

分类号: R737.33
UDC: 610

密级: 不保密
学校代码: 11065

268

青岛大学

硕士学位论文

山东青岛地区宫颈病变组织中 HPV16 URR 和 E6 基因突变分析

赵成琳

指导教师	王言奎 教授
学科专业名称	妇产科学
论文提交日期	2011 年 4 月 8 日
论文答辩日期	2011 年 5 月 29 日
答辩委员会主席	孔北华 教授

摘要

目的

分析山东省青岛地区妇女不同宫颈病变组织中人乳头瘤病毒16型(HPV16)上游调控区(URR)和E6基因序列多态性,以及序列变异与宫颈病变的相关性。

材料与方法

[1] 2007年8月至2010年7月间自青岛大学医学院附属医院收集宫颈病变标本共374例,其中120例为该院妇产科住院病人手术切除宫颈癌组织,病理诊断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。254例标本是选取门诊病人宫颈液基细胞学涂片异常的宫颈活检标本,其中50例病理诊断为宫颈上皮内瘤变III级(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN),32例病理诊断为宫颈上皮内瘤变II级。

[2] 采用蛋白酶K法提取新鲜组织标本DNA。

[3] 以提取的DNA为模板,采用聚合酶链反应(PCR)技术,以通用引物(MY09/11)筛选出感染高危型HPV的宫颈组织标本,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URR和E6基因全序列,将所获得PCR基因产物进行纯化后测序,与德国HPV标准株进行比对分析,寻找HPV16 URR和E6的突变位点。

结果

[1] 宫颈癌组、CINI组 和 CINI组 HPV16 感染率分别为 60.00%(72/120)、43.10% (50/116) 和 23.19% (32/138), 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。

[2] URR 测序结果发现了 19 个突变位点,所有标本在 7521 位点均发生了 G→A 突变; 64.22% (70/109) 标本中检测到 24, 7730 和 7842 的联合突变, 为另一突变热点。E6 测序结果共发现 17 个突变位点, 突变热点为 178 位点 (D25E), 其在宫颈癌组、CINI组 和 CINI组 的比例分别为 61.11%(44/72)、62.00%(31/50)和 50.00% (16/32), 三组之间差别无统计学意义 ($P=0.499$)。仅观察到 6 例 350 位点突变 (L83V)。AS 是最多见的突变类型, 在 154 例 HPV16 阳性标本中占 59.09%, 其次为 E-P 原型 33.12%。

结论

[1] HPV16感染与宫颈癌的发生发展密切相关。

[2] 青岛地区妇女宫颈病变组织中 HPV16 URR 突变热点为 nt7521 以及 nt24, 7830 和 7842 的联合突变。HPV16 E6 突变热点为 nt178。

[3]AS 和原型是青岛地区宫颈病变组织中两种主要的 HPV16 分支。

关键词:宫颈肿瘤; 人乳头状瘤病毒; **URR; E6;** 基因突变

Abstract

Objective

The study was performed to investigate genetic variants of the HPV16 URR and E6 genes derived from Qingdao women with different stages of cervical lesions, and to assess the association between the sequence variant and the cervical lesions.

Materials and Methods

[1] We use the technology of polymerase chain reaction (PCR) to detect 120 cases of cervical cancer, 254 cases with cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Then we selected samples with HPV16 positive, and amplifies the HPV16 URR and E6 genes. The products of PCR were purified and sequenced, and then were compared with the standard strain.

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

[3] The extracted DNA samples were amplified by polymerase chain reaction(PCR) using specific primers for high-risk HPV(MY09/11), HPV16 to identify the positive tissues.

[4] DNA extracted from the HPV16 positive tissues were amplified by the primers for URR and E6, then the PCR fragments of HPV16 URR and E6 genes were purified, sequenced and compared with the standard stain.

Results

[1] HPV16 was present in 60.00%(72/120) of cervical cancers, 43.10% (50/116) in CINIII and 23.19% (32/138) in CINII. The distribution of HPV16 in Qingdao were significantly associated with cervical neoplasia development ($P=0.000$).

[2] There was 19 kinds of mutations in the URR gene. The mutation at nt 7521 from G to A was most frequent. A remarkable finding was the co-mutations including nt 24, nt 7730 and nt 7842. The most frequent sequence variation of E6 was nt 178, which was 61.11% (44/72)、62.00% (31/50) 和 50.00% (16/32) in Cervical cancer、CINIII and CINII. The mutation of L83V was only found in 6 cases. In Qingdao area, two major branches of HPV16 were type AS 59.09%, followed by protype 33.12%.

Conclusions

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

[2] The mutational hot spots of HPV16 URR are nt7521 and a co-mutation including nt24, nt The mutational hot spots of HPV16 URR are nt7521 and a co-mutation including nt24, nt7830 and nt7842. The hot spot of E6 was nt178.

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

Key words: Cervical carcinoma; HPV; URR gene; E6 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实验组织标本.....	2
1.1.4阳性对照细胞	3
1.2实验方法.....	3
1.2.1实验标本DNA的提取及溶解.....	3
1.2.2聚合酶链反应PCR.....	4
1.2.3实验步骤.....	6
1.2.4扩增核酸产物电泳分析.....	6
1.2.5目的基因测序及分析.....	7
1.2.6统计学分析.....	7
第2章结果.....	8
2.1实验标本中HPV16的扩增结果.....	8
2.2HPV16阳性标本中URR、E6的扩增结果.....	8
2.3DNA测序结果.....	9
2.3.1HPV16 URR的测序结果.....	9
2.3.2 HPV16 E6的测序结果.....	10
2.4实验结果分析.....	11
第3章讨论.....	14
3.1HPVURR, E6基因的结构和功能.....	14
3.2HPV16 URR, E6的突变情况.....	15

结论.....	17
参考文献.....	18
综述.....	21
攻读学位期间的研究成果.....	33
致谢.....	35
学位论文独创性声明.....	36
学位论文知识产权权属声明.....	36

引言

宫颈癌(cervical cancer)是常见的妇科恶性肿瘤。据统计, 每年新发宫颈癌病例中有80%来自发展中国家^[1], 我国每年新发病例约13.15万, 占世界每年宫颈癌新发病例总数的28.8%, 且近年来呈现地区增长及发病年龄提前的现象^[2]。自1974年德国Zur Hausen等提出人乳头状瘤病毒与子宫颈癌发病可能有关的假说^[3]以来, 国内外学者通过收集不同国家区域病例标本, 并采用PCR等其他技术对子宫颈癌与HPV感染关系进行了大量研究, 发现90%以上宫颈癌组织样本中可检测到高危HPV DNA, 说明HPV感染与宫颈癌的发生发展密切相关^[4]。目前学者普遍认为, 高危型HPV感染是宫颈癌发生发展的重要因素^[5]。

HPV属乳多空病毒科家族(papovaviridae family), 是一组体积较小的环状双链并由DNA核心和蛋白衣壳组成的无包膜病毒。HPV基因组含有近8 000碱基对(bp), 分为3个部分, 包括早期区(early region, E)含有E1, E2, E4, E5, E6和E7共6个基因; 晚期区(late region, L)和长控制区(long control region, LCR)。到目前为止, 已鉴定出200多个HPV基因亚型, 根据其致癌性的大小分为高危型(High-oncogenic risk HPV)和低危型(Low-oncogenic risk HPV)。高危型HPV如HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58等, 通常引起生殖道的高级别甚至恶性病变, 如宫颈上皮内瘤样病变II-III(cervical intraepithelial neoplasia II-III, CINII-III)和浸润性宫颈癌等, 其中HPV16和HPV18是导致宫颈癌最常见型别; 而低危型HPV如HPV6, 11, 42, 43, 44, 54, 61等, 常引起女性生殖道良性病变, 如肛周皮肤和阴道下部的湿疣类病变和低度宫颈上皮内瘤样病变(CINI)。

HPV的感染最常见于年轻及性活动活跃的人群, 其中70-80%都依靠自身免疫力予以清除, 20-30%转为持续感染, 10%进展为CINI, 只有1%发展为浸润性癌^[6,7], 另外一些机体和环境的因素也能够增加HPV的严重感染和持续感染并发展为宫颈上皮内肿瘤和宫颈癌。HPV感染细胞后以两种物理状态存在: 在良性病变中HPV常以游离的形式存在, 这部分病变多见于低危HPV感染; 而在与HPV相关的恶性肿瘤中, 病毒DNA常以单拷贝或多拷贝整合到宿主染色体中, 使相应的基因调控失调, 该部分多见于高危HPV感染。HPV在整合到细胞DNA的过程中, 病毒基因组常发生断裂, 导致病毒基因缺失或发生改变, 使病毒癌基因E6 / E7在宫颈组织中得以持续过量表达^[8]。同时大量流行病学数据显示基因发生突变后, 可使感染特定型别HPV16的病变更易进展为宫颈癌, 由此可见宫颈癌的发生发展是一个多因素导致的结局。

本研究通过分析山东青岛地区妇女不同宫颈病变组织中 HPV16 URR 和 E6 基因突变规律, 了解基因突变的地域性特点及其与宫颈癌发生发展的相关性。

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) 凝胶成像系统 | 美国 PE 公司 |
| 3) 水平电泳仪及电泳槽 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 4) 电子天平 | 上海天平仪器厂 |
| 5) 高速低温台式离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 6) 可调式微量移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 7) 紫外分光光度仪 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 8) 可调式微量移液器 | 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) 无水乙醇 | 烟台三和化学试剂有限公司 |
| 3) 氯仿 | 烟台三和化学试剂有限公司 |
| 4) Tris 饱和酚 | 北京索莱宝科技有限公司 |
| 5) 琼脂糖 | Spanish 分装 |
| 6) 二甲苯 | 天津巴期夫化工有限公司 |
| 7) PBS | 美国 Gibco 公司 |
| 8) PCR 引物 | 上海生工生物技术公司 |
| 9) Maker | Takara 公司 |

1.1.3 实验组织标本

2007年8月至2010年7月间自青岛大学医学院附属医院收集宫颈病变标本共374例,其中120例为该院妇产科住院病人手术切除宫颈癌组织,病理诊断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。254例标本是选取门诊病人宫颈液基细胞学涂片异常的宫颈活检标本,其中50例病理诊断为宫颈上皮内瘤变III级(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN),32例病理诊断为宫颈上皮内瘤变II级。所有标本收集后立即保存于-70℃,且收集前未进行任何放化疗。患者均为青岛人,汉族,出生并一直生活在青岛。宫颈癌组的平均年龄 45.8 ± 9.3 岁,CINI组为 42.4 ± 9.6 岁,CINII组为 41.4 ± 11.5 岁。标本采集之前均获得患者知情同意,青岛大学伦理委员会通过该研究。

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 实验方法

1.2.1 实验标本 DNA 的提取及溶解

1.2.1.1 制备裂解缓冲液

1.2.1.1.1 1×HMWbuffer 的制备

表 1.1 1×HMWbuffer 制备体系

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

1.2.1.1.2 裂解液的制备

蛋白酶 K	20 μ l
10 % SDS	40 μ l
1 $\times$ HMWbuffer	3.94ml

1.2.1.2 实验标本DNA的提取

[1]先将宫颈实验组织用PBS液冲反复洗2~3次。

[2]无菌眼科剪剪切组织，大小约1mm³，将剪碎的组织移入15 ml离心管。

[3]采用胰蛋白酶消化所收集LCT细胞标本，完成后将液体移入离心管瞬时离心，留取管内的细胞碎片，向离心管内加入D-Hanks液，反复清洗3次，再次离心（1500rpm $\times$ 5min），留取沉淀进行下一步裂解。

[4]在装有剪碎宫颈组织或宫颈细胞悬浊液的离心管内加4ml裂解缓冲液，吹打混匀约3min，水浴箱55℃2h或37℃/42℃过夜（条件允许时摇床震荡）。

[5]观察实验标本的裂解情况，如裂解不理想适当增加裂解液或提高裂解温度；如裂解理想，则加等体积饱和酚抽提，反复颠倒混匀20min，然后3000rpm $\times$ 15min离心。

[6]重复上一步骤，并加入平稳取出离心管后上层水相入新离心管（避免将下层浑浊物带入），加入等体积氯仿饱和氯酚（其比例为1比1）混合液后，重复上一步骤中的离心过程。

[7] 离心后将管内水相移入新管，将提前放在-20℃冰箱内的乙醇加入管内水相（其比例为2.5:1），反复颠倒将其混匀，放入-20℃冰箱过夜。

[8]过夜后将离心管进行离心（3000rpm $\times$ 10min），如有絮状沉淀产生，则将其沉淀挑入加-20℃70%乙醇内作为DNA原样保存；若无絮状沉淀产生，则进行反复离心后留取沉淀作为DNA原样。

[9]PCR反应时，挑取少量沉淀入新EP管中，室温下晾干至透明状，加入适量PCR水溶解即成为DNA实验标本，保存于4℃。

1.2.2 聚合酶链式反应 (PCR)

1.2.2.1 引物设计及合成

应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 根据 Seedorf 等^[34]1985 年发表的 HPV16 基因组全序列, 由上海生工生物工程技术有限公司负责设计本实验所需要的所有引物, 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
β -globin	F: GAAGAGCCAAGGACAGGTAC R: CAACTTCATCCACGTTACC	268bp
HPV 通用引物	F:CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC R:GCA CAG GGA CAT AAC AT GG	450bp
HPV16 特异性引物	F:AGG GCG TAA CCG AAA TCG GT R:GTT TGC AGC TCT GTG CAT A	140bp
HPV16URR	F: CCA TTT TGT AGC TTC AAC CCG R: AAG TGT GGT AAC TTT CTG GGT CGC TCC TG	617bp
HPV16E6	F: GAA ACC GGT TAG TAT AAA AGC AGA C R: AGC TGG GTT TCT CTA CGT GTT CT	476bp

1.2.2.2 聚合酶链反应 (PCR) 体系

去离子水	14.3 μ l
MgCl ₂ (25mM/L)	2.5 μ l
10 $\times$ buffer	2.5 μ l
dNTP	0.5 μ l
TaqDNA 聚合酶	0.2 μ l
上游引物	0.5 μ l
下游引物	0.5 μ l
DNA	4 μ l

1.2.2.3 PCR 反应条件

将上述实验物品按照相应计量加入到 EP 管内，此操作过程在冰盒上面进行以免酶类物质发生变性并保证实验准确性，同时加入石蜡油覆盖在反应体系上层防止反应过程中反应体系增发导致扩增无法进行，开始扩增。反应过程中均用稳定表达目的片段的标本以及 Siha 细胞株 DNA 做阳性对照，以 4 μ l 双蒸水代替 DNA 的反应体系做阴性对照。扩增条件：95℃预变性 5 min；95℃变性 30s，55℃复性 30s，72℃延伸 30s，可根据经验对不同的目的片段进行 35-39 个循环；热循环结束后 72℃延伸 10min。

1.2.3 实验步骤

采用 β -globin 检测新鲜组织标本及细胞悬液标本提取核苷酸的质量。以提取的 DNA 为模板，首先利用通用引物筛选出 HR-HPV 阳性标本，再采用型特异性引物及 URR 及 E6 引物实现对 HPV16 标本的筛选及扩增出目的基因 URR 及 E6。

1.2.4 扩增核酸产物电泳分析

1.2.4.1 制备 TBE 缓冲液

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

1.2.4.2 琼脂糖凝胶（1.6%）的制备

- [1] 预热电子天平约 30min，称取琼脂糖 0.32g，将其倒入小烧瓶。
- [2] 先用 0.5 $\times$ TBE 缓冲液冲洗量筒 3 遍，量取缓冲液 20ml，倒入琼脂糖烧瓶内混匀。
- [3] 将烧瓶移入微波炉内加热后取出，置于室温(注意实验室要通风良好)，待温度降至 50-60℃时加入 1 μ LEB,混匀。
- [4] 倒入 8 孔或 11 孔模型中，30min 后自然凝固。
- [5] 拔出模型梳，小心取出胶，将其密封保存于 4℃，备用。

1.2.4.3 电泳分析

在 PCR 扩增仪中取出扩增标本，避免震荡，自 EP 管石蜡油液面下采用微量移液器吸取扩增产物约 4 μ l，加入电泳缓冲液适量，反复吸打混匀，将混合液加入至 1mm 的胶孔内，避免微量移液器进入胶孔过深将胶孔戳穿导致标本交叉污染，采用 100V 恒压电泳 40min-50min（注意保持电压的持续稳定性）后取出。

将凝胶放置在紫外分光光度仪下观察，等待系统分析凝胶并采集图像。

1.2.5 目的基因测序及分析

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 实验标本中 HPV16 的扩增结果

采用1.6%琼脂糖凝胶对DNA产物进行电泳，电泳结果显示在140bp处观察到扩增的条带。(如图2.1所示)。

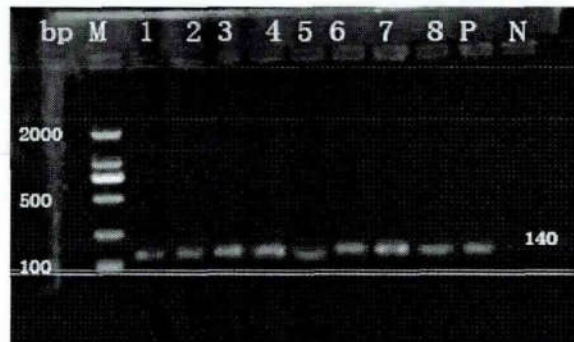


图 2.1 HPV16 聚合酶链反应结果

M 为 Marker, 1-8 为 HPV16 阳性标本, P 为阳性对照, N 为阴性对照

实验选取的 374 例宫颈病变标本中，宫颈癌组、CINIⅢ组和 CINIⅡ组 HPV16 感染率分别为 60.00%(72/120)、43.10% (50/116) 和 23.19% (32/138)。

2.2 HPV16 阳性标本中 URR、E6 的扩增结果

选取HPV16阳性的DNA作为模板，利用特定引物扩增URR、E6基因，其阳性结果分别在617bp和503bp处观察到扩增条带。(图2.2、2.3所示)。

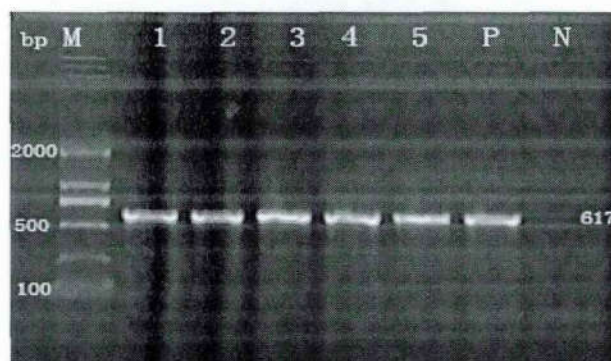


图 2.2 URR 扩增结果

M 为 Marker, 1-5 为 HPV16 URR 阳性标本, P 为阳性对照, N 为阴性对照。

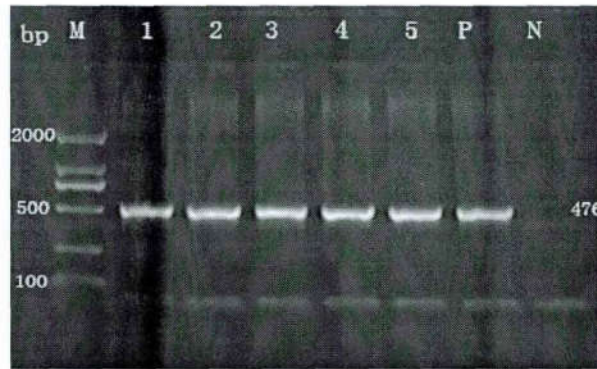


图 2.3 HPV16 E6 扩增结果

M 为 Marker, 1-5 为 HPV16E6 阳性标本, P 为阳性对照, N 为阴性对照。

共有109例标本成功扩增出URR基因，宫颈癌组、CINI组 and CINII组分别为48例、37例和24例。共有154例标本成功扩增出E6基因，宫颈癌组、CINI组 and CINII组分别为72例、50例和32例。

2.3 DNA 测序结果

2.3.1 HPV16 URR 的测序结果

URR 测序后典型突变位点及峰图见图 2.4-2.7。

A C T A T A G T T T A

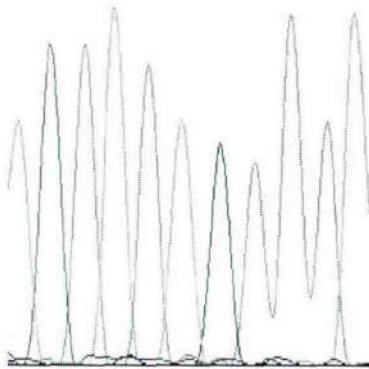


图 2.4 G7521A 的峰图

A A T T A A G G G C G

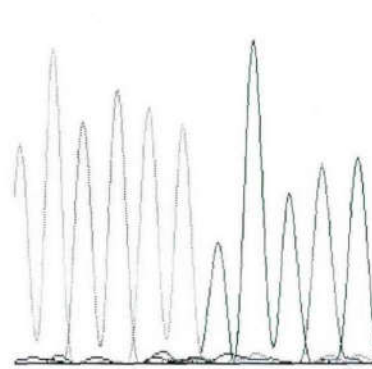


图 2.5 C24T 的峰图

T T A A C T A C C C T

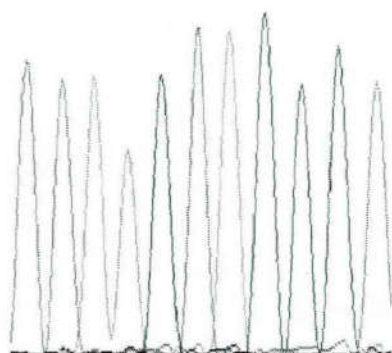


图 2.6 C7730T 的峰图

A A C T A C A C A T G

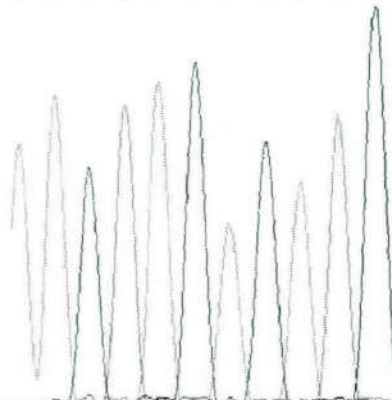


图 2.7 G7842A 的峰图

2.3.2 HPV16 E6 的测序结果

E6 测序后典型突变位点及峰图见图 2.8-2.12。

A T A C A T G A T A T A T A T

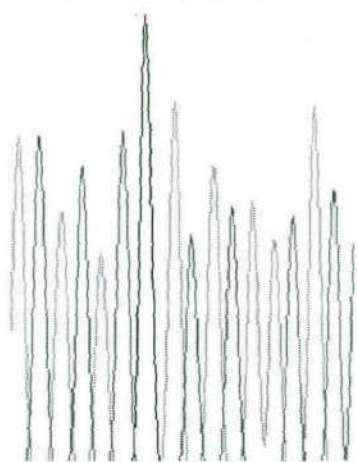


图 2.8 标准株 178 位碱基的峰图

T A T A C A T G A T A T A T A T

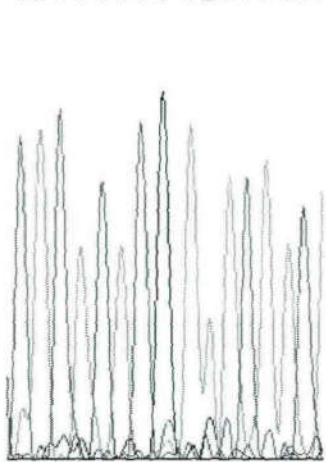


图 2.9 T178A 的峰图

A T A C A T G A G A T A T A T A T A T

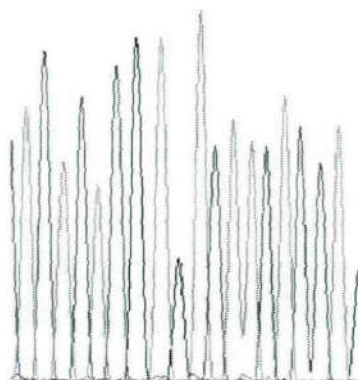


图 2.10 T178G 的峰图

AS	A	-	-	-	-	-	a	-	-	-	6	5.5	1	1	4
E	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2.8	0	1	2
E	A	-	-	-	-	-	a	-	-	-	1	0.9	0	1	0
E	A	-	-	-	G	-	-	-	-	-	2	1.8	0	0	2
	109	70	70	70	12	12	12	1	5	5	109		24	37	48

注：E-P 为与标准株一致，AS 为 HPV16 病毒亚洲突变型，E 型为欧洲突变型；“-”表示未发生碱基突变，大写字母表示该碱基发生突变。

2.4.2 HPV16 E6 基因核苷酸及氨基酸序列分析

扩增成功的 E6 标本中发现 17 个突变位点，其中 13 个位点为错义突变，4 个位点为无义突变（由于其中 8 个位点突变只在极少例标本中，且在以往报道中很少发现，本文中未予讨论），结果见表 2.2。该结果提示 178 位点为突变热点，该突变类型导致 E6 蛋白第 25 位由天冬氨酸变为谷氨酸(D25E)，共 91 例标本该位点发生突变，其在宫颈癌组、CINI 组和 CINII 组的比例分别为 61.11% (44/72)、62.00% (31/50) 和 50.00% (16/32)，该突变在不同宫颈病变组织中的分布差异无统计学意义 ($P=0.499$)。我们仅观察到 6 例 350 位点突变，该突变导致第 83 位氨基酸由亮氨酸突变为缬氨酸 (L83V)。其余各突变位点以及在各组中的分布见表 2.2。

表 2.2 不同宫颈病变组织中 E6 基因突变位点及其所致氨基酸变化

标准株	HPV16 E6 开放读框架									氨基酸					
	131	133	176	178	241	267	276	335	350	变化	N	比例	病变		
	A	A	G	T	T	G	A	C	T				CINI	CINII	宫颈癌
E-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-		47	30.5	15	12	20
E-P	-	-	-	-	g	-	-	-	-		3	1.9	0	1	2
E-P	-	g	-	-	-	-	-	-	-		1	0.6	0	1	0
AS	-	-	-	G	-	-	-	-	-	D25E	83	53.9	16	30	37
AS	c	-	-	G	-	-	-	-	-	D25E	4	2.6	0	1	3
AS	-	-	-	A	-	-	-	-	-	D25E	1	2.6	0	0	1
E	-	-	-	-	-	-	-	-	G	L83V	1	0.6	0	1	0
E	-	-	A	-	-	-	-	-	-	D25N	2	1.3	0	1	1
E	-	-	-	-	-	A	-	-	-	R38K	1	0.6	0	0	1
E	-	-	-	-	-	-	-	-	G	L83V	4	2.6	1	1	2
E	-	-	-	-	g	-	-	-	G	L83V	1	0.6	0	1	0
E	-	-	-	-	-	-	-	T	-	H78Y	1	0.6	0	0	1
E	-	-	-	-	-	-	G	-	-	N58S	2	1.3	0	1	1
n	4	1	3	89	4	1	2	1	7		154		32	50	72

注：E-P 为与标准株一致，AS 为 HPV16 病毒亚洲突变型，E 型为欧洲突变型；“-”表示未发生碱基突变，大写字母表示该碱基突变导致的氨基酸改变，小写字母表示碱基突变未导致氨基酸改变，即无义突变。“D25E”表示，HPV16E6 基因第 25 个氨基酸由“D”突变为“E”。

2.4.3 HPV16 亚型分析

E6 基因测序成功的标本共有 154 例，青岛地区最常见的 HPV16 亚型为 AS 型，

在总标本中占 59.09% (91/154)。其次为 E-P 原型 33.12% (51/154)，另外一个突变型别就是 E 型 7.80% (12/154)，未发现其它亚型。AS 型在宫颈癌组、CINIII 组和 CINII 组的比例分别为 61.11% (44/72)、62.00% (31/50) 和 50.00% (16/32)，三组之间差别无统计学意义 ($P=0.499$)。E-P 原型在三组分别为 30.56% (22/72)、28.00% (14/50) 和 46.88% (15/32)，三者之间差别无统计学意义 ($P=0.170$)；欧洲型 E 型则分别为 8.33% (6/72)、10.00% (5/50) 和 3.12% (1/32)，三组间差别无统计学意义 ($P=0.512$)。感染 HPV16AS 亚型的宫颈癌患者平均年龄 (46.6 ± 8.02 岁) 比感染 E 亚型 (平均年龄 54.5 ± 9.26 岁) 的患者小 8 岁。

第3章 讨论

宫颈癌是严重威胁妇女生命健康的疾病,高危型人乳头状瘤病毒与宫颈癌发病关系密切。国际宫颈癌生物医学研究组织(the international biological study of cervical cancer, IBSCC)报道平均 92.5%(范围在 75%-100%)的宫颈癌细胞中含有 HPV DNA,其中超过 2/3 的宫颈癌病例与 HPV16 型(51.0%)或 HPV18 型(16.2%)感染有关,说明 HPV 16 和 HPV 18 是妇女宫颈癌的主要病原^[9]。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。

3.1 HPVE6, URR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,其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。

HPV上游调控序列(URR),长约850bp,由5'区,中央区(角质化依赖性增强子区)和3'区组成,是HPV的非编码区域,除含有调控E6、E7基因的增强子和启动子P97元件外,同时,URR还含有多个细胞因子和转录因子结合位点,如细胞因子1(nuclear factor 1, NF1),特异蛋白1(specificity protein 1, SP1)以及细胞阴阳因子1(yin-yang factor 1, YY1)等多种细胞因子对URR区的启动子具有激活或抑制作用。URR的突变可通过阻遏子结合位点的缺失和激活因子结合能力的增强而增强URR区的启动活性。URR的5'区含有晚期转录产物的转录终止位点和多聚腺苷酸化位点,作用于晚期mRNA稳定性水平的负调控元件和一个调控转录的E2结合位点,中央区含有上皮细胞特异转录增强因子^[10-14],并包含大部分的转录因子结合位点,这些结合位点以细胞类型特异性方式正向或负向调控URR的活性,并进一步调控整个基因组的表达与复,从而对细胞的不同生理和分化状态做出反应^[17]。3'区包括E6启动子P97以及4个顺势作用元件,即1个Sp1结合位点,是复制起点和转录起点;2个病毒癌基因E2结合位点;以及1个TATA盒,负责前起始复合体的建立和结合^[15]。

HPV E6 基因编码的 E6 蛋白是最先表达的蛋白,定位于核基质及非核膜片段,通过不同途径导致细胞的永生。E6 通过与 P97 结合后才能发挥促癌作用,二者的结合以及转录起点由两个核基质连接区域(nuclear matrix attachment regions, MARs)连接起来,其中 1 个位于 URR 的 5' 区,另外一个位于 E6 基因内^[16]。其 C 端是由 4 个氨基酸残基 X-(S/T)-X-(V/L/I)构成的高度保守的序列,为 PDZ 结合域,介导与宿主细胞的 PDZ 蛋白间的相互作用^[18]。

E6蛋白最重要的作用是对抑癌基因p53的作用,可促进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Cdks等的调控作用丧失,最终细胞DNA损伤累积细胞发生癌变^[19]。HPV 16 E6编码的E6原癌蛋白通过E6相关蛋白(E6-associated proein, E6-AP)连接介导与P53结合, E6、E6-AP和P53三者可以形成三聚体,从而促进P53的泛素化降解,使细胞绕过G1/S和G2/M的检查点机制转向恶性增殖^[20]。此外, E6原癌蛋白是一种促进宫颈癌的发生发展多功能蛋白,主要通过激活端粒酶而使正常细胞逃脱衰老过程中的增殖限制而永生化^[21,22]。这就提示减少或封闭HPV阳性肿瘤细胞中E6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。PDZ蛋白是宿主细胞的膜蛋白,在维持宿主细胞正常结构、信号传导、细胞连接以及维持细胞正常功能方面其重要作用。高危型HPV E6与PDZ蛋白有高度亲和力,导致降解,对细胞的正常结构及正常功能产生不可逆的破坏,导致细胞的永生化及癌症的发生^[23,24]。

3.2 HPV16 URR, E6的突变情况

不同研究均显示, HPV16 的 URR 序列是突变概率最高的序列,而在该段序列中突变率最高的是 G7521A, 在世界范围内该位点的突变率为 80%^[25-26]。本研究中 G7521A 的突变率为 100%, 该突变位于 YY1 结合位点。Michael JL 等^[27]研究表明, YY1 结合位点序列的突变不仅能提高 p97 启动子的转录活性 2~3.5 倍, 进而导致 HPV16 病毒癌基因 E6、E7 转录能力的下降, 从而诱发了细胞的永生性。于勤等^[28]研究认为该位点突变与病毒感染及宫颈癌的发生相关。但本研究中 7521 位点突变在宫颈不同病变组中均发生了突变, 该位点的突变并没有显示出较原型更强的致癌性。以上数据提示该位点突变在世界范围内的高突变率与地域及种族无明显关联。

此外 24, 7730 和 7842 三个位点的联合突变有较高的发生率, 且在宫颈癌、CINII 及 CINIII 组中均检测到该联合突变, 其在三组分布之间的差别无显著性差异, 提示在本实验中该三个位点的突变与细胞永生化无明显关联。本研究中多个位点变异位于已知的可与多种转录因子结合的区域: G7521A 和 G7826A 位点突变位于 YY1 结合区域; T7714G 位点突变位于转录因子 NF1 结合区域; G7868A 位点突变则位于病毒复制因子 E2 同 URR 结合的区域。这些位点的突变有些对病毒的致癌性无影响, 有些则可能分别或通过协同作用提高癌基因的表达, 促进细胞损伤修复异常及无限增殖, 最终导致恶性肿瘤的发生。而相关突变位点的致癌机制及其相互作用还需进一步的研究, 为我们以后的工作提供了思路。

E6 为世界范围内研究最多的基因, 其特征性突变为 T350G, 即 L83V 变异型, 一系列对 L83V 的研究得出其在不同地域有不同的分布频率, 在北美突变率为 40%, 欧洲 44%, 美洲中部和南部为 52%; 而在东南亚为 6%, 非洲为 2%~8%, 该突变在欧美是最多见的突变类型^[29,30,31]。本研究中仅有 6 (3.9%) 例标本有发生该突变,

其中 2 例为宫颈癌, 3 例在 CINIII 组, 1 例在 CINII 组。已经有文献报道, L83V 突变与野生型 E6 相比更容易导致宫颈鳞状上皮高度病变的发生, 因而是宫颈病变进一步发展的危险因素^[31]。

相对于欧美国家流行的 T350G 突变, 东南亚地区流行的 HPV16 E6 突变类型为 T178 位点, 即 D25E 变异型, 该突变在东南亚不同国家有着不同的分布频率, 在中国为 62%, 在日本为 44%, 在德国为 0.9%, 而在瑞典未检出该突变^[30, 32]。Cai HB 等^[30]在对湖北宫颈病变妇女中的研究中发现 D25E 是宫颈鳞状上皮癌最主要的突变, 且与宫颈鳞癌的发生有密切的关联, 而日本相关研究也表明该突变是癌前病变进展及癌症发生的主要诱因^[32]。本研究表明 178 位点突变频率最高, 其在宫颈癌组突变率为 61.11%, 其在宫颈癌组、CINIII 组和 CINII 组的分布差异无统计学意义。同时, Chan PK 等^[33]研究表明, D25E 突变平均分布在宫颈病变的不同阶段。以上数据提示, HPV16 AS-E6 D25E 变异可能与地域分布, 而不是宫颈病变的进展有关。

本研究 AS 是青岛地区主要亚型 (59.09%), 其次为原型和 E 型。熊光武等^[26]对中国北京宫颈癌患者的研究结果为 AS 型和 E 型, 未检测到原型。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)。我们的研究还发现感染 HPV16 AS 亚型的宫颈癌患者平均年龄比感染 E 亚型的患者平均小 8 岁。熊光武等^[26]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%)。吴玉平等^[29]对中国中部及南部妇女宫颈癌患者的研究显示, AS 亚型 (65.45%) 突变与宫颈癌的年轻化趋势存在一定联系。上述资料提示中国地区 AS 亚型突变较欧洲 E 型具有更强的致癌性。

总之, 本研究反映出青岛地区不同宫颈病变组织中 HPV16URR 与 E6 癌基因存在多种序列变异, 提供了关于 HPV 基因变异与宫颈病变之间的理论基础, 为以后大规模该方面的研究积累流行病学资料。

结论

- 1、 HPV16感染与宫颈癌的发生发展密切相关。
- 2、青岛地区妇女宫颈病变组织中HPV16 URR突变热点为nt7521以及nt24， 7830和7842的联合突变。HPV16 E6突变热点为nt178。
- 3、AS和原型是青岛地区宫颈病变组织中两种主要的 HPV16 分支。

参考文献

1. Parkin DM, Bray FI, et al. Estimating the world cancer burden: globocan 2003.[J].Int J Cancer, 2001.94(3):153.
2. 万磊, 万建平, 张燕玲, 等。子宫颈癌年轻化趋势的临床分析[J] .中国肿瘤临床。2004, 31(10) :547。
3. 周琦. 子宫颈癌与人乳头状瘤病毒感染(J). 肿瘤学杂志, 2005, 11(2): 81.
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,AndreaT,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. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection . J Am Osteopath Assoc. 2006,106(3 Suppl 1):S2-S8.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Tan, S. H., L. E. C. Leong, P. Walker, and H. U. Bernard. 1994. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two ?anking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. J. Virol. 68:6411-6420.
11. Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry. 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. J. Virol. 71:9343-9349.
12. Furth PA, Baker CC. A clement in the bovine papillomavirus late 3' untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels[J]. J Virol, 1991, 65: 5806-5812.
13. Kennedy IM, Haddow JK, Clements JB. A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability[J. J Virol, 1991, 65: 2093-2097.
14. Romanczuk H. Tifferry F. Howley PM. Mutational analysis of cis element involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 p97 and type 18 p105 promoters[J]. J virol, 1990, 64: 2849-2859.
15. Sailaja G, wAns RM, Bemard HU. Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 1715-1724.

16. Tan, S. H., D. Bartsch, E. Schwarz, and H. U. Bernard. 1998. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *J. Virol.* 72:3610–3622.
17. O' Connor M, Chan S Y, and Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control regions of genital HPVs, part II I-A, P. 21—0. 111 G Myers, }L U. Bernard, H. Delius, C. Baker,J. Icenogle, A. Halpem, and C. Wheeler. Human papillomaviruses 1995 compendium[B]. Los Alamos National Laboratory,Los Alamos, N.M.,USA.
18. Christy M. Hebner, Laimoms A. Laimins. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and ontogenicity[J]. *Rev Med Virol*, 2006, 16: 83-97.
19. Gheah PL,Looi LM. P53 immunohistochemical expression: messages in cervical careinogenesis. *Pathology*,2002, 34(4): 326-331.
20. Bouht G, Horvath C, Vanden Broeck D, et al. Human papillomavires: E6 and E7 oncogenes[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(11): 2006-2011.
21. Tim Veldman, Izumi Hofikawa, J. Carl Barrett, et al. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavims type 16 E6 oncoprotein[J]. *J Virol*, 2001, 75(9): 4467-4472.
22. Astrid C. Baeye, Allison Berger, Robert Sehlcgel, et al. Cervical epithelial cells transduced with the papillomavims E6 / E7 oneogenes maintain stable ievels of oncoprotein expression but exhibit progressive, major increases in hTERT gene expression and telomerase activity[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160: 1251—1257.
23. Michael A. James, John H. k, Aloysius J. Klingelhutz. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces clAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ bingding motif-dependent manner[J]. *Virol*, 2006, 80(11): 5301-5307.
24. G Sanelemente, D K Gill. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis[J]. *Eue Acad Dermatol Venereol*, 2002, 16(3): 231-240.
25. Yamada T, Manos MM, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective[J]. *J Virol*, 1997, 71(3): 2463–2472.
26. 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[J]. *遗传*, 2010, 32(4): 339-347.
27. Michael JL, Christina I, James R, et al. Upstream regulatory region alterations found in human papillomavirus type 16 (HPV-16) iIsolates from cervical carcinomas increase transcription, ori function, and HPV immortalization capacity in culture[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(15): 7457–7466.

28. 余勤, 马正海, 王艳萍, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型上游调控区 DNA 多态性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(11): 1000-1004.
29. Wu Y, Chen Y, Li Y, et al. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China[J]. J Clin Virol. 2006; 35: 264-269.
30. Cai HB, Chen CC, Ding XH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population[J]. EJSO, 2010, 36: 160-163.
31. Pande S, Jain N, Prusty BK, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 1060-1066.
32. Matsumoto K, Yasugi T, Nakagawa S, et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer[J]. Int J Cancer, 2003, 106: 919-922.
33. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China[J]. J Infect Dis, 2002, 186: 696-700.
34. Seedorf K, Krammer G, Durst M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. Virology, 1985, 145(1): 181-185.

综述

HPV 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。HPV16 癌蛋白可通过多种途径使细胞周期调控异常, 细胞永生化, 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】 宫颈肿瘤; 人乳头状瘤病毒; 基因; 突变;

【中图分类号】 R737.33 **【文献标识码】** A

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤, 据世界范围内的统计, 全球每年新发病例 50 万, 死亡 20 万例, 其中新发病例中 80 %来自发展中国家^[1]。我国每年新发病例约 13.15 万, 占世界每年宫颈癌新发病例总数的 28.8%, 每年有 2 万名妇女死于宫颈癌, 且近年来呈现地区增长及发病年龄提前的现象^[2]。宫颈癌的病因研究一直为国内外学者所重视, 1974 年 zurHausen 首次提出 HPV 感染与宫颈癌的发生发展有密切关系^[4], 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^[3-7]。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。

一、HPV 和宫颈癌

1、HPV 的分型

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。按照 HPV 与生殖道恶性肿瘤发生危险性高低分为高危型 (High-oncogenic risk, LR) 和低危型 (Low-oncogenic risk, HR)。高危型 HPV 包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、等^[8], 与子宫颈癌及子宫颈上皮内瘤变(CIN)相关, 尤其 HPV16 型和 HPV18 型是子宫颈癌中最常见型别。低危型 HPV 包括 HPV1、6、11、42、43 等, 常引起生殖道疣等良性病变。Bosch 等对 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 HPV DNA 阳性, 其中 HPV16 感染占 50%以上, 其次为 HPV18 等^[9]。不同种类 HPV 与子宫颈癌的组织学分型及临床分期有关, 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^[10]。HPV16 单独感染或以 HPV16 感染为主的混合感染, 临床分期较低, 预后较好^[11]。

2、HPV 的结构

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，由 DNA 核心和蛋白衣壳组成，直径约 52-55nm，病毒颗粒含有一条约 8000 碱基对双链 DNA。其 DNA 包括 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)，参与病毒 DNA 复制、转录和细胞转化，导致细胞永生；3kbp 的晚期转录区 (late region, L)，是病毒组装所必须部分；一长约 1kb 的上游调控区 (upstream regulatory region, URR)，也称为长调控区 (long control region, LCR)，其中含有多个病毒复制及转录所需要的转录因子结合位点及控制元件。

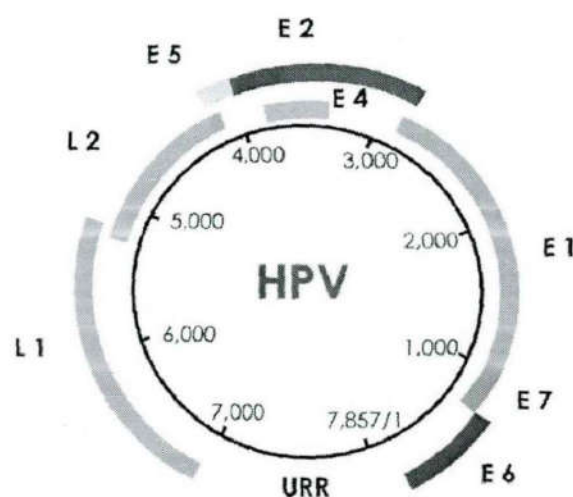


图 1 HPV 的结构^[12]

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 蛋白具有较强的细胞增殖抑制作用，并可通过抑制基因启动子等调节 E6 和 E7 的表达。E4 蛋白具有破坏宿主细胞骨架的作用。E5 是膜整合蛋白，在感染细胞克隆早期的繁殖、扩张中起重要作用。晚期转录基因是维持病毒的强免疫原特性的主要部分，包括 L1 和 L2，目前多用于 HPV 预防性疫苗的研究。URR 是 HPV 的非编码区域，除含有调控 E6、E7 基因的增强子和启动子 P97 元件外，同时，URR 还含有多个细胞因子和转录因子结合位点，如细胞因子 1 (nuclear factor 1, NF1)，特异蛋白 1 (specificity protein 1, SP1) 以及细胞阴阳因子 1 (yin-yang factor 1, YY1) 等多种细胞因子对 URR 区的

启动子具有激活或抑制作用。URR 的突变可通过阻遏子结合位点的缺失和激活因子结合能力的增强而增强 URR 区的启动活性

3、HPV 的感染与基因整合

HPV 多通过性行为感染，尤其是初次性生活年龄小于 20 岁，因其生殖道器官组织发育不完全，防御系统不完善，因此在性生活时极易造成皮肤或黏膜轻微损伤^[13]。性生活摩擦导致基底层细胞暴露，病毒进入机体建立低复制游离病毒基因组并随细胞染色体共同复制。感染 HPV 后，由于宿主自身体内免疫抗体的存在，绝大多数感染为自限性过程，只有一小部分持续 HPV 感染者出现 HPV 基因的线性化、与宿主细胞基因整合，经过 8-12 年的潜伏期，才最终发展为高度宫颈上皮病变甚至宫颈癌。

4、E6、E7、URR 的致癌机制

HPV E6 基因编码的 E6 蛋白主要分布于宿主细胞的细胞膜和细胞核，其开放读码

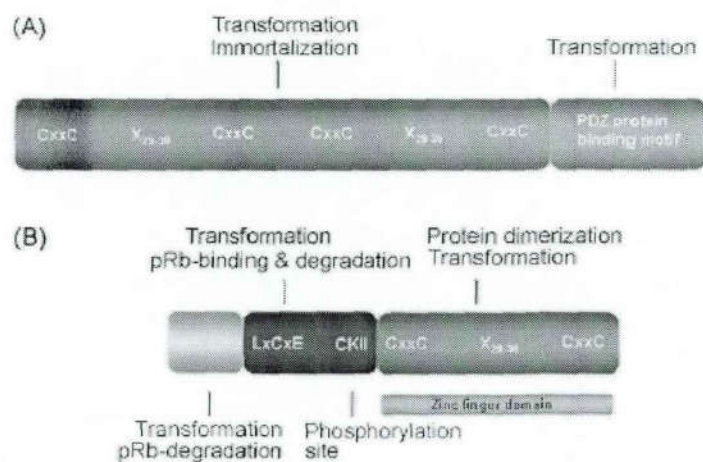


图 2 E6 和 E7 蛋白的结构^[14]

可以编码150个氨基酸左右的小蛋白，分子量为16-18KD。其特征性结构是含有2个锌指结构，其结构基础是C-x-x-C(色氨酸-x-x-色氨酸)（见图2-A）。这种结构是所有HPVE6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。其C端是由4个氨基酸残基X-(S/T)-X-(V/L/I)构成的高度保守的序列，为PDZ结合域，介导与宿主细胞的PDZ蛋白间的相互作用^[15]。E6蛋白主要的促癌机制是通过结合并诱导p53降解，促进凋亡和DNA修复，从而导致细胞的增殖失控。以上过程依赖于E6相关蛋白(E6-associated prorein, E6-AP)连接介导才能与P53结合并发挥作用。E6、

E6-AP和P53所形成的三聚体,诱导P53的泛素化降解,导致细胞增殖永生化^[16]。PDZ蛋白是宿主细胞的膜蛋白,在维持宿主细胞正常结构、信号传导、细胞连接以及维持细胞正常功能方面其重要作用。高危型HPV E6与PDZ蛋白有高度亲和力,导致降解,对细胞的正常结构及正常功能产生不可逆的破坏,导致细胞的永生化和癌症的发生^[19,20]。此外,E6还可通过抑制SRC家族激酶降解,降低干扰素 β (IFN- β)的表达,并黏附到肿瘤坏死因子(TNF)上等途径逃避宿主免疫抑制细胞凋亡,从而使细胞发生瘤样变^[13-21]。

E7蛋白一个仅有98个氨基酸的低分子量酸性蛋白,负责整个病毒的转化,也具有锌指结构,与E7蛋白二聚体形成有关。E7蛋白有三个保守区(conserved regions,CR): -NH₂端的CR1区,其不直接与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(CKII),可被磷酸化,从而增强转化细胞的能力; -COOH端的CR3区,该区包括两个C-x-x-C位点,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^[14,22]。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。HPV病毒感染宫颈细胞后,E7通过多种途径恢复其转录活性:如E7与E2F竞争性结合pRb,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^[23, 24]。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上游调控序列URR是HPV的非编码区域,含有调控E6、E7基因的增强子和启动子P97元件外,同时,URR还含有多个细胞因子和转录因子结合位点,如细胞因子1(nuclear factor 1, NF1),特异蛋白1(specificity protein 1, SP1)以及细胞阴阳因子1(yin-yang factor 1, YY1)等多种细胞因子对URR区的启动子具有激活或抑制作用。URR的突变可通过阻遏子结合位点的缺失和激活因子结合能力的增强而增强URR区的启动活性。

二、HPV基因多态性与宫颈癌的关系

1、HPV基因多态性与宫颈癌

如前所述,目前已知HPV型别有200多种,20余种已证实与子宫颈肿瘤相关,尤

其HPV16型和HPV18型是子宫颈癌中最常见型别。Ho在世界范围内分析了HPV16 URR (Upstream regulatory region) 突变, 并根据地域分布将HPV16基因突变分为5大类。根据这一基础, 国际宫颈癌生物学研究(the international biological study of cervical cancer, IBSCC)在世界范围内分析了HPV16 E6、L1、L2和URR核苷酸序列, 结果显示HPV16变异谱系分布有明显的地域差别, 并根据变异株的地理分布区域命名病毒的种系发生群。6种主要的种系分别是①欧州型(E); ②亚洲型(As); ③亚美型(AA); ④非洲1型(Af1); ⑤非洲2型(Af2); ⑥北美型(NA)^[25]。HPV型内突变可作为研究流行病学中病毒的传播, 持续感染以及临床宫颈病变进展的一种工具。大量研究证实HPV存在大量型内变异, 并能引起病毒的持续和反复感染、病毒DNA高拷贝数, 不同类型的HPV16变异株具有不同的生物学活性和致癌潜能^[25-27], 同时提示部分HPV16突变体与宫颈病变进一步发展密切相关^[28-31]。德国标准株则与病毒的清除及病灶的复原有关^[32]。已经观察到, 在异性恋的女性患者宫颈涂片中及同性恋的男性患者的直肠涂片中发现了相同的HPV病毒突变体。另有一项新加坡研究证实, 仅在50%的性伴侣中发现了相同的HPV突变体, 提示病毒变异体的性传播性是比较低的^[33]。由此可见, HPV的突变是在感染了宿主细胞后发生的, 并由此导致了宿主上皮细胞的永生。北美的一项研究表明, HPV16非欧洲突变体与宫颈上癌前病变的进展^[34]以及直肠原位癌的发生发展密切相关^[35]。在巴西的一项流行病学研究中, HPV 16及 18的非欧洲突变体与病毒的持续感染以及宫颈病变的发展密切相关^[36]; 意大利的病例对照研究提示与正常组相比较, 宫颈癌患者具有更高的AS型突变体^[37,38]。

2、HPV研究热点

世界上研究热点主要集中在HPV16/18E6、E7、URR。就世界范围而言, 最具特征性的E6基因突变为T350G, 即 L83V变异型(第83位氨基酸由缬氨酸变为亮氨酸), 不同地域该位点突变有着不同的分布频率, 墨西哥HPV16 E6基因L83V突变株在浸润性子宫颈癌中占93.5%, 在北美突变率为40%, 欧洲44%, 美洲中部和南部为52%; 而在东南亚为6%, 非洲为2%~8%, 该突变在欧美是最多见的突变类型^[26,27,39,40]。不同研究提示, HPV的持续感染以及由此而导致的宫颈上皮内高级别病变与L83V与有关^[40-42], 或者与浸润性子宫颈癌有关^[43,44]。而在世界其他区域, 则得出L83V主要与宫颈早期坏死有关, 与浸润性子宫颈癌无明显相关性^[45,46]。相对于欧美国家流行的T350G突变, 东南亚地区流行的HPV16 E6突变类型为T178位点, 即D25E变异(第25位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸), 该突变在东南亚不同国家有着不同的分布频率, 在中国为 62%, 在日本为44%, 在德国为0.9%, 而在瑞典未检出该突变^[27,47]。该变异株在东亚人种中分布频率要显著高于其他地区人种, 所以该位点的突变被认为是

亚洲型尤其是东亚型病毒分支的特异性变异。Cai HB等^[27]在对湖北宫颈病变妇女中的研究中发现D25E是宫颈鳞状上皮癌最主要的突变,且与宫颈鳞癌的发生有密切的关联,而日本相关研究也表明该突变是癌前病变进展及癌症发生的主要诱因^[47]。

E7与E6相比,序列比较保守,其编码的 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。最常见的E7突变G647A,即N29S(第29位天冬酰胺变为丝氨酸)^[26,48]。对韩国和泰国性工作者的研究显示,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;以上研究检测到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^[49]。而我国杨英捷及张帆的研究提示N29S突变与宫颈病变进展相关^[50,51]。然而,对中国四川省,日本和德国妇女的研究中,该突变在不同宫颈病变中分布十分相近^[52,53,54]。

URR 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。不同研究均显示,HPV16 的 URR 序列是突变概率最高的序列,而在该段序列中突变率最高的是 G7521A,在世界范围内该位点的突变率为 80%^[25,39,48]。Michael JL 等^[55]研究表明,YY1 结合位点序列的突变不仅能提高 p97 启动子的转录活性 2~4 倍,进而导致 HPV16 病毒癌基因 E6、E7 的表达增加,改变角质细胞的生长速度,最终导致细胞的永生性。余勳等^[56]研究认为该位点突变与病毒感染及宫颈癌的发生相关。Kurvinen 等^[57]研究认为病毒癌基因转录的增强和致癌性的增加通常并不是由 URR 突变引起。

3、HPV16 AS亚型

HPV16 中的 AS 亚型主要分布在亚洲的东南部,大约分布在 26%的亚洲东南部宫颈标本中,而在其他标本中很少检测到。与世界其他地域 HPV16 的流行情况不同,AS 型是中国流行程度最广的一种分支。熊光武等^[60]对中国北京宫颈癌患者的研究结果为 AS 型和 E 型,未检测到原型,其年轻宫颈癌组中 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%)。吴玉平等^[26]对中国中部及南部妇女宫颈癌患者的研究显示,AS 亚型(65.45%)突变与宫颈癌的年轻化趋势存在一定联系。上述资料提示中国地区 AS 亚型突变较欧洲 E 型具有更强的致癌性。而余勳^[56]在对我国新疆地区维吾尔族宫颈癌妇女 HPV16 URR 的突变研究中提示:新疆株属亚裔美洲型(AA 型),其中一些突变与病毒的感染和宫颈癌的发生相关,一些突变可提高病毒基因的转录水平。其研究中 URR 在宫颈癌组织中的位点突变分布与北美洲的分布接近,提示基因突变具有地域性与种族性分布。在 E 型突变流行的欧洲地区,如英国和瑞典,HPV16E 型突变株与 HPV 的持续感染和宫颈病变由低级向高级转化有关^[41-43],或者与浸润性宫颈

癌有关(瑞典)^[43,44]。通过以上讨论,我们可以提出一个假设,即不同的 HPV16 变异致癌的可能存在差异,是因为它们所处的地理环境不同。这就为我们提出了一个新的观点,病毒的变异可能与地域分布,而不是与宫颈病变的进展有关^[59]。

4、p53,Rb与宫颈癌

p53基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因,是已知的抑癌基因和癌基因中变异频率最高的基因^[60,61]。野生型p53基因定位于人染色体短臂17P13.1区,全长约20KB,由11个外显子和10个内含子组成,编码一种核内磷酸蛋白,其转录产物为mRNA,有抑制或阻止细胞转化、繁殖的功能,从而避免肿瘤的发生。当细胞在各种理化因素作用下发生DNA损伤,野生型p53基因即可使阻止细胞分裂,促使细胞修复损伤并回复正常,因此野生型p53基因常被称为“基因的卫士”。而当这一“基因卫士”发生突变时,其抑制细胞转化、繁殖的功能消失,刺激细胞分裂,从而导致了细胞的永生化。多数人体肿瘤的p53突变是基因编码序列的改变,据报道约90%的突变集中在外显子4和10之间,局限于p53基因的DNA结合结构域。流行病学研究显示,感染HPV病毒的宿主细胞持续表达E6癌蛋白,通过结合P53蛋白结合而致P53蛋白失活,缺少了“基因卫士”保护的宿主细胞损伤不能被修复并持续增殖,最终含HPV的宿主细胞生长失控,最终造成细胞永生化。

视网膜母细胞瘤(Rb)基因是发现的第一个抑癌基因,是生长抑制蛋白,在细胞周期调节中起关键作用。Rb蛋白分布于核内,是一类DNA结合蛋白。正常情况下,非磷酸化Rb与E2F特异结合,形成Rb-E2F复合物后,作为转录抑制因子,负向调控G1/S期的转变,抑制细胞周期的进展,抑制细胞增殖。在HPV病毒感染组织细胞后,E7蛋白通过自身Rb结合位点,优先与非磷酸化的Rb结合,这种高亲和性使Rb-E2F复合物解离,并通过Cullin2泛素化Rb,因此E2F可以持续性的发挥转录激活作用,从而促进G1/S期的转变和细胞分裂增殖加快^[62,63]。研究发现,E7蛋白同Rb的结合能力与E7蛋白的转化能力有关。高危型HPV E7蛋白同Rb的结合能力比低危型HPV E7蛋白高5~10倍。同时研究发现,Rb是染色体维持蛋白(MCM)的负调控因子。MCM在细胞复制过程中结合于cDNA复制的起点,确保复制的准确性,其突变可导致MCM蛋白的异常表达,MCM蛋白表达下调引起人细胞增殖能力的丢失。当HPV病毒感染组织细胞后,其编码的癌蛋白分别灭活p53及Rb后间接影响MCM的表达,导致细胞增殖异常,细胞发生永生化。目前尚没有关于宫颈癌组织中Rb基因多态性的研究,该方面的研究有待于我们去施行。

总之,综上所述,HPV16是导致宫颈癌发生的关键因素,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,且具有地域性及种族性

特点。目前研究均提示HPV16突变位点与宫颈病变发生发展的关系密切,但尚无统一论,因此仍然需要进一步完善及合理的研究。

参考文献

1. Parkin D, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: globocan 2003 [J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(3): 153.
2. 万磊, 万建平, 张燕玲, 等. 子宫颈癌年轻化趋势的临床分析[J]. *中国肿瘤临床*. 2004, 31(10: 547).
3. Andersson S, Rylander E, Larsson B, et al. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis[J]. *European Journal of Cancer*, 2001, 37 (5):246 .
4. Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 1991, 184(1):9-13.
5. 钱德英, 岑坚敏, 王丁, 等. 高危型人乳头状瘤病毒 DNA 检测与细胞学联合检查对子宫颈癌前病变筛查的研究 [J]. *中华妇产科杂志*. 2006, 41(1):34 -37.
6. 曹泽毅. *中华妇产科学*. 北京:人民卫生出版社, 1999.1749.
7. 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.
8. 刘光明, 许廷贵. HPV 感染与宫颈癌[J]. *Chinese Medical Science&Heath*, 2007, 4(4): 65.
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. *AmJ Obstet Gynecol*, 2003, 188(3): 657-663.
11. 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
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. Deacon JM, Evans CD, yule R, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case—control study nested within the Manchester cohort[J]. *Br J Cancer*, 2000, 88(11): 1565—1572
14. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application . *Nat Rev Cancer*. 2002, 2(5):342-350.

15. Christy M. Hebner, Laimoms A. Laimins. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and ontogenicity[J]. *Rev Med Virol*, 2006, 16: 83-97.
16. Bouht G, Horvath C, Vanden Broeck D, et al. Human papillomaviruses: E6 and E7 oncogenes[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(11): 2006-2011.
17. Michael A. James, John H. K. Aloysius J. Klingelutz. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner[J]. *Virol*, 2006, 80(11): 5301-5307.
18. G Sanelemente, D K Gill. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis[J]. *Eur Acad Dermatol Venereol*, 2002, 16(3): 231-240.
19. Filippova M, Song H, Connolly JL, et al. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF)R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2002, 277(24): 21730-9.
20. 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.
21. James MA, Lee JH, Klingelutz AJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappa B, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner[J]. *J Virol*, 2006, 80(11): 5301-5307.
22. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis[J]. *Virol*, 2004, 78: 11451-11460.
23. 李华, 高国兰. HPV 与宫颈癌的研究进展[J]. *实用癌症杂志*, 2007, 22(4): 420.
24. Zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92: 690-698.
25. Yamada T, Manos MM, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective[J]. *J Virol*, 1997, 71(3): 2463-2472.
26. Wu Y, Chen Y, Li Y, et al. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China[J]. *J Clin Virol*, 2006, 35: 264-269.
27. Cai HB, Chen CC, Ding XH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population[J]. *EJSO*, 2010, 36: 160-163.
28. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16

- and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:796-802.
29. Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000;81:2959-68.
30. Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:343-51.
31. Hildesheim A, Schiffman MH, Bromley C, et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:315-8.
32. 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.
33. Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Lee SK, et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 343-351.
34. Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Lee SK, et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 343-351.
35. Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, et al. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res* 1998; 58: 3839-3844.
36. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000; 81: 2959-2968.
37. 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.
38. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R Rodriguez A, et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 315-318.
39. Pande S, Jain N, Prusty BK, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(3): 1060-1066.
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. 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.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, et al. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(2):488-494.
 47. Matsumoto K, Yasugi T, Nakagawa S, et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 2003, 106:919-922.
 48. 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.
 49. Vaeteewoottacharn K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas. *Anticancer Res* 2003; 23: 1927-1931.
 50. 张帆等. 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.
 51. 杨英捷等. 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.
 52. Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes*. 1994 Sep;9(1):85-92.

53. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung JL, Xu LY, Cheng AF. 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.
54. 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.
55. Michael JL, Christina I, James R, et al. Upstream regulatory region alterations found in human papillomavirus type 16 (HPV-16) isolates from cervical carcinomas increase transcription, ori function, and HPV immortalization capacity in culture[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(15): 7457-7466.
56. 余勐, 马正海, 王艳萍, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型上游调控区 DNA 多态性分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26(11): 1000-1004.
57. Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, et al. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(11): 1402-1410.
58. Byeong SC, Sung SK, Haesun Y, et al. Distinctive Distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S Intratypic Asian Variants in Korean Commercial Sex Workers. *Journal of Medical Virology*, 2007, 79:426-430.
59. Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, et al. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis[J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(3): 307-312.
60. Herbsleb M, Knudsen UB, Orntoft TF, et al. Telomerase activity, MIB-1, PCNA, HPV16 and p53 as diagnostic markers for cervical intraepithelial neoplasia [J]. *APMIS*, 2001, 109(9): 607-617.
61. Tjalma WA, Weyler JJ, Boge JJ, et al. The importance of biological factors (Bcl-2, Bax, p53, pCNA, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001, 97(2): 223-230.
62. 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.
63. 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.

攻读学位期间的研究成果

赵成琳, 王言奎, 罗兵, 王玉婷, 彭丽娜, 赵雪珍. 青岛地区宫颈癌组织中 HPV16 多态性分析. 中国妇产科临床进展, 2011, 12 (1): 36-42。

赵成琳, 王言奎, 罗兵, 王玉婷, 彭丽娜. 青岛地区宫颈病变组织中 HPV16 URR 和 E6 基因突变分析. 现代妇产科进展, 待发表。

附录

英文缩写注解

bp	base pair	碱基对
CIN	cervical intraepithelial neoplasm	宫颈上皮内瘤变
CC	cervical cancer	宫颈癌
dNTP	deoxyribonuceoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
ddH ₂ O	double distilled water	双蒸水
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid	乙二胺四乙酸二钠盐
EB	Ethidium bromide	溴化乙啶
HR-HPV	high-risk HPV	高危型人乳头瘤病毒
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
IBSCC	the international biological study of cervical cancer	国际宫颈癌生物学研究组织
LCR	Long control region	长控制区
LR-HPV	low-risk HPV	低危型人乳头瘤病毒
nt	nucleotide	核苷酸
ORF	open reading frame	开放读码框
pRb	Retinoblastoma protein	视网膜母细胞瘤蛋白
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸缓冲液
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
Taq	Taq DNA polymerase	嗜热DNA聚合酶
URR	upstream Regulation Region	上游调节区

致 谢

时光飞逝，转瞬三年的硕士研究生生活已经接近尾声。在此，我想对我的老师、朋友，我的父母及亲人表达我由衷的谢意。

首先，也是最主要感谢的是我尊敬的导师王言奎教授，衷心感谢恩师三年来研究生生活中对我的谆谆教诲和悉心关怀，在学业上对我精心指导，在思想、生活上给我无微不至的关怀。同时王老师精益求精的工作作风、严谨的治学态度、渊博的知识、高尚的人格和宽厚豁达的学者风范给我留下了刻骨铭心的印象，使我受益匪浅，并将成为我今后医学道路上的榜样，在此谨向王老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

感谢戴淑真教授、车艳辞老师、王黎明老师、于凤胜老师、夏玉芳老师，彭伟老师，于莎老师，罗兵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。

感谢彭丽娜师姐，杨文玖师兄对我实验上的耐心帮助！同时还要感谢同窗王玉婷，同学晁艳、贾玉平等在学习中的诸多帮助，感谢舍友朱林林、张科花、崔晓燕、尹娜，好友李俊娟、张久旭等的诸多照顾，感谢所有未提及姓名但给予过帮助与关怀的同学和朋友！

最后，我要感谢一直给予我默默支持和帮助的父母，焉得谖草，言树之背，养育之恩，无以回报，谢谢两个字不足以表达我对二老的感激。你们永远健康快乐是我最大的心愿。

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！

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：

赵明琳

日期：2011年5月29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：

赵明琳

日期：2011年5月29日

导师签名：

丁小

日期：2011年5月29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)