突变(见表 3.5)。这些联合突变对 HPV 致癌性的影响均有待进一步研究。

表 3.5 E6、E7 联合基因突变分析

编号	E6 178	E7				合计
		647	666	843	846	
标准碱基	T	A	G	T	T	
1	G	G		C	C	7
2	G	G			C	9
3	G	G				4
4	G					1
5					C	1
6		G			C	2
7	A		A			2
8			A			2
9		G	A		C	2
合计						30

第四章 结论

- 1) 青岛地区宫颈上皮内瘤变Ⅲ级中 HPV16 感染率较高。
- 2) 亚洲型 (As) 是青岛地区感染率最高的 HPV16 突变型。
- 3) 青岛地区 HPV16 E6、E7 基因与 Genbank 中标准株比较存在多种突变。HPV16 E6 和 E7 的突变热点分别是 T178G (D25E) 和 A647G (N29S)、T846C。E6 T178G 和 E7 T846C、A647G 是常见的联合突变位点。

参考文献

1. 李连弟, 鲁凤珠, 张思维等. 中国恶性肿瘤 20 年变化趋势及近期预测分析. 中华肿瘤杂志. 1997, 19(6): 3-9.
2. ZurHausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology, 1991, 184(1): 9-13.
3. Tjalma WA, Van Waes TR, Van den Eeden LE et al. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2005, 19: 469-483.
4. 郎景和, 刘继红, 宋学红. 宫颈病变的诊治[J]. 现代妇产科进展杂志., 2005, 9(14): 341-352.
5. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. J Am Osteopath Assoc. 2006, 106(3 Suppl 1): S2-S8.
6. Hwang E, Riese D, Settleman T. Inhibition of cervical cell line proliferation by the introduction of a papillomavirus regulatory gene. Virol, 1993, 67: 3720-3729.
7. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis, 1994, 170(5): 1077-1085.
8. Sun ZR, Ren GW, Cui X, et al. Genetic Diversity of HPV-16 E6, E7, and L1 Genes in Women With Cervical Lesions in Liaoning Province, China.
9. Saegusa M, Hashimura M, Takano Y, et al. Absence of human papillomavirus genomic sequences detected by the polymerase chain reaction in oesophageal and gastric carcinomas in Japan. Mol Pathol, 1997, 50: 101-104.
10. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method[J]. JAMA, 1991, 265: 472-477.
11. Petignat P, Faltin D, Goffin F, Billieux MH, Stucki D, Sporri S, Vassilakos P. Age-related performance of human papillomavirus testing used as an adjunct to cytology for cervical carcinoma screening in a population with a low incidence of cervical carcinoma. Cancer, 2005, 105: 126-132.
12. 陈琪珍. HPV-DNA 检测及其在宫颈癌筛查中的临床价值. 中华现代妇产科杂志, 2005, 2(7): 600-603.
13. Walboomers JM M, Jacobs MV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol, 1999, 189: 12-19.
14. Franceschi S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. Recent Results Cancer Res, 2005, 166: 277-297.
15. Marinko Dobec. Human Papillomavirus Infection Among Women With Cytological Abnormalities in Switzerland Investigated by an Automated Linear Array Genotyping Test. Journal of Medical Virology, 2011, 83(8): 1370-6. doi: 10.1002/jmv.22126.
16. A Pavani Sowjanya. Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus(HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. BMC Infectious Diseases, 2005, 5: 116.
17. Mario Sideri. Age distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial neoplasia. Gynecologic Oncology, 2011, 121: 510-513.
18. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor

cervical abnormalities. *Int. J. Cancer*, 1996. 69: 364—368.

19. 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 Gen Virol*. 2006;87(Pt 5):1181-1188.

20. 熊光武, 袁杨, 李萌, et al. 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. *遗传学报*, 2010, 32(4): 339-347.

21. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 2003, 22: 5201-5207.

22. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.*, 2006, 16: 83-97.

23. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Virology*, 2004, 78: 11451—11460.

24. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 1998, 58: 829-833.

25. Steger G, Ham J, Yaniv M. E2 proteins: Modulators of papillomavirus transcription and replication. *Meth Enzymol*, 1996, 274: 173—185.

26. Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, et al. Physical Status of the E2 human papillomavirus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol*, 2001, 21: 129-134.

27. Andersson S, Safari H, Mints M, et al. Type distribution, viral load and integration status of high risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer(CIN). *Br J Cancer*, 2005, 92: 2195-2200.

28. 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. *Int J Gynecol Pathol*. 1998, 17: 146-153.

29. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KID, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*, 2004, 92: 873-878.

30. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 1755-1762.

31. Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol*, 2003, 56, 532-536.

32. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int. J. Cancer*, 1996. 69: 364—368.

33. Zehbe I, Voglino G, Delius H, et al. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*, 1998, 352: 1441—1442.

34. Veress G, Murvai M, Szarka K, et al. Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur J Cancer*, 2001, 37: 1946-1952.

35. Kimbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*, 1993, 67: 6929--6936.

36. Rastogi T, Hildesheim A, Sinha R. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 909-917.
37. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 315-318.
38. Seedorf K, Krammer G, Dürst M, et al. Human papillomavirus 16 DNA sequence. *Virology*, 1985, 145: 181-185.
39. Zehbe I, Richard C, DeCarlo CA, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 2009, 383: 69-77.
40. Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16. *Virology*, 2012, 432(1): 127-32.
41. Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Letters*, 2000, 156: 159-165.
42. Shang Q, Wang Y, Fang Y, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in cervical carcinomas in patients in northeast China. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(7): 2656-63.
43. Cai HB, Chen CC, Ding XH. Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population. *Eur J Surg Oncol*, 2010, 36(2): 160-163.
44. 刘国炳, 刘欣, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16E6 序列多态性及同源性分析[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(13): 985. 998.
45. 朱开春玛, 依努尔·尼娅孜, 代建霞, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 型 E6 基因变异分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13(3): 209-212.
46. Qiu AD, Wu EQ, Yu XH, et al. HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China. *Gynecol Oncol*, 2007, 104: 77-85.
47. 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. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2011, 21(3): 551-558.
48. Chansaenroj J, Theamboonlers A, Junyangdikul P, et al. Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2012, (13)2: 599-605.
49. Jenison SA, Yu Xp, Valentine JM, et al. Characterization of human antibody-reactive epitopes encoded by human papillomavirus type 16 and 18. *J Virol*, 1991, 65: 1208-1218.
50. Radhakrishna Pillai M, Sreevidya S, Pollock BH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2002, 87(3): 268-273.
51. 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. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2007, 21: 32-34.
52. Bhaaacharjee B, Mandal NR, Roy S, et al. Characterization of sequence variations within HPV16 isolates among Indian women: Prediction of causal role of rare non-synonymous variations within intact isolates in cervical cancer pathogenesis. *Virology*, 2008, 377: 143-150.
53. 金纳, 姚晓红, 赵可佳, 等. 不同引物介导的聚合酶链反应对人乳头瘤病毒的快速检测与分型[J]. *中国综合临床*, 2007, 23(3): 258-260.
54. Van Duin M, Snodders PJ, Vossen MT, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon72 polymorphism genotypes in cervical

carcinogenesis. *J Gen Virol*, 2000, 81: 317-325.

55. Youk EG, Ku JL, Park JG. Detection and typing of human papillomavirus type 16. *Dis Colon Rectum*. 2001, 44(2): 234-242.

56. Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes*, 1994,9(1):85-92.

57. Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, et al. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol*. 2004,74(1):117-126.

HPV 基因的多态性与宫颈病变的关系

高危型 HPV 的持续感染是主要的致宫颈癌原因。HPV 遗传物质整合到宿主的染色体后,相关基因断裂,使癌基因相关蛋白过度表达,引起宿主细胞凋亡抑制,发生细胞过度增殖,最终引发宫颈癌。HPV16 是全世界分布范围最广的分支。其存在多种碱基突变,不同 HPV16 变异类型具有不同的生物学特性和致病潜能,而且变异株的生物学特性因人类种族遗传特性不同和地区环境变化而具有明显差异,可能会使病毒侵袭性增强。这为基因变异情况研究,为 HPV 病毒感染的诊断、治疗、以及疫苗的研制提供了更广阔的思路。

关键词:宫颈癌;人乳头瘤病毒;基因;突变;宫颈癌前病变

中图分类号 R737.33 文献标识码 A

宫颈癌在妇科肿瘤中发病率较高。流行病学研究和生物学研究发现,高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染为宫颈癌前病变和浸润性宫颈癌发生的必要条件^[1]。几乎所有浸润性宫颈癌患者的病变组织中均能检测到高危型 HPV (HR-HPV) DNA^[2]。HPV 广泛存在于自然界中,绝大多数女性一生中都会受到 HPV 侵袭,但是,多数患者可以通过自身免疫避免 HPV 持续感染,只有少数的感染会进一步发展成与 HPV 有关的癌前病变或者宫颈癌^[3,4]。宫颈癌的发生是复杂的恶性转变过程,除了 HPV 感染,还受到社会经济状况、生活习惯等多方面影响。近几年的研究表明,病毒与宿主遗传物质的改变,如碱基点突变,在宫颈癌的发病过程中不容忽视。

1. HPV 结构与功能

人乳头瘤病毒于 1949 年首次通过电镜被发现。具有嗜上皮细胞性的 HPV 是 DNA 病毒,属于乳多空病毒科多瘤病毒亚科;病毒衣壳由 70 多个壳微粒构成,为正二十面体。其 DNA 链又可以编码蛋白质的开放读码框架(ORF),分别为早期转录区(E, 8 个)、晚期转录区(L, 2 个)和长控制区(LCR, 1 个)。

早期转录区(E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8)主要对 DNA 的复制进行调控。E1 蛋白可以调节 HPV DNA 复制,保持病毒 DNA 的环状结构,使链状 DNA 闭合成环。其具有 3' -5' 解旋酶活性和 ATP 酶活性,在起始点与 HPV DNA 结合,启动复制。E2 可通过负调节合成病毒癌蛋白,并诱导细胞自杀,阻止细胞无分裂。E2 蛋白可以结合 HPV16, 18 的基因启动子,抑制病毒癌基因的翻译。在基因整合的过程中,HPV DNA 环状结构在 E2 基因部位被打开,且常伴有 E2 基因的破坏和缺失,造成 E2 功能表达缺失,失去 E2 的负向调节功能。E3 在 HPV16 中不存在,只在变异体的 HPV5

中有发现。E4 蛋白影响细胞骨架正常功能,在病毒生命周期中影响其装配。E5 基因大多整合过程中缺失,是可以和多种人体组织因子结合的膜整合蛋白,也是可以促进宫颈组织细胞向恶性转化^[5,6]。E8 只有在部分 HPV5 和 HPV1a 的亚型中能被观察到。

E6、E7 基因是 HPV 感染宿主细胞过程中主要的致癌基因。其中,首先转录合成的是 E6,其开放读码可以编码 150 个左右氨基酸构成的小蛋白。E6 蛋白中含有四个 C-X-X-C(色氨酸-X-X-色氨酸)样的锌指结构。其与细胞的转录激活、恶性转化相关,并且影响多种蛋白的功能。在致癌风险高的 HPV 中,PSD-95/Dlg/ZO1(PDZ)区域是 E6 的主要功能区,可以影响相应蛋白质的生物功能^[7]。通过 E6 的相关蛋白(E6-AP),E6 作用于 p53,具有泛素连接酶活性的 E6-AP,可以引起 p53 的赖氨酸泛素化,诱导 p53 发生降解,从而使 p53 如 mdm2、p21 和 bax 等的下游的靶基因诱导细胞周期的停滞,促进细胞无限分裂。E6-AP 还可以使 SRC 家族激酶的作用周期延长,正向调节分裂增殖。端粒酶还可以被 E6 激活,使细胞永生^[8]。通过 IFN- β ,E6 可以减少 IFN- β 的表达,使免疫系统不能正常识别病毒抗原。E6 也可以不通过 E6-AP,直接影响蛋白质的 PDZ,抑制其正常功能。

E7 基因编码的蛋白约由 100 个氨基酸构成。E7 蛋白共有三个保守区(conserved regions, CR),氨基端(-NH₂)的 CR1 区、CR2 区和羧基端(-COOH)的 CR3 区。CR1 区能参与细胞转化过程及 pRb 的降解。CR2 区含有能与 pRb 结合的相对保守的核心序列,即 LxCxE 和 CK II。CR3 区含有两个 C-X-X-C 样的基序,与 E7 二聚体有关,可以作用于金属离子和多种蛋白^[9,10]。在宫颈组织中,E2F 结合 pRb 后,活性明显降低。HPV 感染细胞后,E7 可以竞争性结合 pRb,与 pRb 亲和力更强,能将 pRb 结合的 E2F 解离,使其作用持续存在,促进恶性变。不仅如此,被结合后的 pRb 在体内存在的时间缩短,同样可以解除对 E2F 的抑制^[7];E7 还可以与其他的 pRb 家族成员如 p107, p130 相互作用,同样可以使 E2F 游离;与此同时,E7 还可以使细胞周期调节蛋白 A 和 E 激活,使抑制细胞增生的过程的多种蛋白质被降解^[11]。

在诱导正常组织细胞发生恶性变的过程中,E6、E7 基因不仅有相互独立的作用方式,还可以相互协同,缩短细胞恶性变的进程。E7 的过高表达可诱导细胞自发凋亡,而 E6 可抑制此过程。同样,E7 也可以通过自身途径降解相关蛋白质,从而使其对 E6 的影响消失。

病毒开放编码区中,晚期转录区有两个,分别为 L1 和 L2,与病毒衣壳的合成相关。其中 L1 基因相对保守,具有较强免疫原性,HPV 疫苗多针对于此进行研究。LCR 影响病毒基因转录,从而对病毒开放阅读编码区的其它部分进行调控。

2. HPV 基因型分布

与已知 HPV 核苷酸序列相比,乳头瘤状病毒命名委员会规定,当 E6, E7 和 L1 开放读码序列变异超过 10% 时,则归类为新的 HPV 型别;相差在 2%~10% 间时,归类为亚型;编码区变异在 2% 以内,非编码区变异不超过 5% 时,归类为型别突变^[12,13]。目前,包括亚型和变种在内,已经发现了 200 多种 HPV 基因型,其中约有 14 中基因型与宫颈恶性病变的发生和进展密切相关^[14,15]。低危型 HPV (非癌相关型, LR-HPV): 包括 6、11、42、43 和一些新发现的 HPV; HPV-DNA 常为二倍体或多倍体,通常引起 CIN I 和部分 CIN II, 并且大多数可以自行消退,几乎未发现 LR-HPV 感染导致的 CIN III 甚至宫颈癌;高危型 HPV (癌性相关型, HR-HPV): 包括 HPV16、18、58、31、33、35、39、45、51、52、56、59、68 等; HPV DNA 通常是非整倍体,感染多不能自行消退,极少发生逆转,多为持续性感染,并与 CIN III 和浸润性癌直接相关^[16]。李瑞兰等研究发现^[17], 高危型 HPV 感染组患者进展为 CIN II 级以上的发生率明显比 HPV 阴性组及低危型 HPV 感染组高。可见宫颈 HPV 感染的类型是影响宫颈病变结局的重要因素之一。多项研究发现, HPV 分布存在明显差异, 其中, HPV16 和 18 型是世界范围内流行最广泛的两种类型^[18,19,20,21]。Adriana C Vidal 等人研究发现^[22], 绝大多数浸润癌都包括 HPV16 感染。其可能为单一 HPV16 感染,也可能合并其他型别同时感染。不同类型的宫颈癌,其生物学特性也可能因 HPV 不同而异。HPV16 感染多引起的组织学分型为鳞癌,而 18 型阳性的组织学分型多为腺癌^[24,23]。

国际相关组织分析了 HPV16 型 L1、L2、E6 及 URR 碱基排序,认为 HPV16 变异因环境地区改变而不同。常见的几种分别是北美型 (NA)、亚洲型 (As)、欧洲型 (E)、亚美型 (AA)、非洲 1 型和非洲 2 型 (Af2)^[25]。流行病学研究中, HPV 型别内突变的探讨可以作为预测感染预后一条新思路。相当数量的碱基点突变存在于人乳头瘤病毒中,并可能导致其致病性发生变化,增加侵蚀性^[26,27]。同时也暗示部分 HPV16 突变类型与宫颈病变进一步发展可能密切相关^[17,28,29,30]。在北美和巴西地区的流行病学调查研究发现, HPV16 的非 E 型突变体与病毒的持续感染以及宫颈病变的发展密切相关^[28,29]; 而意大利的病例对照研究发现, 宫颈癌患者中的 HPV 具有更高比例的 As 型突变体^[17,31]。

中国大部分地区感染范围及人数最多的是 HPV16 As 型。熊光武等对我国首都宫颈癌患者进行研究^[32], 只发现了亚美型和欧洲型两种。而且其感染 As 型的宫颈癌的比例年轻组 (66.7%) 明显高于中老年组 (47.4%)。相反, E 型的感染比例在年轻组 (33.3%) 中则低于中老年组 (52.7%)。对于我国中南部地区的宫颈癌患者, 吴玉平等^[27] 研究结果表明, As 突变型 (65.45%) 亦在年轻组宫颈癌患者中常见, 推测可能与宫颈癌发病率的年轻化趋势有一定的相关性。由此可见, As 亚型在我国流行范围较广, 并且比 E 型具有更强的致癌性。与我国其他地区不同, 余勤对新疆维吾尔族的宫颈癌患者 HPV16 URR 的突变研究发现, 当地流行的变异株属 AA 型^[33],

与我国大部分地区明显不同。与我国流行趋势不同,欧美地区主要以 E 型为主,并且他们认为欧洲型 HPV16 的致病性明显增强^[34, 35, 36, 37]。综合上述研究,可见不同的 HPV16 变异分支致癌性存在的差异,可能是由于所处的地理环境引发的^[38]。

3. HPV 碱基突变热点

世界上关于 HPV 基因突变的研究热点主要集中在 HPV16/18 E6、E7、LCR 基因,其他基因研究的相对较少。

印度、美国、法国^[39, 40, 41]有学者曾进行过 E2 研究,未发现有明显的突变规律,其突变位点的价值有待进一步研究。针对 HPV16 E5, Eriksson 等^[42]研究发现, A4042G 和 A3979C 点突变在 As 型和 E 型中广泛存在,而 A3979C, A4077T 和 A4042G 突变则在 As 型比较典型,但我国对 E5 相关研究并不多见。

Yamada 等^[25]研究发现,宫颈癌组织中 HPV16 碱基突变特点在地区之间存在差异,其中对 HPV16 E6 的研究比较多。亚洲特别是东亚地区,突变率最高的位点是 T178G。我国学者对广东、四川地区宫颈癌患者进行研究也发现,中国主要突变位点与亚洲地区其他多数国家相似,也以 T178G 为主^[43, 44]。欧洲地区出现频率最高的碱基变化位点则是 E350G/T。E350G/T (L83V) 在世界范围分布较广泛,但各地区对该突变的发生率也明显不同。中美洲地区, HPV16 E6 基因不发生 E350G/T 突变的人数只有不到 1/10^[45]。在北美地区、日本及东南亚,其发生率分别为 40%、28%、6%^[46]。可见美洲地区该突变位点发生频率明显高于亚洲地区。对于该点的突变意义,各个地区的研究结果也存在分歧。Londesborough 等报道 HPV16E6 L83V 突变能促进宫颈上皮内瘤样病变由低级别向高级转化,促使病情恶化^[47];瑞典相关报道也认为 L83V 与浸润性宫颈癌有关^[34, 37]。而在意大利和捷克地区的研究中,却认为该位点突变与宫颈癌的侵袭性无明显关联^[48, 49]。在我国,虽然以 T178G 突变为主,但发现新疆地区的维吾尔族的女性宫颈癌组织中却主要以 T350G,即 L83V 突变为主^[50],但对于该位点突变意义尚待进一步研究。

西方国家认为 E7 序列相对保守,突变株不如 E6 多,但东亚地区研究发现 E7 突变率非常高,并且集中发生在 G647A(N29S)^[51, 52]。我国大部分地区及日本的研究均认为发生率最高的 E7 基因突变是 N29S^[33, 53]。G647A 的变异可能会使 pRb 和 E2F 的结合受到影响,从而发生 HPV 的持续感染。有文献报道^[54],发现 E6 T350G 和 E7 A647G 联合突变可能是我国特有的,但这种协同突变对宫颈癌发生过程中的影响尚未明确。

HPV16 L1 基因在宫颈癌组织中可发生多位点变异。有对新疆南部地区女性 L1 基因研究表明,其基因点突变相对集中,且比较多见^[41]。Pande 等人对印度北部地区宫颈癌组织进行研究,共发现 13 处变异,其中有 4 处为新发现的变异。可以

引起氨基酸改变的碱基突变共有 5 处, 其中突变频率最高的位点位于 A6695C^[42]。

LCR 在突变频率比较高, 其重要功能区是 CTSE, 可以影响癌基因表达。该功能区的突变会影响病毒整合和游离状态的相互转化, 可能会降低病毒致病性。同时, E2 基因在该基因的特异性结合区发生 C7450T 位点碱基置换, 也可能使 E2 的表达下降, 促使发生宫颈癌^[55]。LCR 突变频率最高的位点在 YY1 结合区域的 G7521A^[32, 56]。

URR 可作用于启动子 P97, 影响病毒癌基因的表达。研究表明, URR 是 HPV16 中突变率最高的基因, 且最容易发现突变热点是 G7521A, 约 80%^[25, 32, 42]。其他研究还发现, YY1 结合位点发生的突变可以使 p97 的转录活性提高数倍, E6、E7 的翻译表达增加, 增加角质细胞生长速度, 发生恶变^[57]。余勛等认为宫颈癌的起始与发生这个位点突变的病毒关系密切^[33]。Kurvinen 等的观点则相反, 认为 URR 突变一般不会影响病毒侵袭性^[49]。

综上所述, HPV16 和 18 是全球分布最广泛、研究最多的两种基因型。但其在不同地区也存在一定的突变特点, 这些突变可能与分布的地理环境或人群生活习惯相关, 其是否会影响病毒致癌性, 有待进一步探讨。近几年, 各地区对 HPV 的分子水平的研究不断深入, 使部分 HPV 的生物学特性逐渐明确, 为早期的合理治疗 HPV 感染及宫颈癌的预防提供了更广阔的思路。

参考文献

1. Andersson S, Rylander E, Larsson B, et al. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis[J]. *European Journal of Cancer*, 2001,37(5):246.
2. Walboomers, JM M, Jacobs MV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. *J Pathol* 1999, 189:12-19.
3. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc*. 2006, 106(3 Suppl 1):S2-S8.
4. Tjalma WA, Van Waes TR, Van den Eeden LE et al. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2005, 19: 469 -483.
5. Zhang B, Spandau DF, Roman AS. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *Viol.* 76:220-231.
6. Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV 16 E5 protein : expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Viol.* 1995,211:227-233.
7. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 2006,16:83-97.
8. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncol.* 2003,22:5201-5207.
9. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer:from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002,2(5):342-350.

10. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis[J]. *Virol.* 2004;78:11451-11460.
11. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:690-698.
12. De Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types : an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994;186:1-12.
13. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect. Dis.* 1994;170:1077-1085.
14. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. Review. *J Clin Virol.* 2005, 32(Suppl):S16-S24.
15. Jung WW, Chun T, Sul D, et al. Strategies Against Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer[J]. *J Microbiol* 2004; 42:255-266.
16. 陈琪珍. HPV-DNA 检测及其在宫颈癌筛查中的临床价值. *中华现代妇产科杂志* [J]. 2005,2(7):600-603.
17. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer[J]. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:315-318.
18. Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, et al. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:1611-11622.
19. Coutlee F, Ratnam S, Ramanakumar AV, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in cervical epithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Canada[J]. *J Med Virol* 2011;83:1034-1041.
20. Marinko Dobec. Human Papillomavirus Infection Among Women With Cytological Abnormalities in Switzerland Investigated by an Automated Linear Array Genotyping Test[J]. *Journal of Medical Virology* 2011;83(8):1370-1376.
21. A Pavani Sowjanya. Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus(HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. *BMC Infectious Diseases* 2005;5:116.
22. Adriana C Vidal. Distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in Tanzanian women[J]. *Infectious Agents and Cancer* 2011;6:20
23. Altekruze SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, et al. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. *Am J Obstet Gynecol*, 2003,188(3):657-663.
24. Wsierska-Gadek J, Horky M, How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplay contributes to its (re)-activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003,12:266-272.
25. Yamada T, Manos MM, Pete J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective[J]. *J Virol*, 1997.71(3):2463-2472.
26. Cai HB, Chen CC, Ding XH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population[J]. *J Clin Virol.* 2006,36:160-163.
27. Wu Y, Chen Y, Li Y, et al. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China[J]. *J Clin Virol.* 2006,35:264-269.
28. Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2000,81:2959-2968.

29. Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:343-351.
30. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:796-802.
31. 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. *Int J Cancer.* 1999;82(2):203-207.
32. 熊光武等. 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. *遗传.* 2010;32(4):339-347.
33. 余勤, 马正海, 王艳萍, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型上游调控区 DNA 多态性分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志.* 2006;26(11):1000-1004.
34. Sathish N, Abraham R, Peedicayil A, et al. HPV16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia. *Cancer Lett.* 2005; 229(1) : 93-99.
35. Tu JJ, Kuhn L, Denny L, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(2):736-742.
36. Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16(HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett.* 2000;156(2):159-165.
37. DeBoer MA, Peters LA, Aziz MF, et al. Human papillomavirus type 18 variants : histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer.* 2005;114(3):422-425.
38. Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, et al. The role of TP53 in cervical carcinogenesis[J]. *Hum Mutat.* 2003;21(3):307-312.
39. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, et al. E2 sequence variations of HPV16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent[J]. *Gynecol Oncol.* 2004;95:363-369.
40. Eriksson A, Herron JR, Yamada T, et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol.* 1999;80:595-600.
41. Lee K, Magalhaes I, Clavel C, et al. Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res.* 2008;131:106-110.
42. 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]. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1060-1066.
43. Qiu AD, Wu EQ, Yu XH, et al. HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China. *Gynecol Oncol.* 2007;104:77-85.
44. 刘国炳, 刘欣, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16E6 序列多态性及同源性分析[J]. *肿瘤防治杂志.* 2005;12(13):985-998.
45. Londesborough P, He 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. *Int. J. Cancer.* 1996;69:364-368.
46. Zehbe I, Wilander E, Delius H, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 1998;58:829-833.
47. Tu JJ, Kuhn L, Denny L, Beanie KJ, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(2):736-742.

48. DeBoer MA, Peters LA, Aziz MF, et al. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia Suriname, and The Netherlands. *GynecolOncol*. 2004,94(2):488-494.
49. Lizano M, Berumen J, Guido MC, et al. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1997,89(16):1227-1231.
50. 朱开春玛, 依努尔·尼娅孜, 代建霞, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 型 E6 基因变异分析[J]. *临床肿瘤学杂志*. 2008,13(3):209-212.
51. Vaeteewoottacham K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co-mutation of HPV 16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas. *Anticancer Res*. 2003,23(20):1927-1931.
52. 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 Gen Virol*. 2006,87:1181-1188.
53. Climent C, Nazario CM, Umpierre S, et al. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer in Puerto Rican women. *P R Health Sci J*. 2007,18(10):672-679.
54. Shang Q, Wang Y, Fang Y, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in cervical carcinomas in patients in northeast China. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(7): 2656-63.
55. BhaRacharjee B, Sengupta S. HPV16 E2 gene disruption and polymorphisms of E2 and LCR :some significant associations with cervical cancer in Indian women. *Gynecol Oncol*. 2006,100(2):372-378.
56. 马正海, 张富春, 梅新娣等. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型 L1 基因突变谱分析. *中华医学杂志*. 2004,84(12):987-991.
57. Michael JL, Christina I, James R, et al. Upstream regulatory region alterations found in human papillomavirus type 16 (HPV-16) isolates from cervical carcinomas increase transcription, orifunction, and HPV immortalization capacity in culture[J]. *Journal of Virology*. 2009,83(15):7457-7466.

攻读学位期间的研究成果

王玉洁, 车艳辞, 初慧君, 闫丽萍, 戴淑真. HPV 检测对非典型鳞状细胞患者临床管理中的应用价值. 齐鲁医学杂志. 已收稿.

致谢

踏上医学之路已经将近八年，在青医的研究生学习也即将结束，在这 3 年里，我收获丰富，感受颇深。

首先要感谢我敬爱的导师车艳辞副教授。衷心感谢她这三年中在课题研究及临床实习中的精心指导和日常生活的无微不至的关心。车老师人格高尚，为人随和，治学严谨，思维敏锐，对工作精益求精，是我终生学习的榜样。在此，还要衷心感谢戴淑真教授，刘丽芝、初慧君、闫丽萍及丁朝霞等各位老师，崔虹飞、徐晓燕及程方正等各位同学在日常生活及课题研究过程中给予的帮助和鼓励。并感谢青岛市宫颈癌重点实验室及其各位老师在实验中给予的支持和指导。

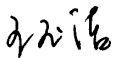
在此，还要感谢默默支持我的父母。感谢父母的养育之恩和谆谆教导，让我能够健康快乐的成长，在困难面前给予我鼓励和支持。

求学中的硕士研究生三年即将圆满结束，我会谨记恩师的教导，以饱满的热情迎接新的挑战！

学位论文独创性声明

本人声明，所呈交的学位论文系本人在导师指导下独立完成的研究成果。文中依法引用他人的成果，均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担由此引发的一切责任和后果。

论文作者签名： 

日期： 2013-5-29

学位论文知识产权权属声明

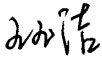
本人在导师指导下所完成的学位论文及相关的职务作品，知识产权归属学校。学校享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为青岛大学。

本学位论文属于：

保密 ☐，在 年解密后适用于本声明。

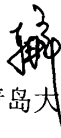
不保密 ☒。

(请在以上方框内打“√”)

论文作者签名： 

日期： 2013年5月29日

导师签名：



日期： 2013年5月29日

(本声明版权归青岛大学所有，未经许可，任何单位及任何个人不得擅自使用)

青岛地区宫颈上皮内瘤变中HPV16 E6和E7多态性分析

作者: [王玉洁](#)
学位授予单位: [青岛大学](#)

引用本文格式: [王玉洁](#) [青岛地区宫颈上皮内瘤变中HPV16 E6和E7多态性分析](#)[学位论文]硕士 2013