

青岛大学

硕士学位论文

不同阶段宫颈上皮病变组织中人乳头瘤病毒16型转化基因E7和
E5序列多态性分析

姓名：王玉婷

申请学位级别：硕士

专业：妇产科学

指导教师：王言奎

20110529

不同阶段宫颈上皮病变组织中 人乳头瘤病毒 16 型转化基因 E7 和 E5 序列多态性分析

摘 要

目的

HPV16的基因突变存在地域差异,本研究拟通过分析宫颈癌组织中及不同病变宫颈细胞中HPV16E7和E5基因的突变情况,探讨青岛地区不同阶段宫颈上皮病变组织中人乳头瘤病毒16型转化基因E7和E5序列的多态性,以及序列变异与宫颈病变的相关性。

材料与方法

[1] 收集山东青岛地区宫颈癌新鲜组织 120 例,其中宫颈鳞状上皮细胞癌 107 例,腺癌 10 例,腺磷癌 3 例;LCT(液基细胞学检查)标本 300 例,180 例 LSIL(低度鳞状上皮内病变),120 例 HSIL(高度鳞状上皮内病变)。LCT 标本中有临床病理资料的标本共有 144 例,其中包括 59 例正常宫颈组织,8 例 CINI,15 例 CINII,及 62 例宫颈原位癌。

[2] 用蛋白酶K法,OMEGA试剂盒分别提取新鲜组织和细胞DNA。

[3] 以提取的DNA为模板,采用PCR技术,以通用引物筛选出感染高危型HPV的宫颈标本,然后用HPV16型特异性引物筛选出HPV16阳性标本。

[4] 以HPV16阳性标本DNA为模板,扩增E6、E7、E5基因全序列。

[5] 所获基因全序列PCR产物纯化后测序,与德国HPV标准株进行比对分析,寻找HPV16E7和E5的突变位点,并比较热点突变位点突变频率在各组的差异。

结果

[1] 在180例LSIL,120例HSIL,67例 $\leq$ CINI,77例CIN2/3及120例宫颈癌组织中HPV16DNA的检出率分别为19.44%(35/180)、45.83%(55/120)、28.36%(19/67)、36.36%(28/77)、60%(80/120)。

[2] 青岛地区最常的HPV16亚型是AS型,约占55.83%(91/163),其次是E型,约占44.17%(72/163)。

[3] HPV16 E7基因测序成功132例,其中LSIL组28例,HSIL组39例, $\leq$ CINI组14例,CIN2/3组24例,ICC组65例。E7共测得7个突变位点,最常见的是A647G(N29S)。A647G在LSIL,HSIL, $\leq$ CINI,CIN2/3及浸润性宫颈癌中的突变率分别为42.86%(12/28)、51.28%(20/39)、64.29%(9/14),54.17%(13/24),60%(39/65)。

[4] HPV16E5基因测序成功64例,其中LSIL组22例,HSIL组25例, $\leq$ CINI组8例,CIN2/3组18例,ICC组17例。E5共测得5个突变位点,其中2个为错义突变,3个

为无义突变。A3979C(I44L)、A4042G(I65V)和A4077T(无义突变)联合突变出现频率最高,在LSIL、HSIL、 $\leq$ CINI、CIN2/3和ICC组的突变频率分别为68.18% (15/22)、52%(13/25)、75%(6/8)、61.11% (11/18) 和58.82% (11/17)。核苷酸位点3979、4042和4077的联合突变只存在于亚洲株中,且存在于所有的亚洲株中。

结论

[1] HPV16感染与宫颈癌的发生发展密切相关。

[2] 青岛地区流行的HPV16亚型为As型,HPV16AS型比E型具有更高的致癌潜能。

[3] 青岛地区HPV16E7基因最常见的突变位点为A647G (N29S)。该变异可能与癌的发生发展无关而仅仅是地域性的差异。

[4] HPV16E5基因核苷酸位点3979、4042和4077是区分亚洲株和欧洲株的重要位点。

硕士研究生 王玉婷 (妇产科学)

指导教师: 王言奎 教授

关键词: 宫颈疾病; 人乳头瘤病毒 16 型; E7 基因; E5 基因; 突变

Analysis of the relative distribution and gene variation of HPV16 E7 and E5 genes at different stages of cervical lesions

Abstract

Objective

Human papillomavirus type 16 (HPV16) has a number of intratypic variants; each has a different geographical distribution and some are associated with enhanced oncogenic potential. This study was performed to identify sequence variants in the HPV 16 transforming gene E7 and E5 derived from Qingdao women with cervical and noncancerous lesions, and to assess the association between the sequence variant and the cervical lesions.

Materials and Methods

[1] 420 cervical cases consisted of 180 low-grade squamous intraepithelial lesions, 120 high-grade squamous intraepithelial lesions and 120 invasive cervical carcinoma. By histopathologic examination, 264 case biopsies were graded as normal cervical tissues(n=59), cervical intraepithelial neoplasia grade 1(CIN 1, n=8), cervical intraepithelial neoplasia grade 2 (CIN 2, n=15), cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3, n=62), or invasive cervical carcinoma(ICC, n=120) according to the highest grade present within a lesion.

[2] DNA samples were extracted from the cervical scrapes and tissues.

[3] DNA samples were amplified by polymerase chain reaction(PCR) using specific primers for high-risk HPV, HPV16 to identify the positive tissues.

[4] DNA samples extracted from the HPV16 positive tissues were amplified by the primers for E7 and E5.

[5]Then the PCR fragments of HPV16 E7 and E5 genes were purified, sequenced and compared with the type strain.

Results

[1] The positive rate of HPV16 was 19.44% (35 of 180) for LSIL, 45.83% (55 of 120) for HSIL, 28.36% (19 of 67) for =CINI, 36.36% (28 of 77) for CIN2/3 and 60%

(80 of 120) for patients with cervical cancer.

[2] The most frequent HPV 16 branch was type AS(51.52%), followed by type E (48.48%). It was found that AS-positive cervical cancer patients were 10 years younger than E-positive ones.

[3] 65 cases of ICC, 28 cases of LSIL, 39 cases of HSIL, 24 cases of CIN2/3 and 14 cases of =CIN1 were analysed for HPV16 E7 sequence variation. Seven variants of the HPV 16 E7 gene were identified. The A647G(N29S) is the prevalent variant in all analyzed different disease stages being present in 42.86% of LSIL, 51.28% of HSIL, 64.29% of CIN1, 54.17% of CIN2/3 and 60% of ICC.

[4] 22 cases of LSIL, 25 cases of HSIL, 8 cases of =CIN1, 18 cases of CIN2/3 and 17 cases of ICC were analysed for HPV16 E5 sequence variation. 5 variants were identified and only 2 showed an amino acid change. The most frequent E5 variation was A4042G (I65V) in combination with A3979C (I44L) and A4077T (nonsense mutation). The prevalence of A3979C, A4042G and A4077T was 68.18% (15/22) in LSIL, 52% (13/25) in HSIL, 75% (6/8) in =CIN1 cases, 61.11% (11/18) in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 cases and 58.82% (10/17) in invasive cervical carcinoma cases.

Conclusions

[1] HPV16 is associated with the progression of cervical cancer.

[2] HPV16AS lineage is predominant in Qingdao. AS lineage appears to be more oncogenic than E lineage.

[3] The A647G(N29S) is the prevalent variant in Qingdao cervical cancer cases. The results do not show any importance of E7 variants for ICC progression in Qingdao women.

[4] 3979th, 4042th and 4077th nucleotide in E5 gene is the very important site to distinguish the Asia and the Europe prototype strain.

Postgraduate: Yuting Wang Ren(Gynecology)

Directed by Prof: Yankui Wang

KEY WORDS: Cervical diseases; HPV16; E7 gene; E5 gene; variability

引 言

流行病学与基础研究证实，HPV 感染与宫颈上皮内瘤变（cervical intraepithelial neoplasia, CIN）及宫颈癌的发生发展密切相关。高危型人乳头瘤病毒(Human papilloma virus, HPV)，尤其是 HPV16 和 HPV18 型的持续感染是宫颈癌发生和发展过程中最主要的病因。在所有的高危型病毒中，HPV16 是流行程度最广的一种亚型。HPV16 主要通过其早期蛋白 E6、E7、E5 的相互作用来诱发肿瘤。对 HPV16 型病毒全基因组测序后结果显示 感染宫颈的 HPV16 病毒存在多种突变模式，其中 2%的突变位点位于编码区，5%的突变位点位于非编码区^[1]。流行病学研究显示，不同的 HPV16 分支具有不同的致癌潜能，目前认为，这种不同的致癌能力可能与某些基因序列突变有关，如癌基因 E6、E7 某些核苷酸位点的突变，这些突变可以增强 E6、E7 蛋白转化活性。分子病毒学研究表明宫颈组织中肿瘤病毒基因存在变异，此种变异具有地域和种族性发生的特点。目前，世界上很多地区对 HPV16 E6、E7、LCR、L1 和 L2 等基因的多态性进行了探讨，结果都不尽相同，甚至相互矛盾。个别基因位点的突变与宫颈癌发生发展的关系还有待于进一步研究。宫颈癌病毒基因研究的最终目的是为宫颈癌寻求一条早期预防的措施，为阻断疾病提供科学依据。

本研究通过宫颈癌样本的 HPV16 病毒的 E7 和 E5 的测序比对，分析这些位点的突变在青岛地区患者的分布情况，探讨 HPV16 病毒基因突变的发生规律及与宫颈癌发生之间存在的潜在相关性，为以后研制能诱发较高特异性免疫水平的针对中国青岛地区地方株的 HPV16 治疗性疫苗打下基础。中国有关 HPV 基因多态性的研究依然十分缺乏，我们的研究对 HPV 基因突变与宫颈癌关系的研究具有十分重要的意义，能有效地补充国内此方面数据。

第1章 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器

- | | |
|---------------|-----------------|
| (1) PCR 扩增仪 | 美国 PE 公司 |
| (2) 水平电泳仪及电泳槽 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| (3) 凝胶成像系统 | 美国 PE 公司 |
| (4) 高速台式冷冻离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| (5) 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) 超声波水浴仪 | 河北省虹宇仪器设备有限公司 |
| (10) 转盘式微波炉 | 顺德革兰仕电器厂 |

1.1.2 主要试剂

- | | |
|-------------|--------------|
| (1)蛋白酶 K | Takara 公司 |
| (2)Tris 饱和酚 | 北京索莱宝科技有限公司 |
| (3)氯仿 | 烟台三和化学试剂有限公司 |
| (4)无水乙醇 | 烟台三和化学试剂有限公司 |
| (5)PBS | 美国 Gibco 公司 |
| (6)琼脂糖 | Spanish 分装 |
| (7)PCR 试剂盒 | Tiangen 公司 |
| (8)PCR 引物 | 上海生工生物技术公司 |
| (9)Maker | Takara 公司 |

1.1.3 宫颈癌新鲜组织，宫颈脱落细胞

2009 年 8 月至 2010 年 7 月，从在青岛大学医学院附属医院妇科门诊自愿接受下生殖道 LCT(液基细胞学检查)检查的妇女中筛选出 300 例。其中包括 180 例 LSIL（低度鳞状上皮内病变），120 例 HSIL（高度鳞状上皮内病变）。LCT 标本中有临床病理资料的标本共有 144 例，其中包括 59 例正常宫颈组织，8 例 CINI，15 例 CINII，及 62 例宫颈原位癌。120 例浸润宫颈癌组织均取自青岛大学医学院附属医院住院手术病人（2007 年 8 月至 2010 年 7 月），患者均为青岛籍，出生并长期生活在青岛，无在外地的长期居住史。病理学诊断其中 107 例为宫颈鳞状上皮癌，10 例为宫颈腺癌，3 例为宫颈腺鳞癌。组织标本储存于-70℃。LSIL， HSIL 和宫颈癌组患者的中位年龄分别为 39.5 岁(21-60 岁)，42.5 岁(20-69 岁)，46 岁(30-82 岁)。

1.2 方法

1.2.1 新鲜组织或细胞 DNA 的提取及溶解

1.2.1.1 制备裂解缓冲液

1.2.1.1.1 制备 1×HMWbuffer

表 1.1 1×HMWbuffer 制备方案

	起始浓度	配 制 体 积 (ml)	质 量 (g)	终浓度(mM)
Tris 碱	1M	10	0.242	10
NaCl	5M	30	0.753	150
EDTA	250mM	40	0.7445	10
ddH ₂ O		910	200ml	
总体积		990	200ml	

1.2.1.1.2 制备 4ml 裂解液

1×HMWbuffer	3.94ml
蛋白酶 K	20 μ l
10%SDS	40 μ l

1.2.1.2 DNA的提取

[1]将新鲜组织用PBS液冲洗2~3次，无菌眼科剪将组织剪碎至最大径小于5mm，将剪碎的组织移入15 ml离心管。细胞悬液离心后弃上清，取沉淀，用胰酶消化后移入15ml离心管离心，弃液体，加冰冷的D-Hanks液（2-4ml），洗涤3次，1500rpm离心5min，弃上清，留沉淀。

[2]加4ml裂解缓冲液，颠倒混匀，55℃2h或37℃/42℃水浴过夜。

[3]加入等体积饱和酚，轻柔颠倒混匀20min，3000rpm离心15min。

[4]上层水相移入15ml新离心管，加入等体积饱和酚、氯仿（1：1）混合液，轻柔颠倒混匀20min，3000rpm离心15min。

[5] 上层水相入15ml新离心管，加入2.5倍体积-20℃无水乙醇，颠倒混匀，如出现絮状沉淀，直接将沉淀挑出移入-20℃70%乙醇的1mlEP管中-20℃保存，无沉淀者-20℃过夜。

[6]次日3000rpm离心10min，将絮状沉淀物挑入加有-20℃70%乙醇的1mlEP管中-20℃保存。

[7]使用时挑取少量沉淀入新EP管中，室温晾干至透明状，加入适量PCR水溶解，保存于4℃备用。

1.2.2 聚合酶链式反应（PCR）

1.2.2.1 引物设计及合成

根据 Seedorf 等^[1]1985 年发表的 HPV16 基因组全序列，应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件分别设计扩增 HPV16E6、E5 和 E7 编码基因的 3 对引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成，引物序列及扩增产物大小见表 1.2。

表 1.2 各基因的引物序列及扩增长度

引物名称	序列(5' → 3')	产物大小
HPV 通用引物	F:CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC	450bp
	R:GCA CAG GGA CAT AAC AT GG	
HPV16 特异性引物	F:AGG GCG TAA CCG AAA TCG GT	140bp
	R:GTT TGC AGC TCT GTG CAT A	
HPV16E5	F:CAG TGT CTA CTG GAT CCA TGT CTA TAT	270bp
	R:ACA TTA TGT ACG AAT TCA TTA TGT AAT TA	
HPV16E7	F: AGA AAC CCA GCT GTA ATC AT	315bp
	R: TTA TGG TTT CTG AGA ACA GA	

1.2.2.2 PCR25μl 反应体系

去离子水	17.8μl
10×buffer	2.5μl
dNTP	200μM
上游引物	20pmol
下游引物	20pmol
TaqDNA 聚合酶	1U
DNA	100-200ng

1.2.2.3 反应条件

依次向 Ep 管内加入相应量的各种试剂，震荡混匀后瞬时离心，加入石蜡油 20μl 覆盖，瞬时离心后，进行 PCR 扩增。每次 PCR 均设阳性及阴性对照，阳照对照为既往阳性标本，阴性对照 2μl DNA 以去离子水代替。目的基因的扩增条件相同,为 95℃ 预变性 5 min; 95℃变性 30s, 55℃复性 30s, 72℃延伸 30s, 共 35 个循环; 热循环结束后 72℃延伸 10min。

1.2.3 实验步骤

β-globin 主要用于检测标本提取产物中 DNA 的质量。以提取的 DNA 为模板，首先用 MY09/MY11 通用引物筛选出高危型 HPV 阳性标本，进而用 HPV16 型特异性引物筛选出 HPV16 阳性标本,对 HPV16 阳性标本进行 E7 和 E5 全序列 PCR 扩增。

1.2.4 扩增产物电泳分析

1.2.4.1 0.5×TBE 缓冲液的制备

硼酸	6.875g
EDTA	0.93g
Tris 碱	13.5g
双蒸水	2500ml

1.2.4.2 制备 1.6%琼脂糖凝胶

[1]称取 0.32g 琼脂糖，移入小烧瓶，量筒量取 20ml 0.5×TBE 缓冲液，移入小烧瓶，轻轻震荡混匀，将瓶口封闭。

[2] 微波炉内中火加热 2min 左右，至琼脂糖完全溶解。

[3] 将小烧瓶置于室温，自然冷却至 50-60℃时加入 1μLEB, 混匀。

[4] 倒入 11 孔或 8 孔模型中，厚度以 3-5mm 为宜，待其自然凝固。

[5] 拔出模型梳，将胶密封保存于 4℃冰箱，备用，胶可保存 1-2 周。

1.2.4.3 电泳分析

取扩增产物 4μl，加入 10×或 6×上样缓冲液 0.5μl 混匀，加样至被 0.5×TBE 缓冲液没过 1mm 的胶孔内，注意勿使样本溢出胶孔，避免标本间交叉污染，将胶摆放整齐，以保证电泳带整齐，100V 恒压电泳 40min 时停止电泳，紫外分光光度仪下观察条带，凝胶成像分析系统分析凝胶并采集图像。

1.2.5 核酸序列测序及分析

PCR 产物纯化后进行双向测序，纯化和测序服务由北京华大基因研究中心提供，测序结果用 DNASTar 软件分析目的基因突变，寻找热点突变位点，分析序列多态性。

1.2.6 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件进行统计处理，计数资料样本率的比较采用卡方检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

第 2 章 结 果

2.1 标本中高危型 HPV 及 HPV16 的扩增结果

PCR扩增产物经1.6%琼脂糖凝胶电泳，凝胶电泳结果显示PCR产物电泳后分别在450bp和140bp处观察到扩增条带。（图2.1、2.2所示）。

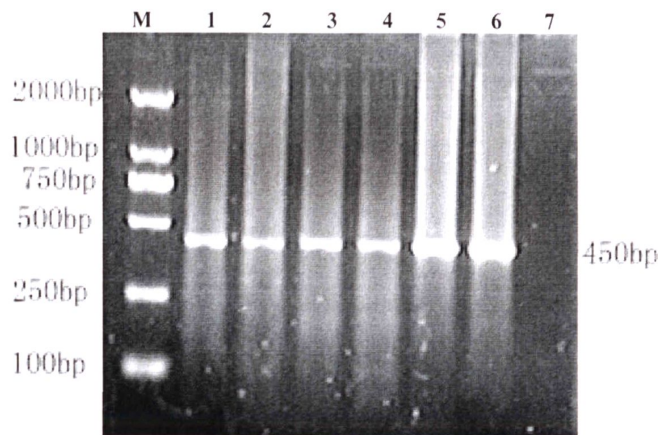


图 2.1 高危型 HPVPCR 结果

M 为 Marker 条带。1-5 为高危型 HPV 阳性标本，6 为阳性对照，7 为阴性对照。

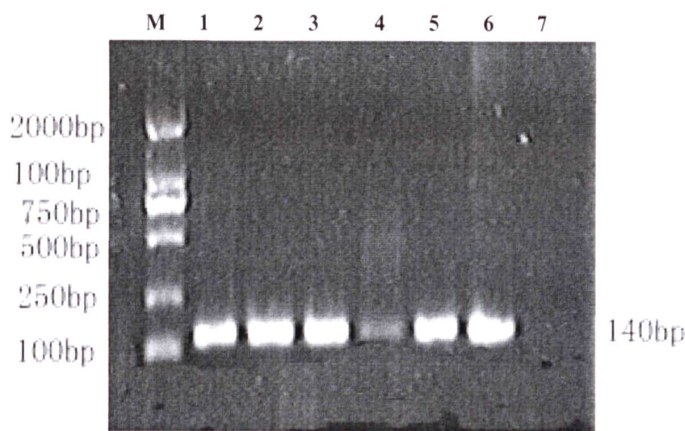


图 2.2 HPV16 筛选结果

M 为 Marker, 1,2,3,5,6,为 HPV16 阳性标本，4 为弱阳性标本，6 为阳性对照，7 为阴性对照

400例山东青岛地区宫颈标本中，高危型HPV扩增出245例（61.25%），HPV16扩增出170例（69.39%）。在180例LSIL，120例HSIL，67例≤CINI，77例CIN2/3及120例宫颈癌组织中HPV16DNA的检出率分别为19.44%（35/180）、45.83%（55/120）、28.36%（19/67）、36.36%（28/77）、60%（80/120）。

2.2 不同宫颈病变患者 HPV16 亚型的分布

E6 基因测序成功的标本共有 163 例。青岛地区最常见的 HPV16 亚型为 As 型，占 55.83%(91/163)，其次是 E 型，占 44.17%(72/163)。LSIL、HSIL 和 ICC 组 As 亚型所占比例分别为 50%、62.26%和 54.17%，三者之间的差异没有统计学意义，结果见表 2.1。≤CINI，CIN2/3 和 ICC 组 As 亚型所占比例分别为 50%、65.63%和 59.15%，三者之间的差异没有统计学意义，结果见表 2.2。感染 HPV16 As 亚型的 ICC 患者中位年龄(41±7.11 岁)比感染 E 亚型(中位年龄 51±7.99 岁)的患者平均小 10 岁。

表 2.1 不同宫颈病变患者 HPV16 亚型的分布

分组	As 亚型	E 亚型	As 亚型所占的比例
LSIL	19	19	50%(19/38)
HSIL	33	20	62.26%(33/53)
ICC	39	33	54.17%(39/72)
总数	91	72	55.83%(91/163)

表 2.2 不同宫颈病变患者 HPV16 亚型的分布

分组	As 亚型	E 亚型	AS 亚型所占的比例
≤CIN I	9	9	50%
CINII +CINIII	21	11	65.63%
ICC	42	29	59.15%
总数	72	49	59.50%

2.3HPV16 阳性标本中 E7 和 E5 的扩增结果

以 HPV16 阳性标本 DNA 为模板，利用跨 E7 及 E5 完整阅读框扩增 E7 及 E5 基因，目的片段长度分别为 315bp 及 267bp（图 2.3、2.4、）

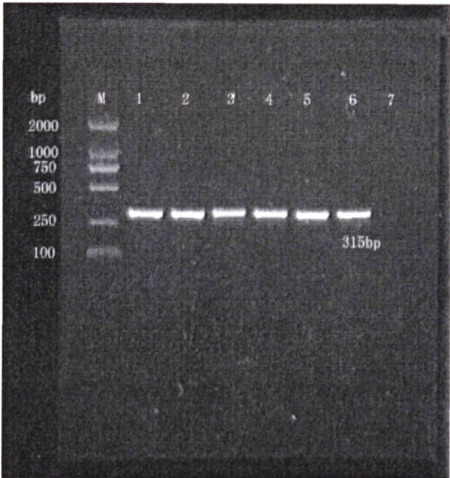


图 2.3 HPV16E7 基因全序列扩增结果

M 为 Marker, 1,2,3,4,5 为 HPV16E6 扩增阳性标本, 6 为阳性对照, 7 为阴性对照。



图 2.4 HPV16E5 基因全序列扩增结果
M 为 Marker, 1, 2, 3, 4, 5 为 HPV16E5 扩增阳性标本, 6 为阳性对照标本, 7 为阴性对照。

HPV16 E7基因测序成功132例，其中LSIL组28例， HSIL组39例， $\leq$ CINI组14例，CIN2/3组24例，ICC组65例。HPV16E5基因测序成功64例，其中LSIL组22例， HSIL组25例， $\leq$ CINI组8例， CIN2/3组18例， ICC组17例。

2.4 基因测序结果

HPV16E7 和 E5 测序后典型突变位点及峰图见图 2.5-2.11。

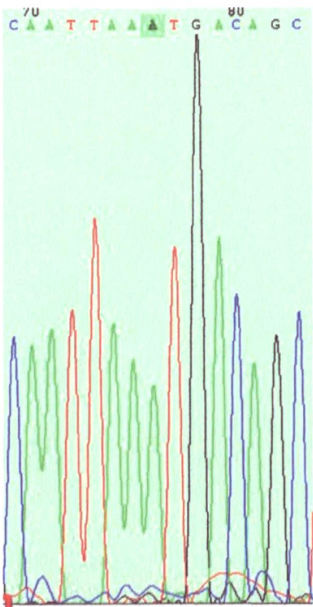


图 2.5 E7 标准株 647 位碱基的峰图

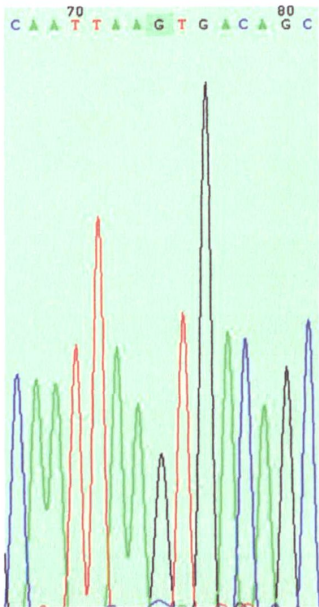


图 2.6 E7A647G 的峰图

2.3.2 HPV16 E5 的测序结果

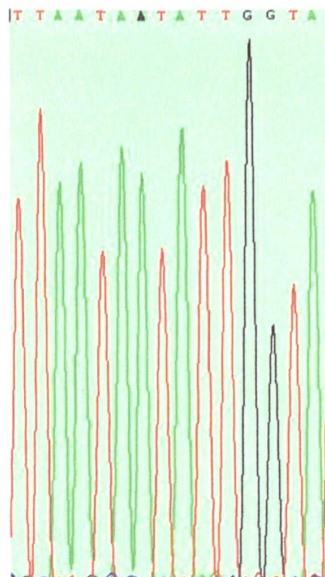


图 2.7 E5 标准株 3979 位碱基的峰图

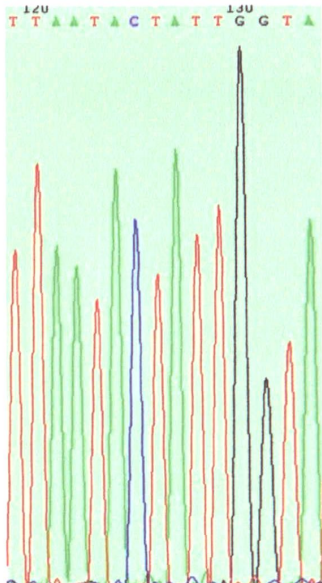


图 2.8 E5A3979C 的峰图

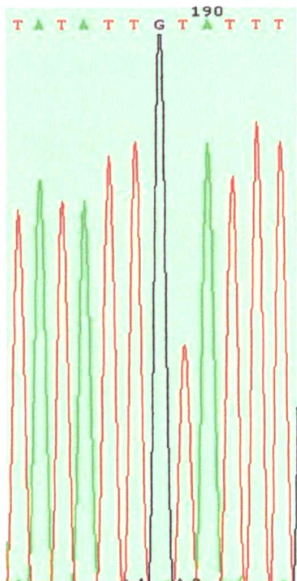


图 2.9 E5A4042G 的峰图

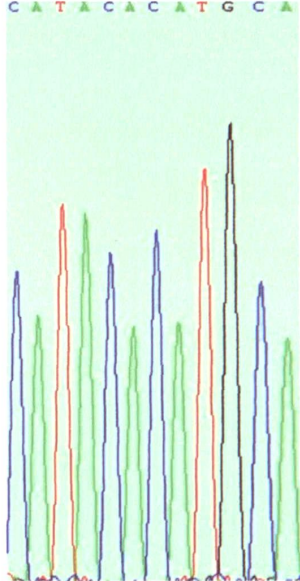


图 2.10 E5 标准株 4077 位碱基的峰图

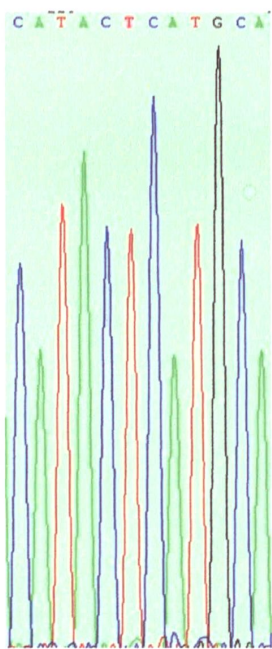


图 2.11 E5A4077T 的峰图

2.5 测序结果分析

2.5.1 HPV16 E7 基因核苷酸序列分析

表 2.3 HPV16E7 基因核苷酸及氨基酸序列的变异情况(一)

分组	原型	突变型							
			647	646	645/647	647/666 *	666 *	760 *	790/836
LSIL n=28	10 (35. 71%)	18 (64. 29%)	11 (39. 29%)	1 (3. 57%)	0	1 (3. 57%)	4 (14. 29%)	0	1 (3. 57%)
HSIL n=39	10 (25. 64%)	29 (74. 36%)	20 (51. 28%)	0	0	0	4 (10. 26%)	5 (12. 82%)	0
ICC n=65	10 (15. 38%)	55 (84. 62%)	35 (53. 85%)	0	1 (1. 54)	3 (4. 62%)	13 (20%)	3 (4. 62%)	0
总数	30	102	66	1	1	4	21	8	1

*表示该突变位点为无义突变。原型中包括 EP-T、E 及 As 亚型中与标准株相同的标本。括号内为突变频率。

表 2.4 HPV16E7 基因核苷酸及氨基酸序列的变异情况（二）

分类	HPV16E7 基因突变位点				氨基酸突变	N	百分比	例数		
	645	647	666*	760*				≤CIN1	CIN2/3	ICC
原型	A	A	G	T		13	12.62%	3	3	7
原型	-	G	A	-	N29S	4	3.88%	1	0	3
原型	-	G	-	-	N29S	2	1.94%	1	0	1
原型	-	-	-	C		7	6.80%	1	3	3
原型	-	-	A	-		7	6.80%	1	3	3
原型	C	G	-	-	L28F, N29S	1	0.97%	0	0	1
E	-	-	-	-		1	0.97%	0	0	1
E	-	-	A	-		10	9.71%	0	0	10
AS	-	-	-	-		4	3.88%	0	2	2
AS	-	G	-	-	N29S	54	52.43%	7	13	34
N	1	61	21	7		103		14	24	65

*表示该突变位点为无义突变。原型中包括 EP-T、E 及 AS 亚型中与标准株相同的标本。括号内为突变频率。

HPV16 E7 基因测序成功 132 例，其中 LSIL 组 28 例， HSIL 组 39 例， ≤CINI 组 14 例， CIN2/3 组 24 例， ICC 组 65 例。以 GenBank 中 K02718/HPV16R 基因序列为原型参照进行比对分析，结果见表 2.3 及 2.4。

如表 2.3 所示，突变型在各组所占的比例分别为 64.29%、74.36%和 84.62%，三组间比较无统计学差异 ($\chi^2=4.260$, $P=0.119$)。共测得 7 个突变位点，其中 4 个为错义突变，3 个为无义突变；只存在 A647G(N29S)突变的突变频率最高，其次为只存在 G666A 突变（无义突变），在 LSIL、HSIL、ICC 组的突变率分别为 39.29%、51.28%、53.85%和 14.29%、10.26%、20%。三组间 A647G 突变频率无显著性差异 ($\chi^2=1.696$, $P=0.428$)，G666A 突变频率也无显著性差异 ($\chi^2=1.862$, $P=0.394$)。E7 基因序列分析表明，只存在 A647G 突变的宫颈组织标本，95.45%（63/66）属于 HPV16As 亚型，另有 3 例 EP-T 亚型， HSIL 组 2 例，宫颈癌组 1 例。

如表 2.4 所示，在扩增成功的 103 例标本中，突变型在 ≤CINI 组， CIN2/3 组和 ICC 组所占的比例分别为 78.57%、87.5%和 89.23%（ $P>0.05$ ）。共测得四个突变位点，两个无错义突变，两个为无义突变。最常见的突变位点是 A647G，在 ≤CINI 组， CIN2/3 组和 ICC 组突变频率分别为 64.29%， 54.17%， 60%（ $P>0.05$ ）。其次为 G666A，在 ≤CINI 组， CIN2/3 组和 ICC 组突变频率分别为 14.29%， 12.5%， 24.62%（ $P>0.05$ ）。

2.5.2 HPV16 E5 基因核苷酸序列分析

结果

表 2.5 HPV16E5 基因核苷酸及氨基酸序列的变异情况（一）

分组	原型	突变型	HPV16E5 基因突变位点						
			3979/ 4042	4042	4042/ 4071 *	3979/4042/ 4077 *	3979/4042/40 90 *	3979/4042/ 4077*/4090*	
LSIL n=22	0	22 (100%)	3 (13.64%)	0	3 (13.64%)	15 (68.18%)	1 (4.55%)	0	
HSIL n=25	0	25 (100%)	5 (20%)	6 (24%)	0	13 (52%)	0	1 (4%)	
ICC n=17	0	17 (100%)	3 (17.65%)	2 (11.76)	1 (5.88%)	10 (58.82%)	1 (5.88%)	0	
总数	0	64	11	8	4	38	2	1	

表 2.6 HPV16E5 基因核苷酸及氨基酸序列的变异情况（二）

分类	HPV16E5 基因突变位点					氨基酸突变	N	百分比	例数		
	3979	4042	4071	4077	4090				≤CIN1	CIN2/3	ICC
原型	A	A	A	A	T		0		0	0	0
原型	-	G	-	-	-	I65V	7	16.28%	1	5	1
原型	-	G	c	-	-	I65V	2	4.65%	0	1	1
原型	C	G	-	-	-	I44L, I65V	4	9.30%	1	1	2
原型	C	G	-	-	c	I44L, I65V	1	2.33%	0	0	1
E	-	G	-	-	-	I65V	1	2.33%	0	0	1
E	C	G	-	-	-	I44L, I65V	1	2.33%	0	0	1
AS	C	G	-	t	-	I44L, I65V	27	62.79%	6	11	10
	33	43	2	27	1		43		8	18	17

HPV16E5基因测序成功64例，其中LSIL组22例， HSIL组25例， ≤CINI组8例， CIN2/3组18例， ICC组17例。以GenBank中K02718/HPV16R基因序列为原型参照进行比对分析，结果见表2.5及2.6。

如表2.5所示，测序结果显示没有发现原型株，因为4042核苷酸位点均发生突变；共测得5个突变位点，其中2个为错义突变，3个为无义突变。A3979C(I44L)、A4042G(I65V)和A4077T(无义突变)联合突变出现频率最高，在LSIL、HSIL和ICC组的突变频率分别为68.18%、52%和58.82%，三组间无显著性差异($\chi^2=1.273$ ， $P=0.529$)。

如表 2.6 所示，A3979C(I44L)、A4042G(I65V)和 A4077T(无义突变)联合突变出现频率最高，在≤CINI 组，CIN2/3 组和 ICC 组所占的比例分别为 75%、61.11%和 58.82% ($P>0.05$)。

2.5.3 HPV16 E7 和 E5 基因突变

表 2.7 HPV16 E7 和 E5 基因突变

HPV16		分组		
16E7	16E5	LSIL	HSIL	ICC
原型	原型	0	0	0
原型	突变型	4	5	3
突变型	原型	0	0	0
突变型	突变型	16	15	12
A647G	E5L	12	10	8
总数		20	20	15
共同突变率(%)		80	75	80

所有 HPV16 阳性的标本中，E7 和 E5 基因均扩增成功的标本共有 55 例，其中 LSIL 组 20 例， HSIL 组 20 例， ICC 组 15 例。

如表 2.7 所示，LSIL、HSIL 和 ICC 组同时存在 E7 和 E5 基因突变的标本分别为 80%（16/20）、75%(15/20)、80%(12/15)，统计分析 E7 和 E5 基因的共同突变率在各组的分布相似($\chi^2=0.001, P=0.970$)。同时存在 E7 基因 A647G 突变和 E5 基因 A3979C、A4042G、A4077T 联合突变的标本在各组的分布也无显著性差异($\chi^2=0.416, P=0.812$)。

表 2.8 HPV16 E7 和 E5 基因突变（二）

HPV16		分组		
16E7	16E5	≤CINI	CIN2/3	ICC
原型	原型	0	0	0
原型	突变型	1	4	2
突变型	原型	0	0	0
突变型	突变型	5	13	14
总 数		6	17	16
共同突变率(%)		83.33%	76.47%	87.5%

如表 2.8 所示，≤CINI 组，CIN2/3 组和 ICC 组同时存在 E7 和 E5 基因突变的标本分别为 83.33%，76.47%，87.5%（ $P>0.05$ ）。

第3章 讨论

宫颈癌是严重威胁妇女健康、导致妇女死亡的主要恶性肿瘤之一,全球每年新发病例 50 万,死亡 20 万例。我国宫颈癌每年新增发病数超过 13 万,占世界新发病例的 28.8%,每年有 2 万名妇女死于宫颈癌,且近年来发病还呈现年轻化的趋势^[2-5]。因此宫颈癌的防治因此成为热点研究课题。人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)是一组嗜上皮组织的小双链 DNA 病毒,高危型 HPV(包括 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 和 58 型等)感染与宫颈癌发生密切相关,是目前唯一可以完全确认的致癌病毒。国际癌症研究协会(IARC)对已发表的 85 份研究中的 10058 例宫颈癌病例进行分析,发现超过 2/3 的宫颈癌病例与 HPV16 型(51.0%)或 HPV18 型(16.2%)感染有关。研究 HPV16 基因变异情况对病毒感染的诊断、治疗、以及疫苗的研制均具有重要的意义^[6]。目前认为,不同类型的 HPV16 变异株具有不同的生物学活性和致癌潜能^[7-9]。有研究认为,病毒的致癌能力不仅与病毒的类型和变异相关,而且与宿主的免疫活性特别是 HLA 多态性相关。因此变异株的致癌能力具有地域性和种族性的特点^[10]。HPV16 主要通过其早期蛋白 E5、E6、E7 的相互作用诱发肿瘤。在 HPV16 感染引起子宫颈癌的过程中,HPV16 E7 蛋白在感染的细胞内持续稳定表达,并通过与抑癌蛋白 RB 结合,促进其降解,并使细胞进入 S 期,引起细胞转化。虽然 HPV16 E5 蛋白为弱转化蛋白,但它可与多种细胞生长因子受体结合从而刺激细胞增殖^[11]。因此,在 HPV 致宫颈癌的检测分析和宫颈癌发生分子机制的研究中,对 E7 和 E5 基因的检测和分析是十分重要的。

3.1 HPV16E7和E5基因的结构和功能

HPV16 基因组包括 6 个早期转录基因(E),2 个晚期转录基因(L)和 1 个长调控区(LCR),其中 E6 和 E7 基因在宫颈上皮细胞增殖及永生化过程中发挥着重要作用。E6、E7 基因是重要的导致宫颈细胞恶化的转录基因,其表达产物 E6 和 E7 原癌蛋白在宫颈癌发生、发展过程中起着至关重要的作用,E6、E7 转化蛋白与细胞癌基因和抑癌基因之间的相互作用是高危型 HPV 导致宫颈癌的关键^[12]。

E6 蛋白是小分子量的核磷蛋白,可与 p53 结合促进 p53 蛋白的降解,导致 p53 功能减弱或丧失,使 p53 对细胞增殖周期相关因子 p21, PCNA, Cyclins 以及 Cdk 等的调控作用丧失,最终细胞 DNA 损伤累积细胞发生癌变^[13]。E7 基因编码多功能核磷蛋白,单独作用即可转化 NIH3T3 细胞,与活化的 Ras 基因共转染可转化人上皮细胞。而抑癌基因 RB 编码产物 pRB 蛋白具有调节细胞生长的功能,次磷酸化的 pRB 可通过结合转录因子 E2F 抑制细胞增殖,磷酸化的 pRB 则失去对细胞生长的控制,E7 蛋白可干扰抑癌蛋白 RB 与 E2F 结合而导致细胞增殖周期的紊乱^[14]。E6 蛋白与肿瘤生长抑制因子 p53 以及 E7 蛋白与肿瘤抑制蛋白 RB 的结合,可使 p53 和

pRB 失去抑癌效应, 导致细胞生长失控, 逐渐获得不死性, 进而转化为癌细胞。这就提示减少或封闭 HPV 阳性肿瘤细胞中 E6 和 E7 基因的表达可恢复内源性抑癌基因的活性, 从而阻止肿瘤细胞的增殖, 为宫颈癌的治疗提供新的途径。E5 基因能够与 PDGF1 P 受体、表皮生长因子受体(EGF-R) 相结合, 形成稳定的复合物, 导致多种原癌基因的过表达, 刺激细胞飞速增长^[15]; 能够抑制永生化的人类角质化细胞中 p21 抑癌基因的表达, 并使受感染细胞耐受物理和化学损伤^[16], 也可逃避宿主细胞免疫监视, 并协同 E7 刺激细胞增殖^[17,18]。

3.2 HPV16 亚型的分布

1997 年, Takashi Yamada 通过对五大洲 22 个国家 400 多例 HPV16 阳性标本进行测序, 发现 HPV16 病毒存在多种突变模式, 根据这些突变位点的差异, HPV16 能进一步细分为 6 个分支: 欧洲型(E)、亚洲型(As)、亚美型(AA)、非洲 1 型(Af1)、非洲 2 型(Af2)、北美型(NA)。许多研究结果表明, 非欧洲型比欧洲型具有更高的致癌潜能, 患者年轻化且预后较差^[19-21]。

青岛地区 HPV16E 型和 AS 型的分布占了绝对主导地位(100%)。该结果与北京地区一致^[22], 但在吴玉萍的研究中, 发现个别 Af 亚型的存在^[23]。熊光武等^[22]研究结果显示: 在 31 例宫颈癌患者中 As 型(54.8%)和 E 型(45.2%)的分布占了绝对的主导地位(100%)。吴玉萍等^[23]的研究结果显示: 55 例宫颈癌患者中, AS 型占 62.27% (37/55), E 型占 27.27% (15/55), Af 型占 5.45% (3/55)。由此我们认为, 与世界其他地域 HPV16 的流行情况不同, 在中国 As 型是流行程度最广的一种分支, 其次是 E 型为欧洲型(E)。我们的研究还发现 AS 亚型宫颈癌患者的中位年龄明显低于 E 亚型患者, 感染 HPV16AS 型的宫颈癌患者年轻化的趋势有可能是 AS 亚型具有更高潜在致癌能力的表现。非欧洲型比欧洲型 HPV16 具有更高的潜在致癌能力, 该观点已在墨西哥, 意大利以及中国多次提出^[21-24]。熊光武等^[22]的研究表明按 35 岁分组, 年轻宫颈癌组中 As 型的分布频率(66.7%)要高于中老年宫颈癌组(47.4%); 相应地 E 型的分布频率(33.3%)则要低于中老年宫颈癌组(52.7%)。吴玉萍等^[23]的研究也表明, 感染 HPV16E 型的宫颈癌患者中位年龄是 50.54 ± 10.91 岁, 而感染 AS 型患者的中位年龄为 42.98 ± 10.43 岁, 比感染 E 型的患者平均年轻 8 岁。

3.3 HPV16E7、E5 的突变情况

本研究结果显示 HPV16 E7 基因 A647G 为高频突变位点, 与我国其它地区, 如广东、四川、湖北、北京、南昌、大连以及香港等地结果一致^[22,23,25,26]。但上述地区还检测到 T846C(无义突变) 高频突变位点, 而我们在青岛地区各种宫颈组织中未检测到 T846C 的变异。E7 基因与抑癌蛋白 Rb 的相互作用被认为是导致宫颈癌的主要因素, E7 蛋白第 21-34 位氨基酸为抑癌蛋白 Rb 的结合区^[27], N29S 变异可能会影响到二者的结合, 阻碍了 Rb 介导的细胞凋亡, 从而导致 HPV 的持续感染。世界各地对

A647G 位点突变与宫颈癌关系的研究结果不尽相同,甚至相互矛盾。Song 等对韩国妇女的研究显示, A647G(N29S)的突变率随宫颈病变程度的加重而升高,提示其与宫颈癌的发生发展有关^[28]。杨英捷等对北京及张帆等对湖北省的研究也得出了相似的结论^[29, 30]。而我们的研究则显示 A647G 在各组的突变频率无显著性差异,表明 A647G 与宫颈癌的发生发展没有关系,与我国四川省以及日本和德国的研究结果一致^[1,31,32]。鉴于 A647G 为 As 亚型的典型突变, A647G 是否为导致 As 亚型具有更高致癌性的原因,有待于进一步的研究。绝大部分 A647G 变存在于 HPV16 As 亚型,只有少数 E 型存在该位点突变。Choi 等对韩国性工作者的研究显示 A647G 与宫颈癌的发生发展没有关系,而是一个区分 As 亚型和 E 亚型的特异性位点,即 A647G 核苷酸突变仅仅是地域性的差异^[33]。虽然 A645C(L28F)的变异只在一例宫颈癌组织中发现,但是在韩国妇女的宫颈组织中,可达到 19% 的发生率^[34],且在日本和意大利也有该突变的存在^[32,35]。另有 ASCUS 病人的宫颈细胞中,发现一例 A646C(N29S)的变异,该变异从未被报道过。

有关 HPV16 E5 基因多态性的研究较少,Eriksson 等^[36]研究发现 A3979C 和 A4042G 点突变广泛存在于 HPV16 As 型和 E 型中,而 A3979C, A4042G 和 A4077T 是 As 亚型的典型突变。我们在绝大部分 As 亚型中均检测到 A3979C, A4042G 和 A4077T 的联合突变,且未在 E 亚型中检测到该联合突变,说明 E5 基因 3979、4042 和 4077 位点是区分亚洲株和欧洲株的重要位点。在台湾地区该联合突变也最为常见,正常宫颈组织和宫颈癌中的突变率分别为 12.5% (1/8) 和 50% (7/14)^[37]。我们的研究显示, E5 基因高度保守,突变位点比较集中,主要是 A3979C, A4042G 和 A4077T 突变,这三个位点的联合突变在不同宫颈病变中的分布无明显差异。我们的研究倾向于认为, E5 基因突变与宫颈癌的发生发展无明显关系,世界各地 E5 基因序列差异主要表现为地域性的不同。

E7/E5 基因序列联合分析, A647G/A3979C/A4042G/A4077T 在不同宫颈病变组的检出率十分相似,表明该联合突变与宫颈癌的发生无明显关系。

青岛地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 癌基因存在多种序列变异,其可能与病毒致癌潜能和宫颈癌的发生发展无关; E5 基因的三个常见突变位点未发现与宫颈癌发生发展的关系;青岛地区宫颈癌患者中 As 和 E 型是两种最主要的 HPV16 分支, As 型可能比 E 型具有更高的致癌潜能。目前,国际范围内并没有针对 HPV16 各致癌基因与宫颈癌的关系形成统一的定论,仍需要一个大样本的全球性的研究来达成共识。

结论

[1] HPV16感染与宫颈癌的发生发展密切相关。

[2] 青岛地区流行的HPV16亚型为As型, HPV16AS型比E型具有更高的致癌潜能。

[3] 青岛地区HPV16E7基因最常见的突变位点为A647G (N29S)。该变异可能与癌的发生发展无关而仅仅是地域性的差异。

[4] HPV16E5基因核苷酸位点3979、4042和4077是区分亚洲株和欧洲株的重要位点。

参考文献

1. Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 1985, 145(1): 181-185.
2. 曹泽毅. 中华妇产科学. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 1749.
3. World Cancer Research Fund in Association with American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective. Menasha American Institute for Cancer Research, 1997, 30-308.
4. 乔友林, 章文华, 李凌, 等. 子宫颈癌基因筛查方法的横断面比较研究. 中国医学科学院学报, 2002, 24(1): 50
5. 李隆玉, 李诚信. 宫颈部的预防及普查. 中国实用妇科与产科杂志. 2003, 19(3): 151-152.
6. Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R, Batra S, Das BC. 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 Clin Microbiol*, 2008, 46(3): 1060-1066.
7. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 1998, 58(4): 829-833.
8. Andersson S, Alemi M, Rylander E, Strand A, Larsson B, Sallstrom J, Wilander E. Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer*, 2000, 83(3): 307-310.
9. Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol*, 1996, 70(10): 6987-6993.
10. Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, Tang X, Yasugi T, Kawana K, Sekiya S, Hirai Y, Kukimoto I, Kanda T, Taketani Y. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett*, 2000, 156(2): 159-165.
11. Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, Roman A. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*. 2003 May 25;310(1):100-8.
12. 徐波, 胡丽娜, 顾美礼. 人乳头瘤病毒 E6、E7 原癌蛋白致癌的机制. 国外医学妇产科分册, 2001, 28 (4): 198
13. Wsierska-Gadek J, Horky M. How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1010:266-72
14. Imai Y, Matsushima Y, Sugimura T, Terada M. Purification and characterization of human papillomavirus type 16 E7 protein with preferential binding capacity to the underphosphorylated form of retinoblastoma gene product. *J Virol*. 1991 Sep;65(9):4966-72

15. Genter Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res.* 2005 Aug 1;65(15):6534-42.
16. Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol.* 2002 Jan;76(1):220-31.
17. Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, Lee WH, Chen SL. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *J Biomed Sci.* 2001 Mar-Apr;8(2):206-13.
18. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol.* 2006 Dec;151(12):2321-35. Epub 2006 Jul 27.
19. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JM, Stukart MJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stevens FR, Dyer PA, Sinnott P, Stern PL. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer.* 1998, 78(2): 166-171.
20. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 1998, 58(4): 829-833.
21. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. 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 Jul 19;82(2):203-7.
22. 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.
23. Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, He Y, Zhang Y. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol.* 2006 May;87(Pt 5):1181-8.
24. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Sep 5;93(17):1325-30.
25. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Infect Dis.* 2002 Sep 1;186(5):696-700. Epub 2002 Aug 5.
26. 刘欣, 刘国炳, 庞占军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16E7 序列多态性分析. 第一军医大学学报. 2005, 25(10):1272-1275.
27. Jenison SA, Yu XP, Valentine JM, et al. Characterization of human antibody-reactive epitopes encoded by human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol* 1991;65:1208-18.
28. Song YS, Kee SH, Kim JW, et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type

- 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol*. 1997 Aug;66(2):275-81.
29. 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(1):32-34.
30. 张帆,丁晓华,蔡红兵,等.人乳头瘤病毒 16 型转化基因在不同阶段宫颈上皮病毒变组织中的分布及基因变异特点. *中华肿瘤杂志*.2010,32(2):107-110.
31. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Infect Dis*. 2002 Sep 1;186(5):696-700. Epub 2002 Aug 5.
32. 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 Sep;9(1):85-92.
33. Choi BS, Kim SS, Yun H, et al. Distinctive distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S intratypic Asian variants in Korean commercial sex workers. *J Med Virol* 2007;79:426—30.
34. Youk EG, Ku JL, Park JG. Detection and typing of human papillomavirus in anal epidermoid carcinomas: sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus Type 16. *Dis Colon Rectum*.2001.Feb;44(2):236-42.
35. Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, Stellato G, Gregg S, Piccoli R, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Franceschi S, Buonaguro FM. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol*. 2004 Sep;74(1):117-26.
36. Eriksson A, Herron JR, Yamada T, et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterised by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol* 1999;80:595-600.
37. Hsieh CH, Tsao YP, Wang CH, et al. Sequence variants and functional analysis of human papillomavirus type 16 E5 gene in clinical specimens. *Arch Virol*. 2000;145(11):2273-84.

综述

HPV 及其相关基因多态性与宫颈癌的关系

【摘要】 人乳头状瘤病毒 (HPV), 尤其是高危型 HPV16 的持续感染是宫颈癌的主要致病因素, HPV16 E6、E7 蛋白可分别与肿瘤抑制蛋白 p53 和 pRb 结合, 使 p53 通路和 pRb 通路失活, 细胞周期调控异常, 细胞永生, 从而导致宫颈癌的发生。HPV16 存在多种突变位点, 不同 HPV16 变异株具有不同的生物学活性和致癌潜能, 而且变异株的致癌能力具有地域性和种族性的特点, HPV16 变异株可能与宫颈癌的发生发展有关。研究 HPV16 基因变异情况对病毒感染的诊断、治疗、以及疫苗的研制均具有重要的意义。

【关键词】 宫颈疾病; 人乳头状瘤病毒; 基因; 突变

【中图分类号】 R737.33 **【文献标识码】** A

宫颈癌 (Cancer of cervix, CC) 是近年来导致女性死亡的最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率有逐年上升, 近年来还呈现年轻化趋势^[1-4]。因此, 宫颈癌的病因及发病机制的研究一直受到国内外学者的高度重视。人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染特别是高危型 HPV 感染, 如 HPV16, HPV18 等与宫颈癌发生发展的关系已得到肯定, 但感染 HPV 的妇女中, 绝大多数感染为自限性过程, 只有一小部分持续 HPV 感染者, 经过 8-12 年的潜伏期, 才最终发展为高级别的宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasm, CIN) 甚至宫颈癌。这表明除了 HPV 感染, 还存在其他一些危险因素影响宫颈病变的发生发展, 如性生活紊乱、过早性生活、早年分娩、密产、多产、经济状况低下、种族和地理环境等。综上所述, HPV 感染是宫颈癌发生发展的必要但非充分因素^[5], 研究显示 HPV16 存在多种突变位点, 不同 HPV16 变异株具有不同的生物学活性和致癌潜能, 而且变异株的致癌能力具有地域性和种族性的特点。HPV16 变异株可能与宫颈癌的发生发展有关。本文就 HPV 各基因及与宫颈癌的关系的研究新进展做一综述。

一、HPV 和宫颈癌

1974 年 zurHausen 首次提出 HPV 感染与宫颈癌的发生发展密切相关^[6]。后续的研究也显示, 基本上所有的宫颈癌病理样本中均能找到 HPV 病毒, 从而证明了 HPV 感染是宫颈癌发生的重要原因, 也使宫颈癌成为所有人类癌症病变中唯一一个病因明确的癌症。持续 HPV 感染是子宫颈癌能否发生的关键。理论上来说, 杜绝及根除了 HPV 感染就可以消灭宫颈癌。

1、HPV 的分型

根据乳头瘤状病毒命名委员会规定,与已知的核苷酸序列相比,E6,E7和L1开放读码序列相差超过10%者归为新的HPV型别,相差在2%-10%间者归为亚型,编码区相差在2%以内,非编码区相差不超过5%者归为型别突变^[7,8],迄今为止已发现200多种HPV型别,其中40余种可感染生殖道粘膜。依据HPV与生殖系统癌瘤的关系将HPV分类为低危型(Low-oncogenic risk,LR)和高危型(High-oncogenic risk,HR),低危型如HPV6、11、40、42、43、44、53、54、57等,高危型如HPV16、18、26、31、33、45、51、52、55、56、58等。高危型人乳头瘤病毒,尤其是HPV16和HPV18型的持续感染是宫颈癌发生和发展过程中最主要的病因。在所有的高危型病毒中,HPV16是流行程度最广的一种型别。据文献报道,相比其他病毒亚型,HPV16更有可能长期在宫颈上皮内复制生存^[9]和更易导致宫颈上皮内瘤变^[10,11]。Bosch等^[12]对22个国家的1035例宫颈癌样本进行研究发现,92.9%的宫颈癌样本HPVDNA阳性,其中HPV16感染占50%以上,其次为HPV18等。不同的宫颈癌的组织学分型及临床分期与不同HPV型别有关,如宫颈鳞状细胞癌中最常见的是HPV16型,宫颈腺癌中则是以HPV18型^[13];HPV16单独感染或以HPV16感染为主的混合感染引起的病变,临床分期较低,预后较好^[14]。

2、HPV 的结构与功能

1949年Strauss在电镜下发现了HPV,HPV属于乳多空病毒科多瘤病毒亚科,是一组嗜上皮组织的小双链DNA病毒,直径约52-55nm,病毒颗粒含有一条约8000碱基对双链DNA,外包以病毒衣壳,含有72个壳微粒,相对分子质量为 5×10^6 。具有由一条DNA链编码的9个开放读码框架(ORF),9个ORF仅从一条DNA链上译码,HPV基因组分为3个功能区,即约5kbp的早期转录区(early region,E),是病毒复制的必需部分,3kbp的晚期转录区(late region,L),是病毒组装所必需部分,和一长约1kb的长控制区(long control region,LCR),其中包括病毒复制和转录所需要的多个cis元件。

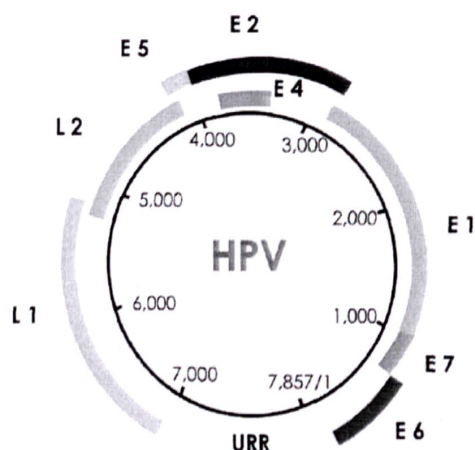


图1 HPV 的结构^[15]

早期转录区包括 E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8，主要调控染色体外的 DNA 复制（见图 1）。其早期区基因编码的蛋白中，E6 和 E7 蛋白是高危型 HPV 的主要转化癌蛋白，可分别通过与 p53 和 pRb 蛋白结合并引起后者的功能性灭活，干扰细胞周期负调控功能，导致某些细胞系的永生化和转化。E1 蛋白可以识别 HPV 复制起点，在病毒复制的起始过程中起着重要作用。E2 蛋白通过抑制基因启动子的转录功能调节 E6 及 E7 的表达。E1 和 E2 蛋白可特异结合 LCR 特定的序列，调节其他基因的转录。E4 蛋白调节病毒的复制和成熟，并具有破坏宿主细胞骨架的作用。E5 是细胞膜或内膜整合蛋白，主要在感染细胞克隆早期的繁殖、扩张中起重要作用。E8 仅存在于 HPV1a 和 HPV5 的变异体中。晚期转录基因包括 L1 和 L2，它们分别是病毒的衣壳蛋白和次要衣壳蛋白，其中 L1 相对保守一些，因具有强免疫原性而多用于 HPV 预防性疫苗的研究。LCR 可与转录因子相互作用，从而调节 E 区和 L 区基因的转录。

3、E6、E7、E5 的致癌机制

E6 在 HPV 感染细胞的过程中，是最先表达的蛋白，定位于核基质及非核膜片段

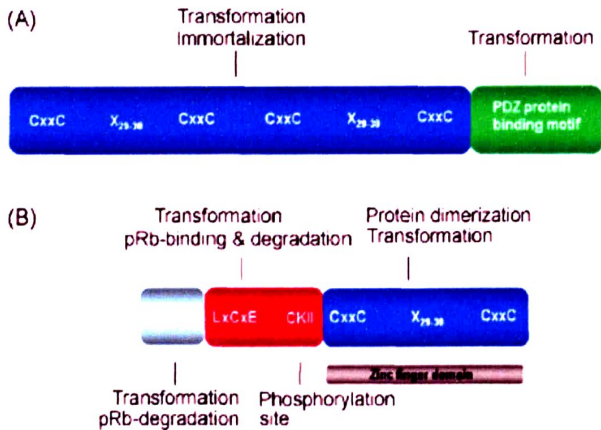


图 2 E6 和 E7 蛋白的结构^[20]

上，体外表达的 E6 蛋白含 151 个氨基酸，分子量为 16-18KD。E6 蛋白的主要结构特征是含有 2 个锌指结构，每个锌指结构的基础是含有 2 个 C-x-x-C(色氨酸-x-x-色氨酸)（见图 2-A），这种结构是所有 HPV E6 所共有，与细胞的恶性转化、转录激活、蛋白间的相互作用等密切相关。在高危型 HPV 中，E6 的 -COOH 端含有 PSD-95/Dlg/ZO1(PDZ)区域，可以与含有 PDZ 区域的蛋白相互作用^[19]。E6 蛋白能特异性结合 p53，促使 p53 快速降解，从而导致细胞周期失控，其效应等同 p53 突变，

这一过程依赖于细胞蛋白 E6-AP。由于 E6-AP 具有泛素连接酶的活性, 可使 p53 的赖氨酸泛素化, 诱导 p53 的降解, 从而也使 p53 诱导下游靶基因 p21, mdm2 和 bax 等的表达而发挥其抗增殖作用; E6 与 E6-AP 的结合也可以抑制 SRC 家族激酶降解, 促进细胞有丝分裂; E6 原癌蛋白是一种多功能蛋白, 它可能通过激活端粒酶而使正常细胞逃避衰老过程中的增殖限制而永生化^[20]; E6 可与干扰素调控因子-3 (IRF-3) 结合, 降低干扰素 β (IFN- β) 的表达, 使病毒逃逸正常的免疫反应; E6 亦可黏附到肿瘤坏死因子 (TNF) 上, 防止其诱导细胞凋亡; E6 还可以与含有 PDZ 区域的底物作用, 诱导泛素介导的降解影响细胞增殖, 细胞极性 & 细胞粘附, 从而诱导 HPV 感染细胞发生恶性转化。

E7 蛋白是 HPV 的主要转化蛋白, 是一个仅有 98 个氨基酸的低分子量酸性蛋白。E7 蛋白有三个保守区 (conserved regions, CR), -NH₂ 端的 CR1 区, 1-15 氨基酸, CR2 区, 16-37 氨基酸, -COOH 端的 CR3 区, 38-98 氨基酸 (见图 2-B)。CR1 区不直接与 pRb 结合, 主要参与细胞转化和 pRb 的降解。CR2 区含有一个 LxCxE (22-26) 位点, 是与 pRb 结合的核心序列; 另外还含有一个酪蛋白激酶 II 的磷酸化位点 (CK II), 包含两个 Ser 残基, 在 HPV16E7 蛋白中被磷化, 从而增强转化细胞的能力。CR3 区包括两个 C-x-x-C 位点, 两个位点间相隔 29/30 个氨基酸。CR3 区形成的锌指与 E7 蛋白二聚体的形成有关, CR3 区可以与 pRb 及其它宿主细胞蛋白结合, 也可以和金属

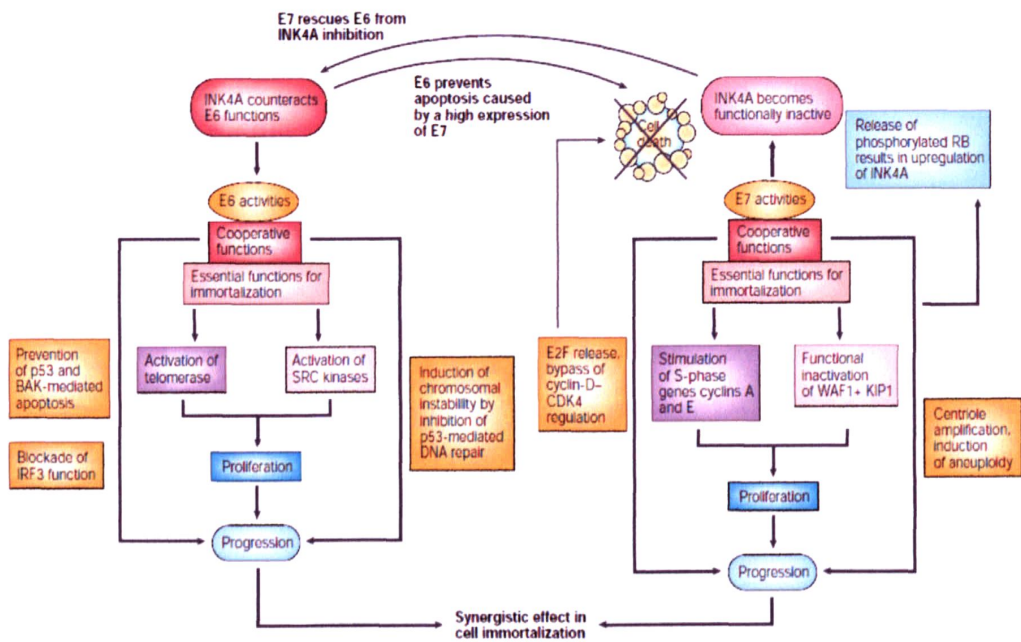


图 3 HPV 的致癌机制^[17]

结合^[18,21]。E7 蛋白的 CTL 识别区主要集中在 CR3 区, E7 的 49~57 位氨基酸表位能

诱导肿瘤清除的细胞毒性 T 淋巴细胞反应, E7 的 72~98 位氨基酸可激活 T 细胞介导的免疫应答。在正常宫颈细胞中, pRb 以非磷酸化状态存在, 并可以与 E2F 结合从而抑制 E2F 的转录活性, 而 E7 与 pRb 的亲和力远远超过 pRb 与 E2F 的亲和力。HPV 病毒感染宫颈细胞后, E7 通过多种途径作用使 E2F 处于游离状态, 恢复其转录活性: 如 E7 与 pRb 结合使 E2F 释放, 通过泛素蛋白酶体通路直接诱导 pRb 降解, 与 pRb 家族的其他成员如 p107, p130 相互作用等, 从而使 G1 期进入 S 期所需的基因得以转录, 细胞周期调控失控, 细胞发生永生化^[16]; 此外, E7 还可以激活细胞周期调节蛋白 A 和 E, 解除 p21, p27 等细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKIs) 对细胞增殖的抑制作用, 同时改变了细胞受损时 p53 介导的细胞生长停滞状态^[22]。

在诱导细胞发生永生化的过程中, E6、E7除了其独立的作用途径外, 还可以通过协同作用提高细胞的转化效率。E6、E7基因转化细胞主要有两条途径, 一是E6、E7基因本身高度复制和转录, 通过激活整合部位原癌基因而引发癌变; 二是高倍表达的E6蛋白、E7蛋白分别与 P53结合、pRB结合, 激发细胞分裂增殖, 加速细胞无限制生长。

HPV 16 的 E5 蛋白位于高尔基氏器膜和质膜上, 是 10kD 的疏水蛋白质, 由 2 个功能域组成: 一是氨基端疏水域, 与 E5 蛋白在转化细胞膜或内膜上的插入位置有关; 另一是羧基端的亲水域, 若将羧基端部分注射至休止细胞, 能够诱导细胞 DNA 合成^[23]。E5 基因能诱导 c-fos 基因的表达, c-fos 是早期反应基因, 形成转录因子 AP-1 复合体, 激活一系列细胞生长控制基因。E5 蛋白可引起 con-nexin 43 的脱磷酸作用, 进而阻断细胞间交通, 从而使宿主细胞对癌蛋白 E6/E7 的作用较未感染细胞的调控信号更为易感, 导致癌变^[24, 25]。

高危型 HPV 感染后病毒 DNA 整合到宿主细胞基因组中, E6、E7 癌基因高表达的癌蛋白联合 E5 癌蛋白促进细胞转化和永生^[26]。E6、E7 蛋白整合到宿主基因组后依然保持完整, 然而 E5 蛋白常存在丢失现象, 与 E6、E7 相比明显低表达, 表明 E5 蛋白主要在 HPV 致癌的早期阶段促进瘤样增生, 在肿瘤持续或侵袭阶段作用不明显。E5 蛋白能与上皮细胞生长因子受体(EGF-R) 相结合, 形成稳定的复合物, 与 EGF 共同作用抑制 EGF-R 的降解, 进而刺激增强了 VEGF 的表达, 而 VEGF 在宫颈癌发生的早期起着非常重要的作用, 表明 E5 在肿瘤早期血管形成中起了重要作用。1992 年 Chan 等通过 PCR 扩增 HPV 16 E5 DNA, 结果发现, 早期宫颈癌标本中阳性率明显高于晚期宫颈癌标本中, 使用 PT-PCR 检测结果显示, 早期标本中 E5 mRNA 阳性率明显高于晚期标本中。从而印证了 E5 主要是在肿瘤形成的早期阶段起作用。

二、HPV基因多态性与宫颈癌的关系

大多数妇女一生中都会感染 HPV, 但 70-80% 呈自限性过程, 约经过 7-8 个月可自行清除, 只有 5%-10% 为持续感染, 部分持续感染 HPV 的患者经过要 8-24 个月潜伏期发展为宫颈上皮内瘤变, 其中部分宫颈上皮内瘤变患者又需要平均 10-20 年的潜伏期发展为宫颈癌, 也就是说最终只有不足 1% 的 HPV 感染患者最终发展为宫颈癌^[27,28,29]。也就是说, 宫颈癌的发生发展是一个多因素共同作用的结果^[8]。

1、高危型HPV16的亚型

1985 年, Seedorf 通过对 HPV16 型病毒全基因组进行测序发现, HPV16 病毒存在许多突变位点^[30]。根据不同的突变位点, HPV16 能进一步细分为 6 个分支: 欧洲型(E)、亚洲型(As)、亚美型(AA)、非洲 1 型(Af1)、非洲 2 型(Af2)、北美型(NA)。流行病学研究结果表明, 不同的 HPV16 分支具有不同的致癌潜能, 可能会导致不同的临床结局^[31-33]。

熊光武等^[34]研究结果显示, 北京地区宫颈癌患者中 As 型和 E 型的分布占了绝对的主导地位, 可达 100%。吴玉萍等^[35]的研究结果显示: 55 例宫颈癌患者 AS 型和 E 型共占 94.55% (52/55), 另有 3 例 Af 型占 5.45% (3/55)。由此我们认为, 与欧美地区 HPV16E 型占主导地位不同, 在中国 As 型是流行程度最广的一种分支, 其次是 E 型为欧洲型(E)。非欧洲型比欧洲型 HPV16 具有更高的潜在致癌能力, 该观点已在墨西哥, 意大利以及中国多次提出^[33-36]。熊光武等^[34]的研究表明按 35 岁分组, 年轻宫颈癌组中 As 型的分布频率(66.7%)要高于中老年宫颈癌组(47.4%); 相应地 E 型的分布频率(33.3%)则要低于中老年宫颈癌组(52.7%)。吴玉萍等^[35]的研究也表明, 感染 HPV16E 型的宫颈癌患者中位年龄是 50.54 ± 10.91 岁, 而感染 AS 型患者的中位年龄为 42.98 ± 10.43 岁, 比感染 E 型的患者平均年轻 8 岁。。HPV16AS 亚型是亚型地区最常见的分型, 可能与宫颈癌患者年轻化有关。

2、HPV基因多态性与宫颈癌的关系

研究表明, HPV基因突变株可以改变病毒的致癌性和免疫源性, 从而增强病毒的病原性^[37,38], 使感染HPV16病毒的宫颈组织更易向CIN和宫颈癌进展。有研究显示HPV16德国标准株与病毒的清除及病灶的复原有关系^[39]。HPV基因突变主要在于编码区, 可造成基因编码氨基酸的同义或非同义改变, 其中非同义改变会导致HPV基因编码蛋白构象及功能的变化。HPV病毒感染宿主细胞时为游离状态, 随后病毒核酸整合入宿主细胞, 抗原提呈细胞摄取、加工、处理抗原并将抗原信息提呈给免疫细胞, 诱导人体的细胞免疫和体液免疫, 细胞免疫可以清除体内已感染的HPV病毒, 体液免疫可以产生记忆细胞, 再次感染时可迅速清除入侵的同样抗原。HPV突变体的基因产物, 可能改变HPV抗原决定簇区的性质, 从而使病毒逃脱宿主的免疫反应。突变株造成表达蛋白不同, 从而引起癌蛋白的结构和功能改变, 影响其与其

它癌基因、抑癌基因间的相互作用,造成癌细胞永生化;影响宿主某些肿瘤相关基因的转录,可以诱导细胞由G1期进入S期,使细胞周期的调控机制失控,造成细胞无限增殖。文献显示,HPV突变株可以影响HPV病毒组装、转录、致病能力,导致细胞发生永生化,从而造成HPV的持续感染状态,导致宫颈癌前病变甚至浸润性宫颈癌的发生^[40,41,42-45]; HPV突变株还可能影响PCR的敏感性和特异性。研究表明,含有HPV16E6基因突变的突变株,尤其是含有Q14H、H78Y或者L83V突变位点者可同时导致角质素5和10的异常表达,从而阻止细胞分化、凋亡,促进细胞增殖,最终导致细胞永生化,表明某些特定突变株与标准株相比具有更强的致癌能力^[32]。

目前国外关于HPV病毒基因突变的研究主要集中在HPV16/18的E6、E7和LCR基因。Yamada等^[46]研究发现,宫颈癌组织中HPV16基因突变具有地域性的特征,根据E6、L1、LCR的突变情况将HPV16突变型别分为欧州型(E)、亚洲型(As)、亚美型(AA)、非洲1型(Af1)、非洲2型(Af2)、北美型(NA)。已报道的发生频率最高的E6突变为E350G(L83V)(L83V,即第83位氨基酸由缬氨酸变为亮氨酸),在多个亚洲地区国家宫颈癌组织中检出的另外一种常见HPV16 E6基因突变为T178G(D25E)(D25E,即第25位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸)。E350G/T/L83V是热点中的热点,其在世界各宫颈癌高发区的分布不同:在墨西哥为93.5%^[40],在北美洲为40%,在日本为28%^[32],在东南亚仅为6%。英国和瑞典的研究发现,E6突变株E350G(L83V)可导致HPV的持续感染,并介导宫颈病变由低级向高级转化有关^[47,48]; Londesborough等研究显示该突变与CIN1向CIN3的转化有关^[40];瑞典的研究发现,该突变与浸润性宫颈癌的发生发展有关^[49,50],而意大利和捷克的研究却发现其与宫颈癌的发生发展无明显相关性^[51,52]。新疆地区的研究表明,该地区HPV16E6的高频突变为T350G,占53.6%,其次为标准株(39.6%)^[53]。广东地区的高频突变是T178G^[54]。四川地区E6基因高频突变是T178G/D25E(30.1%),其次为德国标准株(23%),且发现了个别未曾报道的基因突变,如G94A, C173T等^[55]。

E7序列与E6相比相对保守,突变位点较少。最常见的E7突变为A647G(N29S)^[19,20],而E7蛋白第21-29位氨基酸为抑癌蛋白pRb的结合区,N29S变异可能会影响到二者的结合,阻碍了pRb介导的细胞凋亡,从而导致HPV的持续感染。E6和E7基因存在E7 N29S和E6 L83V的协同突变,但是这种协同变异与宫颈癌发生发展的关系尚未明确^[64]。我国湖北、北京、大连地区的高频突变位点G647A/N29S^[56-58]。关于A647G(N29S)与宫颈癌发生发展关系,尚存在争议。Song等对157名韩国妇女的研究显示,A647G(N29S)的突变率随宫颈病变程度的加重而升高,正常组织中A647G突变率为33.33%(3/9),CIN3中为50%(3/6),宫颈癌组织中为70.37%(19/27),提示其与宫颈癌的发生发展有关^[59]。杨英捷等对北京及张帆等对湖北省的研究也得出了相似的结论^[60,61]。张帆等通过对湖北地区36例宫颈炎

组织, 40 例宫颈上皮内瘤变组织, 124 例宫颈癌组织的研究发现: A647G 突变在炎症组为 35% (7/20), 在 CIN 组为 40.9% (9/22), 在癌症组为 70% (21/30), 表明其与宫颈癌的发生发展有关。而我国四川省以及日本和德国的研究结果则表明 A647G(N29S)在不同病变宫颈组织中的分布频率相似, 与宫颈癌的发生发展无关 [62,63]。

世界上关于 E2 突变株的研究相对较少, Sathish N^[65] 等对印度 56 例 HPV16 阳性宫颈组织标本进行研究发现, 印度 E2 基因的主要突变型别为 A2983G、C3516A、A3538C、T3566G、C3684A 以及 T3694A; 法国 115 例和美国 600 例 HPV16 阳性宫颈组织标本^[66,67] 中 E2 的主要突变型别为 C3410T, 即 P219S; 苏格兰和德克萨斯州则为 A2938G、T3384C、C3410T、C3684A、T3205A 以及 T3575G。世界各地宫颈癌患者中 HPV16 L1 基因发生多位点变异, Pande 等人研究了印度北部地区宫颈癌组织, 发现了 13 处变异, 其中包括 4 处新变异。错义突变共有 5 处, 突变频率最高的 A6695C^[68]。国内研究发现新疆南部地区宫颈癌组织 L1 基因有多处突变位点, 其中 6240, 6432, 6901-6902, 6951-6953 都是高频突变位点^[69]。LCR 突变频率最高的位点是位于 YY1 结合区域的 G7521A^[34,70]。有关 HPV16 E5 基因多态性的研究较少, Eriksson 等^[67] 研究发现 A3979C 和 A4042G 点突变广泛存在于 HPV16 As 型和 E 型中, 而 A3979C, A4042G 和 A4077T 是 As 亚型的典型突变。

综上所述, HPV16 是导致宫颈癌发生的必要不充分条件, HPV16 存在多种突变位点, 不同 HPV16 变异株具有不同的生物学活性和致癌潜能, 而且变异株的致癌能力具有地域性和种族性的特点。HPV16 突变位点与宫颈病变发生发展的关系, 尚无定论。

参考文献:

1. 曹泽毅.中华妇产科学.北京:人民卫生出版社,1999.1749.
2. World Cancer Research Fund in Association with American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective. Menasha American Institute for Cancer Research, 1997, 30-308.
3. 乔友林, 章文华, 李凌, 等.子宫颈癌基因筛查方法的横断面比较研究.中国医学科学院学报,2002,24(1): 50.
4. 李隆玉, 李诚信.宫颈部的预防及普查.中国实用妇科与产科杂志,2003, 19(3): 151-1
5. Zur Hausen H. Papillomavimses causing cancer: evasion from hostcell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(2):690-698.
6. Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology, 1991, 184(1):9-13.
7. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, 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.
8. de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1994, 186: 1-12.
9. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. Virology, 2005, 337(1): 76-84.
10. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(14): 1072-1079.
11. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(14): 1066-1071.
12. Bosch FX, Castellsague X, Munoz N, et al. Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(15): 1060-1067.
13. Altekruse 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.
14. Shyu JS, Chen CJ, Chiu CC, et al. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with cervical

- neoplasia in histological typing and clinical stage in Taiwan: an in-situ polymerase chain reaction approach . *J Surg Oncol.*, 2001,78(2):101-109.
15. Boulet G,Horvath C,Broeck DV,Sahebali S,et al.Human papillomavirus:E6 and E7 oncogenes.*Int J B C* ,2007,39:2006-2011.
16. 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.
17. 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.
18. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application . *Nat Rev Cancer*. 2002, 2(5):342-350.
19. 徐波.人乳头瘤病毒 E6、E7 原癌蛋白致癌的机制.国外医学妇产科学分册.2001,28(4):198-200.
20. Fehrmann F,Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Onco*, 2003, 22: 5201-5207.
21. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis[J]. *Viol*,2004,78:11451-11460.
22. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection . *J Am Osteopath Assoc*. 2006,106(3 Suppl 1):S2-S8.
23. 徐铃.人乳头瘤病毒 E5 基因. 国外医学分子生物学分册.1998,20(2):52-54.
24. Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, Alonso A.Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J Virol*. 1995 Jul;69(7):4489-94.
25. Chen SL, Lin YK, Li LY, Tsao YP, Lo HY, Wang WB, Tsai TC. E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol*. 1996 Dec;70(12):8558-63.
26. Pr  tet JL, Charlot JF, Mougin C. Virological and carcinogenic aspects of HPV. *Bull Acad Natl Med*. 2007 Mar;191(3):611-23; discussion 623.
27. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection . *J Am Osteopath Assoc*. 2006,106(3 Suppl 1):S2-S8.
28. Damasus-Awatai G, Freeman-Wang T. Human papillomavirus and cervical screening . *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003,15(6):473-477.
29. 朗景和,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.
30. Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 1985, 145(1): 181-185.
31. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JM, Stukart MJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stevens FR, Dyer PA, Sinnott P, Stern PL. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer*, 1998, 78(2): 166-171.

32. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 1998, 58(4): 829–833.
33. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. 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 Jul 19;82(2):203-7.
34. 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.
35. Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, He Y, Zhang Y. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol*. 2006 May;87(Pt 5):1181-8.
36. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Sep 5;93(17):1325-30.
37. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*,2005, 32 (Suppl. 1):S1–S6.
38. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, 2006,118: 1071–1076.
39. Grodzki M, Besson G, Clavel C, Franceschi S, et al. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev*,2006, 15: 820–822.
40. 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.
41. Zehbe I, Voglino G, Delius H, Wilander E, et al. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*, 1998, 352:1441–1442.
42. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*,2001, 93:315–318.
43. Kimbaurer 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.
44. Rastogi T, Hildesheim A, Sinha R. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nat Rev Cancer*, 2004,4:909–917.
45. Veress G, Murvai M, Szarka K, Juhasz A, et al..Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur J Cancer*, 2001,37:1946–1952.
46. Yamada T, Manos MM, Peto J,Greer CE,et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancer:a worldwide perspective. *J Virol*,1997, 71(3):2463-2472.
47. Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, Lapointe N, et al. Detection of human papillomavirus type

- 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol.* 2000, 38(9):3388-3393.
48. Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, Tang X, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett.*, 2000, 156(2):159-165.
49. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, Chandy G. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia. *Cancer Lett*, 2005, 229(1):93-99.
50. De Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Fleuren GJ. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer*, 2005, 114(3):422-425.
51. Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, Garcia-Carranca A. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(16):1227-1231.
52. de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Kolkman-Uljee S, Fleuren GJ. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(2):488-494.
53. 马正海,张富春,梅新娣,等.新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 型 E6 基因变异分析[J].癌症, 2004,23(9):1016-1020.
54. 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.
55. Qiu AD, Wu EQ, Yu XH, Jiang CL, 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.
56. 熊光武,袁杨,李萌,等.北京地区宫颈癌 HPV16 上游调控序列、E6、E7 癌基因序列初步分析. 遗传.2010,32(4):339-347.
57. 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 May;87(Pt 5):1181-8.
58. 张帆,丁晓华,蔡红兵,等.人乳头瘤病毒 16 型转化基因在不同阶段宫颈上皮病毒变组织中的分布及基因变异特点.中华肿瘤杂志.2010,32(2):107-110.
59. Song YS, Kee SH, Kim JW, et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol.* 1997 Aug;66(2):275-81.
60. 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(1):32-34.
61. 张帆,丁晓华,蔡红兵,等.人乳头瘤病毒 16 型转化基因在不同阶段宫颈上皮病毒变

62. 组织中的分布及基因变异特点. 中华肿瘤杂志. 2010, 32(2): 107-110.
63. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Infect Dis*. 2002 Sep 1; 186(5): 696-700. Epub 2002 Aug 5.
64. 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 Sep; 9(1): 85-92.
65. Choi BS, Kim SS, Yun H, et al. Distinctive distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S intratypic Asian variants in Korean commercial sex workers. *J Med Virol* 2007; 79: 426—30.
66. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, et al. E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 95: 363-369.
67. 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.
68. 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.
69. Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R, Batra S, Das BC. (2008). 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 Clin Microbiol*, 46(3): 1060—1066.
70. 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
71. Kammer 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, 81(Pt 8): 1975—1981.

攻读学位期间的研究成果

1. 王玉婷, 王言奎, 赵成琳. HPV16 E7 和 E6 基因多态性与宫颈癌临床病理特征相关性分析, 2011, 已排版。
2. 王玉婷, 王言奎, 罗兵, 赵成琳. 青岛地区人乳头瘤病毒 16 型 E7 和 E5 基因序列多态性分析, 2011, 等待发表。
3. Yuting Wang, Yankui Wang, Bing Luo, Chenglin Zhao, Chengquan Zhao, Analysis of the relative distribution and gene variation of HPV16 E7 and E5 genes at different stages Of cervical lesions.尚修改。

附录

英文缩写注解

bp	base pair	碱基对
CC	cervical cancer	宫颈癌
CIN	cervical intraepithelial neoplasm	宫颈上皮内瘤变
ddH ₂ O	double distilled water	双蒸水
dNTP	deoxyribonuceoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
EB	Ethidium bromide	溴化乙啶
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid	乙二胺四乙酸二钠盐
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
HR-HPV	high-risk HPV	高危型人乳头瘤病毒
nt	nucleotide	核苷酸
ORF	open reading frame	开放读码框
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸缓冲液
pRb	Retinoblastoma protein	视网膜母细胞瘤蛋白
rpm	rounds per minute	每分钟转数
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
sec	second	秒
Taq	Taq DNA polymerase	嗜热DNA聚合酶
URR	upstream Regulation Region	上游调节区

致 谢

怀着一份对救死扶伤光荣使命的憧憬，我选择了青岛大学医学院，接触医学已经整整八年了，转瞬三年的硕士研究生生活也已经接近尾声。三年的时间，学习了很多，经历了很多，使我从一个完全的学生开始接触社会，完成了一次蜕变。

感谢我的导师王言奎教授，王老师精湛的医术，一丝不苟的态度，精益求精的执着，仁慈的内心，谦逊的态度，幽默的谈吐，无不对我影响深远，在我的医学道路了树立了榜样。感谢戴淑真教授、姚勤老师、王黎明老师、车艳群老师、于凤胜老师、田甜老师，夏玉芳老师、彭伟老师等，各位严师在我临床工作中给予的无私指导我将谨记在心。感谢妇产科全体老师对我工作和学习的支持和帮助，感谢所有患者在我学习的道路上所给予的宽容和理解，有你们的支持和理解才有我们的进步，才有医学事业的传承和发展。感谢青岛大学微生物教研室的罗兵老师，在实验过程及论文写作中给予的关怀和帮助。

我的学生生涯即将结束，马上要踏入社会，开始工作，我将以更加饱满的热情投入到学习和工作中，工作上一丝不苟，生活上乐观向上，过好每一天，走好人生的每一步！

不同阶段宫颈上皮病变组织中人乳头瘤病毒16型转化基因
E7和E5序列多态性分析

作者：[王玉婷](#)
学位授予单位：[青岛大学](#)



引用本文格式：[王玉婷](#) [不同阶段宫颈上皮病变组织中人乳头瘤病毒16型转化基因E7和E5序列多态性分析](#)[学位论文
]硕士 2011