

山东青岛地区宫颈癌组织中HPV16E6和E2基因突变分析

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HPV16E6和E2基因的突变情况,探讨山东青岛地区宫颈癌组织中HPV16E6和E2基因的主要突变型别及新型别。

材料与方法:

[1] 收集山东青岛地区宫颈癌新鲜组织43例,石蜡包埋标本61例,其中宫颈鳞状上皮细胞癌95例,腺癌6例,腺鳞癌3例。[2] 用蛋白酶K法,OMEGA试剂盒分别提取新鲜组织,石蜡标本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的宫颈癌标本,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、E2X、E2Y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HPV16E6和E2的突变位点。

结果:

[1] 山东青岛地区宫颈癌组织中高危型HPV及HPV16感染率分别为93.27 % (97/104), 69.23 % (72/104)。[2] 石蜡标本扩增效率不高,在104例宫颈癌组织中37例E6, 11例E2X, 23例E2Y扩增并测序成功。成功测序的E6中有5例与标准株序列相同, 32例存在突变,其中25例突变型别为T178G或T178A(D25E) (67.57%); E2中23例均存在C3684A(T-K), 14例同时存在T3524C、C3684A(T-K)和C3787A(D-E), 8例同时存在A2926G、C3159A(T-K)、G3249A(R-Q)、T3384C(I-T)、C3410T(P-S)、C3684A(T-K) 以及C3787A(D-E)。

结论:

[1] 山东青岛地区宫颈癌组织中HPV16感染率与世界平均感染水平相近。[2] 山东青岛地区宫颈癌组织中HPV16E2和E6基因与德国标准株比较存在多处变异。

硕士研究生 彭丽娜 (妇产科学)

指导教师 王言奎 教授

关键词:宫颈肿瘤;人乳头状瘤病毒;E6;E2;基因突变

Mutations of E6 and E2 oncogenes of human papillomavirus 16 in women with cervical carcinoma in Qingdao

Abstract

Objective

The intratypic sequence mutation of HPV16 are known to differ in geographic distribution. The aim of this study was to investigate the distribution of HPV16 E6 and E2 gene mutation in cervical cancer to identify the most prevalent and novel HPV16 mutations in Qingdao, Shandong.

Materials and Methods

[1] 104 cervical cancer cases consisted of 43 fresh tissues and 61 paraffinaceous tissues were recruited, including 95 squamous carcinoma, 6 adencarcinoma and 3 adenosquamous carcinoma.[2] DNA samples were extracted from the cervical cancer 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 E6 and E2.[5]Then the PCR fragments of HPV16 E6 and E2 genes were purified, sequenced and compared with the type stain.

Results

[1] The positive rate of HPV and HPV16 was 93.27%(97/104) and 69.23 % (72/104) respectively in Qingdao, Shandong.[2] Among 104 cervical cancer tissues, 37 E6, 11 E2X and 23 E2Y were amplified and sequenced successfully, for the efficiency of amplification low in paraffinaceous tissues. Prototype HPV16 E6 was found in 5 cases (13.51%) while mutation was detected in 32 cases (86.49%), among which the T178G or T178A (D25E) mutation was found in 25 cases(67.57%). The E2 sequence of 23 cases contained C3684A(T-K), that of 14 cases contained T3524C, C3684A (T-K) and C3787A (D-E) at the same sample, and 8 cases contained A2926G, C3159A (T-K), G3249A (R-Q), T3384C (I-T) , C3410T (P-S), C3684A(T-K) and C3787A(D-E) meanwhile.

Conclusions

[1] The infection rate of HPV is close to the level of the world in cervical cancer in Qingdao.[2] There are several HPV16 E6 and E2 gene mutations in cervical cancer tissue of Qingdao women.

Postgraduate student: Li-Na Peng (Obstetrics and Gynecology)

Directed by Prof. Yan-Kui Wang

Key words: Cervical carcinoma; HPV; E6 gene; E2 gene; Gene mutation

目 录

引言	1
第1章材料和方法	2
1.1材料	2
1.1.1主要仪器	2
1.1.2主要试剂	2
1.1.3宫颈癌组织, 石蜡标本	3
1.1.4阳性对照细胞	3
1.2方法	3
1.2.1.新鲜组织或细胞DNA的提取及溶解	3
1.2.2石蜡标本DNA的提取	5
1.2.3聚合酶链反应PCR	7
1.2.4实验步骤	8
1.2.5扩增产物电泳分析	9
1.2.6核酸序列测序及分析	9
第2章结果	10
2.1.高危型HPV、HPV16的扩增结果	10
2.2E6、E2X、E2Y基因的扩增结果	10
2.3基因测序结果	12
2.3.1HPV16 E6的测序结果	12
2.3.2 HPV16 E2的测序结果	13
2.4测序结果分析	15
第3章讨论	17
3.1高危型HPV,HPV16的感染情况	17
3.2HPVE6、E2基因的功能	17
3.3E6、E2X、E2Y基因突变情况	19

3.4E6与E2基因突变的相关性.....20

结论.....21

参考文献.....22

综述.....27

攻读学位期间的研究成果.....42

附录.....43

致谢.....44

学位论文独创性声明.....45

学位论文知识产权权属声明.....45

引言

宫颈癌 (cervical cancer) 是最常见的女性恶性肿瘤之一。在全球的女性恶性肿瘤中, 宫颈癌的发病率和病死率仅次于乳腺癌^[1]。全球每年新发病例493000万, 死亡病例高达274000万。我国每年宫颈癌的新发病例超过13万, 占世界新发病例的1/4-1/3, 约2-3万名妇女死于宫颈癌, 并且出现了年轻化趋势^[2]。1974年德国学者Zur Hausen首先提出了人乳头瘤病毒 (human papillomaviruse, HPV) 感染是宫颈癌最主要的发病因素^[3]。后有学者用PCR技术, 对来自22个国家和地区近10000例宫颈癌患者进行研究发现, 99.17%的宫颈癌组织样本中可检测到HPV DNA^[4], 说明HPV感染与宫颈癌的发生关系密切。现认为, 高危型HPV感染是引发宫颈癌发生发展的首要且始动因素^[5]。

HPV 属乳多空病毒科多瘤病毒亚科, 是一组无包膜的嗜上皮组织的小双链环状DNA病毒, 含有近8000个碱基对, 有9个开放读码框架 (ORF), ORFs包含8个早期转录区 (Early region, E) E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8, 2个晚期转录区 (Late region, L) L1、L2 和一个长调控区 (long control region, LCR)。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。在已发现的200多个 HPV 亚型中, 40余种与生殖系统疾病有关, 20余种与宫颈肿瘤相关, 其中以 HPV16、18 与宫颈癌的关系最为密切。E6、E7 可分别与抑癌蛋白 P53 和 pRb 结合, 诱导 p53 和 pRb 降解, 促进宫颈细胞增殖和细胞永生。研究表明, 在宫颈病变进展过程中, 通常伴有 HPV 基因组与细胞 DNA 的整合。这种整合通常发生在 E2 区, 同时 E2 被破坏或缺失, E6 和 E7 失去了 E2 的抑制后表达上调, 对宫颈细胞的增殖和永生产生持续刺激作用^[6]。

大多数感染HPV的妇女, 70-80%都依靠自身免疫力予以清除, 只有不足1%继续进展为宫颈癌^[7], 预示着除了环境因素, 免疫及遗传因素在宫颈病变进展过程中可能也是不可或缺的^[8]。大量流行病学数据显示基因突变株可通过改变病毒的致癌性和免疫源性增强病毒的病原性^[9,10], 从而使感染特定型别HPV16的病变更易进展为宫颈癌。德国标准株则与病毒的清除及病灶的复原有关^[11]。Yamada等^[12] 研究发现, 宫颈癌组织中HPV16基因主要突变型别存在地域差异, 并将HPV16突变型别分为欧洲株, 非洲株1, 非洲株2, 北美株, 亚美株, 亚洲株等六大类, 在欧洲地区主要突变为E350G/T(L83V, 即第83位氨基酸由缬氨酸变为亮氨酸), 亚洲主要为T178G(D25E, 即第25位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸)。世界各地同种突变株的分布也不同, 不同地区中同一基因突变型别与宫颈病变关系亦有明显差异。在墨西

哥HPV16 E6基因L83V突变株在浸润性宫颈癌中占93.5%^[13]，在日本为28%^[14]，在东南亚仅为6%。在英国和瑞典，E6突变株E350G(L83V)与HPV的持续感染和宫颈病变由低级向高级转化有关^[15,16]，但Londesborough 等报道 HPV16 E6 L83V与宫颈上皮内瘤样病变1级向3级的转化有关^[17]；在瑞典，L83V与浸润性宫颈癌有关^[18, 19]，而在意大利和捷克却主要与宫颈早期坏死有关，与浸润性宫颈癌无明显相关性^[20, 21]。

本研究旨在通过分析山东青岛地区宫颈组织中HPV16E6和E2基因突变情况，探讨其与该地区宫颈癌的关系。

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) 高速低温台式离心机 | 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)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)二甲苯 | 天津巴期夫化工有限公司 |
| (5)无水乙醇 | 烟台三和化学试剂有限公司 |
| (6)PBS | 美国 Gibco 公司 |
| (7)琼脂糖 | Spanish 分装 |
| (8)PCR 试剂盒 | Tiagen 公司 |
| (9)PCR 引物 | 上海生工生物技术公司 |
| (10)Maker | Takara 公司 |

1.1.3 宫颈癌新鲜组织，石蜡标本

收集宫颈癌 43 例新鲜组织，61 例石蜡包埋标本为实验对象，其中新鲜组织来源于青岛大学医学院附属医院 2007 年 7 月—2009 年 7 月间收治并临床病理诊断为宫颈癌的手术组织，所有组织经手术切除后尽快保存于-70℃冰箱，石蜡标本来源于 2007 年 5 月—2008 年 12 月莱西市人民医院病理科归档的宫颈癌标本，患者均为山东青岛人，年龄在 26—82 岁之间，中位年龄为 46.7 岁。其中宫颈鳞状上皮细胞癌 95 例，腺癌 6 例，腺鳞癌 3 例。所有标本均未进行过放化疗。

1.1.4 阳性对照细胞

宫颈癌 Siha 细胞株（含有 HPV16 基因组的细胞）两瓶。

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	20μl
10 % SDS	40μl

1.2.1.2 DNA的提取

[1]将新鲜组织用PBS液冲洗2~3次，无菌眼科剪剪切组织至约1mm³大小，将剪碎的组织移入15 ml离心管。如为细胞(本实验选用Siha细胞)，将细胞培养瓶中的细胞用胰酶消化后移入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，吹打混匀，55℃2h或37℃/42℃过夜（摇床震荡）。

[3]加等体积饱和酚抽提，颠倒混匀20min，3000rpm×15min离心。

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

[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，-20℃过夜（若有絮状沉淀，可将絮状沉淀直接挑入加有-20℃70%乙醇的1ml高压灭菌EP管中）。

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

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

1.2.2石蜡标本DNA的提取

1.2.2.1准备工作

1.2.2.1.1 HiBind DNA结合柱的平衡

[1]取一个新HiBind DNA结合柱装在收集管中，吸取200μl的Buffer GPS平衡缓冲液至柱子中；

[2]室温放置3-5min；

[3]室温下12000rpm离心2min；

[4]倒弃收集管中的滤液，把HiBind DNA柱子装在收集管中，加入700 μ l灭菌水至柱子中；

[5]室温下按上述条件离心；

[6]倒弃收集管中的滤液，把HiBind DNA柱子重新装在收集管中。

[7]这就是平衡好的柱子，可室温放置1-2周。

1.2.2.1.2试剂的准备

[1]OB蛋白酶保存于22-25 $^{\circ}$ C，用1.5ml10mM. pH8Tris-HCl稀释后保存于-20 $^{\circ}$ C。

[2]用96-100%的无水乙醇稀释DNA Wash Buffer。

[3]用前Buffer BL中可能有沉淀，需37 $^{\circ}$ C加热小瓶使沉淀溶解。

[4]用前除Elution Buffer, 其它试剂均需平衡至室温。

1.2.2.2标本DNA的提取

[1]用手术刀切除组织块上多余的石蜡，切片5-10 μ m厚，面积不超过250mm²，如组织表面已暴露于空气中，弃掉前2-3张切片。

[2]将切片迅速放入1.5mlEP管中，每个EP管中放入的切片数不超过8张，并加入1ml二甲苯，关盖剧烈震荡10s。

[3]室温10000rpm离心2min，小心吸去上清，勿触动沉淀。

[4]沉淀上加入1ml无水乙醇，以去除样品上残留的二甲苯。

[5]室温10000rpm离心2min，小心吸去上清，尽量去净，勿触动沉淀。

[6]开盖，37 $^{\circ}$ C放置15min，或直至残留乙醇全部挥发。

[7]加入200 μ lBuffer TL，90 $^{\circ}$ C孵育10min。

[8]室温放置5min使样品冷却。

[9]加入20 μ lOB蛋白酶，震荡混匀，然后55 $^{\circ}$ C孵育3min或过夜。

[10]加入200 μ lBuffer BL，震荡混匀。

[11]加入250 μ l无水乙醇，充分震荡混匀。

[12]将EP管中所有样品包括沉淀全部移入已平衡好的HiBind DNA结合柱内，小心勿湿套管的边缘，室温10000rpm离心1min，弃掉含液体的收集管。（如裂解液未完全滤下。调高转速再次离心直至HiBind DNA结合柱内无液体。）

[13]将HiBind DNA结合柱置于新的2ml收集管，加入500μlBuffer HB，室温10000rpm离心1min，弃掉含液体的收集管。

[14]重复上述步骤。

[15]将HiBind DNA结合柱置于新的2ml收集管，加入500μl乙醇稀释好的DNA Wash Buffer，室温10000rpm离心1min，弃掉含液体的收集管。

[16]重复上述步骤。

[17]室温全速离心2min，使HiBind DNA结合柱完全干燥。（此步对其后DNA的溶解至关重要。）

[18]将HiBind DNA结合柱置于无菌1.5mlEP管中，加入20-100μl70℃预热好的Elution Buffer，室温静置3min。

[19]室温10000rpm离心1min，离心液4℃贮存备用。

[20]重复步骤[18],[19]。

1.2.3 聚合酶链式反应（PCR）

1.2.3.1 引物设计及合成

参考文献并经 BLAST 分析证明与人类其它基因编码序列无同源性，即对 HPV 目的基因具有特异性，由上海生工生物工程技术有限公司负责合成所需引物。引物序列和 PCR 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	上游引物	下游引物	扩增长度
β-globin ^[22]	5'-gaagagccaaggacaggtac-3'	5'-caacttcatccacgttcacc-3'	268bp
MY09/MY11 ^[23]	5'-cgtccaaaaggaaactgac-3'	5'-gcacagggacataacaatgg-3'	450bp
HPV16 型特异性引物 ^[24]	5'-agggcgtaaccgaaatcggt-3'	5'-gtttgcagctctgtgcata-3'	140bp
E6 ^[25] (nt53-nt533)	5'-gaaacggtagtatataaaagcagac-3'	5'-atgtgggtttctctacgtgttct-3'	503bp
E2X ^[26] (nt2811-nt3471)	5'-atgaaaatgatagtacagac-3'	5'-tggatagtcgtctgtgttct-3'	660bp
E2Y ^[26] (nt3448-nt3873)	5'-cgaagaacacagacgactatcca-3'	5'-ggatgcagtatcaagatttgt-3'	425bp

1.2.3.2 PCR25μl 反应体系

去离子水	14.3μl
10×buffer	2.5μl
MgCl ₂ (25mM/L)	2.5μl
dNTP	0.5μl
上游引物	0.5μl
下游引物	0.5μl
TaqDNA 聚合酶	0.2μl
DNA	4μl

1.2.3.3 反应条件

按照上述顺序依次向 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，置入 PCR 扩增仪中按表 2 中所示反应条件进行扩增。每次 PCR 反应均用 Siha 细胞株 DNA 做阳性对照，25μl 双蒸水做阴性对照。个基因扩增条件见表 1.3。

表 1.3 PCR 扩增条件

	热启动	热循环			循环数	延伸
		变性	退火	延伸		
β-globin	94℃ 5min	94℃ 60s	55℃ 60s	72℃ 90s	30	72℃ 10min
MY09/MY11	94℃ 5min	94℃ 60s	55℃ 60s	72℃ 90s	35	72℃ 10min
HPV16	94℃ 5min	94℃ 30s	55℃ 120s	72℃ 120s	35	72℃ 10min
E6	94℃ 5min	94℃ 30s	55℃ 30s	72℃ 60s	30	72℃ 10min
E2X	94℃ 5min	95℃ 60s	45℃ 45s	72℃ 30s	35	72℃ 10min
E2Y	94℃ 5min	95℃ 60s	48℃ 45s	72℃ 30s	35	72℃ 10min

1.2.4 实验步骤

β-globin 主要用于检测石蜡标本提取产物中 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 E6 和 E2 全序列 PCR 扩增。

1.2.5 扩增产物电泳分析

1.2.5.1 0.5×TBE 缓冲液的制备

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

1.2.5.2.2 制备 1.6%琼脂糖凝胶

- [1] 电子天平称取 0.32g 琼脂糖，移入小烧瓶，量筒量取 20ml0.5×TBE 缓冲液，混匀，遮蔽瓶口。
- [2] 微波炉内加热至琼脂糖完全溶解，一般液体沸腾时即可溶解。
- [3] 将小烧瓶置于室温，待温度降至 50-60℃时加入 1μLEB, 混匀。
- [4] 倒入 11 孔模型中（制取的胶的厚度以 3-5mm 为宜），30min 后自然凝固。
- [5] 拔出模型梳，将胶密封保存于 4℃，备用，可保存 1-2 周。

1.2.5.3 电泳分析

于 Ep 管石蜡油液面下取扩增产物 5μl，加入 10×或 6×上样缓冲液 0.5μl 混匀后，加样至被 0.5×TBE 缓冲液没过 1mm 的胶孔内，注意不要将样溢出，防止标本间交叉污染，100V 恒压电泳 40min 或电泳上样缓冲液至胶的 1/2 或 2/3 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。

1.2.6 核酸序列测序及分析

对电泳条带清晰者，取 50μl PCR 产物纯化，后进行测序，以获得可靠的序列信息，纯化和测序服务由南京金思特有限公司提供，测序结果用 DNASTar 软件进行比对分析。

以HPV16阳性标本DNA为模板，利用跨E6完整阅读框扩增E6基因，分段扩增E2全序列，E6、E2X、E2Y阳性结果分别在503bp、660bp和425bp处观察到扩增条带。（图2.3、2.4、2.5）。

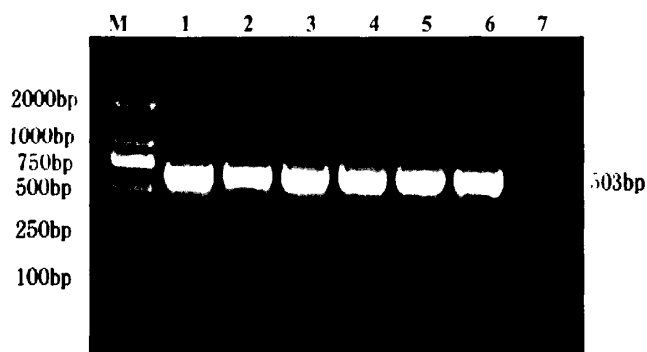


图 2.3 HPV16E6 全序列的扩增结果

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。。

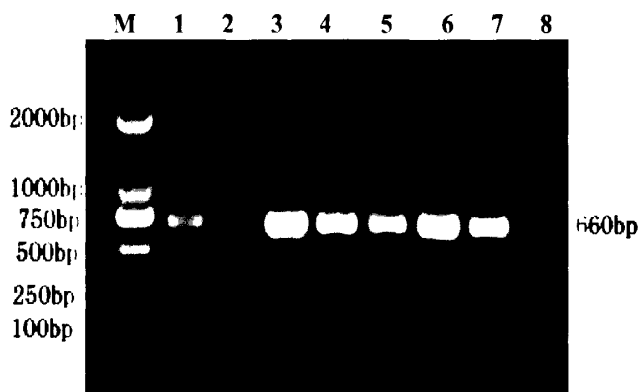


图 2.4 E2XPCR 结果

M 为 Marker, 1,,3,4,5,6 为 HPV16E2X 扩增阳性标本, 2 为未阴性标本, 7 为阳性对照, 8 为阴性对照。。

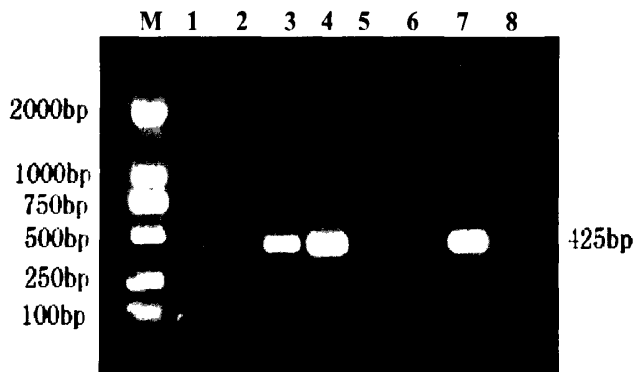


图 2.5 E2YPCR 结果

M 为 Marker, 3, 4 为 E2Y 扩增阳性标本, 1, 2 为弱阳性标本, 测序可能失败, 7 为阳性对照, 8 为阴性对照。。

31例HPV16阳性新鲜组织中扩增出E6基因31例，E2X为15例，E2Y为25例，42例石蜡标本中扩增出E69例，E2Y为1例，余均未扩出E6相应条带。

2.3 基因测序结果

2.3.1 HPV16 E6 的测序结果

对于扩增出的 E6 全序列，31 例新鲜组织中，30 例成功测序，1 例因条带太弱或有杂带测序失败，9 例石蜡标本中，7 例测序成功，2 例因上述原因测序失败。测序后典型突变位点及峰图见图 2.6-2.10。

ATACATG AATAATAT

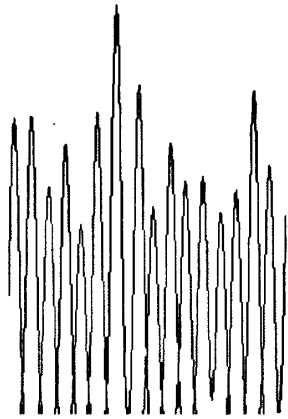


图 2.6 标准株 178 位碱基的峰图

TATACATG AATAAT

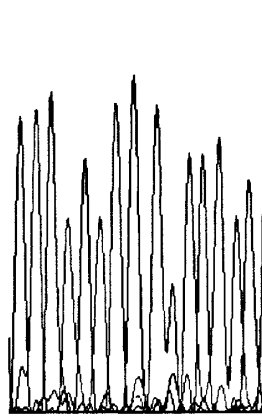


图 2.7 T178A 的峰图

ATACATG AATAATATTAG

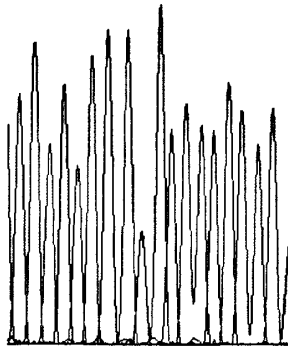


图 2.8 T178G 的峰图

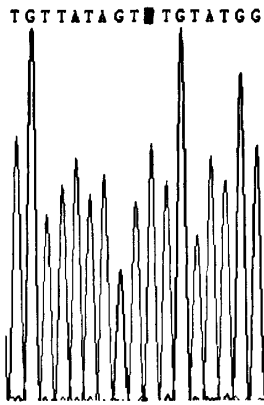


图 2.9 T350T 的峰图

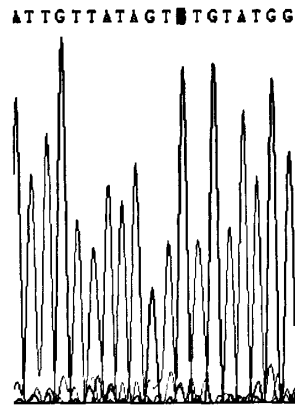


图 2.10 T350G 的峰图

2.3.2 HPV16 E2 的测序结果

15 例 E2X 中有 11 例测序成功，对扩增出的 E2Y 全序列，25 例新鲜组织中 22 例测序成功，1 例石蜡标本测序成功，余均因上述原因测序失败。

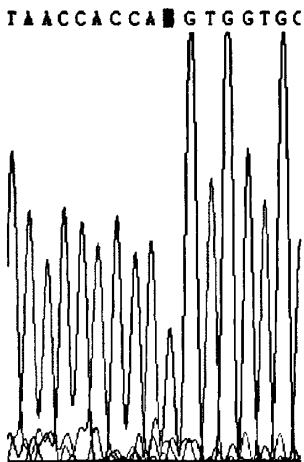


图 2.11 A2926G 的峰图

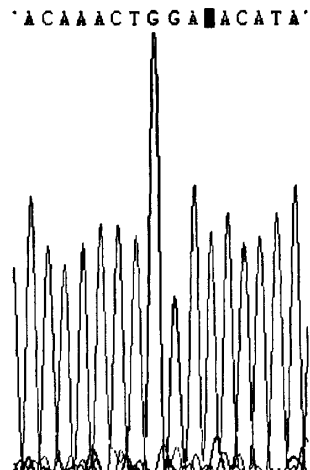


图 2.12 C3159A 的峰图

AAAGGAATACAAACATA

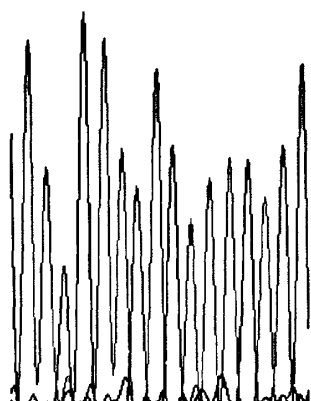


图 2.13 G3249A 的峰图

CCCTGAAAATATTAGG

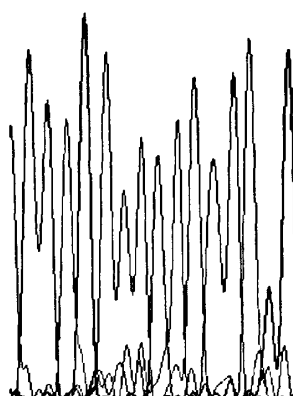


图 2.14 T3384C 的峰图

GCCAAACCACCCGCGCGG

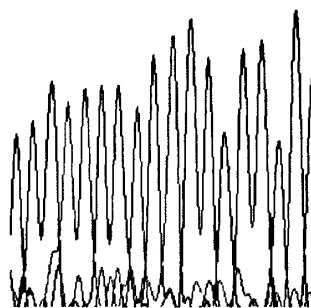


图 2.15 C3410T 的峰图
CATTGTAATTGTA

CTAAGTTGTGCACAG

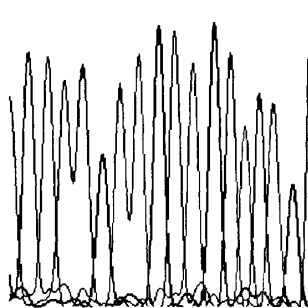


图 2.16 T3524C 的峰图
GCAACGTGACAAATTT

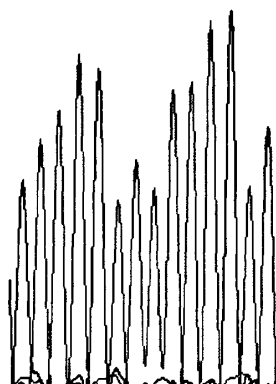


图 2.17 C3684A 的峰图

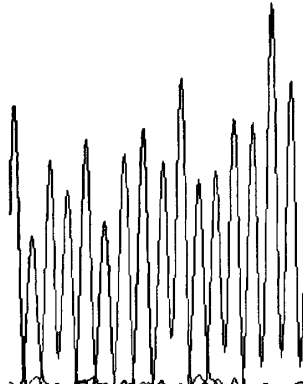


图 2.18 C3787A 的峰图

2.4 测序结果分析

表2.1 HPV16E6和E2的突变位点

E6 nt53-533												E2 nt2811-3873												例数						
氨基酸	Q D				N H L				E R				T R Q				E I P E				T T N D									
	L E				S Y V				D K				K Q H				K T S K				K S T E									
	9	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	5	5	2	3	3	3	3	3	3	3	3								
-	3 6 7 4				7 3 5 4 4				8 2 3				9 1 2 2 2				3 3 4 4 5				5 6 6 7 7									
	4	1	2	8	1	6	5	0	0	2	7	5	3	6	9	9	5	4	0	4	0	9	1	4	4	3	9	7	37	
标准株	G	A	A	T	T	A	C	T	G	A	A	G	A	A	C	G	G	T	G	T	C	G	A	T	C	C	A	C		
1	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	A	A	-	g	-	C	T	-	-	c	A	-	-	A	3
2	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	A	A	T	-	-	C	T	-	-	c	A	-	-	A	1
3	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	A	T	-	-	A	C	T	-	-	c	A	-	-	A	1
4	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	A	A	-	g	-	C	T	-	-	-	A	-	-	A	1
5	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	A	-	-	A	4
6	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	A	A	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	1
7	-	C	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	A	A	-	-	-	C	T	-	-	c	A	-	-	A	1
8	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	A	A	-	g	-	C	T	-	-	c	A	-	-	A	1
9	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
10	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	A	-	-	A	1
11	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	A	G	-	A	1
12	a	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	A	1
13	a	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	A	1
14	a	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	T	-	-	c	A	-	-	A	1
15	a	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	1
16	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	1
17	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	A	-	-	-	1
18	-	-	-	-	-	-	T	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	1
19	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
20	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
21	-	-	T	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	1
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	C	-	1
25	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
																														5

小写字母表示同义突变，大写字母表示非同义突变，‘-’表示与标准株序列相同，缺失者表示碱基缺失或扩增阴性。氨基酸一行，“|”代表突变位点致氨基酸同义突变，“|”缺失表示此突变位点所表达的氨基酸亦缺失。

在 37 例测序成功的 E6 全序列中，E6 发现 13 个突变位点，10 种突变型别，其中 T178G 21 例，T178A 4 例，它们编码的 E6 蛋白第 83 位氨基酸均由天冬氨酸变为谷氨酸，此种型别约占 67.57%，为主要感染型别。5 例与标准株序列相同，约占 13.51%，欧美地区的主要突变型别 T350G (L83V) 仅有 1 例，占 2.7%，余为其它突变型（见表 2.1），各 1 例，约占 16.21%。E2 发现 15 个突变位点，其中 E2X 中有 5 种突变型别，E2Y 中有 5 种突变型别，总的来说，在 E2 全序列中有 7 种突变型别。14 例同时存在 T3524C、C3684A(T-K)和 C3787A(D-E)变异，8 例同时存在 A2926G、C3159A (T-K)、G3249A(R-Q)、T3384C(I-T)、C3410T(P-S)、 C3684A(T-K) 以及 C3787A(D-E)变异。

在 HPV16 E6、E2X 和 E2Y 同时测序成功的标本中，E6 突变位点 T178G 均与 E2 突变位点 A2926G、C3159A (T-K)、G3249A(R-Q)、T3384C(I-T)、C3410T(P-S)、C3684A(T-K) 以及 C3787A(D-E)同时存在；T178A 则与 C3684A(T-K)同时存在。见表 2.1。

第3章 讨论

世界范围内宫颈癌的发病率、危险率仅次于乳腺癌,严重威胁女性健康。自1974年Zur Hausen发现HPV感染是宫颈癌的主要致病因素后,HPV成为世界研究热点。Jan.M.Walboomers的名言是“几乎所有的宫颈癌病理样本中均能找到HPV,从而印证了HPV是宫颈癌的主要原因,也使宫颈癌成为目前人类所有癌症病变中唯一病因明确的癌症”。没有HPV感染,就不会发生宫颈癌。

3.1 高危型HPV,HPV16的感染情况

在已发现的200余种HPV中,根据与宫颈肿瘤的关系将HPV分为低危型(Low-oncogenic risk,LR,如HPV6、11、40、42、43、44、53、54、57等)和高危型(High-oncogenic risk,HR,如HPV16、18、26、31、33、45、51、52、55、56、58等)。国际宫颈癌生物学研究(IBSCC)机构曾报道宫颈癌组织中HPV-DNA的检出率超过93%,更有研究显示99.7%的宫颈癌标本中可以检测到HPV-DNA^[27]。2005年国际癌症研究协会(IARC)对已发表的85份研究中的10058例子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^[28],证实了HPV16型为宫颈癌的主要感染型别,且很少产生地域差异^[29,30]。即世界高危型HPV与HPV16平均感染率分别为90%以上,50%。而有数据显示亚洲高危型HPV及HPV16的平均感染率分别为85.9%,52.4%,其中中国/香港/台湾HPV平均感染率最低,为82.5%,HPV16感染率相对较高,为58%左右^[31]。我国吴玉萍,吴恩奇等分别对广州300例,四川190例宫颈癌标本进行研究发现高危型HPV及HPV16感染率分别为91.3%/68.7%,93.2%/73.7%。浙江,延边等地的也均有较高感染率,与世界平均水平基本持平,且证实了我国妇女宫颈癌组织中的主要感染型别亦为HPV16。本研究结果显示,高危型HPV感染率为93.27%(97/104),HPV16感染率为69.23%(72/104),产生80%与90%差异的原因可能与PCR敏感性不同,造成结果假阳性或假阴性有关。所以本实验采用MY09/MY11通用引物和HPV16特异性引物双重扩增以尽可能准确地检出HPV16阳性标本。总的来说,本实验结果基本符合世界平均感染水平,并提示HPV尤其是HPV16在山东青岛地区宫颈癌组织中有较高的检出率。

3.2 HPV E6,E2基因的结构和功能

HPV基因组主要包括6个早期转录基因(E),两个晚期转录基因(L)和一个长调控区(LCR),其中E6和E7基因在宫颈上皮细胞增殖,永生化的过程中发挥着重要作用。E6在HPV感染细胞的过程中,是最先表达的蛋白,存在于细胞膜上和细胞核中,其开放读码可以编码150个氨基酸左右的小蛋白,分子量为16-18KD。E6蛋白含有四个C-x-x-C(色氨酸-x-x-色氨酸)的锌指结构,与细胞的恶性转化,转录

激活,蛋白间的相互作用等关系密切。在粘膜高危型 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^[32]。E6 可通过 E6 相关蛋白(the E6 associated protein,E6-AP)与抑癌蛋白 p53 结合,形成稳定的三元复合物,使 p53 发生构象改变;同时由于 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 进入泛素蛋白酶体通路而降解。P53 被降解后,使其下游靶基因 p21,mdm2 和 bax 等的抗增殖作用丧失,积累了损伤 DNA 的细胞越过 G1 / S 检验点,促进细胞从 G1 期进入 S 期,细胞周期调控失控,阻止细胞凋亡,促进细胞增殖;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 可激活端粒酶,阻止细胞衰老、凋亡^[33];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,使病毒逃避宿主免疫;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,细胞极性及细胞粘附,从而诱导 HPV 感染细胞发生恶性转化。E7 癌基因编码大小约 100 个氨基酸的低分子量蛋白。E7 蛋白有三个保守区 (conserved regions,CR),-NH₂ 端的 CR1 区,CR2 区,-COOH 端的 CR3 区 (见图 2-B)。CR1 区参与细胞转化和 pRb 的降解,却不直接与 pRb 结合。CR2 区含有一保守的能与 pRb 结合的核心序列——LxCxE 和一个酪蛋白激酶 II 的磷酸化位点 (CK II)。CR3 区包括两个 C-x-x-C 基序,两个基序间由 29/30 个氨基酸相间隔。CR3 区可以与 pRb 及其它宿主细胞蛋白结合,也可以和金属结合,并且与 E7 蛋白二聚体的形成有关^[32,34]。在正常细胞中,pRb 以非磷酸化状态与 E2F 结合,抑制 E2F 的转录活性。而 E7 与 pRb 的亲合力较 pRb 与 E2F 的亲合力强,HPV 感染细胞后,E7 与 E2F 竞争结合 pRb,使 E2F 处于游离状态,恢复其转录活性,促进细胞由 G1 期进入 S 期,细胞周期调控失控,细胞发生永生化;E7 也可通过泛素蛋白酶体通路直接诱导 pRb 降解,使 E2F 发挥其转录活性^[33];E7 还可与 pRb 家族的其他成员如 p107,p130 相互作用,使 E2F 游离;此外,E7 可以激活细胞周期调节蛋白 A 和 E,解除细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKIs) 如 p21,p27 对细胞增殖的抑制作用,同时解除了在细胞受损时 p53 介导的细胞生长停滞状态^[14]。在诱导细胞发生永生化过程中,E6、E7 不仅有其独立的作用途径,他们可相互协同,提高细胞的转化效率。CKI INK4A 可抑制 E6 的作用,而 E7 可通过激活细胞周期调节蛋白 A 和 E 解除 CKI INK4A 对 E6 的作用。相反地,E7 的高表达可诱导细胞发生凋亡,而 E6 又可抑制此过程^[33]。E2 蛋白由三个功能区域组成,包括 N 端-可与 HPV E1 解螺旋酶及复制有关区域相互作用激活细胞转录;C 端-DNA 结合区,并有二聚作用;铰链区。E2 蛋白是一种凋亡前体蛋白,可通过抑制病毒癌蛋白的复制和诱导凋亡而表现出较强的细胞增殖抑制作用。E2 蛋白可与 E6、E7 的启动子相邻基序-LCR 的重复序列 ACCN6GGT 结合,通过抑制基因启动子如 HPV16,18 的 p97 和 p105 的转录

功能等多条途径调节 E6 和 E7 的表达^[35,36]。E2 功能受损,可致 E6 和 E7 持续表达,从而对宫颈细胞增殖和细胞永生化产生持续刺激,影响宫颈病变的严重程度,是宫颈癌组织中主要基因改变之一。

3.3 HPV16E6、E2的突变情况

HPV16各基因都存在型内变异,可存在于编码区也可存在于非编码区,可造成基因产物氨基酸的同义或非同义改变。氨基酸的非同义改变可能会引起HPV基因编码蛋白的构象及功能发生变化。HPV在人体内可通过抗原提呈细胞将病毒抗原提呈给免疫细胞,诱发人体的细胞免疫和体液免疫,前者可清除体内易感染的HPV,后者则可防止同型HPV的二次感染。HPV突变体的基因产物有可能改变HPV抗原决定簇区的性质而使病毒逃脱宿主免疫反应。突变株表达各种蛋白可以诱导细胞由G1期进入S期,使细胞周期调控机制失控,造成细胞增殖。有研究表明,HPV突变株可造成HPV的持续感染,介导癌前病变向宫颈癌的转变^[13,37];HPV突变株可能影响病毒的组装、转录,致病能力,对p53的降解能力及促进细胞发生永生化能力^[38-41];HPV突变株还可能影响PCR的敏感性和特异性。Zehbe I^[42]等的最新研究显示,感染HPV16E6突变株细胞和感染德国标准株(Seedorf等^[43]于1985年首先在德国一妇女宫颈癌组织中测序所得的标准序列)细胞相比,突变株尤其是Q14H/H78Y/L83V亚美株可同时导致角蛋白5和10的异常表达,从而阻止细胞分化、凋亡,促进细胞增殖。说明某些特定突变株具有较强的致癌能力。世界上研究热点主要集中在HPV16或18E6、E7、LCR。研究显示,不同国家不同地区宫颈癌组织中HPV突变株的型别各不相同^[12,37];欧美地区主要以T350G,即L83V(亮氨酸变为缬氨酸)为主,东亚地区主要以T178G,即D25E(天冬氨酸变为谷氨酸)为主,其中在日本第二主要突变型别为T350G/L83V^[44]。我国的研究主要集中在HPV16 E6和E7基因。91例新疆维吾尔族妇女宫颈癌患者主要以T350G,即L83V突变为主,占53.6%,其次为标准株(39.6%),D25E(4.25%)位居第三^[45]。广东地区的热点突变在nt178,即D25E^[46]。张爱东等^[47]对四川省158例宫颈癌患者进行研究发现,E6基因型别主要以欧洲标准株(23%)和东亚株T178G/D25E(30.1%)为主,且发现了一些未曾报道的基因突变,如G94A,C173T,A203G,C240G,A464G和T511C。本研究显示,山东青岛地区E6突变主要以T178G或T178A,即D25E为主,约占67.57%(25/37),其次为欧洲标准株,占13.51%(5/37),欧洲株T350G/L83V仅占2.7%(1/37)。

研究发现,在HPV亚临床感染,宫颈低级和高级病变中HPV基因组均以游离,整合两种形式存在,但在宫颈低级病变中基因组整合的几率小,在高级病变及宫颈癌组织中这种整合现象似乎更为明显,推测HPV基因与宿主基因发生整合,是宫颈病变由低级向高级转变的关键环节^[48-52]。基因在整合过程中可通过多种机制造成E2

基因的损伤^[53,54]。正常的E2基因可调节E6、E7的转录活性；E2的破坏或缺失则致E6、E7基因的表达上调，促进细胞发生永生化，宫颈病变由低级向高级转变。本研究E2的扩增效率（23/104）明显低于E6的扩增效率（37/104），考虑与E2的破坏有关。E2基因三个功能区均存在突变，且E2基因开放读码区的突变，亦可改变E2蛋白的结构和功能，更易上调癌基因的表达。Sathish N^[55]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^[56,57]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。我国还没有关于E2突变型别的报导。本研究表明，山东青岛地区HPV16 E2基因突变主要以A2926G、T3524C的同义突变和C3159A（T-K）、G3249A（R-Q）、T3384C（I-T）、C3410T（P-S）、C3684A（T-K）、C3787A（D-E）的非同义突变为主。其中A2926G从未报道过，但由于其为同义突变，对基因产物的功能无影响，所以意义不大。

3.4 HPV E6、E2的相关性

已有研究结果显示，HPV基因组中一种基因的突变往往与其他基因突变相关联，也就是说，突变株基因组中各基因突变型别的重组表现出相对稳定，非多样化状态^[12, 58-61]。Swan等^[62]研究发现，E2突变与E6/E7突变存在相关性，通过E6基因突变尤其是nt109-350突变的检测可预测E2的突变类型，同时预示着鉴别HPV16突变型别不需扩增出HPV16的全序列。本研究结果显示，E6的T178G突变通常与E2的A2926G、T3524C、C3159A、G3249A、T3384C、C3410T、C3684A、C3787A突变同时存在，T178A通常与C3684A同时存在，也预示着E6和E2基因间可能存在相关性。我们将在今后的实验中收集大量样本来验证上述观点。

山东青岛地区有其独特的突变型别分布，其分布规律可能与该地区宫颈癌的发生发展存在关系。我们正在进行大样本宫颈癌与正常组织及癌前病变的对照研究，对HPV16 E7、LCR、E5等其他基因做分析，以确定E6基因与其他基因的相关性，为HPV基因变异与宫颈癌的关系提供更完善的理论依据。

结论

1、山东青岛地区宫颈癌组织中高危型HPV及HPV16均有较高的检出率，接近世界水平。

2、山东青岛地区宫颈癌组织中HPV16E6和E2与德国标准株相比存在多处变异。E6的主要突变型别为T178G或T178A(D25E)；E2的主要突变型别为A2926G, T3524C的同义突变和C3159A (T-K)、G3249A(R-Q)、T3384C(I-T)、C3410T(P-S)、C3684A(T-K)、C3787A(D-E)的非同义突变，其中A2926G目前为青岛特有。

参考文献

1. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*, 2001, 37 (Suppl 8): S4-66.
2. 李连弟, 鲁凤珠, 张思维等. 中国恶性肿瘤20年变化趋势及近期预测分析. *中华肿瘤杂志*. 1997, 19(6): 3-9.
3. Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 1991, 184(1): 9-13.
4. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999, 189(1): 12-19.
5. Nicolas FS, Andrea T, Eliane DF, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 2003, 103(4): 519-524.
6. Hwang E, Riese D, Settleman I. Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a papillomavirus regulatory gene. *Virology*, 1993, 67: 3720-3729.
7. Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 2436-2440.
8. Bosch FX, Manos MM, Munos N, Sherman M, et al. Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a world perspective. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87: 796-802.
9. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*, 2005, 32 (Suppl. 1): S1-S6.
10. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer*, 2006, 118: 1071-1076.
11. 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.
12. 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.
13. Lonsdale 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.
14. 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: 829-833.
15. 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.
16. 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.
 17. Tu JJ, Kuhn L, Denny L, Beattie KJ, Lorincz A, Wright TC Jr. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(2):736-742.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method[J]. *JAMA*, 1991, 265:472-477.
 23. 金纳, 姚晓红, 赵可佳, 等. 不同引物介导的聚合酶链反应对人乳头瘤病毒的快速检测与分型[J]. *中国综合临床*, 2007, 23(3): 258-260.
 24. Saegusa M, Hashimura M, Takano Y, et al. Absence of human papillomavirus genomic sequences detected by the polymerase chain reaction in oesophageal and gastric carcinomas in Japan. *Mol Pathol*, 1997, 50:101-104.
 25. van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol*, 2000, 81:317-325.
 26. Bhattacharjee B, Mandal NR, Roy S, et al. Characterization of sequence variations within HPV16 isolates among Indian women: Prediction of causal role of rare non-synonymous variations within intact isolates in cervical cancer pathogenesis. *Virol*, 2008, 377:143-150.
 27. Eiben GL, da Silva DM, Fausch SC, et al. Cervical cancer vaccines recent advances in HPV research. *Viral Immunol.* 2003; 16(2):111-121

28. Franceschi S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer . *Recent Results Cancer Res.* 2005; 166:277-297.
29. Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003, 348:518-527.
30. Saslow D, Castle PE, Cox JT, et al. American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus(HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors . *CA Cancer J Clin.* 2007, 57:7-28.
31. Bao YP,Smith JS,Li N,Qiao YL,et al.Human papillomavirus type distribution in women from Asia:a meta-analysis.*Int J Gynecol Cancer*,2008,18:71-79.
32. Hebner CM,Laimins LA. Human papillomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med.Virol.*, 2006,16:83-97.
33. Fehrmann F,Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 2003, 22: 5201–5207.
34. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Virol.*,2004,78:11451–11460.
35. Demeret C, Le Moal M, Yaniv M, et al. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucl Acids Res*, 1995,23(23): 4777–4784.
36. Steger G, Ham J, Yaniv M. E2 proteins: Modulators of papillomavirus transcription and replication. *Meth Enzymol*, 1996,274:173–185.
37. Zehbe I, Voglino G, Delius H, Wilander E, et al. Risk of cervical cancer and geograp hical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*, 1998, 352:1441–1442.
38. 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.
39. Kirnbauer 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.
40. Rastogi T, Hildesheim A, Sinha R. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nat Rev Cancer*, 2004,4:909–917.
41. 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.
42. Zehbe I,Richard C,DeCarlo CA,Shai A,et al. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis.*Virol.*,2009,383:69-77.
43. Seedorf K, Krammer G, Dürst M, Suhai S, et al. Human papillomavirus 16 DNA sequence. *Virol*, 1985,145:181–185.

44. Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, Tang XH, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Letters*, 2000, 156: 159-165.
45. 朱开春玛, 依努尔·尼娅孜, 代建霞, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织HPV16型E6基因变异分析[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 13(3): 209-212.
46. 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.
47. 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.
48. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, et al. Type distribution, viral load and integration status of high risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer*, 2005, 92: 2195-2200.
49. Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol*, 2003, 56: 532-536.
50. Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllesten UB, Shabalova IP, et al. Early integration of high copy HPV 16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*, 2006, 59: 513-517.
51. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KID, Watkins-Riedel T, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*, 2004, 92: 873-878.
52. Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, et al. Physical status of the E2 human papillomavirus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol*, 2001, 21: 129-134.
53. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, et al. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol*, 1998, 17: 146-153.
54. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 1755-1762.
55. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, et al. E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent. *Gynecol Oncol*, 2004, 95: 363-369.
56. 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.

57. 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.
58. Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, Tucker RA, Rawls WE. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virol*, 1991, 184: 101–7.
59. Eriksson A, Herron JR, Yamada T, Wheeler CM. 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.
60. Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer*, 1999, 83: 449–55.
61. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1035–43.
62. Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, et al. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol*, 2005, 96: 695–700.

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 HPV 的持续感染是宫颈癌的主要致病因素，尤其是 HPV16,18，癌蛋白 E6、E7 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，导致宫颈癌的发生。但近年研究提出 HPV 感染是导致宫颈癌的必要但非充分条件，病毒及宿主自身免疫遗传因素在宫颈癌的发生发展过程中也起着关键作用。目前对于 HPV 各基因、人类白细胞抗原 (HLA)、p53、Rb 基因多态性与宫颈癌相关性的研究成为医学多学科研究的热点之一。现对 HPV 各基因及 HLA、p53、pRb 基因多态性在宫颈癌发生机制中的最新研究进展给予综述。

【关键词】 宫颈肿瘤；人乳头状瘤病毒；p53；pRb；HLA；多态性；

【中图分类号】 R737.33 【文献标识码】 A

宫颈癌 (Cancer of cervix, CC) 是女性生殖系统肿瘤中最常见的恶性肿瘤，其发病率有逐年上升及年轻化趋势^[1-4]。因此，宫颈癌的病因和发病机制的研究受到国内外学者的高度重视。研究表明，人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染尤其是高危型 HPV 感染是宫颈癌的明确致病因素，但在感染 HPV 的妇女中，大多数可在 8 个月左右通过自身免疫将病毒清除掉，只有一小部分持续 HPV 感染者才最终发展为高级别的宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasm, CIN) 及宫颈癌，且需要大约 8-12 年的潜伏期。这表明除了社会经济状况，性行为，性伴性行为，避孕方式，吸烟，营养状况，分娩史，HPV 感染等，还存在其他一些危险因素影响宫颈病变的发生发展。也就是说，HPV 感染是宫颈癌发生发展的必要但非充分因素^[5]。近年来研究发现，病毒和宿主基因变异在宫颈癌的发生发展中也起关键作用。本文就 HPV 各基因及 HLA、p53、pRb 基因多态性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有密切关系^[6]。Jan.M.Walboomers 的名言是“几乎所有的宫颈癌病理样本中均能找到 HPV，从而印证了 HPV 是宫颈癌的主要原因，也使宫颈癌成为目前人类所有癌症病变中唯一病因明确的癌症”。是否有 HPV 感染，或 HPV 能否被清除是子宫颈癌能否发生的关键。从一定意义上说，杜绝及根除了 HPV 感染就可以消灭宫颈癌。

1、HPV 的分型

由于 HPV 不能在体外培养，HPV 的分类与其它病毒不同，不是基于血清学，而是根据通过 DNA 测序后与已知 HPV DNA 的同源性确定不同型别的。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]，到目前为止，已发现 200 种以上不同 HPV 型别，40 余种可以感染生殖道粘膜。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, 如 HPV6、11、40、42、43、44、53、54、57 等）和高危型（High-oncogenic risk, HR, 如 HPV16、18、26、31、33、45、51、52、55、56、58 等）。其中 HPV16、18 与宫颈癌关系最密切。Bosch 等^[9]对 22 个国家 32 所医院的 1035 例宫颈癌，用 PCR 技术进行的 HPV 检测，结果发现，92.9% 的宫颈癌 HPV DNA 阳性，且半数以上为 HPV16 感染，其次为 HPV18 等。不同 HPV 型别与宫颈癌的组织学分型及临床分期有关，宫颈鳞状细胞癌中以 HPV16 型常见，宫颈腺癌中则以 HPV18 常见^[10]；HPV16 单独感染或 HPV16 和 HPV18 混合感染引起的病变，临床分期较低，HPV18 单独感染引起的病变临床分期较高，预后较差^[11]。

2、HPV 的结构与功能

1949 年 Strauss 在电镜下发现了 HPV，HPV 属乳多空病毒科多瘤病毒亚科，是一组无包膜小环状双链结构的 DNA 病毒，具有嗜表上皮细胞的特性，直径约 45–55nm，衣壳呈二十面体立体对称，含有 72 个壳微粒，7800–7900 个碱基对，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），3 个功能区即约 5kbp 的早期转录区（early region, E）、3kbp 的晚期转录区（late region, L）和—长约 1kb 的长控制区（long control region, LCR）。

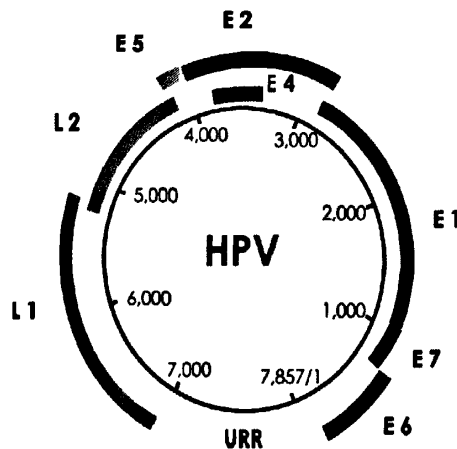


图 1 HPV 的结构^[12]

早期转录区主要对染色体外的 DNA 复制进行调控，包括 E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8(见图 1)。E1 蛋白是 HPV DNA 复制的重要调节因子，维持病毒 DNA 的闭合、环状结构，具有 ATP 酶和 3'-5'解旋酶活性，能够识别 HPV 的复制起始点，在病毒复制起始、延长过程中起关键作用。E2 蛋白是一种凋亡前体蛋白，可通过抑制病毒癌蛋白的复制和诱导凋亡而表现出较强的细胞增殖抑制作用。E2 蛋白还是 DNA 结合蛋白，可通过抑制基因启动子如 HPV16, 18 的 p97 和 p105 的转录功能等多条途径调节 E6 和 E7 的表达。在病毒整合入宿主基因组过程中，E2 是环状结构打开的部位，并常伴有 E2 的破坏或缺失。E2 功能受损，可致 E6 和 E7 持续表达。E3 仅存在于 HPV5 的变异体。E4 蛋白参与病毒装配，并具有破坏宿主细胞骨架的作用。E5 蛋白是细胞膜或内膜整合蛋白，可与表皮生长因子，血小板源性生长因子 β ，集落刺激因子受体结合促进细胞生长，还可抑制细胞凋亡^[13,14]，下调 HLA- I 类分子。在基因整合过程中，E5 完全丢失，因此其主要在 HPV 感染细胞早期的繁殖、扩张中与 E6、E7 一起发挥作用。E6 和 E7 在宫颈癌的发生发展过程中的作用至关重要（详见下述）。E8 仅存在于 HPV1a 和 HPV5 的变异体。晚期转录区包括 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，具有强免疫原性，较多用于 HPV 预防性疫苗的研究。LCR 可以与转录因子相互作用，调节 E 区和 L 区基因的转录。

3、E6、E7 的致癌机制

E6 在 HPV 感染细胞的过程中，是最先表达的蛋白，存在于细胞膜上和细胞核

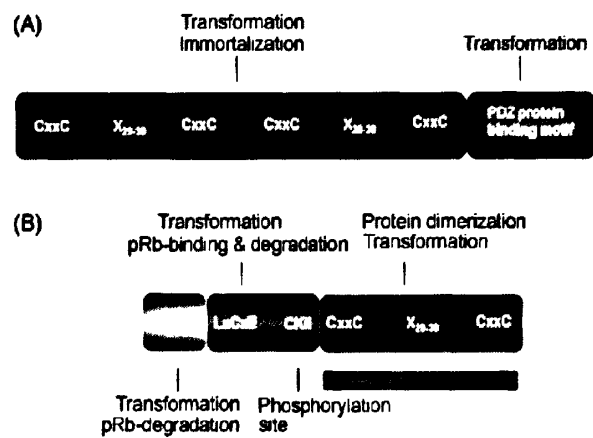


图 2 E6 和 E7 蛋白的结构^[15]

中，其开放读码可以编码 150 个氨基酸左右的小蛋白，分子量为 16-18KD。E6 蛋白

含有四个 C-x-x-C(色氨酸-x-x-色氨酸)的锌指结构(见图 2-A),与细胞的恶性转化,转录激活,蛋白间的相互作用等关系密切。在粘膜高危型 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^[16]。E6 可通过 E6 相关蛋白(the E6 associated protein,E6-AP)与抑癌蛋白 p53 结合,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 下游靶基因 p21, mdm2 和 bax 等的诱导细胞生命周期的停滞及细胞的凋亡抗增殖作用丧失,促进细胞增殖;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 可激活端粒酶,阻止细胞衰老、凋亡^[17];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,使病毒逃避宿主免疫;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 癌基因编码大小约 100 个氨基酸的低分子量蛋白。E7 蛋白有三个保守区 (conserved regions,CR), -NH2 端的 CR1 区, CR2 区, -COOH 端的 CR3 区(见图 2-B)。CR1 区参与细胞转化和 pRb 的降解,却不直接与 pRb 结合。CR2 区含有一保守的能与 pRb 结合的核心序列——LxCxE 和一个酪蛋白激酶 II 的磷酸化位点 (CK II)。CR3 区包括两个 C-x-x-C 基序,两个基序间由 29/30 个氨基酸相隔。CR3 区可以与 pRb 及其它宿主细胞蛋白结合,也可以和金属

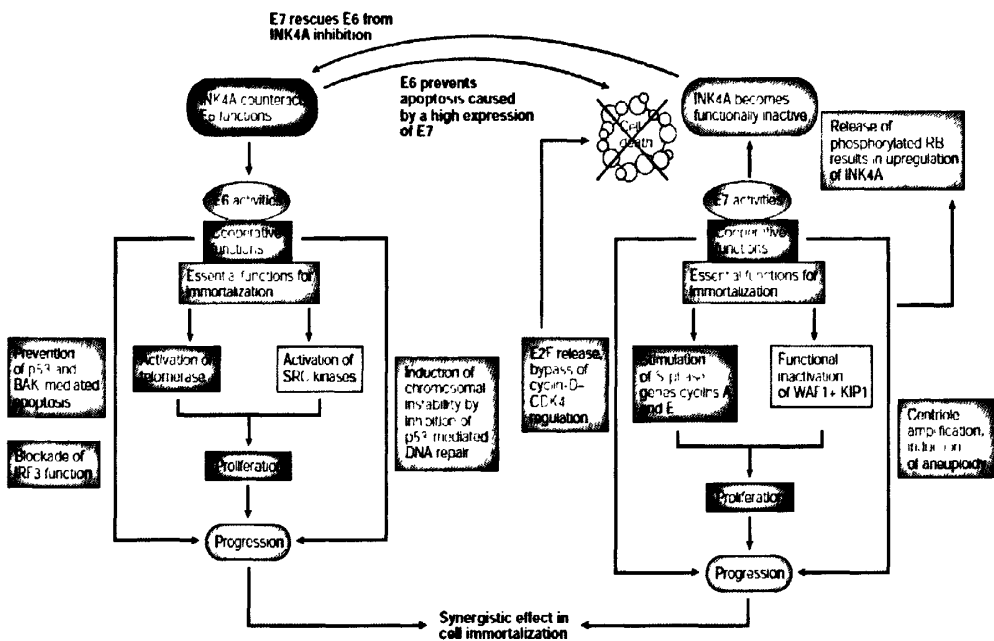


图 3 HPV 的致癌机制^[17]

结合,并且与 E7 蛋白二聚体的形成有关^[15,18]。在正常细胞中, pRb 以非磷酸化状态与 E2F 结合,抑制 E2F 的转录活性。而 E7 与 pRb 的亲合力较 pRb 与 E2F 的亲合力强,HPV 感染细胞后, E7 与 E2F 竞争结合 pRb,使 E2F 处于游离状态,恢复其转录活性,促进细胞由 G1 期进入 S 期,细胞周期调控失控,细胞发生永生化; E7 也可通过泛素蛋白酶体通路直接诱导 pRb 降解,使 E2F 发挥其转录活性^[16]; E7 还可与 pRb 家族的其他成员如 p107, p130 相互作用,使 E2F 游离;此外, E7 可以激活细胞周期调节蛋白 A 和 E,解除细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKIs) 如 p21, p27 对细胞增殖的抑制作用,同时解除了在细胞受损时 p53 介导的细胞生长停滞状态^[19]。

在诱导细胞发生永生化的过程中, E6、E7 不仅有其独立的作用途径,他们可相互协同,提高细胞的转化效率。CKI INK4A 可抑制 E6 的作用,而 E7 可通过激活细胞周期调节蛋白 A 和 E 解除 CKI INK4A 对 E6 的作用。相反地, E7 的高表达可诱导细胞发生凋亡,而 E6 又可抑制此过程。

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一次 HPV,且 70-80% 都依靠自身免疫力经过 7-12 个月予以清除,只有 5%-10% 发展为持续感染。持续感染 HPV 的患者又需要 8-24 个月才有一部分发展为 CIN I、CIN II、CIN III,若要进展为宫颈癌则还需要平均 10-20 年的时间,且只有不足 1% HPV 感染患者最终发展为恶性病变^[20, 21, 22]。也就是说,除了环境因素,免疫及遗传因素在宫颈病变进展过程中可能是不可或缺的^[8]。

1、HPV 基因多态性与宫颈癌的关系

大量流行病学数据显示基因突变株可通过改变病毒的致癌性和免疫源性增强病毒的病原性^[23,24],从而使感染特定型别 HPV16 的病变更易进展为 CIN 和宫颈癌。德国标准株则与病毒的清除及病灶的复原有关^[25]。HPV 基因的突变大部分存在于编码区,可造成基因产物氨基酸的同义或非同义改变。氨基酸的非同义改变可能会使 HPV 基因编码蛋白的构象及功能发生变化。HPV 在人体内可通过抗原提呈细胞将病毒抗原提呈给免疫细胞,诱发人体的细胞免疫和体液免疫,前者可清除体内易感染的 HPV,后者则可防止同型 HPV 的二次感染。HPV 突变体的基因产物有可能改变 HPV 抗原决定簇区的性质而使病毒逃脱宿主免疫反应。突变株表达各种蛋白引起癌蛋白的作用改变,影响其与其它癌基因、抑癌基因间的相互作用,造成永生化或非永生化;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,使细胞周期调控机制失控,造成细胞增殖。有研究表明, HPV 突变株可造成 HPV 的持续感染,介导癌前病变向宫颈癌的转变^[26, 27]; HPV 突变株可能影响病毒的组装、转录,致病能力,对 p53 的降解能力及促进细胞发生永生化的能力^[28, 29, 30, 31]; HPV 突变株还可能影响

PCR的敏感性和特异性。Zehbe I^[32]等的最新研究显示, 感染HPV16E6突变株细胞和感染德国标准株(Seedorf等^[33]于1985年首先在德国一妇女宫颈癌组织中测序所得的标准序列)细胞相比, 突变株尤其是Q14H/H78Y/L83V亚美株可同时导致角质素5和10的异常表达, 从而阻止细胞分化、凋亡, 促进细胞增殖。表明某些特定突变株具有较强的致癌能力。

世界上研究热点主要集中在HPV16/18E6、E7、LCR。Yamada等^[34]研究发现, 宫颈癌组织中HPV16基因主要突变型别存在地域差异, 根据E6、L1、LCR的突变情况将HPV16突变型别分为欧洲株1, 非洲株2, 亚洲株, 北美株, 亚美株等六大类。其中对E6的研究最多, 在欧洲地区主要突变为E350G/T(L83V, 即第83位氨基酸由缬氨酸变为亮氨酸), 亚洲主要为T178G(D25E, 即第25位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸)。E350G/T/L83V又是热点中的热点。发现世界各地该突变株的分布各不相同, 不同地区中该突变型别与宫颈病变关系亦有明显差异。在墨西哥HPV16 E6基因L83V突变株在浸润性宫颈癌中占93.5%^[26], 在北美洲为40%, 在日本为28%^[35], 在东南亚仅为6%。在英国和瑞典, E6突变株E350G(L83V)与HPV的持续感染和宫颈病变由低级向高级转化有关^[36,37], 但Londesborough 等报道 HPV16 E6 L83V与宫颈上皮内瘤样病变1级向3级的转化有关^[38]; 在瑞典, L83V与浸润性宫颈癌有关^[39, 40], 而在意大利和捷克却主要与宫颈早期坏死有关, 与浸润性宫颈癌无明显相关性^[41, 42]。我国的研究主要集中在HPV16 E6和E7基因。91例新疆维吾尔族妇女宫颈癌患者主要以T350G, 即L83V突变为主, 占53.6%, 其次为标准株(39.6%), D25E(4.25%)位居第三^[43]。广东地区的热点突变在nt178, 即D25E^[44]。张爱东等^[45]对四川省158例宫颈癌患者进行研究发现, E6基因型别主要以欧洲标准株(23%)和东亚株T178G/D25E(30.1%)为主, 且发现了一些未曾报道的基因突变, 如G94A, C173T, A203G, C240G, A464G 和 T511C。

E7与E6相比, 序列比较保守, 远不如E6突变株多。最常见的E7突变为G647A(N29S)^[46, 47], 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。在韩国和泰国性工作者中还检测到E7 N29S和E6 L83V变异共存现象, 这种协同变异在宫颈癌发生中的作用尚未明确。我国南昌和珠海地区发生率最高的E7基因突变也为N29S^[47]。

LCR被誉为HPV基因组中最多变的基因, 其细胞型特异性增强(cell-type-specific enhancer, CTSE), 是LCR的重要组成部分, 参与诱导启动子P97的活性, 从而调控转化基因E6 / E7的转录水平。HPV16 CTSE变异可以导致病毒DNA物理状态的改变(由整合型变为游离型), 从而影响宫颈癌的发生过程; LCR的E2结合区ACCN6GGT重复序列发生突变(如C7450T)可以通过下调E2的表达促进宫颈癌的发生^[48]。

世界上关于E2突变株的研究相对较少, Sathish N^[49]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^[50, 51]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。我国还没有此方面的报导。对于E5、E4突变株的研究就更少了。

2、HLA 和宫颈癌

感染 HPV 病毒的妇女大部分可依靠自身的免疫力将病毒清除, 这就需要主要组织相容性复合物 (MHC) 即人白细胞抗原 (HLA), 借助抗原提呈细胞将病毒抗原提呈给 T 细胞, 诱发机体细胞免疫和体液免疫。研究显示, 细胞免疫主要在清除已感染的 HPV 上发挥作用, 体液免疫则阻止同型 HPV 的二次感染。

HLA 是位于人 6p21.31 的一组紧密连锁基因, 基因全长 3 600~4000 kb, 约占人类整个基因组的 1 / 3 000, 是最复杂的人类遗传多态性系统。根据 HLA 复合体中基因座在染色体上的分布情况及其所编码分子的功能差异, HLA 复合体可分为 I、II、III 三类基因, HLA I 类基因长约 1600-2000kb, 靠近染色体顶端, 有 A、B、C、E、H、G、F 基因, HLA-A、B、C 基因编码 HLA-A、B、C 抗原的重链 α 链, I 类抗原的另一条多肽链为位于 15 号染色体的非 HLA 基因编码的轻链 β_2 微球蛋白, 承担向 CD8⁺ 细胞或抑制性 T 细胞提呈肽类的功能, I 类抗原有 7—8 个外显子, 多态性的高变区主要在第 2, 3, 4 外显子。HLA II 类基因长约 1000-2000kb, 靠近染色体着丝点, 有 DP、DQ、DR 和 DZ、DO、DX 等基因, 由大小为 33kDa 链和大小为 28kD 的 β 链组成, 与将 HLA I 类分子装配为多功能蛋白酶及抗原加工相关转运子有关, 能够将加工过的内源性或外源性肽类抗原提呈给 CD4⁺ 辅助细胞, $\alpha 1\beta 1$ 结构域是抗原肽段结合部位并具有高度多态性。HLA III 类基因长约 2000kbp, 位于 I 类和 II 类基因之间, 至少还有 35 种基因, 主要含有与补体有关的 C2、C4A、C4B 以及热休克蛋白 70、肿瘤坏死因子 α 和 β 等基因。

1991 年 Thomssen 在《Nature》杂志上首次报道德国宫颈鳞状细胞癌 (SCCC) 中 HLA-DQB1 03 相关联。此后, 众多报道证实, HLA 与 CC、CIN 和 HPV 感染相关。实验室和临床证据表明, HLA 多态性对 HPV 感染逃脱免疫监视的可能机制有: ①HLA-I 类分子的表达下调、缺失、表达异常或其基因结构异常。E5 即可下调 HLA I 类分子。②HLA-II 类分子基因的多态性及异常表达。③病毒本身变异避开 HLA 免疫识别的监视效应。1995 年 Keating 等发现, 宫颈癌患者 HLA-I 类分子表达降低的现象。一些报道集中在 3 组 HLA-II 类等位基因 / 单倍型: ①DQB1*03(0301, 0302,

0303)。②DRB1*1501-DQB1*0602(连锁不平衡单倍型)。③DRB1*13-DQB1*0603(这两个等位基因存在连锁不平衡)。各种研究结果最一致的发现是, DRB1*13-DQB1*0603 可降低发生宫颈癌的危险性。也有研究相继发表许多与 CC 存在关联的其他等位基因的研究: 伊朗南部 CC 患者中 HLA-DQB1*0601 与宫颈上皮细胞癌之间显著关联; 瑞典妇女中, DRB1*15 和 DQA1 *0102 - DQB1* 0602 与浸润性宫颈癌间显示正关联; DRB1*07 和 DQB1 *0201 与 CC 呈负关联; Climent 等研究发现, DRB1*16 和 DRB1*11 与 CC 间呈正关联, 而 DRB1*01、DRB1*04、DRB1* 14、DRB1 *15、DQB1*04、DQB1*05、DQB1*06 则显示负关联。Castro 等对芬兰 CC 患者研究发现。HLA -B*07 和 HLA-DR*02 可增加 CC 患者的风险性, 而 HLA-DR*86 和 HLA-B*15 却可降低 CC 患者风险性, 支持 CC 发生确实存在明显遗传易感性。法国研究者也发现, HLA-DRB1*1301 或 DRB1*1302 等位基因能抑制 CC 发展。委内瑞拉的研究中。HLA -DQB1*0201-0202 和 *0402 等位基因可增加 CC 风险性。对美国和哥斯达黎加妇女研究发现, HLA-DRB1 *13 单倍型 (HLA-A *02-B* 05-DRB1*13; HLA-A*02-B*44-DRB1*13; HLA-A*02-B*51-DRB1*13)能降低 CC 发生的风险性, 相关性<1。在美洲西南部印第安 CC 妇女中, HLA -A*02 和 DRB1*1402 使 CIN 的风险减少; DRB1 *1501 和 DQA1*0102 使 CIN 的风险增加。对越南妇女研究发现, 宫颈不典型增生与 HLA-DQB1*0302 和 HLA-DOB1*0601 呈正相关, 但与 HLA-DQB1*0301 显示负相关; Ades 等研究发现, B7-DRB1*1501-DQB1*0602 单倍型可以降低高度 CIN 的危险, 尤其是针对感染高危型 HPV 更具有保护作用。也有报道显示, CC 与 HLA-DRB1*0401-DQB1*0301 单倍型与 CC 有关; A*0207 / 0215N 或 A*2402 与浸润性宫颈癌呈负相关, 而 A*1104 则增加浸润性宫颈癌的风险。2008 年 Madeleine 等研究发现, 复合体 A*0201-B*4402-Cw*0501-DRB1*0401-DQB1*030 与宫颈癌发生呈正相关, 同时发现 A*0101-B* 0801-Cw *0701-DRB1* 0301-DQB1 *0201 与 HPV16 阳性宫颈癌有关。Jordanova 等研究 MHC-I 类相关分子显示: HLA-A-MICA 及 CD8 / Treg 的低表达与宫颈癌低生存率呈正相关^[52-60]。

3、p53 和宫颈癌

p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因, 定位于人染色体 17P13. 1 上, 主要功能是控制细胞周期 G1 / S 和 G2 / M 两个关卡, 正常情况下 p53 含量较低, 细胞 DNA 损伤情况下, p53 激活 p21 等下游基因, 抑制细胞从 G1 期进入 S 期, 使损伤的 DNA 在复制之前有足够的时间修复, DNA 修复后方可继续进入细胞周期进行有丝分裂。如果 DNA 损伤过重, P53 则可激活 Bak (Bcl-2 家族成员之一), bax.1 和 fas 受体基因诱导细胞凋亡。E6 蛋白通过 E6 关联蛋白 (E6 associated

protein, E6-AP) 结合并降解 p53 蛋白, 使积累了损伤 DNA 的细胞越过 G1 / S 检验点, 细胞周期继续运转, 使 DNA 受损的细胞既不能修复 DNA 损伤, 又不发生凋亡, 最终导致细胞基因组不稳定, 细胞发生永生化。

p53 的多态性主要体现在其第 4 外显子 72 密码子所编码的氨基酸。1987 年, Maflashewski 等从正常人的体细胞中克隆出 p53 cDNA, 发现 p53 codon 72 存在 2 种变异形式: 编码脯氨酸(proline, p53Pro)的密码子 CCC 和编码精氨酸(arginine, p53Arg)的密码子 CGC。其产物可能为 Pro/Pro 或 Arg/Arg 纯合子, 也可能为 Arg /Pro 杂合子。研究发现, 在实体肿瘤中, p53 基因突变和杂合性缺失现象很常见, 但在宫颈癌的发生频率则极低。此后, p53 codon 72 的变异与宫颈癌的关系引起广大学者的高度重视, 1998 年 Storey 等首次提出 p53Arg 纯合型个体更易感染 HPV, 此种个体患宫颈癌的几率是 p53Pro 纯合型个体的 7 倍。1999 年, 该研究组又发现 p53 codon 72 的两种基因型均为野生型。在此后的大量研究中, 结果显示很不一致。在韩国和南非的研究显示 P53Arg 纯合子与宫颈癌遗传易感性相关; 而英国、日本显示 p53codon72 的多态性与宫颈癌遗传易感性不相关; 甚或有的得到相反的结论, 在他们调查的人群样本中, p53 Arg / Arg 纯合子表面看来具有保护作用, 可以阻止宫颈癌的发生, 可以减少宫颈癌的发病。还有的学者得出的结论是 Pro / Pro 纯合子是宫颈癌的危险因素, 即导致宫颈癌的可能性要高于 Arg / Arg 纯合子。我国新疆地区研究表明 Arg 型可能是维吾尔族宫颈癌遗传易感因素, Pro 型可能是汉族宫颈癌遗传易感因素^[61-64]。有的研究还显示, 虽未发现宫颈鳞癌与 p53Pro / Pro 纯合子之间的关系, 但却发现 p53 Pro / Pro 纯合子提高了宫颈腺癌的易感性^[65]。由此看出该位点多态性与宫颈癌遗传易感性的关系在不同国家、地区、种族的人群中可能存在差异。

有报道回顾分析了 1998—2002 年间的相关文献, 进行了 Meta 分析和回归分析^[66]。在宫颈癌前病变中, 没有发现相关性或异质性的证据。在无明确组织学检查的浸润性宫颈癌中, Arg / Arg 基因型并不增加其发生风险。但是, 在宫颈鳞状细胞癌和腺癌中, 其危险度略有上升。Meta-回归分析表明: 在对照组, 哈带-温伯格平衡差异是造成浸润性病变异质性最重要的因素。但是, 对整体研究而言, 不存在平衡差异。也许由 p53 第 72 位密码子多态性造成的易感性在宫颈癌发生的后期起一定的作用。但是, 不同的方法学分析会造成哈带-温伯格平衡差异, 从而为多态性的检测造成了一定困难。

4、Rb 和宫颈癌

视网膜母细胞瘤 (Rb) 基因是发现的第一个抑癌基因, 定位于 13q14。pRb 处于细胞周期 G1 / S 关卡的中心环节。在去磷酸化状态下 Rb 蛋白结合转录因子 E2F 蛋白, 阻止 E2F 蛋白激活众多的与 DNA 复制有关的蛋白因子, 从而抑制 DNA 合成和

细胞周期进展,使细胞处于 G0 / G1 期和进行细胞分化。E7 蛋白主要结合并降解 Rb 蛋白,释放 E2F 蛋白使激活许多相关的 DNA 合成的蛋白因子,加快 DNA 复制和细胞的分裂繁殖,促进细胞的转化。

目前尚没有关于宫颈癌组织中 Rb 基因多态性的研究,而在其它与 Rb 基因有关的疾病(如食管癌,成视网膜细胞瘤)中已发现 Rb 基因第 9、10、14、17、18、20、23.3 外显子多态性与宿主对疾病的易感性有关^[67,68]。

5、HPV 多态性与 HLA, p53,Rb 基因多态性的关系

在日本人群中,DRB1*1501 和 DQB1*0602 在感染 HPV16E6 原型的患者中出现频率显著高于其它等位基因,而 DRB1*1502 在感染 HPV16E6 突变型 D25E 的患者中出现频率较高^[69]。此外,在 HLA-B7 阳性的宫颈癌患者中感染 E6G131 突变型较多,但这一结论还没得到证实^[70]。Zehbe and collaborators 描述了 HPV16E6350G 突变型与 HPV-I 和 II 的相关性,但此项研究也有待于进一步证实^[71,72]。有研究显示,HPV16 E6 L83V 突变个体与正常人相比,Arg/Arg 纯合子 p53 基因占优势,说明 HPV16 E6 L83V 突变可能和 p53 基因多态性共同参与宫颈病变的发生^[73]。HPV 多态性与 p53,Rb 基因多态性间的关系国内外研究的都很少甚或没有。

综上所述,HPV 和 HLA、p53 基因多态性与宫颈癌的发生发展的关系还有很多不确定因素,尤其是我国地域辽阔,民族众多,不同地区,不同民族宫颈癌的发病率差异很大,基因多态性和宫颈癌关系的差异也很大。尤其是关于 Rb 基因多态性与宫颈癌的关系,HPV 基因多态性和 HLA,p53,Rb 基因多态性的关系,国内外研究还不是很多,所以对基因多态性的研究还需进一步进行。

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. 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.
10. Altekruze SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, et al. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188(3): 657–663.
11. 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.
12. Boulet G, Horvath C, Broeck DV, Sahebali S, et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J B C.* 2007; 39: 2006–2011.
13. 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.
14. Zhang B, Spandau DF, Roman AS. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *Viol.* 1996; 76: 220–231.
15. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(5): 342–350.
16. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006; 16: 83–97.
17. Fehrman F, Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Onco.* 2003; 22: 5201–5207.
18. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis[J]. *Viol.* 2004; 78: 11451–11460.
19. Zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 690–698.
20. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc.* 2006; 106(3 Suppl 1): S2–S8.
21. Damasus-Awatai G, Freeman-Wang T. Human papillomavirus and cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003; 15(6): 473–477.

22. 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.
23. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*,2005, 32 (Suppl. 1):S1-S6.
24. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, 2006,118: 1071-1076.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Kimbauer R,Taub J,Greenstone H, Roden R,et al.Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*, 1993, 67:6929-6936.
30. Rastogi T, Hildesheim A, Sinha R. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nat Rev Cancer*, 2004,4:909-917.
31. 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.
32. Zehbe I,Richard C,DeCarlo CA,Shai A,et al. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis.*Virol.*,2009,383:69-77.
33. Seedorf K, Krammer G, Dürst M, Suhai S, et al. Human papillomavirus 16 DNA sequence. *Virol*, 1985,145:181-185.
34. 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.
35. 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: 829-833..
36. 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.
37. 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.
38. Tu JJ, Kuhn L, Denny L, Beattie KJ, Lorincz A, Wright TC Jr. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(2):736-742.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 朱开春玛, 依努尔·尼娅孜, 代建霞, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 型 E6 基因变异分析[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 13(3): 209-212.
44. 刘国炳, 刘欣, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16E6 序列多态性及同源性分析[J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(13): 985-998.
45. 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.
46. 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, 87:1181-1188.
47. Vaeteewoottacharn K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas. *Anticancer Res*. 2003, 23(2C):1927-1931.
48. Bhattacharjee B, Sengupta S. HPV16 E2 gene disruption and polymorphisms of E2 and LCR: some significant associations with cervical cancer in Indian women. *Gynecol Oncol*. 2006, 100(2):372-378.
49. 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.
50. 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.

51. 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.

52. Climent C, Nazario CM, Umpierre S, et al. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer in Puerto Rican women. *P R Health Sci J*, 2007, 26(2): 97-101.

53. Castro FA, Haimila K, Pasanen K, et al. Geographic distribution of cervical cancer-associated human leucocyte antigens and cervic'ol cancer incidence in Finland. *Int J STD AIDS*, 2007, 18(10): 672- 679.

54. Dao DD, Sierra-Tortes CH, Robazetti SC, et al. HLA-DQB1 and Cervical cancer in Venezuelan women . *Gynecol Oncol*, 2005, 96 (2): 349-354.

55. Carreon JD, Martin MP, Hjlidesheim A, et al. Human leukocyte antigen class I and II haplotypes and risk of cervical cancer. *Tissue Antigens*, 2005, 66(4): 321-324.

56. SchfffMA, Apple RJ, LinP, et al. HLA alleles and risk of cervical intraepithelial neoplasia among southwestern American In an women. *Hum Immunol*, 2005, 66(10): 1050-1056.

57. Lema C, Fuessel-Haws AL, Lewis LR, et al. Association between HLA-DQB1 and cervical dysplasia in Vietnamese women. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(3): 1269-1277.

58. Ades S, Koushik A, Duarte-Franco E, et al. Selected class I and class II HLA alleles and haplotypes and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 2008, 122(12): 2820-2826.

59. Madeleine MM, Johnson LG, Smith AG et al. Comprehensive analysis of HLA -A, HLA—B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 loci and squamous cell cervical cancer risk. *Cancer Res*, 2008, 6(80): 3532—3539.

60. Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, et al. Human leukocyte antigen class I. MHC class I chain-related molecule A and CD8+ / regulatory T—cell ratio: which variable determines survival of eervieal cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(7): 2028-2035.

61. Jee SH, Won SY, Yun JE. et al. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta analysis. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004, 85(3): 301-308.

62. 郝明蓉, 张燕华, 吴俊梅. p53 codon 72 多态性与子宫颈癌关系的研究. *华西医科大学学报*, 2002, 33(2): 274-275.

63. 半灿宇, 刘继红, 黄必军, 等. p53 基因多态性与宫颈癌关系的初步研究. *癌症*, 2004, 23(z1): 1396-1399.

64. 王晓凌, 潘晓琳, 郑兴征, 等. p53 Arg72Pro 多态性与新疆维吾尔族宫颈癌的相关性. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23(2): 151-155.
65. Yang YC, Chang CL, Chen ML Effect of p53 polymorphism on the susceptibility of cervical cancer. Gynecol Obstet Invest, 2001. 51(3): 197-201
66. IKoushik A. Platt R W. Franco E L. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: A meta-analysis review . Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004,13(1): 11-22.
67. Shu Q, Ma QF, Liu SY, Zhang N. Genetic polymorphisms of Rb and susceptibility of esophageal cancer. Zhonghua Waike Zazhi.,2000, 38(5):375-377.
68. José R Valverde ,et al. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. BMC Genetics.,2005,6:53
69. Matsumoto K, Yasugi T, Nakagawa S, Okubo M, Hirata R, Maeda H,et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer. Int J Cancer,2003,106: 919-922.
70. Etherington IJ, Ellis JR, Luesley DM, Moffitt DD, Young LS. Histologic and immunologic associations of an HPV16 variant in LSIL smears. Gynecol Oncol, 1999, 72: 56-59.
71. Zehbe I, Mytilineos J, Wikstrom I, Henriksen R, Edler L, Tommasino M. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. Hum Immunol, 2003, 64: 538-542.
72. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JM, Stukart MJ, et al. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. Int J Cancer 1998; 78:166-171.
73. 黄文林, 姜勇, 董小平, 等. 分子病毒学 (研究生教材), 人民卫生出版社, 2002.

攻读学位期间的研究成果

彭丽娜, 王言奎, 罗兵, 刘元芳, 赵雪珍. 山东青岛地区宫颈癌组织中 HPV16E6 和 E2 基因突变分析. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15. 待发表

赵雪珍, 王言奎, 彭丽娜, 张红. 宫颈癌组织中 HPV16URR、E7 基因突变和序列多态性分析. 青岛大学医学院学报, 2010, 待发表

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

时光总是流逝的这么快，转瞬三年的硕士研究生生活已经接近尾声。三年的时间里，无论是在学习还是工作中都受益匪浅。首先要感谢我尊敬的导师王言奎教授，衷心感谢恩师三年来在学业上的精心指导和殷殷教诲，以及生活上无微不至的关心与照顾。王老师严谨的学风、渊博的知识、敏锐的思维、灵活的手法，幽默的言谈，高尚的人格和宽厚豁达的学者风范使我终身难忘。我将以恩师为榜样，在今后的工作学习中努力进取，不断前进。

衷心感谢戴淑真教授在我学习工作期间给予的悉心指导和热心帮助。感谢姚勤老师、王黎明老师、于风胜老师，叶元华老师，彭伟老师，徐琳老师、张春梅师姐等在我临床工作中给予的无私指导。感谢妇产科全体老师对我工作和学习的支持和帮助。

在课题研究过程中，我非常荣幸的得到青岛大学医学院病原微生物教研室罗兵教授的悉心指导，得到王云老师，史文天师兄，葛翠翠，刘霞，李欣师姐的耐心帮助，在此对他们表示感谢和祝福！同时还要感谢同窗赵雪珍，同学张霞、崔瑛、李敏等在学习中的诸多帮助，感谢舍友任飞飞、戚玉言、孙蕾芳，好友秦琛、赵娜、柳明等的诸多照顾，感谢所有未提及姓名但给予过帮助与关怀的老师、同学和朋友！感谢你们使我的研究生生活丰富多彩，愿我们的友谊地久天长。

最后，我要感谢一直给予我默默支持和帮助的父母。谢谢两个字不足以表达我对二老的感激。感谢父母二十余年来含辛茹苦地养育之恩，教诲之意，让我可以健康快乐地度过校园生活；感谢父母用家庭的温暖为我挡去风雨险阻，让我拥有一颗积极乐观的心去面对生活和工作。

知识无涯苦作舟，硕士研究生学业的完成只是求知道路上的一个重要阶段，以后还有更多的路要走，更多的知识要掌握，探索。我将用我的最大努力，极大的热忱去迎接新的挑战！以报答所有关心我的人，并为我们的事业，社会做出应有的贡献！

学位论文独创性声明

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

本人如违反上述声明，愿意承担由此引发的一切责任和后果。

论文作者签名：彭丽娜

日期：2010 年 5 月 30 日

学位论文知识产权权属声明

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

本学位论文属于：

保密 ☐，在 年解密后适用于本声明。

不保密 ☒。

（请在以上方框内打“√”）

论文作者签名：彭丽娜

日期：2010 年 5 月 30 日

导师签名：王介

日期：2010 年 5 月 30 日

（本声明的版权归青岛大学所有，未经许可，任何单位及任何个人不得擅自使用）

作者：[彭丽娜](#)
学位授予单位：[青岛大学](#)

本文读者也读过(10条)

1. [虞成超](#) [心理干预对生殖道支原体、衣原体感染患者临床疗效的影响](#)[学位论文]2010
2. [杨军锋](#). [鲁盈](#). [杨汝春](#) [SLE患者外周血P-gp表达与激素疗效关系的研究进展](#)[期刊论文]-[光明中医](#)2009, 24 (3)
3. [杨易](#). [许沈华](#). [YANG Yi](#). [XU Shen-hua](#) [胃癌P-糖蛋白表达的临床意义及逆转策略](#)[期刊论文]-[中国肿瘤](#)2006, 15 (8)
4. [潘俊峰](#). [周友珍](#). [吴澄宇](#) [反义MDR1-RNA表达质粒的构建及其对宫颈癌耐药细胞的逆转作用](#)[会议论文]-1998
5. [卢可欣](#) [肺炎支原体多抗原表位表达载体的构建与鉴定](#)[学位论文]2010
6. [刘小平](#). [吴素歌](#). [韩苏夏](#). [李恩孝](#). [吴向陇](#). [李旭](#). [李信民](#). [闫春芳](#) [耐药基因MDR1和GST- \$\pi\$ 在宫颈癌组织中的表达](#)[期刊论文]-[西安医科大学学报](#)2000, 21 (6)
7. [李张云](#) [非小细胞肺癌RRM1表达与吉西他滨体外药敏相关性的研究](#)[学位论文]2010
8. [梅晓冬](#). [蒋旭琴](#) [MRP与肺癌耐药机制](#)[会议论文]-2007
9. [张岩](#). [李宁](#) [子宫颈癌患者新辅助化疗前后癌组织中mdr1、肺耐药蛋白mRNA及其蛋白的表达变化和意义](#)[期刊论文]-[中国综合临床](#)2009, 25 (1)
10. [石健](#) [P-gp、c-erbB-2/Her2与肿瘤](#)[学位论文]2008

引用本文格式：[彭丽娜](#) [山东青岛地区宫颈癌组织中HPV16E6和E2基因突变分析](#)[学位论文]硕士 2010