

分类号: A14

密 级:

UDC: 025.32

单位代码: 84501

学 位 论 文

北京地区收集的人乳头瘤病毒 52 型热点突变及全基因组序列分析的研究

研究生姓名: 李 颖

导 师: 周 玲 研究员

指导老师: 刘宏图 研究员

中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所

申请学位级别: 硕士研究生

专业名称: 免疫学

论文提交日期: 2009 年 6 月

论文答辩日期: 2009 年 6 月

学位授予单位: 中国疾病预防控制中心

答辩委员会主席: _____

论文评阅人: _____

2009 年 6 月

学位论文原创性、真实性声明

本人郑重声明：《北京地区收集的人乳头瘤病毒 52 型热点突变及全基因组序列分析的研究》是本人在中国疾病预防控制中心《免疫学》专业攻读硕士学位期间，在导师指导下完成的硕士学位论文。我承诺：本论文中所涉及的所有数据、试验记录以及研究结果均真实可信，引用资料已注明出处，无剽窃、篡改、抄袭之行为。如本论文原创性方面出现问题，我愿负法律责任。

本课题的研究成果归中国疾病预防控制中心所有，发表文章的单位署名为中国疾病预防控制中心。

特此声明！

学位论文作者（签名）：

李颖

研究生导师（签名）：[周] 玲

2009 年 6 月 8 日

2009 年 6 月 8 日

北京地区收集的人乳头瘤病毒 52 型热点突变 及全基因组序列分析的研究

The study of gene mutation hot spots and whole genome analysis of
human papillomavirus type 52 collected in Beijing

硕士研究生： 李 颖

导 师： 周 玲 研究员

指导老师： 刘宏图 研究员

中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所
北京市宣武区迎新街 100 号

苟

2009 年 6 月

目 录

缩略语表.....	1
中文摘要.....	2
Abstract.....	4
前言.....	7
研究主要流程.....	9
实验材料.....	9
实验方法.....	13
一、HPV52 致癌基因 E5、E6 和 E7 及 LCR 片段的热点突变分析及 5 个 HPV52 分离株的全基因组序列分析.....	13
二、HPV52 标准品的制备.....	15
实验结果.....	16
一、HPV52 致癌基因 E5、E6 和 E7 及 LCR 片段的热点突变分析.....	16
二、5 个 HPV52 分离株的全基因组序列分析.....	32
三、HPV52 标准品的制备.....	34
讨论.....	39
结论.....	49
参考文献.....	50
综述.....	55
致谢.....	62

缩 略 语 表

缩写词	英文	中文
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
ASCUS	atypical squamous cells of undetermined significance	非典型鳞状上皮细胞
bp	base pair	碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内病变
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dH ₂ O	deionised water	去离子水
dNTPs	deoxynucleoside triphosphate	三磷酸脱氧核苷
E	early gene	早期基因
E.coli	Escherichia coli	埃希氏大肠杆菌
HPV	human papillomavirus	人乳头瘤状病毒
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion	上皮内高度病变
kb	Kilo base pairs	千碱基
L	late gene	晚期基因
LCR	long control region	长调控区
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesion	上皮内低度病变
ORF	open reading frame	开放性读码区
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
pRb	retinoblastoma gene product	视网膜母细胞瘤蛋白
rpm	rolls per minute	每分钟转速
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
Tris	trihydroxy methylaminomethane	三羟甲基氨基甲烷
U	unit	活性单位
VLP	virus Like Particles	病毒样颗粒
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

中文摘要

宫颈癌是全球女性的第二大常见癌症,在国内宫颈癌已经成为女性第一位的恶性肿瘤,国内每年约 15 万新发宫颈癌病例。人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈癌发生主要的病因^[1-1]。根据 HPV 感染与宫颈癌的相关性将其分为低危型、疑似高危型和高危型。高危型 HPV 包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58 型等 15 种型别,与宫颈癌、外阴癌、肛门癌等恶性肿瘤相关。欧美等国家中 HPV16 和 18 是宫颈癌中最为常见的高危型 HPV 型别^[5-8]。国内部分地区的流行病学调查结果显示,国内宫颈癌中高危型 HPV 的分布与欧美国家存在着不同,居于前三位的 HPV 型别可能是 HPV16、52、58 或 HPV16、58、52^[9-12]。HPV52 是国内宫颈癌中重要的 HPV 型别之一。

分子生物学水平上 HPV 的致癌机制尚未完全明确,目前已经得到公认的是 HPV 的 E6、E7 蛋白在宫颈癌中的致癌作用,但 E6、E7 蛋白编码区及其他开放性读码区(open reading frame, ORF)及上游调控区(long control region, LCR)的基因序列变异及其与致癌作用的相关性仍在探讨之中并成为研究热点^[13]。E5 基因也是在宫颈癌的发生过程中起着重要作用的癌基因,E5 基因序列的变异对于病毒的致癌作用的改变也有着重要的意义。LCR 区包含启动子等调控元件,与病毒复制转录的调控有关,LCR 的突变可通过阻遏子结合位点的缺失和激活因子结合能力的增强而增强 LCR 的启动活性。目前国外研制的两种宫颈癌预防性的疫苗针对的主要是高危型中的 HPV16 和 18^[14-19]。由于国内上位分布的 HPV 型别与国外不同,相同的 HPV 型别之间也很有可能存在着影响疫苗保护力的变异位点,所以国外的疫苗是否适合于在国内应用还有待于大规模的 HPV 流行病学和基础分子生物学的研究。

明确国内宫颈癌中的主要的 HPV 型别分布,在分子生物学水平上研究主要型别的全基因组序列及型内变异情况,以及建立主要 HPV 型别的阳性参照品有助于推进国内宫颈癌的预防控制工作以及宫颈癌的发病机制的研究。

为了研究北京地区高危型人乳头瘤病毒 52 型(human papillomavirus type 52, HPV52)的全基因组序列信息,以及 HPV52 E5、E6、E7 基因及 LCR 片段的序列情况、热点突变情况及其在临床病理进程中的意义,对北京大学第一医院妇产

科门诊患者进行了宫颈脱落细胞样品的收集，从中提取 DNA，并进行 HPV DNA 分型检测。

统计了前期 1244 例标本中的 HPV 各型别分布情况。在 1244 例标本中，共有 20 种 HPV 型别被检出，HPV 的阳性率为 40.8% (507/1244)，其中 HPV52 的检出率为 5.9% (73/1244)，仅次于 HPV16 的 14.1% (175/1244) 和 HPV58 的 10.5% (130/1244)。

使用 PCR 法扩增了 79 例 HPV52 单独感染标本 E5、E6-E7 片段及 LCR 片段并测序，比对后的结果结合临床病理资料进行分析。测序成功的标本中 E5 基因发生 4 种碱基突变，2 种氨基酸突变；E6 基因发生 8 种碱基突变，2 种氨基酸突变；E7 基因发生 10 种碱基突变，7 种氨基酸突变；LCR 片段发生 40 种碱基点突变，5 种缺失突变。

根据上述热点突变分析结果从 79 例 HPV52 单独感染的标本中抽取 5 个，使用 PCR 的方法分段扩增并进行序列分析，拼接出全长的 HPV52 的序列，5 个 HPV52 分离株的全长序列与欧洲株原型相比，存在 70 种点突变和 1 个 28bp 的插入突变和 3 处缺失突变。~~5 个分离株~~4 个分离株的全长序列的分布特点较为一致，与欧洲株原型相比存在着明显不同。1 个分离株的全长序列分布与欧洲株原型基本一致。认为国内可能存在着两种 HPV52 分离株。

使用 PCR 的方法分两段扩增出两端存在重叠序列的 HPV52 LCR-E6-E7-E5 和 E5-L1 片段，将这两个片段分别克隆到克隆载体中，再与 C33A 细胞系的基因组 DNA 按比例混合^[20]，制作了包含完整 HPV52 序列的标准品。

关键词：人乳头瘤病毒，52 型，基因突变，E5，E6-E7，LCR，标准品

Abstract

The study of gene mutation hot spots and whole genome analysis of human papillomavirus type 52 collected in Beijing

Master Candidate: LI Ying

Supervisor: ZHOU Ling, Professor

Co-mentor: LIU Hongtu, Professor

Institute for viral disease control and prevention, China CDC

Cervical cancer (CC) is the second most common malignant disease among women worldwide, and it is the most common malignant disease among Chinese women. There are about 150,000 incident CC cases per year in China. The causal link between human papillomavirus (HPV) infection and cervical cancer is now established beyond doubt. Based on their association with cervical cancer and precursor lesions, HPVs can also be grouped to high-risk, possible high-risk and low-risk HPV types. High-risk HPV types include type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82, associating with malignant tumors of cervix uteri, vulvae and anus. HPV16 and 18 are two predominant prevalent types associated with CC in Euramerican countries. Data on HPV prevalence suggests that the distribution of HPV types is different in China. HPV16 is the predominant type, following by HPV52, 58 or 58, 52 among Chinese women. HPV52 is an important HPV type associating with CC in China.

The molecular mechanism underlying HPV-induced oncogenesis is unclear. At present the E6 and E7 oncoproteins are thought to play causative roles in the development of pre-neoplastic and malignant lesions of the uterine cervix. But the correlation between mutation of E6, E7 and other ORFs with the development of pre-neoplastic and malignant lesions of the uterine cervix is still being under discussed, and will be a study hotspot. E5 oncoprotein is also

thought to play causative roles in the development of pre-neoplastic and malignant lesions of the uterine cervix, so the study of E5 gene mutation is of great importance. LCR fragment contains the origin of DNA replication as well as important transcription control elements, and it is important for controlling viral gene expression. Variation in the LCR may affect replication in activities of one or more viral proteins. Presently the two prophylactic 'virus-like particle' based vaccines (one bivalent vaccine against HPV16/18 and a quadrivalent vaccine against HPV16/18/6/11) have demonstrated efficacy (about 90-100%) against persistent infection with targeted types. But the distribution of HPV is different and the variation within the same HPV type may affect the protection of the vaccine, even under the supposition that they could prevent 100% of the infection with HPV16/18, they could only be expected to reduce the cancer burden in China by a small percent. So whether the vaccines can be used in China is doubtful.

Investigating the HPV infection in cervix among Chinese women, investigating the whole sequence of major HPV types and the variation within the same HPV type, and establishing standard samples of major HPV types is of important use for the CC prevention and control in China and the study of the molecular mechanism underlying HPV-induced oncogenesis.

To investigate the HPV52 whole sequence and to investigate HPV52 E5, E6, E7 and LCR sequence, hotspot mutation and their association with the development of pre-neoplastic and malignant lesions of the uterine cervix, samples were collected from outpatient women of the first hospital of Peking University, then sample DNA were extracted and checked for 20 HPV DNA types by DNA flow-through hybridization genotyping technique.

HPV type distribution was calculated for the first 1244 samples. Twenty HPV types were detected, and the HPV prevalence was 40.8% (507/1244), and the HPV52 prevalence was 5.9%, third to HPV16 (14.1%) and 58(10.5%).

Sample DNA was extracted from 79 patients with single HPV52 infection, of which E5, E6-E7 and LCR segments were amplified and sequenced, and

the sequence analysis result was analyzed with the clinical data. Four single-nucleotide variations and two amino acid mutation was found in E5; eight single-nucleotide variations and two amino acid mutation was found in E6; ten single-nucleotide variations and seven amino acid mutation was found in E7; and the LCR polymorphism was generated by 40 single-nucleotide variations, one single-nucleotide deletion site, and four fragment-deletion sites.

Five HPV52 single infection samples were extracted based on the result of gene mutation hot spots ananalysis, each was amplified as eight overlapped segments, and the whole sequence was acquired by combination of the eight segments with E5, E6-E7 and LCR sequence known above. The whole sequence polymorphism was generated by 70 single-nucleotide variations, three deletion sites and one insertion sites. Four of the five HPV52 single infection samples had similar sequence distribution characteristic which is different from the HPV52 prototype. There may exist two HPV52 isolated strains in China.

Two long segments covering the whole HPV52 sequence were amplified and cloned into cloning vector, mixed proportionally with C33A DNA, then the whole length HPV52 standard sample for PCR were made.

[Key words] human papillomavirus type 52, gene variants, E5, E6-E7, LCR, standard sample

前言

宫颈癌是全球女性第二大常见癌症^[21]。在发达国家,由于以宫颈组织筛查为手段的预防控制措施的普及,近年来,宫颈癌的发病率已呈下降的趋势^[22]。然而在发展中国家,宫颈癌依然是高发癌症,同时也是女性致死比率居于上位的癌症。全世界每年约有 50 万新发子宫颈癌病例,按人口比例推算我国每年应该有 15 万新发子宫颈癌病例。自 1970 年代末至 1980 年代初,HPV 感染与宫颈癌发生的紧密关联的假说逐渐被建立起来。随着初期的病例-对照到近年来的成规模的大型分子流行病学调查,人们已经接受了这样的假说:HPV 感染是宫颈癌发生主要的病因。

国际上,已经超过 115 种 HPV 被鉴定出来,其中至少 30 种与生殖道传染病有关^[23]。根据 HPV 感染与宫颈癌的关系将其分为低危型、疑似高危型和高危型。低危型如 HPV6 和 11 型极少出现于宫颈恶性组织中,但常从外生殖器疣和宫颈良性病变中发现。高危型 HPV 包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58 型等 15 种,与宫颈癌、外阴癌、肛门癌等恶性肿瘤相关,其中 HPV16 和 18 等型别是欧美国家宫颈癌中最常见的型别。2003 年,Monuz 等总结了包括亚洲的泰国和菲律宾在内的全球 8 个国家的宫颈病变的数据,肯定了 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73 和 82 等 15 个型别是宫颈癌的主要危险因子。

国内宫颈癌中的高危型 HPV 型别分布与欧美国家不同。上世纪 90 年代末国内上海、台湾、江西的一些临床对照实验研究结果显示,宫颈癌中国内的高危型 HPV 的分布与欧美国家存在着不同,HPV52 和 58 型是在国内分布比较多的型别。上海、香港大学所作调查 HPV52、58 分别占 15%和 12.5%。Li LK 在沈阳丹东地区自然人群中的流调结果显示,HPV 总的感染率为 16.8%,分布最多的 HPV 型别为 HPV16 (3.4%),其余依次为 HPV52 (2.5%) 和 58 (1.9%)^[11]。Chen 等在台湾地区的一项研究发现,HPV 在宫颈细胞学正常、ASCUS、LSIL、HSIL 及原位癌中的感染率分别为 33.8%、38.3%、74.9%、84.3%、100%,总阳性率为 68.8%。其中最常见的是 HPV16 (18.5%), 52 (16.5%), 58 (13.2%), 33, 51, 53, 18, 39, 59, 66, 84 及 HPV31^[12]。HPV52 是国内重要的高危型 HPV,但是国内仅有少量针对 HPV52E6 和 L1 基因变异的研究,而且标本数目过少^[21-27]。目前尚不清楚国内 HPV52

全基因序列、型内变异情况及与其他高危型相比致癌作用的强弱等。

国内外围绕 HPV 的研究主要集中在 HPV16 及 18 的基因突变及疫苗研制, 但国内 HPV18 的分布频率相对较低, 而 HPV52 和 58 在亚洲国家中引起的子宫颈癌所占比例较西方国家及非洲国家多, 现行的 HPV 疫苗是否适合在国内应用还有待于更广泛的分子流行病学研究。

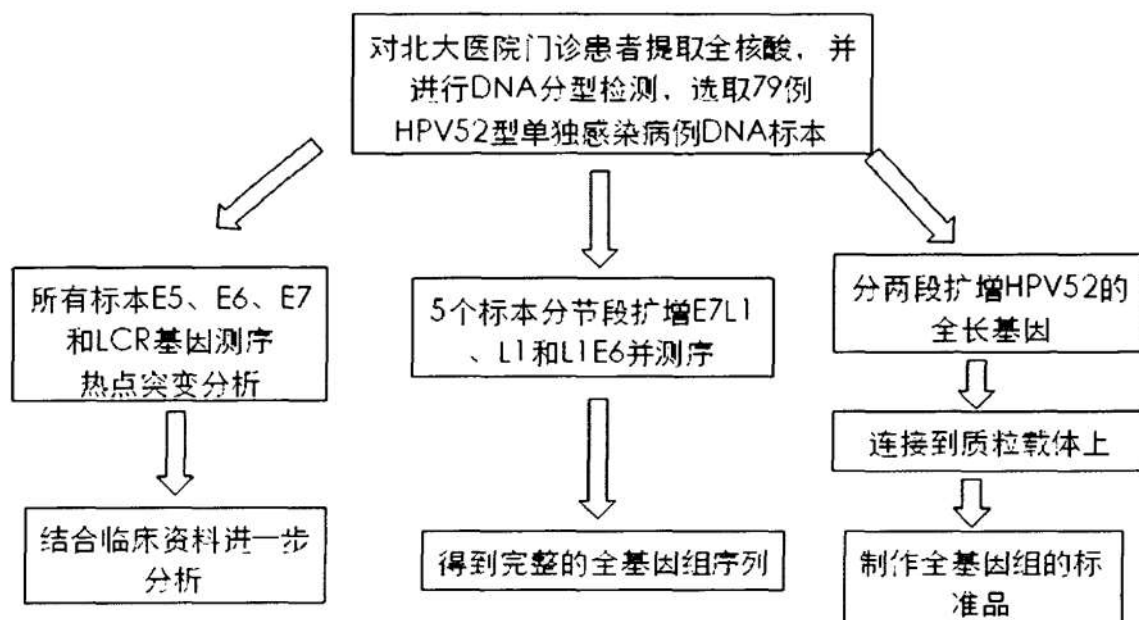
在分子生物学水平上研究 HPV 的致癌机制愈来愈引起学者的热切关注。目前 HPV 的 E6、E7 蛋白在宫颈癌中的致癌作用已经得到公认, 但 E6、E7 蛋白编码区及其他 ORF 及 LCR 序列变异与其致癌作用的相关性仍在探讨之中并成为研究热点。目前, E5 的功能研究还很少。部分研究认为, HPV 的 E5 是一种具有转化作用的癌基因, 能干预生长因子受体^[28], 促进病毒癌基因的转化功能, 抑制抑癌基因的表达^[29], 反式激活基因组启动子, 从而促进病毒增殖并通过多种机制促使损伤细胞通过细胞周期^[30], 在宫颈癌的发生过程中, 有着极其重要的作用。上游调节区是 HPV 变异最多的区域, 该区启动并调控 HPV 癌基因 E6/E7 的表达, 许多细胞因子和转录因子可通过与 LCR 结合调控 HPV E6/E7 基因的表达^[31], LCR 内顺式作用元件的点突变或缺失可改变 LCR 的调控功能。目前 HPV52 基因变异尤其是关于中国地区 HPV52 基因型的研究仍很缺乏, 这大大影响 HPV 疫苗的研制和应用的发展, 阻碍宫颈癌的防治工作的进展。

目前已知的 HPV52 的全长序列只有 HPV52 X74481, 但是国内的 HPV52 分离株的情况尚不清楚, 国内是否存在着特有的 HPV52 分离株, 与欧洲株的序列相比, 同源性情况、型内变异等情况尚不清楚。

目前国际上尚没有 HPV52 标准品。作为在宫颈癌变发生中的重要 HPV 型别, 世界卫生组织已经开始了制作 HPV52 标准品的工作。尤其是作为在国内分布频率居于上位的 HPV52, 在 HPV 的常规筛查和 HPV52 的特性分析中, 有必要使用稳定的 HPV52 标准样品作为阳性参照品。

本课题应用 PCR 及基因测序法研究 HPV52 型主要致癌基因片段及 LCR 区基因突变情况, 探讨其与宫颈病变的相关性, 为 HPV 疫苗的研制和宫颈癌的防治工作提供一定的理论基础; 分析全长 HPV52 的序列情况, 初步了解国内的 HPV52 分离株的情况; 制作用于 PCR 扩增的 HPV52 标准品。

研究主要流程



实验材料

1. 研究对象

收集 2007 年 9 月至 2008 年 2 月就诊于北京大学第一医院妇产科门诊(包括部分体检人群)，自愿进行宫颈 HPV 检测妇女的宫颈脱落细胞标本，收集病例资料，脱落细胞提取 DNA 后，将 DNA 冻存于 -20°C (DNA 标本的提取以及 HPV 的分型工作由北京大学第一医院宫颈病变实验室完成)。前期收集全部脱落细胞 DNA 标本共 1244 例，年龄 19 岁至 85 岁，平均年龄 38.59 岁。后陆续收集到 HPV52 单独感染标本 79 例(对所有标本按收集时间和当日的流水序号依次进行编号，编号为 LY01-LY83，其中 LY15、LY27、LY55 和 LY76 等 4 个编号的标本为无效标本)。

从收集到的 79 例 HPV52 单独感染的标本中挑选出 5 个标本，LY09、LY30、LY34、LY42 和 LY72，进行 HPV52 全基因的序列分析。

2. 菌株、载体和细胞系

大肠埃希菌 DH5 α ：TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司

克隆质粒 pMD18-T: TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司

C33A 细胞系: 购自中国协和医科大学基础医学研究所。细胞培养条件为含 10%FBS, 1%青链霉素, 1%谷氨酰胺的 MEM, 其他培养液均由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所配液室提供。

3. DNA 提取及分型检测试剂

人乳头瘤病毒核酸扩增分型检测试剂盒: 潮州凯普有限公司

QIAamp DNA Mini Kit: Qiagen公司

4. PCR试剂

2.5mM dNTPs: TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司

Ex Taq: TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司

25mM MgCl₂: TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司

AmpliTaQ Gold DNA Polymerase: Applied Biosystems

dH₂O: 实验室制备

5. 琼脂糖凝胶电泳试剂

λ -EcoT14 I DNA maker: 实验室制备

100 bp DNA Ladder Marker: 广东东胜生物科技有限公司

Gene Finder™ 核酸染料: 厦门百维信生物科技有限公司

琼脂糖: 上海 GENE TECH 公司

6×电泳上样缓冲液(Loading Buffer): TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司

0.5xTBE Buffer: 实验室制备

6. LB 培养基: 实验室制备

7. 氨苄青霉素(Amp)

储存液浓度为 100mg/ ml, 工作浓度为 1 00ug/ ml

8. 质粒提取试剂

碱裂解溶液 I、碱裂解溶液 II 和碱裂解溶液 III: 实验室制备

9. DNA 纯化/回收

采用北京博迈德科技发展有限公司的琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒

10. TA 克隆

pMD18-T Vector Kit: TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司

11. 限制性内切酶、BSA、T4 DNA 连接酶: TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司

12. 使用软件

数据统计分析软件: SPSS10.0

基因序列比对、拼接、进化树绘制软件: BioEdit、DNASTAR、Mega4

蛋白质结构预测软件: Discovery Studio 2.0

13. 引物合成

本研究中的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 各引物序列如表1所示:

表1 本研究使用引物列表

Tab.1 Primer list of this study

引物名称	引物序列
HPV52-103	ACAATAACGTACAGTGATGAAACAC
HPV52-108	GTTTGATATAGCTGTGTTGCAGAAG
HPV52-E61	TCGAGGATCCATGTTTGAGGATCCAGCAACACGA
HPV52-E72	GATCGTCGACTTATAGCCGTGCACAGCCGGGGCAC
HPV52EC1	GAAAGACATGTTAATGCAAACAAGC
HPV52EC2	GACGTTACACTTGGGTCACAGGTC
HPV52-107	TTTAAAGGACTATATGTTTTGGGAG
HPV52-102	GGATTATTGTCTCTATATACTATTCTG
HPV52E7L11	CACACTACGGCTATGCATTCATAG
HPV52C2-6	GGTTCTATTACCATATGTGTTTCTG
HPV52C2-1	AAAAGTATTAATACAGCCCTATAG
HPV52M2	ACTAAGGCTCTATGCTTTACATCTACTG
HPV52M1	AGATGTGATAGAATAGATGATGGTGGAG
HPV52C4-2	CTGTTACACAATATTGCTTTGCATCG
HPV52-111	CTATGGATTATACAAACTGGAAGG

HPV52E52	GATCGTCGACTTATTGCAGTTGTGCCAAATACTG
HPV52C5-1	GCTATCTATATCGGTGTATGCGCAG
HPV52C6-2	GTATCCATAGGGATTTCTTCATAGG
HPV52C6-1	TGGTCATGTATTGTTTTCTAGTCC
HPV52E7L12	CTTAGAGACAGGTACAGGAGGCAG
HPV52-105	CCATAATAATACTTTCACTGTACC
HPV52C8-2	ACTGTCACCATATGGCTCGCTAGC
HPV52C8-3	AGGAAATCCTGGGGATTGTCCTCC
HPV52-110	GAAGTGACAAATACAACAAACATG
HPV52-107	TTTAAAGGACTATATGTTTTGGGAG
HPV52-108	GTTTGATATAGCTGTGTTGCAGAAG
HPV52E5C1	GTATATGTGTATGGTAAACACCCAAC
HPV52-110	GAAGTGACAAATACAACAAACATG
MY11	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC

14. 主要仪器和设备

Pharmacia Biotech 凝胶成像仪：美国 BIO-RAD 公司

Power-Pac 3000 Bio-RAD 电泳仪：美国 BIO-RAD 公司

Chimerx 冰箱：Chimerx 公司

TGL-16G 型台式离心机：上海安亭科学仪器厂

Sigma 2-16K 低温高速离心机：美国 Sigma 公司

AF-30 型自动制冰机：意大利 SCOTSMAN 公司

KD23B 型微波炉：中国美的公司

ABI2700 型 PCR 仪：美国应用生物系统公司

ABI2720 型 PCR 仪：美国应用生物系统公司

东盛龙 PCR 仪：广州东盛生物科技有限公司

SCOUT SPN302F 电子天平：美国奥豪斯公司

MILLI-Q 纯水机：美国 MILLIPORE 公司

恒温水浴箱：湖北省黄石市医疗器械厂

导流杂交仪：潮州凯普有限公司

GL-802 型微型台式真空泵：江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司

台式离心机：Eppendorf Centrifuge 5415D

台式低温离心机：Sigma 3K18

低温高速离心机：Hitachi 20PR-52D

台式低速离心机：Anke TDL-40B

PCR 仪：GeneAmp PCR System 2700

天平：OHAUS Adventurer™

恒温水浴：julabo F10

低温水浴：宁波天恒仪器厂 THD-2015

恒温摇床：江苏太仓市实验设备厂 DDHZ-300 多用途台式恒温振荡器

恒温孵箱：Heraeus B5061 EC

凝胶电泳仪：Bio-Rad Mini Protean 3 cell 525BR

紫外分光光度仪为 Eppendorf 公司产品

实 验 方 法

一、HPV52 致癌基因 E5、E6 和 E7 及 LCR 热点突变分析及 5 个 HPV52 分离株的全基因组序列分析

1. 标本的收集及 HPV 分型检测

宫颈脱落细胞的留取：以 HPV 采样专用采样刷于宫颈内口旋转 5-7 周，使毛刷与宫颈充分接触。采样前以无菌棉球擦去宫颈表面过多分泌物，采样过程中注意避免用力不当引起宫颈出血，避免血液对实验的影响。

使用潮州凯普[™]有限公司人乳头瘤状病毒核酸扩增分型检测试剂盒，对所有的宫颈脱落细胞样品进行 DNA 提取，并进行 HPV 的分型检测。

本工作由北京大学第一医院妇产科宫颈病变实验室完成。

2. 研究标本的选取及早期的 HPV52 阳性样品的制备

研究标本的选取：从上述样品中选取 79 例 HPV52 单纯感染标本，作为本研究的标本。热点突变分析结束后，再根据热点突变分析结果从中选择 5 个样品进

行 HPV52 全基因序列分析。

早期的 HPV52 阳性样品的制备：从 79 例 HPV52 单纯感染标本中随机选取 25 份 HPV52 单独感染的标本，每份取 2 μ l DNA 混合，经 HPV52 型特异性 E5、E6-E7 和 LCR 引物扩增确证为 HPV52 阳性，作为本研究早期的阳性对照样品。

3. HPV52各目的片段PCR扩增

(1) PCR用引物汇总

HPV52-103/HPV52-108、HPV52-E61/HPV52-E72 和 HPV52-107/HPV52-102 分别用于 E5 片段、E6-E7 片段和 LCR 片段的扩增。

将 HPV52 序列的 E7 基因至 LCR 片段之间分为两端存在约 120bp 长度重叠序列的 8 个片段，如图 1（灰色箭头表示向下游方向扩增的引物，黑色箭头表示向上游方向扩增的引物）所示，片段 1 的上游引物位于 E7 基因的内部，片段 8 的下游引物位于 LCR 片段的内部。最后结合 E5、E6、E7 基因和 LCR 片段序列分析的结果，拼接出全长的 HPV52 序列。

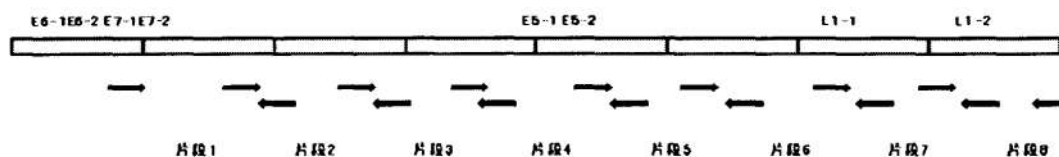


图 1 全长的 HPV52 分段示意图

Fig.1 Sketch map of the fragments of whole HPV52 genome

8 个测序片段 PCR 扩增所使用的引物依次为，HPV52E7L11/HPV52C2-6、HPV52C2-1/HPV52M2 、 HPV52M1/HPV52C4-2 、 HPV52-111/HPV52E52 、 HPV52C5-1/HPV52C6-2 、 HPV52C6-1/HPV52E7L12 、 HPV52-105/HPV52C8-2 和 HPV52C8-3/ HPV52-110。

(2) E5、E6-E7、LCR 片段及 8 个全长测序片段的扩增条件

均为每反应 (50 μ l)，包括 DNA 聚合酶 Ex Taq (TaKaRa) 1U，dNTPs 1 μ l，Mg²⁺ 8 μ l，DNA 模板 1 μ l，引物各 1 μ l。反应条件为 95℃ 20 秒，退火温度 55℃ 30 秒，72℃ 2 分钟，35 循环。

(3) PCR 产物长度确认

使用 1% 琼脂糖凝胶电泳实验来鉴定相应的 PCR 产物。琼脂糖凝胶的配制及电泳按照分子克隆第二版中介绍的方法进行，唯一不同的是使用 GeneFinder™ 代替溴化乙锭观察琼脂糖中的 DNA，GeneFinder™ 按 1: 1000 的比例添加到在琼

脂糖凝胶中使用。

(4) 基因测序

扩增成功的所有样品的 PCR 产物送上海生工(北京)测序部进行序列分析。E5 片段使用 HPV52-108 单向测通、E6-E7 片段使用 HPV52-EC1 和 HPV52-EC2 从中间向两端双向测通, LCR 片段使用 HPV52-107 和 HPV52-102 从两端向中间双向测通。8 个测序片段所使用的测序引物与 PCR 扩增所使用的引物相同。

(5) 数据分析

序列的拼接和比对以及进化树的绘制主要应用 BioEdit、DNASTar 和 Mega 4 软件。以 HPV52 X74481 为标准株, 突变点根据实际峰图进行人工判读。完成序列比对后结合临床资料进行分析, 寻找突变与临床病理的联系。进化树的绘制使用 Mega4 软件。蛋白结构的同源建模使用 Discovery Studio 2.0 软件。

(6) 统计学方法

用 SPSS10.0 软件, 列联表($R \times C$)资料分析, 以百分率作 HPV 感染的评价指标, HPV 型别和各种变异检出率差异用 χ^2 检验, 用 logistic regression 分析 HPV 各型别感染与宫颈病变的关系。所有 P 检验均为双向, 统计学显著性为 $P < 0.05$ 。对多型感染者, 各型别的阳性率重复计算。

二、HPV52 标准品的制备

1. 将全长的 HPV52 基因分成两段克隆到质粒载体中

将全长的 HPV52 序列分成长度约为 3000bp (3K 片段) 和 5000bp (5K 片段) 的两段, 其中 3K 片段包括 E5-L2-L1- Δ LCR, 5K 片段包括 LCR-E6-E7-E1-E2-E4-E5。

以早期的 HPV52 阳性对照品为模板, 分别使用引物 HPV52E5C1/ HPV52-110 和 HPV52-107/ HPV52-108 进行 3K 片段和 5K 片段的 PCR 反应扩增。50 μ l 的 PCR 反应体系包括 DNA 聚合酶 Ex Taq (TaKaRa) 1U, dNTPs 1 μ l, Mg^{2+} 4 μ l, DNA 模板 1 μ l, 引物各 1 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 20 秒, 退火温度 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 5 分钟, 35 循环。

3K 片段和 5K 片段的 PCR 产物经过凝胶纯化回收 (北京博迈德) 后, 克隆到 pMD18-T (TaKaRa) 中。经过酶切 (TaKaRa) 鉴定后选取 3K 片段和 5K 片段的阳性克隆质粒用酒精沉淀的方法进行纯化, 然后测定其在 260nm 和 280nm 的光吸收。

3 次测量 500 倍稀释的 3K1/pMD18-T 的浓度为 $0.376 \mu\text{g/ml}$, 计算后的质粒拷贝数为 2.8×10^{10} 拷贝/ μl ; 3 次测量 500 倍稀释的 3K1/pMD18-T 的浓度为 $0.845 \mu\text{g/ml}$, 计算后的质粒拷贝数为 6.2×10^{10} 拷贝/ μl ; 3 次测量 500 倍稀释的 5K/pMD18-T 的浓度为 $0.514 \mu\text{g/ml}$, 计算后的质粒拷贝数为 2.9×10^{10} 拷贝/ μl 。

3. 提取宫颈癌细胞系 C33A 的基因组 DNA, 并测定其浓度。

使用 Qiagen 公司 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒, 按照说明书提取 C33A 细胞的全核酸。

3 次测量 500 倍稀释的 C33A DNA 的浓度为 $0.133 \mu\text{g/ml}$, 计算后的基因组拷贝数为 2.1×10^4 拷贝/ μl 。

4. 制作混合的 HPV52 标准品

根据 3K1/pMD18-T、3K2/pMD18-T、5K/pMD18-T 和 C33A 细胞基因组 DNA 的浓度, 制作 C33A 基因组 DNA 拷贝为 500 拷贝/ μl 、HPV52 全基因组拷贝数分别为 500 拷贝/ μl 、5000 拷贝/ μl 、50000 拷贝/ μl 、500000 拷贝/ μl 和 5000000 拷贝/ μl 的模拟 HPV52 单纯感染的脱落细胞样品的 HPV52 标准品, 简称为 S1、S2、S3、S4 和 S5。

5. PCR 鉴定制作的 HPV52 标准品。

使用 MY09/11 引物进行相应的 PCR 扩增反应。每反应 ($50 \mu\text{l}$) 包括 DNA 聚合酶 AmpliTaqGold 5U, dNTPs $1 \mu\text{l}$, Mg^{2+} $8 \mu\text{l}$, DNA 模板 $1 \mu\text{l}$, 引物各 $10 \mu\text{l}$ 。反应条件为 95°C 1 分钟, 退火温度 55°C 2 分钟, 72°C 1 分钟 30 秒, 35 循环。

实验结果

一、HPV52 致癌基因 E5、E6 和 E7 及 LCR 热点突变分析

1. 收集标本情况

(1) 前期收集脱落细胞 DNA 标本共 1244 例, 年龄 38.59 ± 10.529 岁, 年龄最小 19 岁, 最大 85 岁。

共有 218 例宫颈病变者接受了宫颈活检, 占 17.5% (218/1244), 其中宫颈炎 82 例, 占 16.6% (82/1244); CIN I 60 例, 占 4.8% (60/1244); CIN II 38 例, 占 3.1% (38/1244); CIN III 36 例, 占 2.9% (36/1244); 原位癌 2 例, 占 0.2% (2/1244)。

(2) HPV 感染情况

1244 名门诊妇女中 20 种 HPV 型别被检出, HPV 阳性率 40.8%(507/1244)。感染率在 5.0%以上者定为常见型别, 分别是 HPV16 (14.1%)、58(10.5%)和 52(5.9%)3 种。其余型别检出率在 4.2%~0.2%间, 从高到低依次为 53、33、6、66、68、39、31、81、11、56、18、42、59、51、44、45 和 35 型, 43 型未检出。HPV16 为最常见的感染型别, 在 HPV 阳性中占 34.5%(175/507)。

按年龄分为 3 组: 19-29 岁, 30-59 岁, 60-85 岁。HPV 在各组中的检出率为 44.5%(122/274), 39.6%(366/925), 42.2%(19/45), 各组检出率差异无统计学意义。

218 例宫颈病变中 HPV 阳性检出率为: 宫颈炎症中 32 例, 占 39%(32/82); CIN I 中 21 例, 占 35%(21/60); CIN II 中 22 例, 占 57.9%(22/38); CIN III 中 31 例, 占 86.1%(31/36); 原位癌中 2 例, 均检出 HPV 感染。4 组病变中, 主要 HPV 型别分布如下(表 2), 其中 HPV16 在宫颈病变中的检出率为 19.7%(43/218), 且随病变程度加重明显增加, 经 χ^2 检验, $\chi^2=34.471$ 、 $P=0.000$, HPV16 感染在不同程度宫颈病变的检出差异有统计学意义, 与病变程度相关。HPV52 及 HPV58 的检出率也随病变程度加重而有升高的趋势, 但 $P>0.05$, 差异无统计学意义。

表 2 宫颈病变中部分 HPV 型别的分布情况

Tab. 2 Prevalence of several HPV types in abnormal histological samples

	HPV16*	HPV58	HPV31	HPV33	HPV52	HPV53	HPV18
炎症	7.3% (6/82)	6.1% (5/82)	3.7% (3/82)	7.3% (6/82)	4.9% (4/82)	1.2 (1/82)	2.4% (2/82)
CIN I	11.7% (7/60)	6.7% (4/60)	3.3% (2/60)	0	5% (3/60)	1.7% (1/60)	0
CIN II	28.9% (11/38)	13.2% (5/38)	2.6% (1/38)	5.3% (2/38)	5.3% (2/38)	5.3% (2/38)	0
CIN III	50% (18/36)	8.3% (3/36)	8.3% (3/36)	19.4% (7/36)	11.1% (4/36)	0	0
原位癌	50% (1/2)	0	50% (1/2)	0	0	0	0

(*差异有统计学意义 $P=0.000$)

2. HPV52 单纯感染检出情况

HPV52 单纯感染共 79 例，其中宫颈细胞学正常者 58 例，占 73.4%(58/79)。宫颈病变者 21 例，占 26.5%(58/79)，其中宫颈炎 8 例，占 10.1%(8/79)；ASCUS 5 例，占 6.3%(5/79)；LSIL 6 例，占 7.9%(6/79)；HSIL 2 例，占 2.5%(2/79)。

3. PCR 扩增和序列分析情况汇总

由于原始脱落细胞中 DNA 含量、提取 DNA 反复冻融引起的降解和 PCR 扩增效率等原因，有个别的 PCR 反应没有成功。挑选 PCR 产物浓度较高的样品送交测序，E5 片段测序成功 56 例，E6 片段测序成功 67 例，E7 片段测序成功 69 例，LCR 片段测序成功 63 例，各片段的 PCR 扩增阳性率和测序成功率见表 3。E5 和 LCR 片段的 PCR 扩增阳性率为 97.5%，E6-E7 片段的阳性率也十分接近 90%，各片段的 PCR 扩增的阳性率均较高，这也说明了 HPV 分型检测系统在 HPV52 的分型上是可靠的。

表 3 HPV52 各片段 PCR 扩增和测序结果汇总

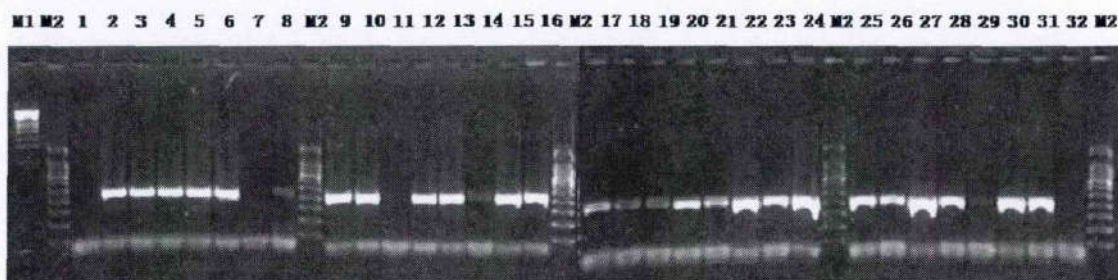
Tab. 3 The result of PCR amplification and sequence analysis of HPV52 samples' segments

HPV52 片段	PCR 阳性	测序成功
E5	97.5%(77/79)	72.7%(56/77)
E6	89.9%(71/79)	94.4%(67/71)
E7	89.9%(71/79)	97.2%(69/71)
LCR	97.5%(77/79)	81.8%(63/77)

4. E5 片段的 PCR 扩增和序列分析结果

(1) E5 片段的 PCR 扩增结果

应用 HPV52-103/ HPV52-108 为引物对样品 DNA E5 片段进行扩增，扩增片段包含完整 E5 片段及部分 E5 上下游基因片段，扩增产物长度 569bp，79 例中共有 77 例扩增成功，测序成功的有 56 例。部分样品的 PCR 扩增结果见图 2。



M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照;
3-32: 样品

图 2 部分样品 E5 片段 PCR 扩增结果

M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: negative control; 2: positive control; 3-32: samples

Fig.2 PCR amplification of E5 fragement of partial samples

(2) E5 基因序列分析结果

以 HPV52 X74481 标准株基因序列为参照, 待测标本与其比对, 有一个碱基替换就确定为点突变。突变位点表示以全基因组的第一个碱基为起始, 如 G3995A, 表示 HPV52 DNA 序列第 3995 号位 G 被 A 替换。氨基酸的突变也是与 HPV52 X74481 标准株相比较, E5-S25F 表示 E5 基因编码的第 25 号位的 S 被 F 替换。“+”表示标本中发生了相应的变异, “-”表示标本中相应位点与欧洲株原型一致。

在 56 例样本中, E5 DNA 序列 8.9%(5/56) 与原型符合, 91.1%的 (51/56) DNA 序列发生了变异, 1 例标本发生了 G3995A 的突变, 占 1.8%(1/56); 1 例标本发生了 C4006T 的突变, 占 1.8%(1/56); 54 例标本发生了 A4055G 的突变, 占 91.1%(51/56); 1 例标本发生了 G4077A 的突变, 占 1.8%(1/56) (3 个标本的突变有重复计算)。E5 基因的突变情况见表 7, E5 基因中各突变位点突变频率的比较见图 3。A4055G 的突变频率高达 91.1%(51/56), 这说明在 E5 基因的 4055 位中国株的共序为 G, 不同于欧洲株的 A。

表 4 E5 基因碱基突变情况列表

Tab. 4 Mutation of E5 gene

Prototype	G	C	A	G
Mutation	A	T	G	A
Location in E5 ORF	63	74	123	145
Location in genome	3995	4006	4055	4077
2	—	—	+	+
3	—	—	—	—
4	—	—	+	—
19	+	—	+	—
44	—	+	+	—

各突变位点突变频率 (%)

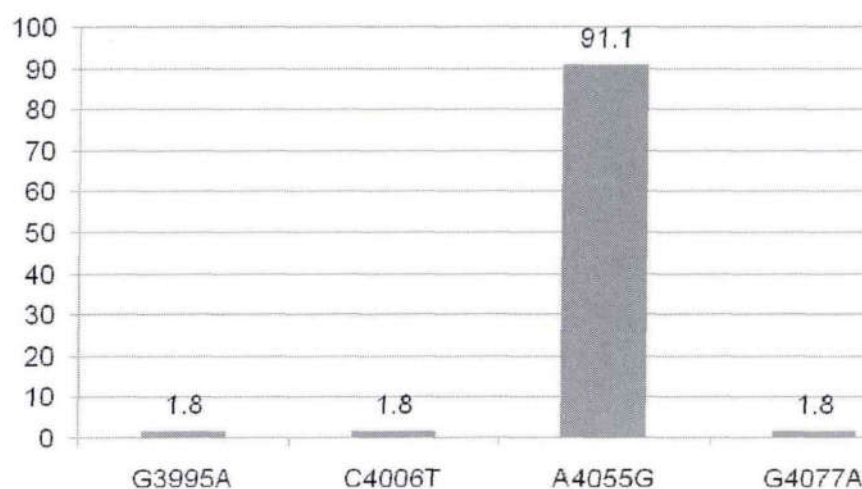


图 3 E5 基因各突变位点变异频率的比较

Fig. 3 Comparison of mutation frequency of different mutation sites of E5 gene

E5 基因编码的氨基酸发生了 2 种突变。其中 G3995A 和 A4055G 未引起氨基酸突变, C4006T 点突变引起氨基酸突变 E5-S25F, G4077A 点突变引起氨基酸突变 E5-V49M, 标本中氨基酸水平的突变率为 3.6% (2/56), 具体标本中的氨基酸突变情况见表 5。

表 5 E5 基因编码的氨基酸突变情况列表

Tab. 5 Amino acid mutation of E5 gene

Prototype	S	V
Mutation	F	M
Location in E5 protein	25	49
2	—	+
3	—	—
44	+	—

(3) 分析 E5 基因编码氨基酸变异的临床意义

结合 HPV52 标本中的病理资料, 比较 E5 氨基酸原型和变异在各组样品中的分布情况。具体情况见表 5。

表 5 E5 氨基酸原型及变异在各组样品中的分布情况

Tab. 5 Prevalence of E5 amino acid prototype and mutant in different histological groups

	氨基酸原型(%)	氨基酸变异(%)
正常组	97.6 (41/42)	2.4 (1/42)
宫颈炎组	100 (5/5)	0 (0/5)
ASCUS	75.0 (3/4)	25.0 (1/4)
LSIL	100 (4/4)	0 (0/4)
HSIL	100 (1/1)	0 (0/1)

*P=0.287

5. E6-E7 片段的 PCR 扩增情况

应用 HPV52-E61/ HPV52-E72 为引物对样品 DNA E6-E7 片段进行扩增, 扩增片段包含完整 E6-E7 片段及部分 E6 上游和 E7 下游基因片段, 扩增产物长度 751bp, 79 例中共有 71 例扩增成功, E6 基因有 67 例测序成功, E7 基因有 69 例测序成功。部分标本的 E6-E7 片段的 PCR 扩增结果见图 4。



M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照;
3-32: 样品

图 4 部分样品 E6-E7 片段 PCR 扩增结果

M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: negative control; 2: positive control; 3-32: samples

Fig. 4 PCR amplification of E6-E7 fragment of partial samples

6. E6 基因的序列分析情况

(1) E6 基因的序列分析结果

在 67 例样本中, E6 DNA 序列 4.5%(3/67) 与原型符合, 标本的突变率为 95.5%(64/67)。1 例标本发生了 A180C 的突变, 占 1.5%(1/67); 1 例标本发生了 T338C 的突变, 占 1.5%(1/67); 61 例标本发生了 G350T 的突变, 占 91.0%(61/67); 16 例标本发生了 G356A 的突变, 占 23.9%(16/67); 1 例标本发生了 A378G 的突变, 占 1.5%(1/67); 62 例标本发生了 A379G 的突变, 占 92.5%(62/67); 1 例标本发生了 T404C 的突变, 占 1.5%(1/67); 1 例标本发生了 A530G 的突变, 占 1.5%(1/67) (标本的突变有重复计算)。E6 基因的碱基突变情况见表 6, 各突变位点的突变频率的比较见图 5。G350T 和 A379G 的突变频率高达 91.0%(61/67) 和 92.5%(62/67), 这说明在 E6 基因的 350 位和 379 位中国株的共序为 T 和 G, 不同于欧洲株。

表 6 E6 基因碱基突变情况列表

Tab. 6 Mutation of E6 gene

Prototype	A	T	G	G	A	A	T	A
Mutation	C	C	T	A	G	G	C	G
Location in E6 ORF	79	237	249	255	277	278	303	429
Location in genome	180	338	350	356	378	379	404	530
LY13	—	—	—	—	—	—	—	—
LY02	—	—	—	—	—	+	—	—
LY03	—	—	—	—	—	—	+	—
LY01	—	—	+	—	—	+	—	—
LY09	—	—	+	+	—	+	—	—
LY26	—	+	+	+	—	+	—	—
LY42	+	—	+	+	—	+	—	—
LY50	—	—	+	—	—	—	—	+
LY64	—	—	+	—	+	+	—	—

各突变位点突变频率 (%)

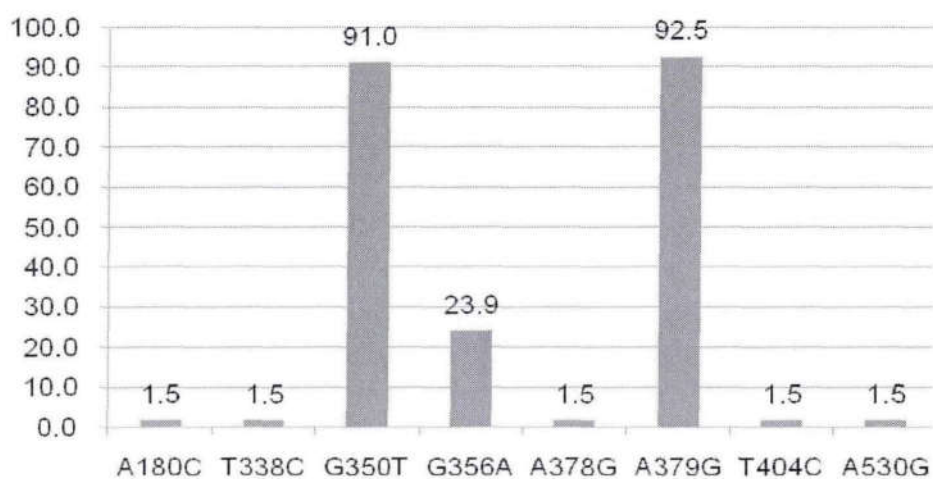


图 5 E6 基因各突变位点变异频率的比较

Tab. 5 Comparison of mutation frequency of different mutation sites of E6 gene

上述 E6 基因中 8 个位点的点突变, 只有 A378G 和 A379G 的点突变引起了氨基酸突变见表。E6 基因编码的氨基酸发生了一个位点上的两种突变 2 种氨基酸突变, 发生氨基酸突变的标本有 62 例, 占 92.5%, 见表 7。

表 7 E6 基因编码的氨基酸突变情况列表

Tab. 7 Amino acid mutation of E6 gene

Location in E6 protein	93
HPV52 X74481	K
LY03	K
LY01	R
LY64	G

(2) 分析 E6 氨基酸变异的临床意义

结合 HPV52 标本中的病理资料, 比较 E6 氨基酸原型和变异在各组样品中的分布情况。具体情况见表 8。

表 8 E6 氨基酸原型及变异在各组样品中的分布情况

Tab. 8 Prevalence of E6 amino acid prorotype and mutant in different histological groups

	氨基酸原型 (%)	氨基酸变异 (%)
正常组	7.8 (4/51)	92.2 (47/51)
宫颈炎组	16.7 (1/6)	83.3 (5/6)
ASCUS	0 (0/4)	100 (4/4)
LSIL	0 (0/5)	100 (5/5)
HSIL	0 (0/1)	100 (1/1)

*P=0.353

7. E7 基因的序列分析情况

(1) E7 基因序列分析结果

在 69 例样本中, E7 DNA 序列 7.2%(5/69) 与原型符合, 突变率为 92.8% (64/69)。1 例标本发生了 T573A 的突变, 占 1.4%(1/69); 1 例标本发生了 T582G

的突变, 占 1.4%(1/69); 1 例标本发生了 C662T 的突变, 占 1.4%(1/69); 1 例标本发生了 A706G 的突变, 占 1.4%(1/69); 1 例标本发生了 G707A 的突变, 占 1.4%(1/69); 1 例标本发生了 T727G 的突变, 占 1.4%(1/69); 1 例标本发生了 C733T 的突变, 占 1.4%(1/67); 3 例标本发生了 G742A 的突变, 占 4.3%(3/69); 63 例标本发生了 C751T 的突变, 占 91.3%(63/69); 64 例标本发生了 A801G 的突变, 占 92.8%(64/69); (标本的突变有重复计算)。E7 基因的碱基突变情况见表 9, 各突变位点的变异频率的比较见图 6。C751T 和 A801G 频率高达 91.3%(63/69) 和 92.8%(64/69), 这说明在 E7 基因的 751 位和 801 位中国株的共序是 T 和 G, 不同于欧洲株。

表 9 E7 基因碱基突变列表

Tab. 9 Mutation of E7 gene

Prototype	T	T	C	A	G	T	C	G	C	A
Mutation	A	G	T	G	A	G	T	A	T	G
Location in E7 ORF	21	30	110	154	155	175	181	190	199	249
Location in genome	573	582	662	706	707	727	733	742	751	801
LY03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LY01	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
LY05	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
LY83	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+
LY50	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+

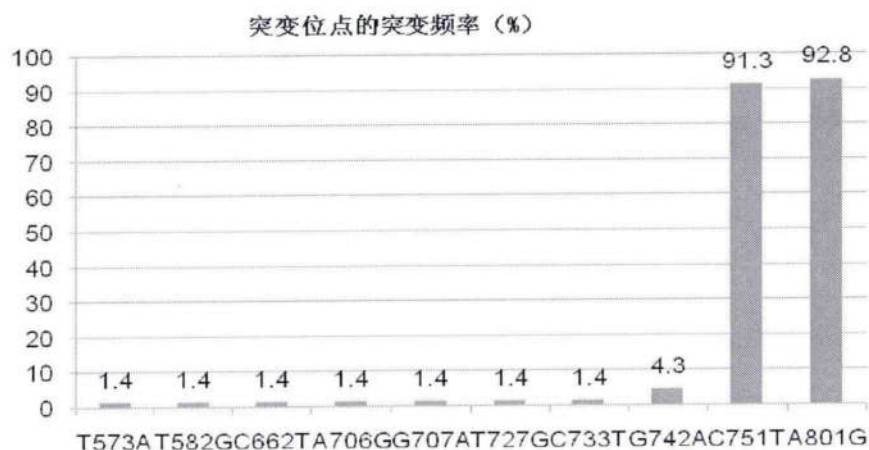


图 6 E7 基因各突变位点变异频率的比较

Tab. 6 Comparison of mutation frequency of different mutation sites of E7 gene

E7 基因共发生了 7 种氨基酸突变。发生氨基酸突变的标本有 4 例, 占 5.8% (4/69)。E7 基因编码的氨基酸的变异情况见表 10。

表 10 E7 基因编码的氨基酸突变情况列表**Tab. 10** Amino acid mutation of E7 gene

Prototype	D	T	S	S	Y	H	D
Mutation	E	N	D	D	D	Y	N
Location in E7 protein	10	37	52	52	59	61	64
LY01	—	—	—	—	—	—	—
LY05	—	—	—	—	—	—	+
LY50	—	+	+	+	+	+	+
LY83	+	—	—	—	—	—	—

(2) 分析 E7 氨基酸变异的临床意义

结合 HPV52 标本中的病理资料, 比较 E7 氨基酸原型和变异在各组样品中的分布情况。具体情况见表 11。

表 11 E7 氨基酸原型及变异在各组样品中的分布情况**Tab. 11** Prevalence of E7 amino acid prototype and mutant in different histological groups

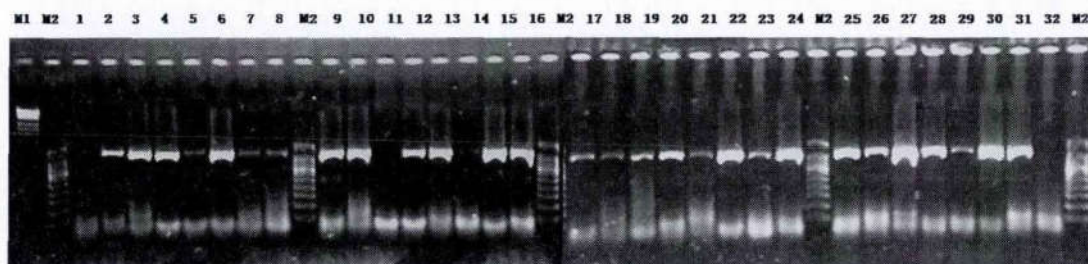
	氨基酸原型(%)	氨基酸变异(%)
正常组	94.1 (48/51)	5.9 (3/51)
宫颈炎组	100 (6/6)	0 (0/6)
ASCUS	80.0 (4/5)	20.0 (1/5)
LSIL	100 (6/6)	0 (0/6)
HSIL	100 (1/1)	0 (0/1)

*P=0.125

8. LCR 片段的 PCR 扩增和序列分析情况

(1) LCR 片段的 PCR 扩增结果

应用 HPV52-107/ HPV52-102 为引物对样品 DNA LCR 片段进行扩增, 扩增片段包含完整 LCR 片段及部分 LCR 上下游序列片段, 扩增产物长度 1245bp, 79 例中共有 77 例扩增成功, 测序成功的有 63 例。样品的扩增情况见图 7。



M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照;
3-32: 样品

图 7 部分样品 LCR 片段 PCR 扩增结果

M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: negative control; 2: positive control; 3-32: samples

Fig. 7 PCR amplification of LCR fragement of partial samples

(2) LCR 片段的序列分析结果

LCR 片段发生 40 种碱基点突变, 5 种缺失突变, 变异程度非常高, 测序成功的 63 例标本 LCR 序列与欧洲株的原型序列相比, 均发生了变异, 突变率为 100% (63/63)。40 处点突变中, 有 26 处点突变的突变频率较低, 最高为超过 7.9% (5/63); 其余 14 处点突变的突变频率较高, 其中 T7933G 的突变频率为 27.0% (17/63), A7938G 的突变频率为 57.1% (36/63), G7168C、C7207A、G7371T、C7698G、A7865G 和 T13C 的突变频率均为 92.1% (58/63), G7622A、T7624G、A7657C、T7659C、G7712C 和 G7861A 的突变频率为 93.7% (59/63), 见表 12。G7168C、C7207A、G7371T、C7698G、A7865G 和 T13C 的突变频率高达 92.1% (58/63), G7622A、T7624G、A7657C、T7659C、G7712C 和 G7861A 的突变频率高达 93.7% (59/63), 可以认为在这些位点上中国株的共序与欧洲株本来就不同。

5 种缺失突变中, 从 7275 到 7293 位的缺失突变和 7615 位的缺失突变的发生频率为 1.6% (1/63), 从 7287 到 7288 位的缺失突变和从 7699 到 7701 位的缺失突变的发生频率为 92.1% (58/63), 从 7385 位到 7289 位 5 个碱基缺失突变的发

生频率为 100% (59/63), 如表 13 所示。从 7287 到 7288 位的缺失突变和从 7699 到 7701 位的缺失突变的发生频率都高达 92.1% (58/63), 即在这些位点上中国株的共序与欧洲株本来就不同。

表 12 LCR 片段 14 处点突变情况列表

Tab. 12 14 Single-nucleotide variation of LCR

Prototype	G	C	G	G	T	A	T	C	G	G	A	T	A	T
Mutation	C	A	T	A	G	C	C	G	C	A	G	C	G	C
Location in LCR	14	53	217	468	470	503	505	544	558	707	711	779	784	801
Location in genome	716	720	737	762	762	765	765	769	771	786	786	793	793	13
	8	7	1	2	4	7	9	8	2	1	5	3	8	
LY01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
LY02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LY03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LY04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LY05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LY06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
LY07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
LY08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
LY09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+
LY11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LY12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
LY13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
LY14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+
LY16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LY22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+

表 13 LCR 片段碱基缺失突变列表

Tab. 13 deletion variation of LCR

Prototype	TG	TATGTATGTGTG TGCATGT	TGTTA	T	TTG
Mutation	deletion	deletion	deletion	deletion	deletion
Location in LCR	133..134	121..139	231..235	461	545..547
Location in genome	7287..7288	7275..7293	7385..73 89	7615	7699..77 01
LY01	+	—	+	—	+
LY02	+	—	+	—	+
LY03	—	—	+	—	—
LY04	+	—	+	—	+
LY05	+	—	+	—	+
LY06	+	—	+	—	+
LY07	+	—	+	—	+
LY08	+	—	+	—	+
LY09	+	—	+	—	+
LY11	+	—	+	—	+
LY12	+	+	+	—	+
LY13	—	—	+	—	—
LY14	+	—	+	—	+
LY16	+	—	+	—	+
LY22	+	—	+	+	+

(3) 结合 HPV52 标本中的病理资料, 比较 LCR 片段变异在各组样品中的分布情况。具体情况见表 14。

表 14 LCR 片段变异在各组样品中的分布情况

Tab. 14 Prevalence of LCR fragement prototype and mutant in different histological groups

	序列原型 (%)	序列变异 (%)
正常组	0 (0/48)	100 (48/48)
宫颈炎组	0 (0/6)	100 (6/6)
ASCUS	0 (0/4)	100 (4/4)
LSIL	0 (0/4)	100 (4/4)
HSIL	0 (0/1)	100 (1/1)

*P=- (No statistics are computed because NEG is a constant.)

(4) 根据 LCR 片段的变异情况绘制进化树

根据 LCR 片段的突变情况, 以欧洲株原型 HPV52 X74481 为参比, 绘制了 63 例标本的进化树, 见图 8。90.5% (57/63) 的标本与欧洲株原型不在同一组内。由此可以认为北京地区收集的 HPV52 分离株与欧洲株原型不同。

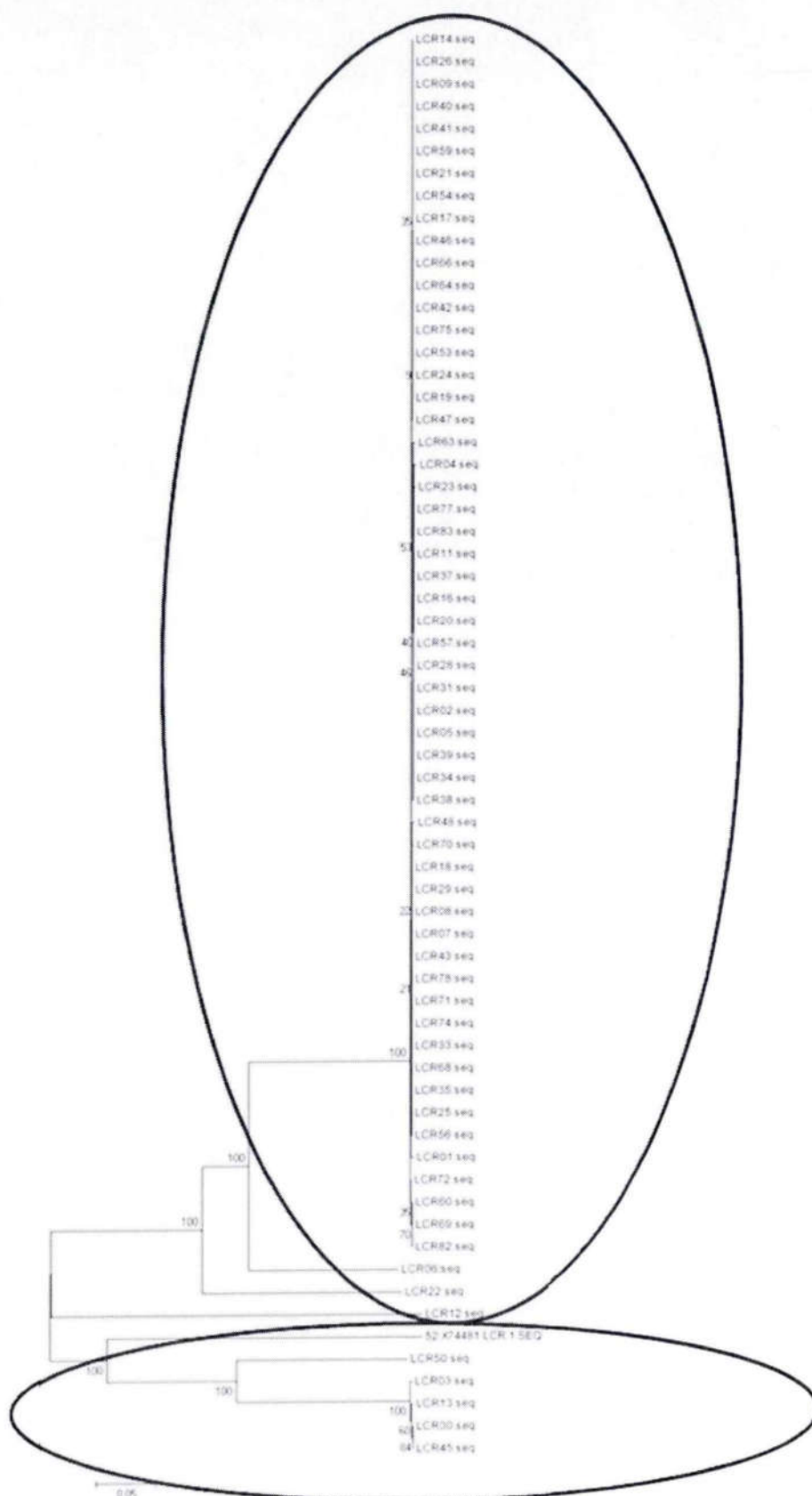


图 8 根据 LCR 的变异情况绘制进化树

Fig.8 Phyligenetic tree constructed on LCR mutation

二、5 个 HPV52 分离株的全基因组序列分析

1. PCR 扩增 8 个测序片段的电泳结果

测序片段 1-8 的大小分别为: 1013bp、911bp、1150bp、1035bp、859bp、907bp、985bp 和 989bp。8 个片段的电泳图片见图 9。



M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1-8: 片段 1-8; 9: 阴性对照

图 9 测序片段的电泳照片

M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1-8: fragment 1-8; 9: negative control

Fig. 9 PCR amplification of sequencing fragments

2. 拼接出的 5 个 HPV52 全长序列与欧洲株原型的比对结果

(1) 与欧洲株相比全长序列的变异情况

根据热点突变的结果中 E5、E6、E7 基因和 LCR 的序列变异情况和共序情况, 挑选了 5 个 HPV52 分离株。其中 LY30 的碱基分布情况与欧洲株原型比较接近, LY09、LY34、LY42 和 LY70 的 E5、E6、E7 基因和 LCR 的序列的多处位点碱基分布与欧洲株不同。

5 个 HPV52 分离株的序列与欧洲株原型相比较, 存在着 70 种点突变、1 个 28bp 的插入突变和 3 处缺失突变。E6 基因 DNA 水平发生 4 种点突变, 氨基酸水平发生 1 种点突变; E7 基因 DNA 发生两种点突变, 氨基酸水平没有发生变异; E1 基因 DNA 水平发生 14 种点突变, 氨基酸水平发生 7 种变异; E2 基因 DNA 水平发生 14 种点突变, 氨基酸水平发生 9 种变异; E5 基因 DNA 水平发生 1 种变异, 氨基酸水平没有发生变异; L2 基因 DNA 水平发生 8 种变异, 氨基酸水平发生 2 种变异; L1 基因 DNA 水平发生 11 种变异, 氨基酸水平没有发生变异; LCR 片段发生 14 种点突变, 3 种缺失突变。

在这 5 个测序成功的标本中, LY09 与 HPV52 X74481 相比, 存在 59 个碱基的点突变, 和 1 个 5 个碱基的缺失突变, 1 个 2 个碱基的缺失突变, 1 个 3 个碱基的缺失突变和 1 个 28 个碱基的插入突变, 全长序列中发生的碱基变异为 1.2% (97/7942); LY30 与 HPV52 X74481 相比, 存在 3 个碱基的点突变, 和 1 个 5 个碱基的缺失突变, 全长序列中发生的碱基变异为 0.1% (8/7942); LY34 与 HPV52 X74481 相比, 存在 56 个碱基的点突变, 和 1 个 5 个碱基的缺失突变, 1 个 2 个碱基的缺失突变, 1 个 3 个碱基的缺失突变和 1 个 28 个碱基的插入突变, 全长序列中发生的碱基变异为 1.2% (94/7942); LY42 与 HPV52 X74481 相比, 存在 59 个碱基的点突变, 和 1 个 5 个碱基的缺失突变, 1 个 2 个碱基的缺失突变, 1 个 3 个碱基的缺失突变和 1 个 28 个碱基的插入突变, 全长序列中发生的碱基变异为 1.2% (97/7942); LY70 与 HPV52 X74481 相比, 存在 59 个碱基的点突变, 和 1 个 5 个碱基的缺失突变, 1 个 2 个碱基的缺失突变, 1 个 3 个碱基的缺失突变和 1 个 28 个碱基的插入突变, 全长序列中发生的碱基变异为 1.2% (96/7942)。

目前认为相同 HPV 型别之间的 L1 基因同源性的 90%, 同一型别内同一分离株 L1 基因的同源性为大于 98% 为标准, 以此为标准与 HPV52 X74481 的 L1 序列相比, LY30 中的碱基均未发生变异, LY09、LY42 和 LY70 存在相同的 10 处碱基发生点突变, 突变率为 0.6% (10/1590), LY34 中有 11 处碱基发生点突变, 突变率为 0.7% (11/1590)。

(2) 插入突变的情况

插入突变的位置从 E5 基因结束后的第 3 个碱基开始, 5 个分离株有 4 个存在着 28bp 的插入突变, 插入序列为 ATTGTACAAACTGTTGTGTGTACTGCT, 如图 10 所示:

HPV52X74481	CTGCAATAACT	████████████████████	GTACATGTAGATTGGCTACATGCATATATGCAAAATATAC
HPV52LY30	CTGCAATAACT	████████████████████	GTACATGTAGATTGGCTACATGCATATATGCAAAATATAC
HPV52LY34	CTGCAATAACTATTGTACAAACTGTTGTGTGTACTGCTGTACATGTAGATTGGCTACATGCATATATGCAAAATATAC		
HPV52LY09	CTGCAATAACTATTGTACAAACTGTTGTGTGTACTGCTGTACATGTAGATTGGCTACATGCATATATGCAAAATATAC		
HPV52LY42	CTGCAATAACTATTGTACAAACTGTTGTGTGTACTGCTGTACATGTAGATTGGCTACATGCATATATGCAAAATATAC		
HPV52LY70	CTGCAATAACTATTGTACAAACTGTTGTGTGTACTGCTGTACATGTAGATTGGCTACATGCATATATGCAAAATATAC		

图 10 28bp 插入突变的示意图

Fig. 10 Sketch map of 28bp insertion

我们对进行 E5 基因序列分析的 56 个标本的测序结果进行了核对, 发现在 56 个标本中有 4 个标本在这个区域的碱基序列与欧洲株原型相一致, 占 7.1%

(4/56), 92.9%(52/56)的标本存在着 28bp 的插入序列, 其中有 51 个标本插入的 28bp 的序列完全一致, 另外 1 个标本的插入序列的第 9 个碱基与其他 51 例标本不同, 为 ATTGTACATAACTGTTGTGTGTACTGCT。该插入突变的位置处于非编码区, 推测可能与基因的表达有关。

(3) 缺失突变的情况

所得 5 个 HPV52 分离株的全长序列中存在 3 处缺失突变的情况如图 11 所示:

HPV52X74481	TTATGTATGTGTG■CATGTTTG	TAGTCTTATGTTATG■TTATG■GTTGCACCCAC	AAACTGACTT■GCTGACTCACA
HPV52LY30	TTATGTATGTGTG■CATGTTTG	TAGTCTTATGTTATG■GTTGCACCCAC	AAACTGACTT■GCTGACTCACA
HPV52LY34	TTATGTATGTGTG■CATGTTTG	TAGTCTTATGTTATG■GTTGCACCCAC	AAACTGACTT■GCTGACTCACA
HPV52LY09	TTATGTATGTGTG■CATGTTTG	TAGTCTTATGTTATG■GTTGCACCCAC	AAACTGACTT■GCTGACTCACA
HPV52LY42	TTATGTATGTGTG■CATGTTTG	TAGTCTTATGTTATG■GTTGCACCCAC	AAACTGACTT■GCTGACTCACA
HPV52LY70	TTATGTATGTGTG■CATGTTTG	TAGTCTTATGTTATG■GTTGCACCCAC	AAACTGACTT■GCTGACTCACA

图 11 3 处缺失突变的示意图

Fig. 11 Sketch map of three deletion mutation

目前在 NCBI 上公布的 HPV52 的全长序列有两个, 分别是 HPV52 X74481 和 HPV52 NC_001592, 经过序列比对后发现, 二者序列是完全一致, 即欧洲株的 HPV52 原型序列只有一种。而本课题中挑取的 5 个 HPV52 分离株 LY09、LY30、LY34、LY42 和 LY70 的全基因序列分析结果显示这 5 个分离株的序列与欧洲原型株相比, LY30 比较接近, 其余 4 个分离株均存在着较大差异。

三、HPV52 标准品的制备

国际上已经建立的 HPV DNA 标准品只有 HPV16 和 18 两个型别。2008 年的 WHO HPV LabNet 中已经提到 WHO 准备建立 HPV31、33、45、52 和 58 等几个主要的 HPV 型别的 DNA 标准样品的工作。工作内容就是把这几个主要型别的全基因组 DNA 分别克隆到质粒载体中, 与 HPV 阴性的宫颈癌细胞系 C33A 的基因组 DNA 按比例混合, 制作出可以模拟宫颈细胞样品的 HPV 感染样品。我们的工作就是以国内的 HPV52 分离株为基础, 用类似的方法建立适用于实验研究的 HPV52 标准品。

1. PCR 扩增 3K、5K 片段

3K 片段的大小为 3442bp, 5K 片段的大小为 5289bp。PCR 扩增的电泳图片见图 12。



M1: λ -*Eco*T14 I digest; 1-8: 3K 片段 PCR 产物; 9-16: 5K 片段 PCR 产物

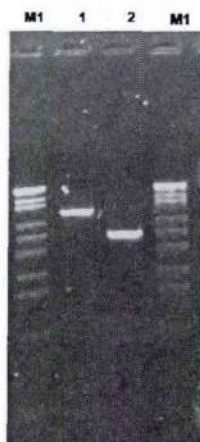
图 12 3K、5K 片段的 PCR 扩增结果

M1: λ -*Eco*T14 I digest; 1-8: PCR amplification of 3K fragment; 9-16: PCR amplification of 5K fragment;

Fig. 12 PCR amplification of 3K and 5K fragment

2. 切胶回收 3K、5K 片段

切胶回收的 3K、5K 片段的电泳图片见图 13。



M1: λ -*Eco*T14 I digest; 1: 5K 片段; 2: 3K 片段

图 13 切胶回收后的 5K、3K 片段

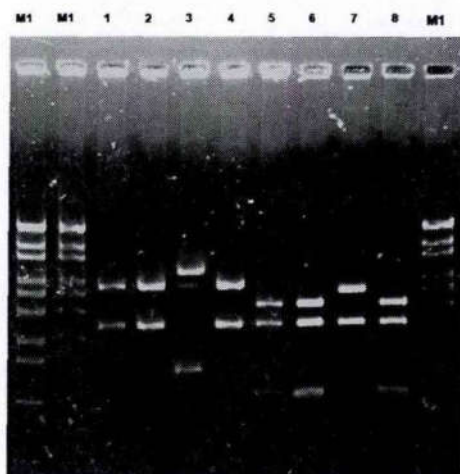
M1: λ -*Eco*T14 I digest; 1: 5K fragment; 2: 3K fragment

Fig. 13 Gel purification of 5K and 3K fragments

3. 酶切鉴定转化质粒

使用 *Bam*HI 和 *Pst* I 的酶切反应鉴定 3K/pMD18-T 质粒。若经 *Bam*HI 酶切后的片段大小为 3900bp 和 2234bp, 则插入子为反向插入; 若酶切后的片段大小为 4899bp 和 1235bp, 则插入子为正向插入。若经 *Pst* I 酶切后的片段大小为 2980bp、

2239 和 915bp, 则插入子为反向插入; 若 *Pst* I 酶切后的片段大小为 3608bp、2239bp 和 287bp, 则插入子为正向插入。电泳照片见图 13。由图 14 分析可知, 3K/pMD18-T 质粒 1、2、4 为反向插入, 3K/pMD18-T 质粒 3 为正向插入。



M1: λ -*Eco*TI4 I digest; 1: *Bam*HI 酶切的 3K/pMD18-T 质粒 1; 2: *Bam*HI 酶切的 3K/pMD18-T 质粒 2; 3: *Bam*HI 酶切的 3K/pMD18-T 质粒 3; 4: *Bam*HI 酶切的 3K/pMD18-T 质粒 4; 5: *Pst* I 酶切的 3K/pMD18-T 质粒 1; 6: *Pst* I 酶切的 3K/pMD18-T 质粒 2; 7: *Pst* I 酶切的 3K/pMD18-T 质粒 3; 8: *Pst* I 酶切的 3K/pMD18-T 质粒 4

图 14 酶切鉴定 3K/pMD18-T 质粒

M1: λ -*Eco*TI4 I digest; 1: 3K1/pMD18-T plasmid digestion by *Bam*HI; 2: 3K2/pMD18-T plasmid digestion by *Bam*HI; 3: 3K3/pMD18-T plasmid digestion by *Bam*HI; 4: 3K4/pMD18-T plasmid digestion by *Bam*HI; 5: 3K1/pMD18-T plasmid digestion by *Pst* I; 6: 3K2/pMD18-T plasmid digestion by *Pst* I; 7: 3K3/pMD18-T plasmid digestion by *Pst* I; 8: 3K4/pMD18-T plasmid digestion by *Pst* I;

Fig. 14 Identification of 3K/pMD18-T plasmid by restriction endonuclease digestion

使用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切反应鉴定 5K/pMD18-T 质粒。电泳图片见图 15。若经 *Bam*HI 酶切后的片段大小为 6890bp 和 1091bp, 则插入子为正向插入, 若 *Eco*RI 酶切后的片段大小为 7363bp 和 618bp, 则插入子为正向插入。由图 15 分析可知, 5K/pMD18-T 质粒为正向插入。



M1: λ -EcoT14 I digest; 1: *Bam*HI 酶切的 5K/pMD18-T 质粒;

2: *Eco*RI 酶切的 5K/pMD18-T 质粒

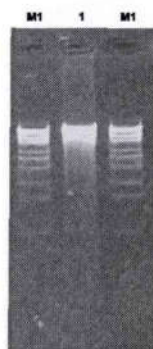
图 15 酶切鉴定 5K/pMD18-T 质粒

M1: λ -EcoT14 I digest; 1: 5K/pMD18-T1 plasmid digestion by *Bam*HI ; 2: 5K/pMD18-T2 plasmid digestion by *Eco*RI

Fig. 15 Identification of 5K/pMD18-T plasmid by restriction endonuclease digestion

4. 提取的 C33A 细胞全核酸电泳图片

C33A 细胞系是从一名 66 岁的高加索妇女的宫颈癌活检标本中传代培养得到的。这个细胞系最初的染色体组是二倍体，具有上皮细胞的形态。细胞系中有异常大小的 pRB 蛋白表达；同时 p53 的表达升高，而且在密码子的 273 位存在 Arg273Cys 的突变。这是个不存在 HPV 感染的宫颈癌细胞系。C33A 细胞与宫颈脱落细胞或者宫颈活检组织的遗传背景相似，从 C33A 细胞中提取的全核酸可以模拟从宫颈脱落细胞或者宫颈活检组织中提取的全核酸。本研究提取的 C33A 全核酸电泳照片见图 16。



M1: λ -EcoT14 I digest; 1: C33A DNA;

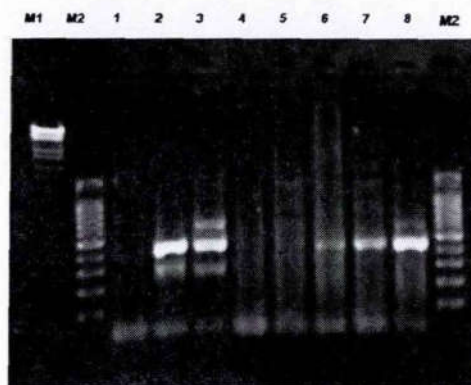
图 16 C33A 细胞 DNA

M1: λ -EcoT14 I digest; 1: C33A DNA;

Fig. 16 C33A DNA

5. PCR 鉴定制作的 HPV52 标准品

由图 17 分析可知, 阴性对照和两个阳性对照的扩增反应均正常, 即整个反应的体系是可信的。S1 的 PCR 扩增结果呈现阴性, S2 的扩增结果为临界阳性, 从 S3 到 S5 的扩增结果均为阳性。由于从 S2 开始到 S5 PCR 扩增的结果呈阳性且产物的量呈梯度递增的趋势, 而从 S1 到 S5 中 HPV52 的病毒基因组拷贝数成 10 倍递增, 可以认为 PCR 反应的检测的灵敏度为 5000 个 HPV52 基因组的拷贝 (S2 中 HPV52 基因组的拷贝数)。该反应的成功可以初步证明建立的 HPV52 标准品是成功的。



M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: 阴性对照; 2: HPV18/pBR322;
3: HPV52/pMD18-T; 4: S1; 5: S2; 6: S3; 7: S4; 8: S5

图 17 PCR 鉴定 HPV52 标准品

M1: λ -EcoT14 I digest; M2: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: negative control; 2:
HPV18/pBR322; 3: HPV52/pMD18-T; 4: S1; 5: S2; 6: S3; 7: S4; 8: S5

Fig. 17 PCR identification of HPV52 standard samples

讨 论

宫颈癌是全球女性第二大常见癌症。在发达国家,由于以宫颈组织筛查为手段的预防控制措施的普及,近年来宫颈癌的发病率已呈下降的趋势。然而,在发展中国家,宫颈癌依然是高发癌症,同时也是女性致死比率居于上位的癌症。在亚洲地区,宫颈癌已经取代乳腺癌成为女性第一位的恶性肿瘤。现在的研究已经证实HPV感染是宫颈癌发生最主要的病因。

目前HPV的E6、E7蛋白在宫颈癌中的致癌作用已经得到公认,但E6、E7蛋白编码区及其他ORF基因序列变异及其与致癌作用的相关性尚未明了。国内外围绕HPV的研究主要集中在HPV16和18的基因突变及疫苗研制,但近期研究发现HPV52和58在亚洲国家中引起的子宫颈癌所占比例较西方国家及非洲国家多,有研究提示其感染率在高危人群中可能仅次于HPV16,但针对HPV52基因变异尤其是关于中国地区HPV52基因型的研究仍很缺乏。在分类学上HPV52与目前世界上的研究热点HPV16同属于人乳头瘤病毒科alpha病毒属的第九种,核酸序列具有高度的同源性^[32]。由于HPV52研究的匮乏,而与HPV52具有高度同源性的HPV16研究则相对较多,故在本讨论中,部分将以HPV16的相关研究为参考对本研究结果进行讨论,也有部分结果的分析会以HPV18为参考。

1. HPV感染情况及国内HPV疫苗的研发

本实验前期共收集DNA样品1244例,其中HPV阳性者507例,感染率为40.8%(507/1244)。HPV16的感染率在检出的20种HPV型别中最高,且检出率随病变程度加重明显增加,HPV58和52是分布频率居于第二和第三位的HPV型别,其分布频率也随病变程度加重有升高的趋势,见表2。既往的研究也提示,在亚洲国家,HPV52、58型的分布较高。沈阳丹东地区685名自然人群的妇女中,HPV52所占的比率为2.5%(17/685)仅次于HPV16的3.4%(23/685),居于第二位。Chen等在台湾地区1246名高危妇女中HPV感染率调查结果显示,HPV52感染率为16.5%(206/1246)也是仅次于HPV16的18.5%(230/1246)居于第二位。杨英捷^[33]等对2285名高危高位妇女进行HPV检测发现,前三位的HPV型别分布的顺序为HPV16(15.9%)、58(11.3%)、52(8.5%)。由此可见国内的HPV型别的分布也具有一定的地域性的特点,HPV16依然是宫颈疾病中最重要的HPV型别,52

和 58 是另外两个最重要的 HPV 型别。

目前的 HPV 疫苗的研究主要针对高危型 HPV, 包括预防性疫苗和治疗性疫苗两大类, 其中预防性疫苗主要通过诱导有效的体液免疫应答来抵抗 HPV 感染, 而治疗性疫苗则主要通过刺激细胞免疫应答以清除病毒感染或已变异的细胞。

目前上市的 HPV 预防性疫苗有 Merck 公司的 Gardasil 和 GSK 公司的 Cervarix。Merck 的 Gardasil 疫苗为四价疫苗, 包含了 HPV16、18、6 和 11 等 4 个型别。GSK 的 Cervarix 疫苗为二价疫苗, 仅包含了与宫颈癌相关的 HPV16 和 18 等两个型别^[14-19]。除了 Merck 和 GSK 两家公司外, 还有 Novavax/NCI 的 HPV16 VLP 正在进行临床 2 期试验。目前虽然 Merck 和 GSK 两家公司疫苗的临床实验结果较为理想, 而且已经上市, 但是疫苗的价格昂贵。且我国一般人群的常见 HPV 型别中, HPV18 是较不常见的型别, 与此相反, HPV52 和 58 是仅次于 HPV16 的常见高危型 HPV。由于 HPV 型别分布上具有很强的地域性, 在我国的 HPV52 和 58 易感的人群中, 仅使用 HPV16/18 的疫苗而不覆盖 52 和 58 两个常见型别是否会带来潜在的风险尚未可知。所以在没有对我国的常见 HPV 型别进行全面序列分析的情况下, 直接依照国外的 HPV 基因序列进行疫苗的研发, 应该采取谨慎的态度。

另外, 疫苗的研发也应该考虑 HPV 型内的变异情况。同一型别 HPV 的序列可能具有较强的变异, 例如, 我们发现 HPV52 的 E6 的我国共序与欧洲原型具有重要的氨基酸突变。

所以国内 HPV 疫苗的研发, 应该考虑国内的 HPV 型别分布情况, 疫苗应该可以覆盖国内分布的最主要的 HPV 型别, 例如, 在国内疫苗的研发应该考虑 52 和 58 这两个型别。另外, 疫苗的研发还要考虑主要型别的型别内 HPV 的序列变异情况。

2. HPV52 的型下分类学

HPV 型别的概念建立于上个世纪末, 此外, 随着对 HPV 研究的深入, HPV 的型下的分类学也在逐渐建立之中, 在 1995 年魁北克举行的国际乳头瘤病毒专题讨论 HPV 会议上, 规定了乳头瘤病毒科的属、种、型、亚型以及分离株的概念。简要地, 型、亚型以及变异株之间的核酸变异率为 $>10\%$ 、 $2-10\%$ 以及 $<2\%$ 。然而, 从近年来看, 除了 HPV16 和 18 两个在欧美非常重要的型别外, 其他的 HPV 型别的型下分类学进展并不好, 即使是研究非常深入的 HPV16, 还没有建立起完整的包括型、亚型以及变异株的分类系统。只是通过对于 HPV16 LCR 中 362bp 片段的序列分析, 将 HPV16 分为 5 种主要变异株体系, 且在单个 HPV16 中观察到强烈的

基因间协同变异。然而,有些证据已经证明型下的分类单元之间存在差异较大的致病性。例如,HPV16 的欧洲型、亚洲型、亚美型、非洲 1 型和非洲 2 型等变异株^[34],这些变异株代表着 HPV16 型下的几个重要的分类群,其中亚美型在与腺癌的相关性、鳞癌进展等方面均显示出高于欧洲原型的致病性。

有关 HPV52 的型下分类学的报道非常少,仅有 Taina' Raiol^[35] 等对全球 70 个 HPV52 样品的分析。本研究中,仅对北京地区收集的 HPV52 单独感染的样品进行了这方面的探讨。首先,依照 Taina' Raiol^[35] 和 Calleja-Macias^[36] 等的方法,使用较短的 LCR 片段对本研究涉及的 67 个样品进行了分析,发现:世界范围内的 HPV52 具有一定的地域性^[35-39], HPV52 分离株大致可以分为 4 个组,国内绝大多数的分离株属于亚洲组。其次,尝试着用完整的 LCR 构建了进化树,发现国内的 HPV52 的分组状况与使用 LCR 片段进行的分组结果基本一致。最后,对本研究涉及的其他基因也进行了进化树分析,发现总体上国内 HPV52 分离株的分组结果基本一致。

3. E6 基因编码氨基酸的 K93R 变异

早期蛋白编码区 (ER), 约占 4Kb, 其中所含的基因表达均发生在病毒的基因组复制之前。ER 区基因编码产物的生物学功能主要涉及病毒基因组的复制、转录调节和诱导宿主细胞发生转化。一般情况下, ER 区基因仅在病毒的非生长性感染期或病毒诱导的转化细胞中表达。HPV E6 基因编码的是具有转化活性的蛋白质。E6 蛋白表达位于细胞核内, 约 150 个氨基酸, 分子量为 18KD, 有 4 个 Cys-X-X-Cys 保守序列, 涉及该蛋白质的结合锌和细胞转化功能。HPV E6 蛋白可与肿瘤抑制基因产物 p53 蛋白结合形成复合物, 通过降解抑制 p53 蛋白对细胞周期的负调控功能, 这可能是 E6 蛋白诱导细胞发生转化和永生化的主要机制。此外, E6 蛋白是是多功能的蛋白质, 在细胞内可以与多种蛋白发生相互作用^[40-41]。

目前研究认为高危 HPV 的 E6 和 E7 蛋白都与细胞转化及永生化的相关, E6 蛋白降解抑癌蛋白 p53, E7 主要是破坏 Rb 蛋白来促使细胞的恶性增生。因此 E6/E7 基因的变异与 HPV 的致癌能力直接相关。

HPV 治疗性疫苗的设计主要针对的 E6 和 E7 基因, 作为重要的治疗性疫苗依据, E6/E7 片段基因结构的研究对宫颈癌的治疗有着重要的指导意义。测序成功的 HPV52 标本与欧洲株原型 HPV52 X74481 相比 91.0% (61/67) 存在 E6-K93R 的突变, 变异的频率高达 90% 以上。香港地区也存在着 HPV52 E6-K93R 的变异^[36]。

日本妇女中也存在着 E6-K93R 的变异, 占据的比率为 98% (45/46)^[37]。该位点氨基酸分布的情况给提示我们 HPV 的型别分布及型内变异株的分布呈现一定的地域性分布的特点。由此我们可以认为在国内 E6 氨基酸 93 位上, 占优势分布的为 R 氨基酸。

我们根据已有的 HPV16 的 E6 基因与其他蛋白分子的结合情况, 使用 Discovery Studio2.0 软件进行了同源建模后发现, HPV52 E6 基因编码的 93 位的氨基酸位于 E6 蛋白高级结构的第三个 α 螺旋的末端, 当 93 位的氨基酸为 K 时, K 处于螺旋结构的末端, 当 93 位为 R 时, R 位于 α 螺旋的结构外。A 图是没有发生 E6-K93R 时的 E6 蛋白二级结构, B 图是发生 E6-K93R 突变后的 E6 蛋白的二级结构(球棍模型处的氨基酸表示 E6 基因第 93 位的氨基酸), 见图 18。E6-K93R 的突变引起了 E6 蛋白高级结构的变化, 而蛋白结构的变化往往会于功能的变化相关。

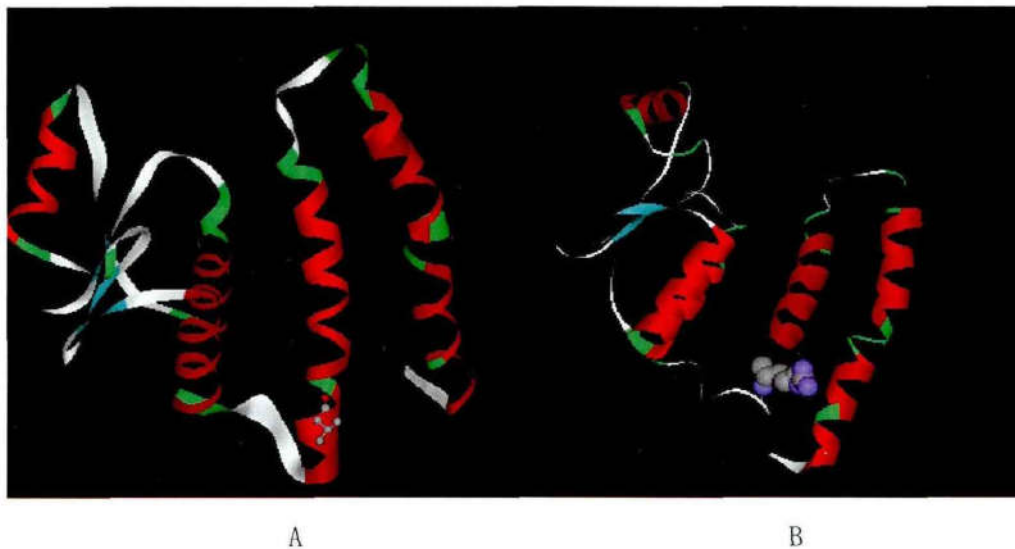


图 18 同源建模的 E6 蛋白二级结构

Fig18 Homology modeling of the secondary Structure of E6 protein

根据现有的 HPV18 型 E6 蛋白的结构域的分析^[45-46], 该突变位点处于 p53 转录反式激活因子。E6-K93R 的突变可能会对 p53 蛋白的转录效率有影响, 可能会上调或者下调 p53 基因的表达。由于 p53 基因的表达与细胞的正常凋亡过程有关, 所以 E6-K93R 的突变有可能会影响细胞的正常凋亡, 并与细胞的增生有关。

4. LCR 区域的变异

上游调控区 (LCR) 区位于 E 区和 L 区之间, 长约 1Kb, 是基因组变异较大的一个区段, 含有乳头瘤病毒基因组 DNA 的复制起点和基因表达所必需的调控元件。HPV 早期和晚期编码区主要受 LCR 的调控。LCR 是非编码基因序列, 含有早期启动子和增强子、沉默子等调节基因结构域, HPV 癌基因 E6、E7 基因的表达直接受到 HPV 早期启动子的控制, 而启动子又受到其余调节结构的调控。增强子区包括许多种细胞转录因子的结合位点, 基因序列变化将影响各种细胞因子的结合从而干涉转录等后续过程。。LCR 序列还包含多个细胞蛋白的结合区域, 包括 API (activator protein 1)、NF1 (nuclear factor 1)、SP1、CEBP (Ccaat enhancer binding proteins)、GRE、NF-IL6、OCT-1、TEF-2、和 YY1 (YY1 transcription factor) ^[10, 47-48] 等。LCR 的突变可通过阻遏子结合位点的缺失和激活因子结合能力的增强而增强 LCR 的启动活性。

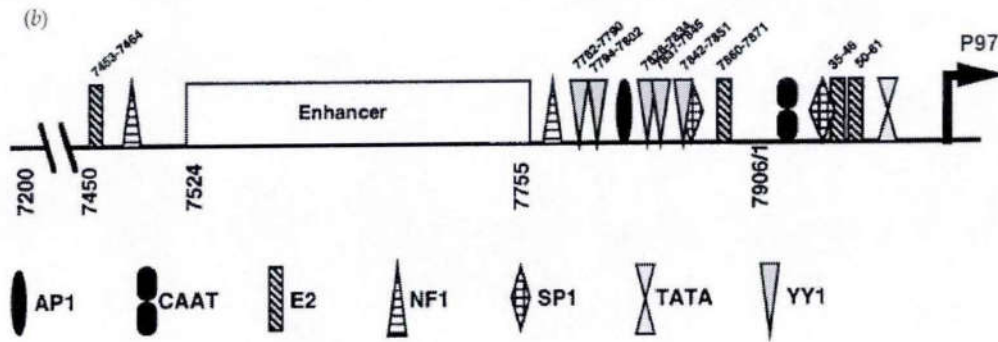
(1) LCR 5 个连续碱基的缺失

63 个测序成功的标本的 LCR 片段与 HPV52 X74481 相比均存在从 7385 位到 7389 位 TGTTA 5 个碱基的缺失突变。Calleja-Macias IE 等对世界范围内 7 个地区的 66 例 HPV52 LCR 序列分析的结果显示, 所有的标本均存在从 7387 位到 7391 位 TTATG 5 个碱基的缺失突变。根据 Calleja-Macias IE 等对 HPV52 X74481 质粒的 LCR 片段重新序列分析结果显示, HPV52 X74481 应该不存在从 7387 位到 7391 位的 TTATG 5 个碱基, 即 GenBank 上的 HPV52 X74481 在 7387 位至 7391 位的碱基序列, 需要进行修正。与修正后的 HPV52 X74481 相比, 国内的所有 HPV52 分离株均存在从 7385 位到 7386 位上 TG 两个碱基的缺失和从 7390 位到 7391 位上 TG 两个碱基的插入 ^[36, 19]。

(2) LCR 中启动子区域的变异分析

启动子序列成分是位于转录起始点附近, 且为转录起始所必须的序列元件, 一般位于转录起始点上游约 200bp 处, 含有能结合转录因子的分散分布的序列元件。目前还没有明确 HPV52 LCR 中启动子区域, HPV 中启动子作用研究最为深入的是 HPV16 和 18。根据 DNA 的同源性以及距离 E6 起始密码子的距离可以估测 HPV52 的 LCR 区各类序列元件的位置 ^[50-56], 见图 19。序列分析的结果显示国内的 HPV52 启动子区域存在着 T7933C 和 A7938G 两种突变, 突变发生的频率分别为

27.0% (17/63) 和 57.1% (36/63)。启动子区基因序列的变化很可能会对启动子的活性有影响, T7933C 和 A7938G 可能会影响早期基因和晚期基因的表达, 但是具体是哪种突变形式会上调或者下调早期基因或晚期基因的表达还需要实验数据的支持。



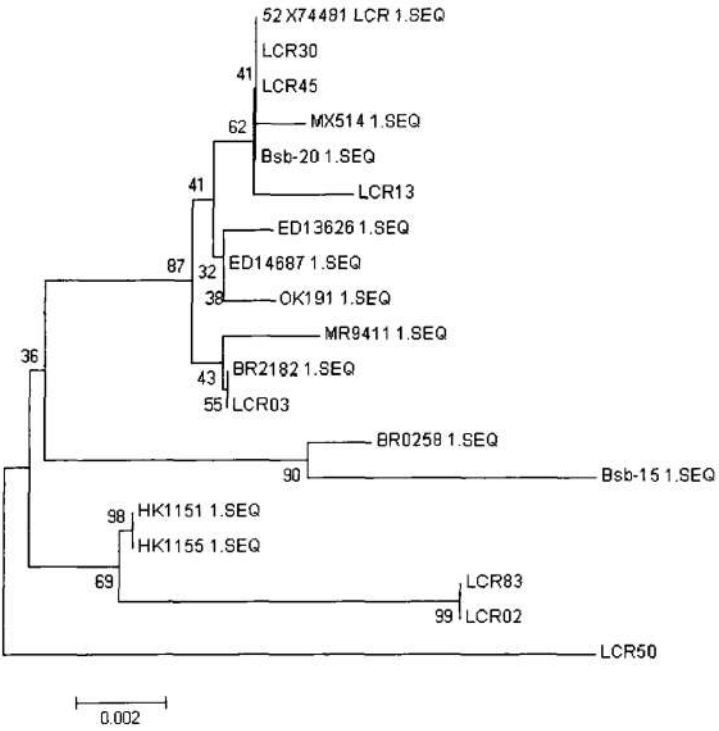


图 20 参照以往的分组标准绘制的进化树 1

Fig. 20 Phyligenetic tree constructed on the current criterion 1

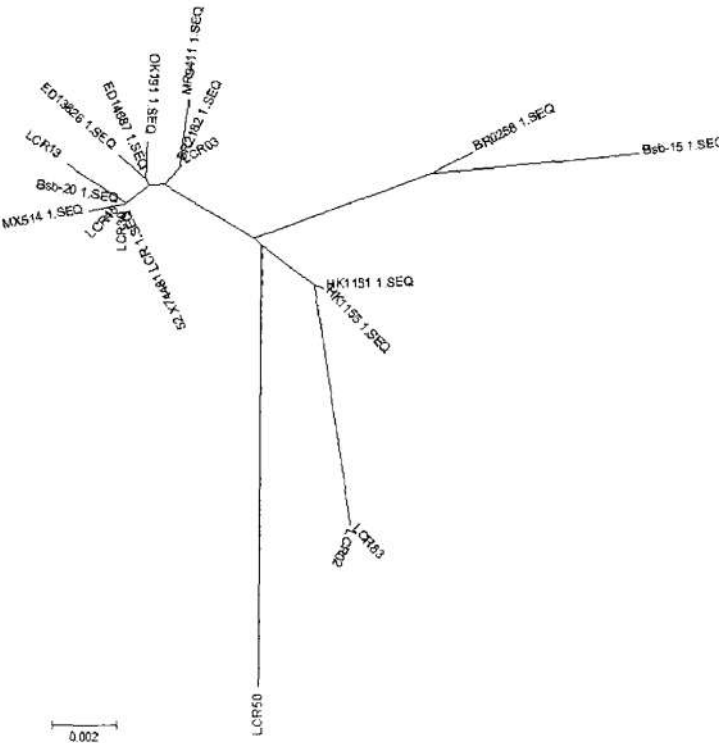


图 21 参照以往的分组标准绘制的进化树 2

Fig. 21 Phyligenetic tree constructed on the current criterion 2

5. 全长的 HPV52 变异情况

目前已经测定的全长的 HPV52 分离株的序列只有 HPV52 X74481, 具体到国内的 HPV52 的全长序列还没有相关研究的报道, 国内存在几种 HPV52 的分离株, 是否存在与 HPV52 X74481 相同的分离株, 各分离株之间序列的同源性情况怎样, 都尚未明确。

(1) 根据全长序列特点进行的分组

5 个全长的 HPV52 分离株的序列与欧洲株原型序列相比, 差异率均小于 2% (LY30 为 0.1%, 其余 4 个标本为 1.2%)。现行的 HPV 分类是以相同 HPV 型别之间的 L1 基因同源性大于 90%, 同一型别内同一分离株 L1 基因的同源性大于 98% 为标准。虽然与欧洲株原型 HPV52 X74481 的 L1 序列相比, 这 5 个标本的发生变异的情况均低于 2% (LY30 未发生变异, LY09、LY42 和 LY70 突变率为 0.6%, LY34 突变率为 0.7%), 基本上可以认为这 5 个 HPV52 分离株与欧洲株原型同属一个分离株。但是从这 5 个标本的 L1 基因序列及全基因组序列的碱基分布情况来看, 仍可以将其细分, LY30 与 HPV52 X74481 差异较小, 可以分在同一组, LY09、LY34、LY42 和 LY70 的序列分布非常相似, 并且与 LY30 和 HPV52 X74481 在很多位点上存在差异, 所以可以将 LY09、LY34、LY42 和 LY70 分为一组。根据全基因组序列分析的结果, 可以认为国内至少存在着两种 HPV52 分离株, 在分布的频率上可能与欧洲株原型序列相近的一组分布频率较低。

由于进行 HPV52 全长序列分析的分离株的数目较少, 尚不能完全了解国内的 HPV52 全长的序列信息, 但是仍然可以根据现有的信息推测, 国内的 HPV52 全长的序列与欧洲株原型相比较存在着一定的差异, 而且很有可能国内的存在着特有的本土的 HPV52 分离株, 而欧洲株 HPV52 只是一个输入型的分离株, 并且本地的 HPV52 在分布频率上占据着明显的优势。明确了解国内 HPV52 分离株的分布情况, 需要测定更多的 HPV52 分离株的全基因序列。

(2) 28bp 插入突变

在全长的序列分析中发现, 5 个标本中的 4 个标本存在着 E5 基因下游第三位碱基位置开始的 28bp 的插入突变。由于进行过 E5 基因的序列分析的标本在相应位点的序列可以从原始的测序结果中得到。经过核对后发现在测序成功的 56 个标本中, 92.9% (52/56) 的标本存在着相应位置 28bp 的插入突变。这也提示

国内的 HPV52 分离株在 E5 基因下游的第三位碱基开始的 28bp 的序列上可能存在着国内的优势序列。

该插入突变的位置位于 E5 基因的 ORF 外, L2 基因的上游约 200bp 的位置。由于突变的位置处于非编码区, 提示其可能与基因的表达有关。使用 DNASTar 软件模拟分析该突变区及其上游整个 E5 基因的 mRNA 的二级结构, 并计算自由能。发现突变株与原型株的 mRNA 的二级结构存在着明显的差异。如图 22、23。可见, E5 基因下游存在该插入序列的 mRNA 的二级结构的自由能低于不包含插入序列的 mRNA。自由能越小, mRNA 的结果越稳定, 结构的稳定尤其是茎环结构的存在会影响核糖体的移动从而影响翻译效率^[57]。所以插入突变发生以后, E5 基因 mRNA 的自由能变低, 茎环结构增多, mRNA 的表达效率降低。

28bp 的插入突变的发生会降低 E5 基因翻译的效率, 国内 92.9% (52/56) 的标本存在着这样的插入突变, 可以认为在 E5 基因的表达上, 国内大部分的 HPV52 的表达效率都要低于欧洲株原型。

Min. Energy: -341.94 Temperature: 37 GU is allowed

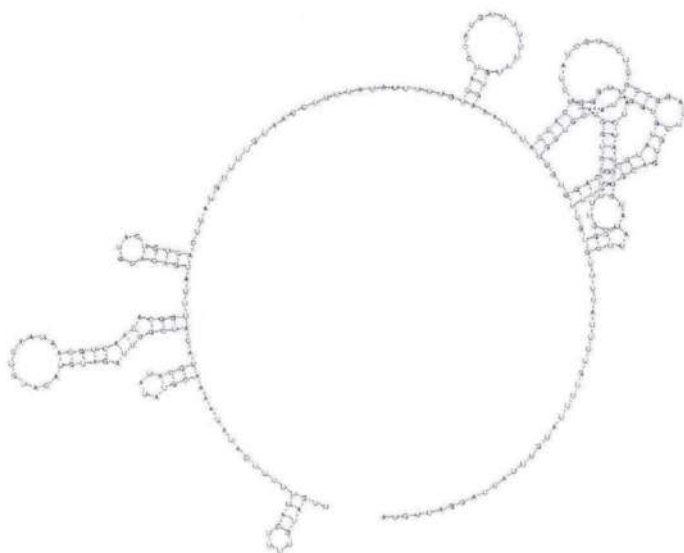


图 22 未发生插入突变的 E5 基因 mRNA 二级结构

Fig. 22 Secondary structure of E5 gene mRNA without 28bp insertion

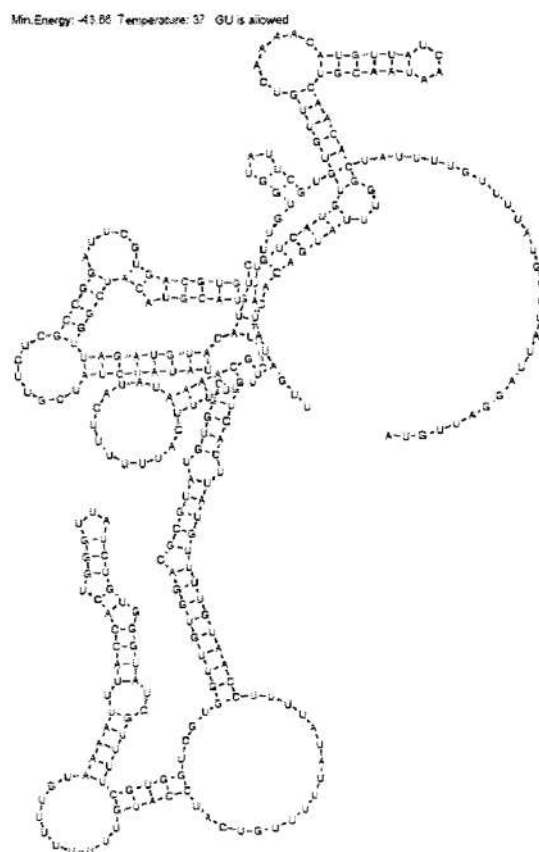


图 23 发生 28bp 的插入突变后的 E5 基因 mRNA 二级结构

Fig. 23 Secondary structure of E5 gene mRNA with 28bp insertion

6. 多位点的协同突变

根据国内 HPV52 分离株的 E5 基因、E5 基因下游区、E6 基因及 E6 蛋白氨基酸、E7 基因和 LCR 片段的变异情况可以归纳出，绝大多数的标本在 E5-A4055G、E5 基因下游第三位碱基开始的 28bp 长度的区域、E6-G350T、E6-A379G(E6-K93R)、E7-C751T、E7-A801G、LCR 片段 12 处碱基突变(G7168C、C7207A、G7371T、C7698G、A7865G、T13C、G7622A、T7624G、A7657C、T7659C、G7712C 和 G7861A) 和两处缺失突变(从 7287 到 7288 位的缺失突变和从 7699 到 7701 位的缺失突变)等位点存在着协同突变。这些发生协同突变的标本在进化树的分析中均属于亚洲株，而与欧洲株进化距离较近的 4 个标本(LY03、LY13、LY30 和 LY45)在相应位点具有明显不同的序列分布特点。这可能是国内 HPV52 分离株的序列分布特点。国内的 HPV52 序列与欧洲株原型相比较在很多位点上存在着差异，可以认为可能国内的存在着特有的本土型的 HPV52 分离株，而欧洲株 HPV52 只是一个输入型的分离株，并且本地的 HPV52 在分布频率上占据着明显的优势。

7. HPV52标准品的意义

目前国际上已经建立的HPV标准样品只有HPV16和18,而作为在亚洲地区分布频率居于上位的HPV52非常有必要建立稳定便利的标准样品,WHO已经开始了这项工作。但是WHO使用的HPV52分离株是否与国内的HPV52分离株相同、是否适用于国内的HPV52相关研究还有待于将来的实验结果。

我们首先建立了以国内HPV52分离株为基础的HPV52全长标准样品。根据初步的实验数据认为我们制作的HPV52标准品可以用于国内HPV52的相关研究。

结 论

1. 在国际上首次建立了可以用于 PCR 扩增的全长 HPV52 标准品。
2. 在本地区高危病人中, HPV52 的检出率仅次于 HPV16、18, 位于第三位, 提示 HPV52 在中国地区的感染率较欧美地区高, 其相关研究具有重要的意义。
3. 在国际上首次分析了 HPV52 分离株的 E5、E7 基因的热点突变; 首次分析了国内 HPV52 分离株的 E6 基因和 LCR 片段的热点突变。国内的 HPV52 分离株 E5、E7 基因水平的突变频率很高, 氨基酸水平的突变频率很低; E6 编码氨基酸普遍存在着 K93R 的突变, 这可能是国内 HPV52 分离株的一个特点; LCR 片段的突变频率很高, 根据 LCR 片段的变异情况可以将国内的 HPV52 分离株大致分为 3 组, 其中国内的大部分分离株属于亚洲组, LY50 是可能是国际上新的分离株; E5 基因下游存在 28bp 的插入突变, 这可能是国内 HPV52 分离株的另一个特点。
4. 国内 HPV52 分离株普遍存在着 E6-K93R、E5 基因、E5 基因下游、E7 基因及 LCR 片段上多处位点的共序, 这可能也是国内 HPV52 分离株的序列分布特点。
5. 完成 HPV52 中国株的全基因组序列分析。

参 考 文 献

- [1] Sapy T, Szikszay A, Konya J, et al. Prevalence of human Papillomavirus infections in our five year Data [J]. Orv Hetil, 2001;142(24): 1265-1268.
- [2] Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus in cervical cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2002;4(2):175-183.
- [3] Pirog EC, Isacson C, Szabolcs MJ, et al. Proliferative activity of benign and neoplastic endocervical epithelium and correlation with HPV DNA detection [J]. Int J Gynecol Pathol, 2002;21(1)22-26.
- [4] Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, et al. Type specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer [J]. N Engl J Med, 1999;341(22):1633-1638
- [5] Munoz N et al.. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. New England J. Medicine. 248: 518-27.
- [6] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cancer worldwide: a meta-analysis. Br J cancer, 2003, 88: 63-73.
- [7] An H J, Cho N H, Lee S Y, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method[J]. Cancer, 2003, 97(7): 1672-1680.
- [8] Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, et al. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. Cancer Res, 2000, 60(21): 6027-6032.
- [9] Lin QQ, Yu SZ, Qu W, Cruz Y, Burk RD. Human papillomavirus types 52 and 58. Int J Cancer. 1998 Jan 30;75(3):484-5.
- [10] Huang S, Afonina I, Miller BA, Beckmann AM. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. Int J Cancer. 1997 Feb 7;70(4):408-11.
- [11] Li LK, Dai M, Clifford GM, et. al. Human papillomavirus infection in Shenyang City, People's Republic of China: A population-based study. Br J Cancer. 2006 Dec 4;95(11):1593-1597.
- [12] Chen CA, Liu CY, Chou HH, et. al. The distribution and differential risks of human papillomavirus genotypes in cervical preinvasive lesions: A Taiwan Cooperative Oncologic Group Study. Int J Gynecol Cancer. 2006 Sep-Oct;16(5):1801-1808.
- [13] Giannoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. J Pathol 2001, 193:295-302.
- [14] Shi L, Sings HL, Bryan JT, Wang B, Wang Y, Mach H, Kosinski M, Washabaugh MW,

- Sitrin R, Barr E. GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development--from bench top to bed-side. Clin Pharmacol Ther. 2007 Feb;81(2):259-64.
- [15] Sharma R, Sharma CL. Quadrivalent human papillomavirus recombinant vaccine: the first vaccine for cervical cancers. J Cancer Res Ther. 2007 Apr-Jun;3(2):92-5.
- [16] Keam SJ, Harper DM. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]. Drugs. 2008;68(3):359-72
- [17] Le Tallec D, Doucet D, Elouahabi A, Harvengt P, Deschuyteneer M, Deschamps M. Cervarix(), the GSK HPV-16/HPV-18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine, demonstrates stability upon long-term storage and under simulated cold chain break conditions. Hum Vaccin. 2009 Jul 19;5(7)
- [18] Keam SJ, Harper DM. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]: profile report. BioDrugs. 2008;22(3):205-8.
- [19] Keam SJ, Harper DM. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]. Drugs. 2008;68(3):359-72.
- [20] WHO HPV LabNet Newsletter No.3, 16 December 2008: 1-9
- [21] Rao PH, Arias-Pulido H, Lu XY, et al. Chromosomal amplifications, 3q gain and deletions of 2q33-q37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma[J]. BMC Cancer, 2004, 4(1):5-6.
- [22] Bulletin. Cervical Cytology Screening[J]. Gynecol Obstet, 2003, 83:237-247
- [23] Segawa T, Yamazaki H, et al. Fragile histidine triad transcription abnormalities and human papillomavirus E6-E7 mRNA expression in the development of cervical carcinoma. Cancer, 1999, 85 (9): 2001-2010.
- [24] 任源, 乌恩奇, 张国楠等. 四川地区宫颈癌 HPV33、52 和 58 型 E6 基因突变分析. 四川肿瘤防治, 2006, 19(1):1-4.
- [25] 邱爱东, 乌恩奇, 任源, 于湘晖, 吴永革, 金英花, 姜春来, 查晓, 孔维, 四川地区宫颈癌患者组织中部分高危 HPV 亚型感染及 E6 基因序列分析中国生物制品学杂志 2006, 19 (5): 441-444
- [26] 曾莉, 郭遂群, 云径平, 谢波, 俞守义. 广东地区宫颈癌 HPV52 型 E6 基因突变分析:, 第三军医大学学报 2007, 29 (12): 1234-1236
- [27] 曾莉, 郭遂群, 云径平, 谢波, 俞守义. 广东地区宫颈癌 HPV52 型 L1 基因突变分析. 广东医学 2007, 28 (6): 906-907
- [28] Eriksn A, et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region [J]. J Gen Virol, 1999, 80 :595~600.
- [29] Christina KJ, Stanley S, Norrild S. Analysis of human papillomavirus type 16 E5

- oncogene expression in vitro and from bicistronic messenger RNAs[J]. *Intervirology*, 1998, 38:339~345.
- [30] Crusius K, Rodriguez I, Alonso A, The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR2independent process in stressed human keratinocytes[J]. *Virus Genes*, 2000, 20:65~9.
- [31] Arany I, Grattendick KJ, Whitehead WE, et al. A functional interferon regulatory factor-1(IRF-1)-binding site in the upstream regulatory region (URR) of human papillomavirus type 16. *Virology*, 2003, 310(2): 280-286.
- [32] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27.
- [33] 杨英捷, 赵健, 李雪倩等. 2285 名妇女生殖道人乳头状瘤病毒筛查分析[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2006, 6:444-445.
- [34] Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 1993 Nov;67(11):6413-23.
- [35] Raiol T, Wyant PS, de Amorim RM, Cerqueira DM, Milanezi NG, Brígido Mde M, Sichero L, Martins CR. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. *J Med Virol*. 2009 Apr;81(4):685-92.
- [36] Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Chu TY, Cubie HA, Cuschieri K, von Knebel-Doeberitz M, Martins CR, Sanchez GI, Bosch FX, Munoz N, Bernard HU. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 2005 Nov;79(21):13630-40.
- [37] Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Yamada M, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Shiromizu K, Fujii T, Taketani Y. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett*. 2001 Sep 10;170(1):19-24.
- [38] Aho J, Hankins C, Tremblay C, Forest P, Poirreaux K, Rouah F, Coutlée F; Canadian Women's HIV Study Group. Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J Infect Dis*. 2004 Jul 1;190(1):46-52.
- [39] Aho J, Hankins C, Tremblay C, Lang F, Forest P, Poirreaux K, Rouah F, Coutlée F; The Canadian Women's HIV Study Group. Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *J Infect Dis*. 2003

Nov 15;188(10):1517-27

- [40] 金奇. 医学分子病毒学. 第一版. 2001. 812-837
- [41] Sedman,S.A., Barbosa,M.S., Vass,W.C., Hubbert,N.I., Haas,J.A., Lowy,D.R.,(1991) The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming transactivating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes65:4860-4866.
- [42] Lamberti,C., Morrissey,L.C., Grossman,S.R., and Androphy,E.J. (1990) Transcriptional by the papillomavirus E6 zinc finger oncoprotein. *EMBO J.* 9:1907-1913.
- [43] Chen,J.J., Reid,C.E., Band,V., and Androphy,E.J. (1995) Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* 269:529-531.
- [44] Halbert,C.L., Demers,G.W., and Galloway,D.A. (1992). The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J. Virol.* 66:2125-2134.
- [45] Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P, Banks L. Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene*. 1994 Jul;9(7):1869-76. Links
- [46] Gerald Myers and Elliot Androphy. The E6 Protein. *III-47. OCT 95.*
- [47] López-Saavedra A, González-Maya L, Ponce-de-León S, García-Carrancá A, Mohar A, Lizano M. Functional implication of sequence variation in the long control region and E2 gene among human papillomavirus type 18 variants. *Arch Virol.* 2009;154(5):747-54.
- [48] Tan SH, Baker CC, Stünkel W, Bernard HU. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology*. 2003 Jan 20;305(2):486-501.
- [49] Shimoda K, Lorincz AT, Temple GF, Lancaster WD. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 1988 Nov;69 (Pt 11):2925-8.
- [50] Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol.* 2000 Aug;81(Pt 8):1975-81.
- [51] Stünkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor MJ, Bernard HU. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *J Virol.* 2000 Mar;74(6):2489-501.
- [52] Zhan D, Santin AD, Liu Y, Parham GP, Li C, Meyers C, Hermonat PL. Binding of the

- human papillomavirus type 16 p97 promoter by the adeno-associated virus Rep78 major regulatory protein correlates with inhibition. *J Biol Chem.* 1999 Oct 29;274(44):31619-24.
- [53] Sichero L, Franco EL, Villa LL. Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis.* 2005 Mar 1;191(5):739-42.
- [54] Romanczuk H, Thierry F, Howley PM. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol.* 1990 Jun;64(6):2849-59.
- [55] Kämmer C, Tommasino M, Syrjänen S, Delius H, Hebling U, Warthorst U, Pfister H, Zehbe I. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer.* 2002 Jan 21;86(2):269-73.
- [56] Dell G, Wilkinson KW, Tranter R, Parish J, Leo Brady R, Gaston K. Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol Biol.* 2003 Dec 12;334(5):979-91.
- [57] Gao W, Rzewski A, Sun H, Robbins PD, Gambotto A. UpGene: Application of a web-based DNA codon optimization algorithm. *Biotechnol Prog.* 2004 Mar-Apr;20(2):443-8.

人乳头瘤病毒疫苗与宫颈癌的疾病控制

从人类最重要的肿瘤之一——宫颈癌的必要致病因子人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 被发现, 一直到 HPV 预防性疫苗的研制成功以及上市, 短短的四分之一个世纪里, 针对 HPV 的疾病控制策略的完善给恶性肿瘤的疾病控制带来了曙光。这是因为在宫颈癌的疾病控制上, 我们不仅可以依据 HPV 作为早期筛查的指标, 现在我们又可以主动地利用疫苗免疫对肿瘤进行预防, 将来我们还有希望利用 HPV 的治疗性疫苗彻底根治宫颈癌。这很有可能是人类第一次利用感染性的病毒彻底完成一个重大恶性肿瘤的疾病控制的典范。

随着 2006 年默沙东 (以下简称 “Merck”) 以及 2007 年葛兰素史克 (以下简称 “GSK”) HPV 预防性疫苗的上市, 在政府政策以及公司政策的推动下, 有关 HPV 的宣传教育在逐步加强, 人们逐渐了解了 HPV 这个名词, 同时也慢慢接受了预防宫颈癌需要注射 HPV 疫苗的概念。我国虽然还没有正式引入疫苗, 但是一般民众也已经开始关注 HPV。本文主要介绍上述 2 家公司的 HPV 疫苗的情况, 然后用比较短的篇幅介绍其他 HPV 疫苗的有关进展。

一、预防性疫苗

1. 疫苗免疫原理

HPV 预防性疫苗的研制成功和早期的病毒样颗粒 (Virus-like particle, VLP) 免疫过程的研究密不可分。人们很早就知道: 具有免疫优势的中和抗原位于主要衣壳蛋白 L1, 而只有具有天然型构象或者基本的五邻体的三级构象的 L1 才能够产生中和抗体。L1 的表达可以形成 VLP, VLP 在形态上和抗原性上几乎与天然的病毒颗粒一样^[1]。有关 VLP 的研究最早可以追溯到 1937 年, Shope 在研究棉尾兔乳头瘤病毒 (cotton tail papillomavirus, CRPV) 时就发现: 在不引起可视的损伤情况下, 具有感染性的提取物, 即 CRPV 对棉尾兔的注射可以诱导对 CRPV¹ 的中和抗体, 同时, 这样的注射可以有效地保护 CRPV 的进攻。从 HPV 疫苗的临床试验结果看, 所有被 VLP 免疫的对象均成为抗体阳性。更重要的, VLP 具有非常高的免疫原性, 与自然条件下的病毒感染相比, 使用 VLP 免疫的个体可以产生高出 10-1000 倍的抗体反应。因此, 使用 VLP 作为预防性疫苗不仅可行, 而且与

¹ 与 HPV 不同, CRPV 可以在体外模型中复制, 便于许多的体外实验。

病毒相比具有更大的优势。

除极少数的情况，HPV 型别间不具有交叉保护的机制。这样，现行的 HPV 预防性疫苗的设计给我们提出了两个问题：（1）疫苗能够保护的型别有限。如果仅考虑宫颈癌的预防，则 Merck 和 GSK 两家疫苗具有仅有 HPV16 和 18 两个型别，除了 HPV16 有可能保护 HPV31 外（两者的同源性非常高），两公司的疫苗对于其他高危型 HPV 感染的阻断效果不会很好。（2）多重 HPV 感染时，其他高危型别与 HPV16/18 是竞争还是协同，还没有明确定论。在这种情况下，我们有理由怀疑疫苗保护了的个体是否更容易感染同源性较差的例如 HPV58 和 52 的感染。还有一点是值得一提的：我国一般人群的常见 HPV 型别中，HPV18 是较不常见的型别，与此相反，HPV58 和 52 是仅次于 HPV16 的常见高危型 HPV^[2-5]。在我国的 HPV58 和 52 易感的人群中，仅使用 HPV16/18 的疫苗而不覆盖 58 和 52 两个常见型别是否会带来潜在的风险，笔者认为是一个需要仔细考虑的问题。

2. 上市疫苗的基本情况

Merck 和 GSK 的疫苗虽然都使用了 L1 基因，但只能从公开资料里知道 GSK 的 HPV16 疫苗使用了临床分离株 GU-1，该株的 L1 基因含有 C 端的缺失突变，表达产物具有较高的免疫原性。在疫苗生产上，Merck 采用酵母发酵以及胞内提取技术，GSK 采用选择了甜菜夜蛾的细胞系进行昆虫表达系统。Merck 的 Gardasil 疫苗为四价疫苗，包含了 HPV16、18、6 和 11 等 4 个型别，每剂量 6/11/16/18 的配方是 20/40/40/20 微克，并添加了铝剂 (Amorphous Aluminum Hydroxyphosphate Sulfate, AAHS)。GSK 的 Cervarix 疫苗为二价疫苗，仅包含了与宫颈癌相关的 HPV16 和 18 等两个型别，每剂量 16/18 是按照 20/20 微克配方的，添加的佐剂为 500 微克的氢氧化铝和 30 微克的 3-O-脱酰单磷酸类脂 A(3-deacylated monophosphoryl lipid A)。两个疫苗都是肌肉注射且注射 3 次，每次 0.5 毫升。Merck 疫苗的注射时间顺序为：0、2 以及 6 个月后，而 GSK 的则是：0、1 以及 6 个月后^[6-11]。

疫苗免疫的持续时间是一个大家非常关注的问题。由于两个疫苗临床 3 期的开始仅仅是最近几年的事情，因而官方的数据表明免疫的持续时间是 4.5 年。但是从早期针对 HPV16 的 VLP 进行的“proof-on-concept”试验的数据看，VLP 免疫后，抗体水平首先达到一个高峰后下降至一个较高水平的平台，平台期抗体水

平比病毒自然感染时的水平至少高一个数量级,同时这样的平台期至少可以维持 48 个月。此外,病毒自然感染状况下,衣壳抗体可以维持 10 年以上的数据也支持疫苗免疫的持续时间会比制药公司官方发表的长。

3. 疫苗的安全性

生产疫苗的两个公司非常注意疫苗的安全性问题。在各自的临床试验中,GSK 要求每次注射后填写 7 天的日志并且在 30 天时见面随访。Merck 要求每次注射后 14 天的日志。总的来说,两个疫苗均为安全并且具有良好的耐受性。注射部位的不良事件(包括疼痛、皮肤变红以及肿胀)上,注射组与安慰剂组差别不大,Merck 的比例分别为 86%和 77%,GSK 为 94%和 88%。全身不良事件(头疼、疲劳、肠胃症状)上,无论哪种疫苗,注射组和安慰剂组的比例也非常地相似。

美国 FDA 和 CDC 特别注意 HPV 预防性疫苗的免疫后追踪,共计有 3 个系统进行免疫后安全性监控,包括:疫苗不良事件报告系统(The Vaccine Adverse Event Reporting System, VAERS)、疫苗安全性数据连接(The Vaccine Safety Datalink, VSD)项目以及临床免疫安全性评估(The Clinical Immunization Safety Assessment, CISA)网络。例如 VAERS 的监测数据显示:截止至 2008 年 12 月 31 日,美国全境已经分发了 2.3 千万盒(每盒包括完整的 3 次注射)Gardasil,仅收到 11,916 份注射该疫苗后的不良事件,相当于 2000 个免疫中只有 1 个不良事件的报告。而在这些报告中 94%被认为是“不严重的”(住院、死亡、永久性残废以及威胁生命的疾病以外的不良事件),仅有 6%的不良事件报告被认为是严重的。所有的“严重”报告均由医学专家仔细分析后,做出不良事件是否与疫苗具有直接关系的结论。在这些严重报告中,主要引起重视的是格林-巴利综合征[Guillain-Barré Syndrome, GBS。又称急性感染多发性神经炎(acute infectious polyneuritis)或急性多发性神经根炎]和死亡。美国 10 岁以上青少年中,每 10 万人中会有 1-2 位患 GBS,许多感染均可以造成 GBS,疫苗安全分析专家的结论也:没有迹象表明 Gardasil 会提高女性免疫后患 GBS 的几率。此外,至 2008 年 12 月 31 日止,已有 32 位女性接受疫苗后的死亡,报告分析后的结果表明这些死亡没有共同的模式,因而不能说这些死亡是由疫苗引起的。总之,美国 FDA 和 CDC 共同承认的疫苗安全性,应该是可信的。

另一方面,上述 2 个疫苗的预防作用非常明显,特别是已经在国外进入临床

4 期试验的 Gardasil。Gardasil 的临床试验样本数已经超过 2 万人，与对照(生理盐水或者疫苗中使用的佐剂)相比，具有显著的效果。临床试验的结果显示，HPV 预防性疫苗可以预防所覆盖的 HPV 型别相关的所有生殖道相关疾病，包括 CIN、VIN、VAIN 等，甚至包括男性的 HPV 相关肿瘤。此外，也有报道表明虽然上述两疫苗仅覆盖了 2 个高危型 HPV 型别，对于 HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 以及 59 等其他 10 种高危型 HPV 型别也具有 38% 的效果。正是因为 16-25 岁年龄组临床试验的成功，2009 年，美国 FDA 已经要求 Merck 提供更多的临床试验结果，尽快开始对高年龄组的临床试验。

二、其他 HPV 疫苗的进展

除了 Merck 和 GSK 两家公司外，还有 Novavax/NCI 的 HPV16 VLP 正在进行临床 2 期试验，BTG International、Berna Bio 以及 GSK/Powerjet 也在开展预防性疫苗的研发。另一方面，近年来的基础研究显示，次要衣壳蛋白 L2 具有可以与其他 HPV 型别交叉反应的中和抗原，因而，来源于某一特定 HPV 型别的 L2 的一个表位就可以作为对多个 HPV 型别进行中和保护。然而，与 L1 相比，L2 具有较低的中和保护作用，L2 是否能够作为预防性疫苗候选还需要经过更深入的研究才能够做出回答。

虽然已经有人研究了 L1 进行宫颈癌治疗的研究，总的来说，其前景并不为多数学者看好。因而，使用 HPV 编码的 L1 以外基因进行治疗性疫苗的研发正在这一领域中成为热点。有关 HPV 早期基因的研究结果显示：对于 LSIL 和 HSIL 需要采取不同的策略进行疫苗设计。由于 LSIL 往往是同质性的，在这类损伤中发生 HPV 的复制，同时，损伤部位细胞的遗传背景比较稳定。因而，LSIL 病人中 HPV 以及宿主细胞的样式相对来说非常类似。而 HSIL 往往是异质性的，HPV 复制处于一种较低的水平，同时细胞因子以及 HLA 的表达发生紊乱。因而，HSIL 病人间甚至是同一病人不同部位间，HPV 以及宿主细胞的样式差距非常之大。就是上述原因决定了 HPV 治疗性疫苗的研发路线。

LSIL 和良性疣的治疗性疫苗中主要选取 E1 和 E2。在家犬的感染模型中，除非是非常高的 E7 表达的情况下，E7 免疫并不能保护对应型别 HPV 的感染，因而 E7 应该不是一个理想的抗原。改造型的 E1 和 E2 在 LSIL 和良性疣的预防和治疗上同时有效，因而，近年来有学者使用 E1 和 E2 与细胞因子或咪唑喹啉

(Imidazoquinoline, IQ) 的组合进行治疗性疫苗的研究。

由于 HSIL 病人中的唯一共同点在于致癌基因 E6 和 E7 的表达, 因而这两个基因是此类病人治疗的唯一候选。我们已经知道即使 CIN3 病人中也可以发生 HPV 的转归, 因而可以推测 CIN3 病人由于 HPV 致癌基因的刺激所造成的自身免疫机制促进了 HPV 的消退。E6、E7 以及 E6-E7 融合基因的相关疫苗的临床试验结果表明, 使用上述两个基因的进行免疫, 在高等级的 CIN、VIN 以及 VAIN 中有一定效果。但是, 由于有关这两个基因致癌的分子机理还不是非常清楚, 一部分学者对于使用这两个基因进行免疫还是抱有非常谨慎的态度。到现在为止, 罗氏公司的几个 E7 疫苗已经分别进入临床 3 期或 2 期试验, 这一进展也鼓舞着我们更深入地探讨 HPV 感染 (特别是肿瘤进展) 过程中免疫机制, 相信随着研究的不断深入, 治疗性疫苗会获得较大突破。

三、今后的 HPV 相关疾病的疾控策略

虽然至 2009 年 2 月, 全世界 HPV 预防性疫苗的累积出货已经达到 4 千万盒, 但是有关 Merck 和 GSK 疫苗的长期效果还没有得到明确结果的情况下, 单纯地依靠疫苗的进行宫颈癌和其他宫颈病变的疾病控制无疑是危险的。

我们知道, 宫颈癌的高发年龄虽然近年来有年轻化的趋势, 但总的来说, 高发人群依然是高年龄层, 特别是 40-60 岁的女性, 这也是美国 FDA 推动疫苗在这高年龄组的临床试验的原因之一。此外, 疫苗的副作用也是各个引入 HPV 疫苗国家关注的问题, 例如, 由于 2009 年早些时候, 西班牙境内发生 2 例疫苗免疫后死亡病例, 西班牙暂停了 Gardasil 在其境内的使用。

我国是一个正处于上升期的发展中国家, 其特点是既有非常发达的超大城市, 如, 北京、上海等城市, 又有中等发达程度的大城市, 如绝大多数的省会城市, 以及非常不发达的西北农村地区。因此, 我们应该参考 WHO 在发达国家和不发达国家的宫颈癌控制政策, 分别对待上述经济发展程度不同的地区。更重要的, 不仅 HPV 型别分布上具有很强的地域性, 例如, 我国的一般人群中的 HPV 常见型为 16、58 和 52 等 3 个型别; 另外, 同一型别 HPV 的序列变异也具有较强的变异, 例如, 我们发现 HPV52 的 E6 的我国共序与欧洲原型具有重要的氨基酸突变。在没有对我国的常见 HPV 型别进行全面序列分析的情况下, 直接依照国外的 HPV 基因序列进行疫苗的研发, 我们表示谨慎的态度。

最后, 应该指出, 即使将来我们可以使用 HPV 的预防性疫苗和治疗性疫苗, 疫苗免疫策略无法替代宫颈癌的早期筛查措施, 这是因为: ①疫苗免疫只能保护个别的 HPV 型别, 如果仅仅使用 VLP 疫苗, 不太可能将更多型别的 HPV VLP 进行免疫; ②疫苗的保护不会是完全的, 同时疫苗寿命也是不明确的; ③HPV 型别的替换无法排除, 即、HPV16 和 18 免疫后, 是否其他型别 HPV 引起的宫颈癌或高等级癌前病变的几率会提高; ④较高年龄组女性无法被免疫策略所覆盖, 她们依然处于风险之中。

参考文献:

- [1] Harro CD, Pang YY, Roden RB, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst*. 2001, 93:284-292.
- [2] Lin QQ, Yu SZ, Qu W, Cruz Y, Burk RD. Human papillomavirus types 52 and 58. *Int J Cancer*. 1998 Jan 30;75(3):484-5. Huang S, Afonina I, Miller BA, Beckmann AM. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer*. 1997 Feb 7;70(4):408-11.
- [3] Li LK, Dai M, Clifford GM, et. al. Human papillomavirus infection in Shenyang City, People's Republic of China: A population-based study. *Br J Cancer*. 2006 Dec 4;95(11):1593-1597.
- [4] Chen CA, Liu CY, Chou HH, et. al. The distribution and differential risks of human papillomavirus genotypes in cervical preinvasive lesions: A Taiwan Cooperative Oncologic Group Study. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Sep-Oct;16(5):1801-1808.
- [5] Huang S, Afonina I, Miller BA, Beckmann AM. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer*. 1997 Feb 7;70(4):408-11.
- [6] Speck LM, Tying SK. Vaccines for the prevention of human papillomavirus infections. *Skin Therapy Lett*. 2006 Jul-Aug;11(6):1-3.
- [7] Siddiqui MA, Perry CM. Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Drugs*. 2006;66(9):1263-71; discussion 1272-3

- [8] Shi L, Sings HL, Bryan JT, Wang B, Wang Y, Mach H, Kosinski M, Washabaugh MW, Sitrin R, Barr E. GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development--from bench top to bed-side. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Feb;81(2):259-64.
- [9] Sharma R, Sharma CL. Quadrivalent human papillomavirus recombinant vaccine: the first vaccine for cervical cancers. *J Cancer Res Ther.* 2007 Apr-Jun;3(2):92-5.
- [10] Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H, Unger ER; Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2007 Mar 23;56(RR-2):1-24.
- [11] Keam SJ, Harper DM. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]. *Drugs.* 2008;68(3):359-72
- [12] Le Tallec D, Doucet D, Elouahabi A, Harvengt P, Deschuyteneer M, Deschamps M. Cervarix(), the GSK HPV-16/HPV-18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine, demonstrates stability upon long-term storage and under simulated cold chain break conditions. *Hum Vaccin.* 2009 Jul 19;5(7)
- [13] Keam SJ, Harper DM. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]: profile report. *BioDrugs.* 2008;22(3):205-8.
- [14] Keam SJ, Harper DM. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]. *Drugs.* 2008;68(3):359-72.

致 谢

在此论文即将完成之际,首先要衷心感谢我的导师周玲研究员三年以来对我的指导、关心和帮助。复试期间的经历我将毕生铭记,因为有周老师的鼓励和帮助我才可以顺利的入学,是周老师给了我这个继续学习的机会,在此要特别向周老师表示感谢。三年来在学业、生活上我又得到了周老师耐心的指导、无微不至的关怀与帮助,我也将铭记终生,并向周老师深表敬意!

衷心感谢曾毅院士,先生深厚的学术造诣和治学严谨的学者风范使我终身难忘!

衷心感谢我的指导老师刘宏图研究员对我的指导和帮助!

感谢叶树清、王湛、王晓莉、杜海军、詹少兵、张磊、王琦等多位老师对我的指导和帮助!感谢杨松梅、王乃福、尉秀霞、李淑英、郭一帆、姚瑶、周正月、吕涛、郝敏、王宝晨、边立华、周媛、赵蕊、李劲涛、张萍等同学给予我的帮助!

感谢曾院士实验室的老师和同学们给予我的无私帮助!

特别感谢科技处王平老师在入学时给予我的帮助以及三年来在多方面给予我的关怀!

在此对所有关心和帮助过我的老师和同学一并致以最诚挚的谢意!

感谢我的家人,感谢他们这么多年来对我的呵护、培养、包容、理解和支持。他们带给我太多的感动,他们是我一直努力的最大动力!

最后感谢各位专家在百忙中审阅论文!