

青岛大学

硕士学位论文

青岛地区宫颈病变组织中人乳头瘤病毒16型L1基因多态性分析

姓名：孙欣

申请学位级别：硕士

专业：妇产科学

指导教师：王言奎

20120610

青岛地区宫颈病变组织中 人乳头瘤病毒 16 型 L1 基因多态性分析

摘要

目的

HPV 病毒基因存在变异,且具有种族和地域特异性。本研究通过对不同宫颈病变组织中 HPV16 L1 基因的检测和序列对比,分析了青岛地区宫颈病变患者 HPV16 L1 基因结构特点和变异规律,探讨基因变异与宫颈癌的相关性,为高特异性疫苗的研制提供实验基础。

材料与方法

(1) 收集山东青岛地区宫颈癌新鲜组织 61 例,经病理诊断为宫颈鳞状上皮细胞癌;LCT(液基细胞学检查)标本 300 例,其中正常细胞 47 例,LSIL(低度鳞状上皮内病变)100 例,HSIL(高度鳞状上皮内病变)153 例。300 例 LCT 标本中有明确病理诊断者 181 例,其中慢性宫颈炎 40 例,宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I~III 级 141 例。

(2) 用蛋白酶K法,分别提取新鲜组织和细胞DNA。

(3) 以提取的DNA为模板,采用PCR技术,以通用引物MY09/11筛选出感染HPV的标本,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L1基因全序列。

(5) 所获PCR产物行基因全序列测序,应用DNASTAR软件,与德国HPV标准株进行比对分析,寻找HPV16 L1的突变位点,分析核苷酸和氨基酸的变异,比较热点突变位点突变频率在各组的差异,并与其他国家其他地区突变位点进行比较。

结果

(1) 慢性宫颈炎组、CIN 组、宫颈癌组 HPV 感染率分别为 75.0%(30/40)、89.4%(126/141)和 93.4%(57/61),3 组相比较,差异有统计学意义($X^2=8.370$, $P=0.015$)。正常细胞、LSIL、HSIL、宫颈癌细胞组 HPV 感染率分别为 55.3%(26/47)、61.0%(61/100)、81.7%(125/153)和 93.4%(57/61)。4 组相比较,差异有统计学意义($X^2=34.405$, $P=0.000$)。

(2) 慢性宫颈炎组、CIN 组、宫颈癌组 HPV16 感染率分别为 30.0%(12/40)、41.1%(58/141)和 65.6%(40/61),3 组相比较,差异有统计学意义($X^2=14.874$, $P=0.001$)。正常细胞、LSIL、HSIL、宫颈癌细胞组 HPV16 感染率分别为 10.6%(5/47)、32.0%(32/100)、53.6%(82/153)和 65.6%(40/61)。4 组相比较,差异有统计学意义($X^2=44.303$, $P=0.000$)。

(3) 所有经过病理诊断的标本中, 共有96成功扩增出L1基因, 其中慢性宫颈炎10例、CINI~III 53例、宫颈癌33例, 其扩增率分别为25.0%、37.6%和54.1%。所有LCT标本中, 共有136例成功扩增出L1基因, 其中HSIL70例, LSIL28例, 正常细胞抹片5例。

(4) L1基因共发现13处变异, 所有标本均发生C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT及G7061A(无义) 5处突变。另一突变热点为A6178C, 其在慢性宫颈炎、CIN、宫颈癌3组间频率分布没有显著性差异($X^2=1.265$, $P=0.531$), 在正常细胞、LSIL、HSIL、宫颈癌细胞4组间频率分布亦没有显著性差异($X^2=6.705$, $P=0.082$)。

结论

(1) 青岛地区HPV16 L1基因存在多态性, 最常见的突变位点为C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT、G7061A(无义) 及A6178C。HPV16 L1基因的多态性具有明显的地域性特征。

(2) 青岛地区 HPV16 L1 基因的多态性可能导致病毒地方株的免疫原性和抗原性改变, 但与宫颈癌的发生发展没有明显关系。

硕士研究生: 孙欣(妇产科学)

指导教师: 王言奎 教授

关键词: 宫颈疾病; 人乳头瘤病毒 16 型; L1 基因; 突变

**Analysis of HPV16 L1
gene variants of different cervical lesions in Qingdao
abstract**

Objective

Human papillomavirus (HPV) has a number of intratypic variants, with racial specificity and different geographical distribution. This study was performed to detect sequence variants of the HPV16 late gene L1 derived from Qingdao women with different cervical lesions, analyze the structural features and variation rule, discuss the association between the sequence variant and the cervical lesions, and to provide experiment foundation of the development of thigh specific vaccine.

Materials and Methods

(1) 61 cervical cancer biopsies, with were diagnosed squamous cervical cancer by pathology, and 300 cervical-scraping cell lysates (LCT) were collected in the Qingdao area. The LCT tissues include 47 normal tissues, 100 Lowgrade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) tissues, and 153 Highgrade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) tissues. In all LCT tissues, 181 tissues were pathologically diagnosed, including 40 chronic cervical inflammation and 141 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I~III.

(2) DNA samples were extracted from the cervical scrapes and tissues.

(3) DNA samples were amplified by polymerase chain reaction(PCR). using specific primers MY09/11 for HPV infection. specific HPV16 primers to identify the positive tissues.

(4) DNA samples extracted from the HPV16 positive tissues were amplified by the primers for L1.

(5) the PCR fragments of HPV16 L1 gene were sequenced and compared with the type stain by DNASTAR.

Results

(1) The positive rate of HPV was 75.0%(30/40)、89.4%(126/141) and 93.4%(57/61) separately in inflammation, CIN and cervical cancer. The distribution showed statistical differences ($X^2=8.370$, $P=0.015$) . The positive rate of HPV was 55.3%(26/47)、61.0%(61/100)、81.7% (125/153)and 93.4%(57/61)separately in normal cells, LSIL,HSIL and cervical cancer cells. The distribution showed statistical differences ($X^2=34.405$, $P=0.000$) .

(2) The positive rate of HPV16 was 30.0%(12/40)、41.1%(58/141) and 65.6% (40/61) separately in inflammation, CIN and cervical cancer. The distribution showed statistical differences ($X^2=14.874$, $P=0.001$) . The positive rate of HPV16 was 10.6% (5/47)、32.0%(32/100)、53.6%(82/153) and 65.6% (40/61) separately in normal cells, LSIL,HSIL and cervical cancer cells. The distribution showed statistical differences ($X^2=44.303$, $P=0.000$) .

(3) A total of 96 samples were amplified successfully in all samples diagnosed by pathology. The rate were 25.0%(10/40)、37.6%(53/141) and 54.1%(33/61) separately in inflammation, CIN and cervical cancer. In all LCT samples, 136 were amplified successfully, with 70 HSIL, 28 LSIL and 5 normal cells.

(4) A total of 13 variants were found in the full length of L1 gene. Five mutations, including C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT and G7061A(nonsense) , were found in all of the positive samples. Mutation of A6178C was another hot spot, whose distribution showed no significant difference among inflammation、CIN and cervical cancer ($X^2=1.265$, $P=0.531$) , and also no significant difference among normal cells, LSIL,HSIL and cervical cancer cells($X^2=6.705$, $P=0.082$).

Conclusions

(1) The C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT、G7061A(nonsense) and A6178C were the prevalent variants in Qingdao cervical lesions. There are significant geographical features in the HPV16 L1 gene variation.

(2) The HPV16 L1 gene variation may cause certain changes concerning immunogenicity and antigenicity of the virus, nevertheless has no apparent connection to the development of cervical lesions.

Postgraduate: Xin Sun (Gynecology)

Directed by Prof: Yankui Wang

KEY WORDS: Cervical diseases; HPV16; L1gene; variability

引言

宫颈癌是常见恶性肿瘤之一，严重威胁妇女健康。人乳头瘤病毒（human papillomavirus, HPV）被证实为宫颈癌主要发病因素之一，尤其是高危型 HPV 持续感染是宫颈癌演进以及宫颈上皮内瘤变（cervical intraepithelial neoplasia, CIN）进展的主要危险因素，世界范围内超过 50% 的宫颈癌可检测到高危型 HPV16 感染^[1]。高危型 HPV 主要包括 16, 18, 31, 33 等型别，青岛地区高危型的 HPV 主要是 16 型^[2]。HPV16 的致癌作用主要是通过其癌蛋白使 P53 及 pRb 蛋白降解和灭活，致癌过程包括吸附与进入细胞、病毒基因组整合、癌基因活化与抑癌基因失活等多个步骤。

分子病毒学研究表明，HPV 病毒基因组包括早期编码区、晚期编码区及调控区，且病毒基因存在变异，形成不同的分子变异体，可根据其基因和核苷酸的变异将 HPV 划分为不同的基因型^[3]。流行病学研究表明，HPV 病毒基因的变异具有种族和地域特异性，而且这些变异可改变转录活性、诱导核酶活性增强、逃避宿主的免疫监视等，即导致病毒生物学行为和致癌潜能改变^[4]。因此，HPV 病毒基因的变异特性使得宫颈病变的预防和治疗也具有了种族和地域性，应根据不同地区 HPV16 的基因结构特点和变异规律进行疫苗的实验研究及宫颈疾病的临床治疗。

尽管已证实高危型 HPV 持续感染与宫颈病变演进密切相关，但 HPV 基因的变异是否在这一过程中起到一定作用尚没有定论，这与缺少大范围的病例调查研究及 HPV 变异的种族和地域性有关。

目前国际及国内对于 HPV16 多态性的研究多集中在早期癌基因 E6、E7 上，对于 L1 研究较少，在青岛地区尚没有类似研究，因此，为弥补这一缺憾，本研究对不同宫颈病变组织中 HPV16 L1 基因进行检测和序列对比，由此分析青岛地区宫颈病变患者 HPV16 L1 基因结构特点和变异规律，探讨基因变异与宫颈癌的相关性，为高特异性疫苗的研制提供实验基础。

第1章 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器

仪器	生产厂家
PCR 扩增仪	美国 PE 公司
水平电泳仪及电泳槽	美国 Bio-Rad 公司
凝胶成像系统	美国 PE 公司
高速台式冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
电子天平	上海天平仪器厂
可调式微量移液器	德国 Eppendorf 公司
紫外分光光度仪	德国 Eppendorf 公司
超声波水浴仪	河北省虹宇仪器设备有限公司
转盘式微波炉	顺德革兰仕电器厂

1.1.2 主要试剂

试剂	生产厂家
蛋白酶 K	Takara 公司
Tris 饱和酚	北京索莱宝科技有限公司
氯仿	烟台三和化学试剂有限公司
无水乙醇	烟台三和化学试剂有限公司
无酶水	上海生工生物技术公司
溴化乙锭 (EB)	烟台三和化学试剂有限公司
PBS	美国 Gibco 公司
琼脂糖	Spanish 分装

PCR 试剂盒	Tiangen 公司
PCR 引物	上海生工生物技术公司
Marker	Takara 公司

1.1.3 研究对象

选取 2008 年 6 月至 2011 年 5 月青岛大学医学院附属医院住院的 61 例宫颈鳞状上皮细胞癌患者的手术标本，患者中位年龄 45.2 岁(34.0-80.0 岁)。FIGO 临床分期：Ia₁ 期 40 例，Ia₂ 期 15 例，IIa 期 6 例；分化程度：低分化 21 例，中分化 30 例，高分化 10 例。所有标本均经手术后病理诊断证实。术前均未行放化疗。

选取本院门诊自愿接受检查妇女的宫颈液基细胞学(LCT)标本 300 例，其中正常细胞 47 例，LSIL（低度鳞状上皮内病变）100 例，HSIL（高度鳞状上皮内病变）153 例。其中位年龄分别为 39.3 岁（20.0~60.0 岁），45.8 岁（23.0~64.0 岁）和 42.6 岁（22.0~65.0 岁）。300 例 LCT 标本中有明确病理诊断者 181 例，其中病理诊断慢性宫颈炎 40 例，CINI~III 级 141 例。患者中位年龄分别为 40.3 岁（20.0~60.0 岁）和 42.6 岁（22.0~65.0 岁）。

所有患者均为青岛籍，出生并长期居住于青岛。标本采集之前均获得患者知情同意，标本采集后储存于-70℃。

1.2 方法

1.2.1 提取、溶解新鲜组织及细胞 DNA

1.2.1.1 制备裂解缓冲液

为有效裂解细胞，使蛋白变性及稳定，并最大化提取核酸，使用化学裂解法处理组织及细胞标本。

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	质 量	终浓度(mM)
		(ml)	(g)	
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

试剂	体积
1×HMWbuffer	3.94ml
蛋白酶 K	20μl
10 % SDS	40μl

1.2.1.2 提取DNA

(1)将新鲜组织用PBS液冲洗2~3次，无菌眼科剪将组织剪碎至最大径小于3mm，将剪碎的组织移入15 ml离心管。加4ml裂解缓冲液，吸管吹打混匀，放置于水浴箱，37℃水浴过夜。

(2)将LCT标本中细胞悬液移至15ml离心管，3000rpm离心10min，弃上清，留沉淀，因LCT标本组织细胞较少，加入600μl裂解缓冲液，颠倒混匀，放置于水浴箱，37℃水浴过夜。

(3)次日，观察离心管中组织或细胞悬浊液的消化情况，如液体较清亮，则加入等体积饱和酚，轻柔颠倒混匀20min，3000rpm离心15min。如组织块或细胞沉淀仍存在，则于离心管中补充等体积裂解液，55℃水浴2h后进行上述实验步骤。

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

(5)弃下层水相，轻柔吸出上层水相，移入15ml新离心管，加入2.5倍体积-20℃无水乙醇，颠倒混匀，如出现絮状沉淀，直接将沉淀挑出移入装有-20℃70%乙醇的1mlEP管中-20℃保存，无沉淀者将离心管置冰箱，-20℃过夜。

(6)次日3000rpm离心10min，将絮状沉淀物挑入装有-20℃70%乙醇的1mlEP管中-20℃保存。

(7)使用时挑取少量沉淀入新EP管中，室温晾干至透明状，加入适量PCR水溶解，紫外分光光度计检测DNA样品的浓度和纯度，调整样品DNA为浓度100ng/μl的PCR模板，保存于4℃备用。

1.2.2 聚合酶链式反应（PCR）

1.2.2.1 设计及合成引物

根据 Seedorf 等^[5]1985 年发表的 HPV16 基因组全序列，应用通用引物 MY09/MY11 筛选 HPV 阳性标本，HPV16 特异性引物筛选 HPV16 阳性标本^[6]。将 L1 基因分为三段，应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件分别设计特异性引物，以对 HPV16 L1 基因进行全序列扩增及测序，引物由上海生物工程技术服务有限公司合成，引物序列及扩增产物大小见表 1.2

表 1.2 实验所用引物序列及扩增产物大小

引物名称	序列(5'→3')	产物大小
通用引物	MY09: CGTCCAAAAGGAAACTGATC	450bp
	MY11: GCACAGGGACATAACATGG	
HPV16 特异性引物	F:AGGGCGTAACCGAAATCGGT R:GTTTGCAGCTCTGTGCATA	140bp
HPV16 L1-1	F:TCCTTTTGGTGGTGCATAC R: ATCACCTGGATTTACTGCAAC	755bp
HPV16 L1-2	F: AGGTGTTGAGGTAGGTCGTG R: TGACATATTTGTACTGCGTGTAG	721bp
HPV16 L1-3	F: TATACATTAAAGGCTCTGGGTC R: TACAAGCACATACAAGCACATAC	764bp

1.2.2.2 PCR50μl 反应体系

试剂	体积
去离子水	31.5μl
10×buffer	5μl
dNTP	4μl(2.5 mmol/L.)
上游引物	2μl(10μmol/L.)

下游引物	2μl(10μmol/L)
TaqDNA 聚合酶	0.5μl(2U/μl)
DNA	5μl (100ng/μl)

1.2.2.3 PCR 法扩增目的基因

计算单次 PCR 所需各试剂的总量（除外样本 DNA），依次加入 Ep 管，混匀后瞬时离心。将混匀后试剂均匀分装入各 Ep 管，分别加入不同 DNA 模板，避免标本间交叉污染，并加入石蜡油 20μl 覆盖，震荡混匀后瞬时离心，置入 PCR 扩增仪扩增。每次 PCR 均设阳性及阴性对照，阳性对照为既往阳性标本，阴性对照以 5μl 去离子水代替 5μl DNA。目的基因的扩增条件相同，为 95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 30s，55℃ 复性 30s，72℃ 延伸 1min，共 39 个循环；热循环结束后 72℃ 延伸 10min。PCR 反应结束后取出扩增产物，置于 4℃ 冰箱中保存。

1.2.3 扩增产物电泳分析

1.2.3.1 配备 0.5×TBE 缓冲液

试剂	质量或体积
硼酸	6.875g
EDTA	0.93g
Tris 碱	13.5g
双蒸水	2500ml

1.2.3.2 制备琼脂糖凝胶

根据不同扩增产物分子量大小，制备不同浓度的琼脂糖凝胶。制备 1.6%的琼脂糖凝胶对 HPV16 及 MY 扩增产物进行电泳，制备 0.8%的琼脂糖凝胶对 HPV L1-1、L1-2 及 L1-3 扩增产物进行电泳。

- [1] 称取相应重量琼脂糖，入小烧瓶，量筒量取 0.5×TBE 缓冲液，移入小烧瓶，轻轻震荡混匀，将瓶口封闭。
- [2] 将烧瓶置微波炉内，中火加热 2min 左右，至琼脂糖完全溶解。
- [3] 取出小烧瓶置于室温，自然冷却至 50-60℃。

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

[5] 拔出模型梳，将胶密封保存于 4℃ 冰箱，备用，胶可保存 1-2 周。

1.2.3.3 电泳分析

取扩增产物 4 μ l，加入 10 $\times$ 上样缓冲液 0.5 μ l 混匀，加样至被 0.5 $\times$ TBE 缓冲液没过 1mm 的胶孔内，注意勿使样本溢出胶孔，避免标本间交叉污染，并将 marker 加入胶孔内同时电泳，以标志 DNA 分子量。将胶摆放整齐，以保证电泳带整齐，100V 恒压电泳 40min 时停止电泳。将琼脂糖凝胶置于 EB 溶液（浓度为 1 μ g/mL）中浸泡 30-40min，于紫外分光光度仪下观察条带，凝胶成像分析系统采集图像。

1.2.4 核酸序列测序及分析

将 L1 阳性样本的 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，测序结果与 Seedorf 等 1985 年发表的 HPV16 L1 基因序列比对，用 DNASTar 软件分析基因突变位点，分析序列多态性。

1.2.5 统计学分析

采用 SPSS17.0 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 不同宫颈病变组织中HPV感染率

应用高危型HPV通用引物MY09/11筛选感染HPV的细胞，PCR扩增后对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，可以观察到在450bp处出现目的条带（如图2.1所示）。

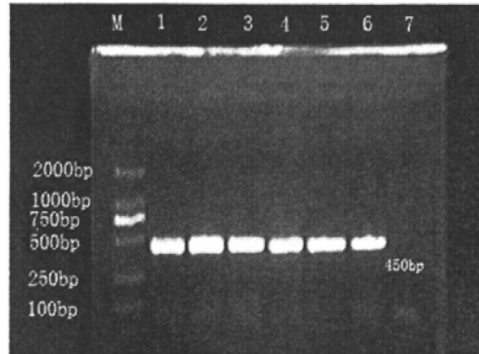


图 2.1 HPV 感染筛选结果

M 为 marker2000 电泳条带，1~5 为待筛选样本电泳条带，6 为阳性对照电泳条带，7 为阴性对照电泳条带。标本 1~5 均为阳性。

宫颈癌组织标本中共有 57 例扩增出目的条带，其 HPV 感染率为 93.4%(57/61)。所有 LCT 标本中，共有 212 例扩增出目的条带，其中 HSIL125 例，LSIL 61 例，正常细胞抹片 26 例，其感染率分别为 81.7%、61.0%和 55.3%。在经过病理诊断的 181 例 LCT 标本中，共有 156 例扩增出目的条带，其中慢性宫颈炎 30 例，CIN126 例，其感染率分别为 75.0%(30/40)和 89.4%(126/141)。将慢性宫颈炎、CIN、宫颈癌 3 组 HPV 感染率相比较，差异有统计学意义 ($X^2=8.370$, $P=0.015$)。将正常细胞、LSIL、HSIL、宫颈癌 4 组 HPV 感染率相比较，差异有统计学意义 ($X^2=34.405$, $P=0.000$)。

2.2 不同宫颈病变组织中16型HPV感染率

应用高危 16 型 HPV 特异性引物筛选感染 HPV16 的细胞，PCR 扩增后对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，可以观察到在 140bp 处出现目的条带（如图 2.2 所示）。

宫颈癌标本中共有 40 例扩增出目的条带，其 HPV 感染率为 65.6% (40/61)。所有 LCT 标本中，共有 119 例扩增出目的条带，其中 HSIL82 例，LSIL32 例，正常细胞抹片 5 例，其感染率分别为 53.6%、32.0%和 10.6%。在经过病理诊断的 181 例 LCT 标本中，共有 70 例扩增出目的条带，其中慢性宫颈炎 12 例，CIN 58 例，其感染率分别为 30.0%(12/40)、41.1%(58/141)。将慢性宫颈炎、CIN、宫颈癌 3 组 HPV 感染率相比较，差异有统计学意义 ($X^2=14.874$, $P=0.001$)。将正常细胞、LSIL、HSIL、宫颈癌 4 组 HPV 感染率相比较，差异有统计学意义 ($X^2=44.303$, $P=0.000$)。

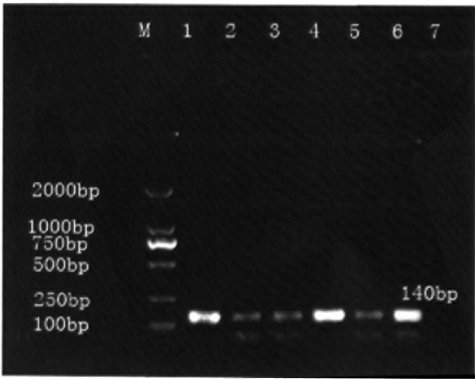


图 2.2 HPV16 感染筛选结果

a: M 为 marker2000 电泳条带, 1~5 为待筛选样本电泳条带, 6 为阳性对照电泳条带, 7 为阴性对照电泳条带, 标本 1 和 4 为阳性, 标本 2、3 和 5 为弱阳性。

2.3 HPV16 L1 基因扩增结果

为对 L1 全序列进行扩增和测序, 根据 Genbank 中公布的 HPV16 基因组全序列, 将 L1 基因分为三段, 应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件分别设计特异性引物。使用 PCR 扩增出序列后经琼脂糖凝胶电泳, 可以分别观察到片段长度 755bp、721bp 及 765bp 的目的条带 (如图 2.3~2.5 所示)。

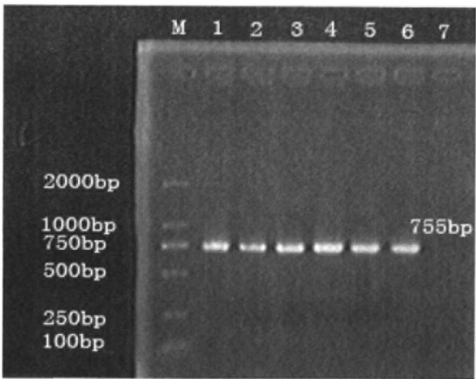


图 2.3 L1-1 电泳结果

a: M 为 marker2000 电泳条带, 1~5 为样本电泳条带, 6 为阳性对照电泳条带, 7 为阴性对照电泳条带。标本 1~5 均成功扩增。

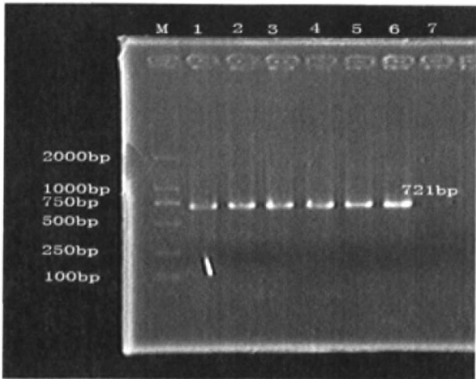


图 2.4 L1-2 电泳结果

a: M 为 marker2000 电泳条带，1~5 为样本电泳条带，6 为阳性对照电泳条带，7 为阴性对照电泳条带。
标本 1~5 均成功扩增。

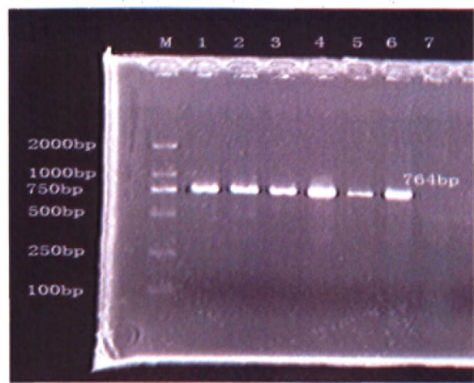


图 2.5 L1-3 电泳结果

a: M 为 marker2000 电泳条带，1~5 为样本电泳条带，6 为阳性对照电泳条带，7 为阴性对照电泳条带。
标本 1~5 均成功扩增。

在经病理诊断的标本中，共有 96 例成功扩增出 L1 基因全长，其中慢性宫颈炎 10 例、CINI~III 53 例、宫颈癌 33 例，其扩增率分别为 25.0%、37.6%和 54.1%。在所有 LCT 标本中，共有 136 例成功扩增出 L1 基因全长，其中 HSIL70 例，LSIL28 例，正常细胞抹片 5 例。

2.4 HPV16 L1 基因多态性分析

经双向测序后比对基因序列，HPV16 L1 基因共发现 13 处变异，其中 7 处为无义突变，4 处错义突变，1 处插入突变，1 处缺失突变。其中突变热点为 A6178C、C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT、G7061A（无义）。主要突变热点峰图及序列比对见图 2.6-2.11。

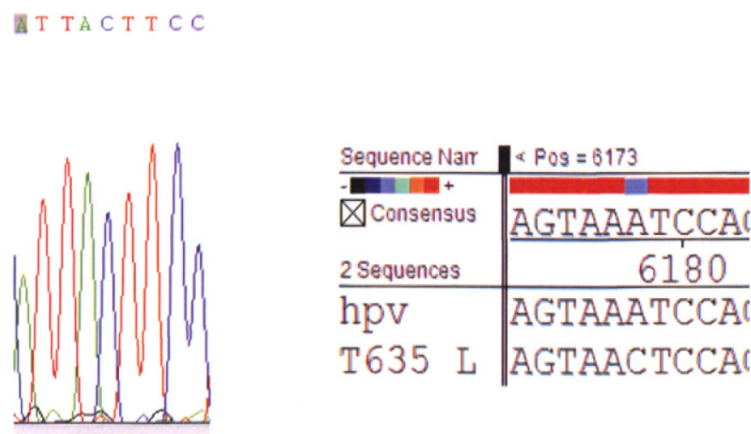
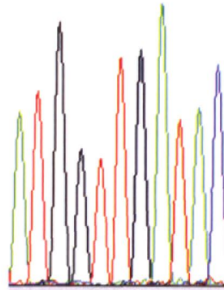


图 2.6 L1 A6178C 峰图及序列比对

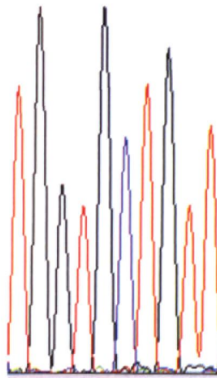
A T G G T T G A T A C



Sequence Name	< Pos = 6236
☒ Consensus	GGTTGATACTGGC
2 Sequences	6240 6
hpv	GGTTCATACTGGC
T373 L	GGTTGATACTGGC

图 2.7 L1 C6240G 峰图及序列比对

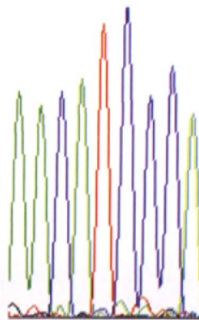
T G G T G C T G T T



Sequence Name	< Pos = 6428
☒ Consensus	TGGTGCTGTTGG'
2 Sequences	6430 64
hpv	TGGTACTGTTGG'
T373_L	TGGTGCTGTTGG'

图 2.8 L1 A6432G 峰图及序列比对

A A C A T C C C A



Sequence Name	< Pos = 6898
☒ Consensus	TAACATCCCAGG'
2 Sequences	6900 69
hpv	TAAC---CCAGG'
T359 L	TAACATCCCAGG'

图 2.9 L1 6902insATC 峰图及序列比对

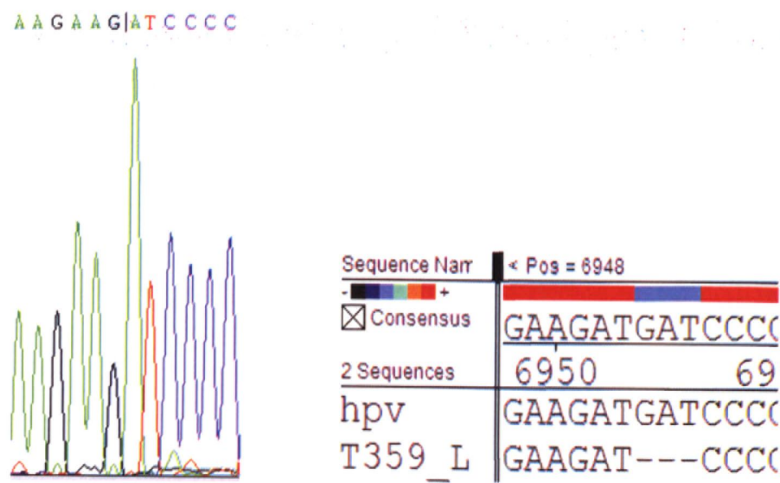


图 2.10 L1 6954delGAT 峰图及序列比对

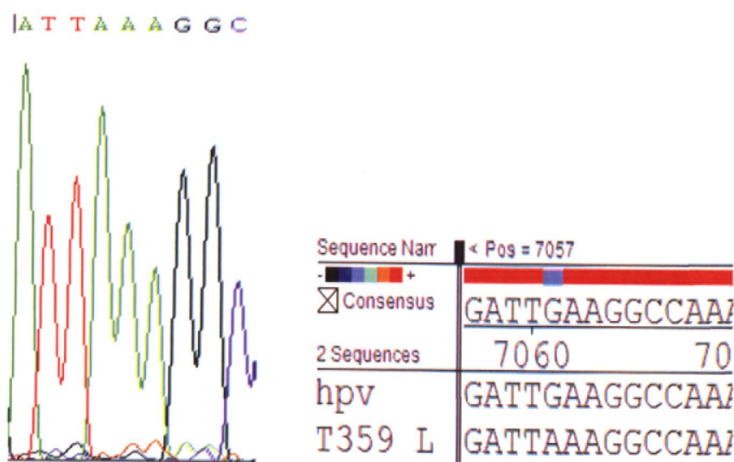


图 2.11 L1 G7061A 峰图及序列比对

2.5 不同宫颈病变中 L1 基因多态性比较

2.5.1 慢性宫颈炎、CIN、宫颈癌中 L1 基因多态性比较

根据手术或 LCT 标本进行病理诊断的结果，可将所有标本分为慢性宫颈炎、CINI~III 和宫颈癌 3 组。变异位点、氨基酸改变及其在这 3 组中的分布见表 2.1。由表可见，所有标本均存在 C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT、G7061A（无义）5 处突变。这 5 处变异位点在 3 组的分布相同，在不同宫颈病变组织中突变率均为 100.0%。除这 5 个突变位点外，其他引起氨基酸改变的位点为 A6178C 及 T6687G。A6178C 在所有标本中共检测到 18 例，突变率为 18.8%。此位点在慢性宫颈炎组、CINI~III 组和宫颈癌组的突变率相比较，差异无统计学意义（ $X^2=1.265$ ，

$P=0.531$)。T6687G 总突变率为 6.3%，将其在 3 组中的突变率相比较，差异亦无统计学意义 ($X^2=0.821$, $P=0.663$)。

表 2.1 不同宫颈病变组织中 L1 基因多态性分析 (一)

变异位点		慢性宫颈炎		CIN(I~III)		宫颈癌		总计	
基因	氨基酸	例数	比例 (%) n=10	例数	比例 (%) n=53	例数	比例 (%) n=33	例数	比例 (%) n=96
A6178C	N207P	1	10.0	9	17.0	8	24.2	18	18.8
C6240G	H228D	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0
A6432G	T292A	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0
A6503G	-	1	10.0	8	15.1	12	36.4	21	21.9
A6551G	-	2	20.0	2	3.8	2	6.1	6	6.3
A6656T	-	0	0.0	3	5.7	0	0.0	3	3.1
A6665C	-	1	10.0	13	24.5	5	15.2	19	19.8
T6687G	S377A	0	0.0	4	7.5	2	6.1	6	6.3
C6824T	-	1	10.0	9	17.0	10	30.3	20	20.8
6902insATC	449insS	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0
A6947G	-	0	0.0	2	3.8	0	0.0	2	2.1
6954delGAT	467delD	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0
G7061A	-	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0

a: “-” 表示未发生氨基酸的改变，该位点突变为无义突变。

2.5.2 正常细胞、LSIL、HSIL、宫颈癌细胞中 L1 基因多态性比较

根据细胞形态学分类，可将所有标本分为正常细胞、LSIL、HSIL 和宫颈癌细胞 4 组。分析变异位点、氨基酸改变及其在这 4 组中的分布，详见表 2.2。由表可见，在增多的样本例数和不同的分类下并没有检测到不同的突变位点，而且同表 2.1 显示，C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT、G7061A（无义）5 处突变均存在于所有标本。这 5 处变异位点在 4 组的分布亦相同，在不同宫颈病变组织中突变率均为 100.0%。而突变热点 A6178C 在所有标本中共检测到 20 例，突变率为 14.7%。此位点在正常细胞、LSIL、HSIL 和宫颈癌细胞 4 组的突变率相比较，差异

无统计学意义 ($X^2=6.705$, $P=0.082$)。T6687G 点总突变率为 8.8%，将其在 4 组中的突变率相比较，差异亦无统计学意义 ($X^2=6.458$, $P=0.091$)。

表 2.2 不同宫颈病变组织中 L1 基因多态性分析 (二)

变异位点		正常细胞		LSIL		HISL		宫颈癌细胞		总计	
基因	氨基酸	例数	比例 (%) n=5	例数	比例 (%) n=28	例数	比例 (%) n=70	例数	比例 (%) n=33	例数	比例 (%) n=136
A6178C	N207P	1	20.0	6	21.4	5	14.0	8	24.2	20	14.7
C6240G	H228D	5	100.0	28	100.0	70	100.0	33	100.0	136	100.0
A6432G	T292A	5	100.0	28	100.0	70	100.0	33	100.0	136	100.0
A6503G	- ^a	0	0.0	3	10.7	8	15.1	12	36.4	22	16.2
A6551G	-	3	60.0	4	14.3	0	0.0	2	6.1	9	6.6
A6656T	-	1	20.0	0	0.0	1	1.4	0	0.0	2	1.5
A6665C	-	2	40.0	3	10.7	5	7.1	5	15.2	15	11.0
T6687G	S377A	2	40.0	2	7.1	6	8.6	2	6.1	12	8.8
C6824T	-	1	20.0	6	21.4	10	14.3	10	30.3	27	19.9
6902insATC	449insS	5	100.0	28	100.0	70	100.0	33	100.0	136	100.0
A6947G	-	1	20.0	1	3.6	0	0.0	0	0.0	2	1.5
6954delGAT	467delD	5	100.0	28	100.0	70	100.0	33	100.0	136	100.0
G7061A	-	5	100.0	28	100.0	70	100.0	33	100.0	136	100.0

a: “-” 表示未发生氨基酸的改变，该位点突变为无义突变。

第3章 讨论

宫颈疾病是威胁妇女健康的常见疾病,可由癌前病变逐渐进展至宫颈癌,后者是导致妇女死亡的重要恶性肿瘤之一。随着研究的深入,人们认识到人乳头瘤病毒是宫颈疾病的重要病因,尤其是高危型 HPV 的持续感染,更是宫颈癌发生发展过程中的重要推动因素。

3.1 HPV16 病毒及其多态性

HPV 病毒为一组嗜上皮组织的小双链 DNA 病毒,高危型 HPV16 是 CIN 及宫颈癌的主要病因之一,因此,为寻找预防及治疗宫颈疾病的途径和方法,对 HPV16 需要进行深入的研究。HPV16 致癌过程包括吸附与进入细胞、病毒基因组整合、癌基因活化与抑癌基因失活等多个步骤,致癌作用主要是通过其癌蛋白使 P53 及 pRb 蛋白降解和灭活,影响细胞内抑癌基因的功能,干扰细胞周期的负调控作用,导致细胞的永生性^[7-8]。

分子生物学研究显示同型 HPV 存在核酸碱基的变异,可形成不同的亚型,即存在基因多态性。HPV16 的这种基因多态性可导致病毒生物学行为上的差别,表现出不同的致癌潜能^[9]。而且流行病学资料显示,HPV16 基因多态性表现出明显的种族和地域差异性。HPV16 多态性研究大多集中在病毒进入组织后发挥作用的某些早期基因,而对于在病毒吸附与进入细胞、引发自然免疫阶段起重要作用的 L1 基因的研究较少,在青岛地区尚没有类似研究。

3.2 L1 基因的结构特点和功能

L1 基因为 HPV16 晚期基因之一,其编码产物作为病毒的主要衣壳蛋白。L1 蛋白分子量约 54-58kDa,其五聚体形式即构成大部分的病毒外壳。

L1 基因比 HPV 早期基因 E6、E2 等相对保守,我们实验发现的 13 处变异中,其中 7 处均为无义突变,说明 L1 在氨基酸序列上相对保守。而且, L1 基因不同部位活性也不同, L1 的 C 端是相对较活跃的区域,而在这一区域发生的变异会影响到锚定于此的螺旋 h5 的结构,提高 L1 蛋白的对酶敏感性,影响 L1 的稳定性^[10]。而与活跃的 C 端不同的是, N 端相对保守,这与 N 端位于质粒界面上,决定着组装颗粒的大小有关。L1 这种 C 端和 N 端表现出的活性差异也在我们实验中体现出来。

L1 基因在 HPV16 的吸附与进入细胞、引发自然免疫、产生中和抗体等阶段发挥重要作用。在感染初期, HPV16 病毒必须通过主要衣壳蛋白与暴露的基底膜上硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPGs) 结合,经过一系列蛋白裂解过程,使先前被遮盖的 L1 蛋白结合位点暴露出来,这样才能与移行到基底膜缺口处的上皮细胞表面受体结

合,从而进入上皮细胞^[11]。进入细胞的 L1 衣壳蛋白主要被树突状细胞、朗格汉斯细胞等固有免疫细胞识别,并产生初始的自然免疫^[12-13]。L1 蛋白尚具有自我组装成病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)的特性,后者可以激活 T 细胞、B 细胞等特异性免疫细胞,产生中和抗体^[14]。这种抗体是保护性抗体,并且可在体内形成记忆,在下次细胞被感染时产生应答,这也是 HPV 预防性疫苗的作用机制^[15]。

3.3 L1 基因多态性分析

VLPs 易激活体内免疫系统,能刺激机体产生高滴度的中和抗体^[16]。而 L1 蛋白氨基酸的改变可以影响其自我组装为 VLPs 的效率从而影响后者的含量^[17],亦可以影响体内免疫细胞对组装后 VLPs 的识别。Kimbauer 等研究发现 C6240G 位点突变可导致变异株产生 VLPs 的含量是原型株的 3 倍,使得变异株的免疫原性增加^[18]。但 Yang 等研究发现,由于宫颈癌组织中 L1 突变的影响,组装成的 VLPs 表现出可逃避树突状细胞监视的行为,即逃避自然免疫^[19]。尚没有实验证实这两种作用何者占据主要位置。

我们发现所有样本均发生 C6240G 突变,导致 228 位氨基酸由组氨酸变为天冬氨酸,这个结果与印度、加拿大等地研究一致^[20-21]。国内新疆、兰州、扬州等地的研究也得出相似结果^[22-24]。这说明 HPV16 青岛地方株可能具有较高的免疫原性,但对树突状细胞等固有免疫细胞的识别性较差。

所有样本中均出现的另两处变异为 6902 位点插入 ATC 及 6954 位点缺失 GAT,分别导致 L1 蛋白 C 端氨基酸序列 449 处插入丝氨酸及 467 处缺失天门冬氨酸。有 19.0% 的样本发现有 6178 位点突变,氨基酸由天冬酰胺变为脯氨酸。此三处变异位点均位于 V5 区,此区在中和抗原表位上其重要作用。V5 区的变异可导致 B 细胞抗原表位发生改变,影响抗体的识别。研究表明针对 L1 主要衣壳蛋白的中和抗体直接识别构象表位。变异引起表位构象改变从而影响中和抗体的结合力及变异株的抗原性^[25]。

目前,在宫颈脱落细胞学检查与诊断中,有使用检测与 L1 蛋白结合的抗体作为检测 HPV16 的方法,如果因为突变的存在,使得抗体无法识别抗原表位,将会导致 HPV16 检测的假阴性,造成漏诊。不仅如此,目前针对 HPV 的预防性疫苗是利用 VLPs 可以刺激免疫系统产生高滴度抗体的特性,加快抗体转换,增强记忆 B 细胞功能,提高体液免疫能力。因此,预防性疫苗发挥作用的程度与抗体与抗原的结合力密切相关。青岛地区 HPV16 L1 基因变异所导致的抗原表位的构象变化,可能会在一定程度上影响预防性疫苗的作用效果。

另一突变热点为 A6432G,导致 292 处氨基酸由苏氨酸变为丙氨酸,此位点编码的氨基酸位于 HPV16 衣壳蛋白五聚体中 L1-L1 界面处。但陈俊等认为,虽然变异

株氨基酸有相应改变,但所构成的蛋白在亲水性、表面可及性及抗原性上与标准株相比较无明显变化^[26]。

3.4 不同地区 L1 基因多态性比较

本实验结果显示:青岛地区宫颈病变组织中 HPV16 L1 基因的突变热点为 C6240G、A6432G、6902insATC 和 6954delGAT,其突变率均为 100.0%。这些突变热点与加拿大^[21]、印度^[20]学者研究结果相一致,但完全不同于巴西^[27]、印度北部地区^[28]、希腊^[29]、西班牙^[30]等国家和地区,其显示的高突变位点包括 A6695C、A6803T 等。将此结果与国内现有的研究资料比较,也存在较明显的异同。6902insATC 和 6954delGAT 两处突变也存在于扬州^[24]、温州^[26]及成渝两地^[31]的地方株,但未能在珠海、南昌^[32]和黑龙江^[33]等地的研究中检测出。于此相反, Qinglong Shang^[33]等在以中国北部地区宫颈病变组织为对象的研究中所得出的突变热点(A5883C、G6085A、A6164G 等)均未在本实验中检测到。由此可见,HPV16 病毒 L1 基因多态性也具有较明显的地区和种族差异性,即便是在亚型一致的情况下,也存在较多差异。于此同时,这种多态性的异同也提示种系起源相关性。

3.5 不同宫颈疾病中 L1 基因多态性比较

将所有样本按病理诊断与细胞形态学两种不同标准分组,分别比较,其各组间 HPV 感染率及 HPV16 感染率均有显著性差异,且均随着病变程度加重而明显升高,这与世界及中国范围内研究结果一致。说明 HPV 的持续感染对宫颈病变的发生发展起重要作用。而研究 HPV16 L1 基因各个变异位点时,其突变频率在不同宫颈病变中分布均没有显著性差异,甚至在所有标本中均出现一致的突变位点,这表明虽然青岛地区 L1 基因存在多态性,而且会对 HPV16 生物学行为产生一定的影响,但此多态性与宫颈病变的发展没有明显关系,这与 Tonon 等的研究结果一致^[34]。世界范围内对于 L1 基因多态性与宫颈病变进展的研究较少,即便是研究较多的 E6 基因多态性,在这一点上也出现相互矛盾的结果。

综上所述,青岛地区宫颈病变组织中 HPV16 L1 基因存在多处变异,这些变异存在明显的种族和地区差异。L1 基因的多态性导致 HPV 病毒的免疫原性和抗原性发生改变,可能会影响青岛地区宫颈疾病的发病及治疗,并影响预防性疫苗的功效。但是本实验并没有发现 L1 基因多态性与宫颈癌发生发展的明显关系,而且国际范围内对于 HPV16 癌基因多态性与宫颈癌的关系并没有形成统一的定论。

HPV16 病毒基因多态性与宫颈疾病的关系,不仅受基因多态性所引起的病毒生物学行为与致癌潜能的变化有关,也与宿主本身组织相容性抗原 HLA 多态性有关,因此,本研究仅从一方面着手,所得出的结论虽然有一定的理论意义,但不免片面。本研究没有将年龄作为影响因素研究讨论,因为据研究,在同一地区内年龄与 HPV16

基因多态性分布没有相关性^[35]。但是作为一个以医院为基础的研究，我们的实验受样本量的限制，还需要进行大样本实验以及对变异株功能的深入研究，以得出更科学的结论。

第4章 结论

1. 青岛地区 HPV16 L1 基因存在多态性，最常见的突变位点为 C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT、G7061A（无义）及 A6178C。HPV16 L1 基因的多态性具有明显的地域性特征。

2. 青岛地区 HPV16 L1 基因的多态性可能导致病毒地方株的免疫原性和抗原性改变，但与宫颈癌的发生发展没有明显关系。

参考文献

- [1]Marc S, Eliane DF. Human papillomavirus infection epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*, 2007,107: S2-S5.
- [2]王玉婷, 王言奎, 赵成琳. HPV16 E7 和 E6 基因多态性与宫颈癌临床病理特征相关性分析. *齐鲁医学杂志*, 2011,26:308-310.
- [3]Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther*, 2002,7:219-237.
- [4]Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, 2006,118:1071-1076.
- [5]Seedorf K, Krammer G, Durst M. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 1985,145:181-185.
- [6]Shimada M, Fukushima M, Mukai H. Amplification and specific detection of transforming gene region of human papillomavirus 16, 18 and 33 in cervicalcarcinoma by means of the polimerase chain reaction. *J Cancer Res*, 1990, 81:1-5.
- [7]Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Onco*, 2003, 22: 5201-5207.
- [8]Boulet G, Horvath C, Broeck DV, et. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J B C*, 2007,39:2006-2011.
- [9]Villa LL, Schlegel R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology*, 1991,181: 374-377.
- [10]Chen XS, Garcea RL, Goldberg I. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*, 2000,5:557-567.
- [11]Johnson KM, Kines RC, Roberts JN. Role of heparin sulfate in attachment to and infection of themurine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol*. 2009.83:2067-2074.
- [12]Lenz P, Day PM, Pang YY, et al. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol*, 2001,166:5346-5355.

- [13]Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. *Cancer Res*,2003,63:3478-3482.
- [14]Da Silva DM, Velders MP, Nieland JD. Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *Int Immunol*,2001,13:633-641.
- [15]McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Path*,2001,82:15-33.
- [16]Kimbauer R, Booy F, Cheng N. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 1992. 89:12180-12184.
- [17]Tan W, Felber BK, Zolotukhin AS. Efficient expression of the human papillomavirus type 16 L1 protein in epithelial cells by using Rev and the Rev-responsive element of human immunodeficiency virus or the cis-acting transactivation element of simian retrovirus type 1. *J Virol*, 1995,69:5607-5620.
- [18]Kimbauer R, Taub J, Greenstone H. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*, 1993, 67:6929-6936.
- [19]Yang R, Wheeler CM, Chen X. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol*.2005,79:6741-6750.
- [20]Pillai MR , Hariharan R, Janki MB. Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population. *Int J Cancer*, 2009, 125:91-103.
- [21]Lee K, Magalhaes I, Clavel C. Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Research*. 2008, 131: 106-110.
- [22]马正海, 张富春, 梅新娣等. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型 L1 基因突变谱分析. *中华医学杂志*,2004, 84:987-991.
- [23]安静, 余黎, 席亮等. 人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白的克隆及表达. *微生物免疫学进展*.2007,35:26-29.
- [24]高慧, 黄正芳, 徐向明等. 扬州地方株 HPV16 L1 基因的克隆及序列分析. *东南大学学报*. 2005, 24:17-20.

- [25]Varsani A, Williamson AL, Jaffer MA. A deletion and point mutation study of the human papillomavirus type 16 major capsid gene. *Virus Res* 2006,122:154-163.
- [26]陈俊,董海艳,朱珊丽等.温州地方株 HPV16 型 L1 基因多态性及蛋白特性分析. *温州医学院学报*, 2009,39:538-545.
- [27]Marcio RC, Daniela MC, Waldenor BC. Prevalence of Human Papillomavirus Type 16 Variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004,99:281-282.
- [28]Shailja Pande, Neeraj Jain, Bhupesh KP. 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. *Journal of Clinical Microbiology*,2008:1060-1066.
- [29]Chara KN, Christine K, Aikaterini C. Genetic Variability and Phylogeny of High Risk HPV Type 16,18, 31, 33 and 45 L1 Gene in Greek Women. *Int. J. Mol. Sci*,2012,13:1-17.
- [30]M. Ortiz, M. Torres. Oncogenic Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution and HPV Type 16 E6 Variants in Two Spanish Population Groups with Different Levels of HPV Infection Risk. *Journal of Clinical Microbiology*,2006,44:1428-1434.
- [31]陈良,丁显平,朱一剑等.成渝两地宫颈癌患者中人乳头瘤病毒 16 亚型 L1、E6 和 E7 基因的分离克隆和序列分析. *国际检验医学杂志*,2010,31:217-219.
- [32]Yuping Wu, Yulong Chen, Longyu Li. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *Journal of General Virology*,2006,87:1181-1188.
- [33]Qinglong Shang, Yan Wang, Yong Fang. Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Identification of Cervical Carcinomas in Patients in Northeast China. *Journal of Clinical Microbiology*,2011,49:2656-2663.
- [34]Tonon SA, Basiletti J, Badano J. Human papillomavirus type 16 molecular variants in Guarani Indian women from Misiones, Argentina. *International Journal of Infectious Diseases*,2007,11:76-81.
- [35]Pista, A, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal. *J. Med. Virol*,2007,79:1889-1897.

综述

HPV 及其基因多态性与宫颈疾病关系

【摘要】 宫颈癌是导致妇女死亡的主要恶性肿瘤之一，宫颈疾病的防治因此成为研究的热点。而近年来的研究表明 HPV 的持续感染是导致宫颈癌发病的主要因素之一，而且由于其病毒不同型别不同亚型之间的多态性，使得 HPV 病毒的生物学性状、宫颈疾病的临床表现及进展预后都发生了改变，对明确发病机制，寻找临床防治最佳方案，疫苗的研制及使用等课题都提出了新的要求。

【关键词】 人乳头状瘤病毒；基因；多态性；宫颈疾病

【中图分类号】 R737.33 【文献标识码】 A

宫颈疾病严重威胁妇女健康，宫颈癌是导致妇女死亡的主要恶性肿瘤之一，全球每年新发宫颈癌病例 50 万，死亡 20 万。我国宫颈癌每年新增发病数超过 13 万，占世界新发病例的 28.8%，每年有 2 万妇女死于宫颈癌，且近年来发病还呈现年轻化的趋势^[1-3]。因此宫颈疾病的筛查及宫颈癌的防治成为研究的热点。人乳头瘤病毒（human papillomavirus, HPV）被证实与宫颈疾病的发生密切相关，是宫颈癌主要发病因素之一，尤其是高危型 HPV 持续感染是女性宫颈癌演进以及宫颈上皮内瘤变（cervical intraepithelial neoplasia, CIN）进展的主要危险因素^[4]。

一. HPV 与宫颈癌

1. HPV 的生物学性状

HPV 是属于乳多空病毒科 A 亚群内的一组 DNA 病毒，对皮肤及黏膜上皮细胞具有特殊嗜性。完整的病毒颗粒为一个感染单位，外壳为衣壳蛋白五聚体，含 72 个衣壳壳，呈 20 面体对称型。HPV 基因组为双链环状 DNA，由 3 个部分组成，包括：早期区（early region, E）含有 E1, E2, E4, E5, E6 和 E7 共 6 个基因，是编码癌蛋白、整合入细胞基因组、引发早期免疫、诱导细胞凋亡或永生性转化、维持病毒载量的基因^[5]；晚期区（late region, L）含有 L1 和 L2，翻译病毒的衣壳蛋白，并与病毒最初的进入细胞有关；长控制区（long control region, LCR），含有增强子及启动子，从转录水平调节病毒癌基因功能。HPV 的基因结构见图 1。

2. HPV 与宫颈病变

宫颈癌是感染性疾病这一观点早就深入人心，对于病原体的寻找也尝试过许多种生物，包括疱疹病毒、支原体、衣原体、滴虫等多种可以感染生殖器的病原体，

均以失败而告终。而人乳头瘤病毒感染直到40年前一直被认为是无足轻重的。之前一般的观点认为，HPV是形成疣、皮肤及体内鳞状粘膜上皮的良性上皮增生的病因，除此之外，并无重要意义。但是这种观点被两篇独立的研究报告打破，一篇是临床研究，另一篇是基础分子病毒学研究。1976年Meisels及Fortin研究表明，细胞学者在宫颈抹片检查中发现的细胞是种挖空细胞——HPV感染后的细胞病理表现^[6]。而低级别宫颈病变或者轻度不典型增生的宫颈细胞也显示出了乳头瘤感染的组织学特征^[7]。这初步提示了HPV感染与宫颈病变的相互关系。不久之后，Lutz从生殖器尖锐湿疣中克隆出一种新的HPV DNA，随后被归类为HPV6^[8]。随后，Lutz用此DNA序列作为探针从生殖器疣中克隆出另一种新的HPV——HPV11^[9]。实验室中其他成员利用HPV11 DNA作为探针，并于1983年从宫颈癌活检标本中克隆出另一型HPV，即HPV16^[10]，一年后，18型HPV也随之产生^[11]。随后进行的多项研究更加表明，HPV的感染是宫颈癌发生发展的重要因素，是宫颈癌的主要病因。至今已发现至少存在40多种可侵犯女性生殖系统的HPV型别，其中约有15种型别的HPV具有高度致癌性，其中，HPV16、18型致癌潜能最高，是约70%宫颈癌的病因^[12]，因此被称为高危型HPV。相对应的，引起生殖器疣等良性上皮内病变的HPV被称为低危型HPV，如HPV6/11。

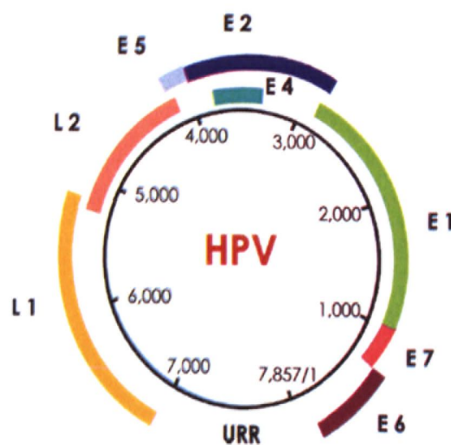


图1 HPV的结构

3. HPV的致癌机制

3.1 HPV 基因致癌作用

3.1.1 早期编码区 HPV 的致癌作用与 HPV DNA 的整合有关。HPV 感染机体并达到一定的病毒载量后，HPV 基因组整合到宿主 DNA 之中，之后，整合后的病毒 DNA 常分裂 E1, E2 基因，开放读码框架(ORF)，导致 E2 功能丢失，失去了对 E6 和 E7 基因的调控，从而引起 E6 和 E7 过表达^[13]。Parish^[14]等进一步研究显示，高危型 HPV E2

蛋白还通过另外两条途径诱导细胞凋亡：一条为 p53 依赖途径，可以诱导 HPV 转化及非转化细胞凋亡；另一条为非 p53 依赖途径，需要 E2 结合到病毒基因组，仅诱导 HPV 转化细胞凋亡。E6 基因编码蛋白可与 P53 蛋白结合，使 P53 蛋白降解而产生细胞转化作用^[15]。E7 基因也是 HR-HPV 的主要致癌基因之一，其编码的蛋白与视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)结合，并抑制其活性，使之功能丧失^[16]。E6 和 E7 基因的主要作用原理见图 2。此外，E1 蛋白具有解螺旋酶活性，是病毒复制的必要成分，调控基因转录。E4 与细胞骨架蛋白相互作用，参与病毒装配。E5 与生长因子受体作用刺激细胞生长，下调 HLA I 类表面分子，使癌变组织免受免疫系统的监测和调控^[17]。

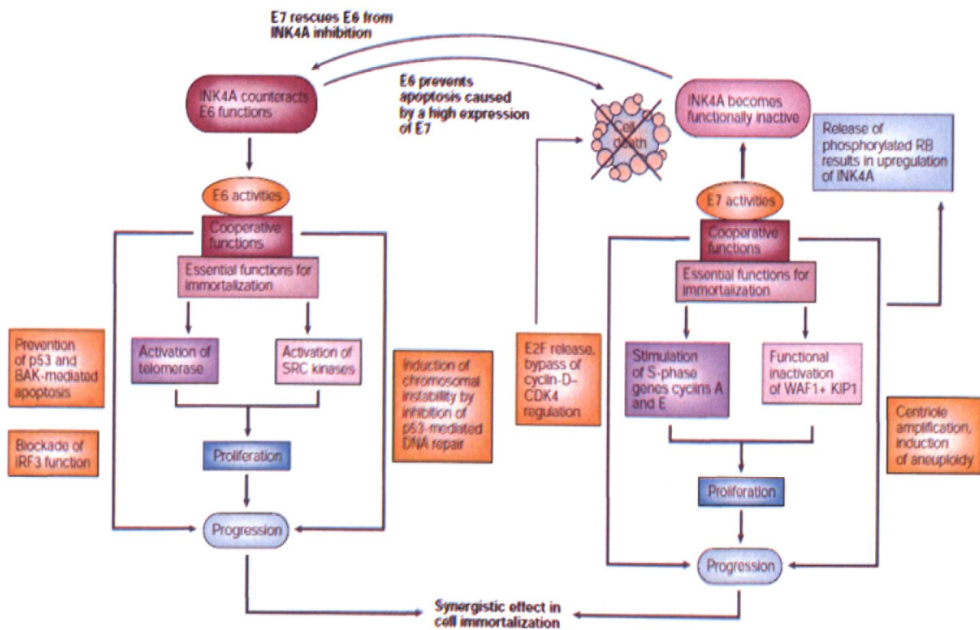


图 2 HPV 的致癌机制

3. 1. 2 晚期编码区 基因为 L1 和 L2，分别编码病毒主要及次要衣壳蛋白^[18]。HPV L1 蛋白为人乳头瘤病毒的主要衣壳蛋白，分子量约 54-58kDa，其五聚体形式即为构成病毒外壳的壳粒。病毒通过 L1 蛋白与宿主细胞表面的 HPV 受体结合^[19]，由此感染细胞。L1 基因在 HPV16 的吸附与进入细胞、引发自然免疫、产生中和抗体等阶段发挥重要作用。在感染初期，HPV16 病毒必须通过主要衣壳蛋白与暴露的基底膜上硫酸乙酰肝素蛋白聚糖（HSPGs）结合，经过一系列蛋白裂解过程，使先前被遮盖的 L1 蛋白结合位点暴露出来，这样才能与移行到基底膜缺口处的上皮细胞表面受体结合，从而进入上皮细胞^[20]。进入细胞的 L1 衣壳蛋白主要被树突状细胞、朗格汉斯细胞等固有免疫细胞识别，并产生初始的自然免疫^[21-22]。L1 蛋白尚有具有自我组装成病毒样颗粒（virus-like particle, VLP）的特性，后者可以激活 T 细胞、B 细胞等

特异性免疫细胞,产生中和抗体^[23]。这种抗体是保护性抗体,并且可在体内形成记忆,在下一次细胞被感染时产生应答,这也是 HPV 预防性疫苗的作用机制^[24]。L2 编码次要衣壳蛋白,恢复病毒基因组的壳体化,并参与病毒 DNA 的核运输。

3.1.3 长调控区 LCR 区内有细胞型特异性增强子(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,影响 E2 的转录,从而调控转化基因 E6 / E7 转录的水平^[25]。

3.2 HPV感染阶段

确定 HPV 是否感染是由 DNA 检测结果判定的,并没有经过病毒分离。生殖道 HPV 感染是主要的性传播的感染之一,但并不是唯一的一个。但实质性性行为不是感染的首要必备条件,病毒可以通过生殖器或者其他粘膜表面的亲密接触而传播^[26]。这些感染非常常见,研究表明,至少有 50%-80% 性生活活跃的成年妇女在某一时期感染过一种或一种以上的生殖道 HPV^[27]。感染的高峰时期是性行为开始后不久^[28],而且随着性伴侣的增多,感染风险会相应的增加^[29]。HPV 感染后首先经过一段潜伏期,由 3-4 周到数月或几年不等,时间的长短极有可能与感染的病毒剂量有关,在这段时期内 HPV 传染性非常高。然后,基于一种至今未明的机制,病毒在体内得以宽容的生长,最终病毒播散并可以检测到病毒 DNA。这段活跃的复制期的长短也存在不同,但是最终绝大多数的感染者能够增强有效免疫反应,使病毒 DNA 转阴,伴随着临床上的疾病状态好转^[30]。少数的患者不能有效地清除病毒,据估计这部分占 12-20%。他们体内的病毒 DNA 持续阳性,处于病毒持续感染状态。就是这样的患者处于病变发展至癌前病变甚至宫颈癌的危险中^[31]。

大部分 HPV 感染为一过性感染,是一个自限性过程,仅少数感染呈持续状态并最终引起宫颈癌的发生。病毒基因的突变与病毒持续感染密切相关,病毒基因突变后可能通过以下因素影响肿瘤的发生: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;影响宿主某些肿瘤相关基因的转录;改变病毒的免疫原性,从而使其逃逸宿主的免疫监视,造成持续感染状态。

4. HPV 多态性

4.1 HPV 多态性与种系发生

70 年代初第一次有证据显示人乳头瘤病毒存在不同的型别,当时取自跖疣疣的纯化的 mRNA 能与取自其他地方的疣的纯化的 DNA 杂交,但是不能与取自自身生殖器的疣杂交。之后的几年里,通过限制性酶切片长度多态性分析,证实了 HPV 的遗传异质性。然后基于 DNA 序列不同的基因和长调控区将 HPV 进行了明确的分型^[32]。

定义新的HPV型的要求,为该病毒基因组中,晚期基因L1基因至少与其它型别有10%的不同。至今已经描述了120多种与人类感染有关的HPV基因型。此外,乳头瘤病毒命名委员会已经决定,当同型不同株HPV基因组的L1基因序列与原型有98%以上相似时,便将其株划分为分子变异体^[32-33]。然而,最近的一项基于对来自不同种系发生分支的12个HPV16型分离株的全基因序列的较的研究表明,有4%的基因、9.9%的氨基酸序列是不同的^[34]。这项研究还发现E4和E5基因比LCR基因更易变,而据报道LCR在分子变异体中的相异程度高达5%^[35]。E5和E2基因的突变中,无义突变比例是最大的。但是,基因序列之间的共突变现象在HPV中表现的非常明显^[36],因此并不能判定无义突变完全没有分子意义。

乳头瘤病毒的进化是值得讨论的,如今,乳头瘤病毒已成为一支独立的分类,与之相对的核酸序列分析说明了它们种系进化中的某些特征^[32]。提起HPV型内核酸多态性,目前国际上研究最多的当属HPV16^[34-36],以及HPV18、45^[37], HPV6、11^[38], HPV5、8^[39],以及近几年的HPV58^[40-41]、31、33、35和HPV52^[42-44]。

90年代初,Ho及其合作者^[35]就发现HPV16分离株可以通过其基因组核苷酸异质性来划分,并且猜测分子变异体的产生经过了相当长的时间跨度。这样,如果将所有的过渡期的基因型都展现出来,就可以重建病毒的种系发生过程。基于这个目的,从五个大洲收集了301个HPV16阳性的宫颈癌样本,将这些样本进行LCR的片段测序,以便重建种系树。经过分析,确定了48个HPV16的分子变异体,其特征是在48个氨基酸位置存在51处点突变。所有的序列都是与原型比对的,这个原型是从一位德国宫颈癌患者组织中分离出的HPV16,这也是第一次进行了全基因测序^[32]的HPV16。但是这个原型并不是HPV病毒的起源,而那个真正的起源现在并不为人所知。

种系发生谱共有五个分支,每个分支的命名反映了它们占优势的地理发源地。其中的两支变种几乎都局限在非洲大陆上,因此命名为非洲1和非洲2型^[35]。含有非洲变种的宫颈癌组织在其他地理位置上出现的频率很低(从0到9%)^[36,45]。第三支变种是在欧洲大陆不同地区检测到的唯一变种,因此命名为欧洲型,在大多数其他地区也可以检测到此型,比率从东南亚的60%到北美的93%^[35]。有意思的是,欧洲型在巴西和阿根廷的上著族群体中竟然有高达80%的流行^[35,46]。第四支变种只由中国和日本分离株构成,因此命名为亚洲型。在其他洲几乎检测不到亚洲型,甚至没有。第五支变种命名为亚洲-美洲型,由亚洲和上著群体中的一小部分和美洲移民分离株构成^[35,46]。这一型只在北美洲,美洲中部,和欧洲的西班牙存在。最近在墨西哥人群中检测到了亚洲-美洲型最高的发生率(88%)^[43]。这些研究表明五大洲的移民情况可以反映在其HPV亚型分布上。

实际上,从巴西南部圣保罗中采集的标本中,我们可以检测到所有地理和种系

相关的种系，这与当地人口中较高的混血相一致^[45]。同样的现象也出现在其他多种族的人群中^[47-48]。此后，人们类似的对其他基因，如E6，L1，L2等进行了测序分析，从而补充完善了种系发生谱^[36]。某些变异遍布全球，这反映了移民；而有些变异因种族不同而表现出隔离现象，这体现了局部的进化。HPV16表现出的这种分布和进化，体现了在好几亿年的时间里，病毒与其天然宿主不断的进行进化。其最早的原始基因组可能发源于非洲，而进化使得HPV16显示出如今的多态性^[37,43]。

4.2 核苷酸多态性与宫颈肿瘤形成的相关性

核酸序列多态性不仅可以分析种系发生，解释全球人群中HPV的分布，而且HPV亚型表现出的多态性可以进行病毒传播的流行病学研究，以及与其持续感染和进展为相关的临床宫颈病变。人们发现在宫颈组织中和生殖道刮片中能够检测到同一种亚型。新加坡的一项研究表明，性伴侣之间的HPV感染型别只有50%是相同的，预示着发生在性生活中的传染具有低感染性^[49]。

在感染HPV的宫颈病变中，往往存在多重感染。在核苷酸水平对HPV分离株的研究可以作为一种方法来区分是持续感染还是由于其他型别的获得性感染。在多重感染标本中，一种主要的变异体可以持续一段时间而其他变异体只是偶尔短暂性的能检测到^[50]。加拿大的数据表明，在感染了人免疫缺陷病毒的妇女中，有8%的比例能检测到持续的HPV16某亚型感染以及超常的其他不同亚型的感染^[51]。然而，也有的前瞻性实验表明，一段时间内，在所有感染HPV16的样本中只能检测到一种亚型^[45]。

HPV病毒基因突变对其生物学行为的影响是值得肯定的。LCR的多态性可能导致多种细胞转录因子结合力的改变，增加或者减少转录因子结合位点，从而直接或间接改变了转录活性。E6、E7的多态性可能导致核酶活性增强，改变细胞内蛋白的结合或者降解，从而改变了细胞内传导通路的活性，并可以诱导并维持转化后的表现型，另外可以逃避宿主的免疫监视。E5的多态性可能导致转录活性的改变。E2的多态性可能导致转录活性的改变，使其易于降解，并增加了复制的效率。L1的多态性会影响L1构象依赖的多肽的合成，而这个多肽是与病毒的抗体中和作用有密切关系的。

虽然基因多态性改变了病毒的生物学行为，但其是否对宫颈病变发生发展起到一定作用尚没有定论。世界范围内已经开展了多项前瞻性研究和病例对照研究，以便能够分析在基因多态性在持续的HPV病毒感染和宫颈病变的发展之间是否有些许可能增加其风险的联系。但是由于样本量的限制，至今仍没有得出统一的结论。目前国内外关于HPV病毒基因突变的研究主要集中在HPV16/18的E6、E7、L1和L2基因。

在北美进行的研究显示，HPV16非欧洲型有增加上皮内瘤变的风险^[49]，而欧洲型

与生殖器原位癌的风险有关^[52]。在巴西圣保罗进行的队列研究中,显示HPV16/18非欧洲型与病毒持续感染及宫颈病变发展有较高的流行病学联系^[45]。在对哥斯达黎加和墨西哥人群的病例对照研究表明,宫颈癌样本与正常宫颈细胞样本相对比,亚洲-美洲型的检出率较高^[47-48]。

在欧洲型占主导地位的欧洲,可以检测到T350G的E6突变,突变导致病毒83位氨基酸由缬氨酸转变为亮氨酸。这也是已报道的E6突变发生频率最高的^[54-58]。这一突变位点在亚洲-美洲型也存在,但不存在于非洲型^[41]。其在全球各宫颈癌高发区的分布不同,如在墨西哥HPV16 E6基因L83V突变株在浸润性宫颈癌中占93.5%,在北美洲为40%,在日本为28%,在东南亚仅为6%。英国一项研究表明,350G突变与病毒持续感染及宫颈病变由初级向CINII/III转变有关^[53]。然这种流行病学结论在其他试验中并没有证实,关于此的数据也仍存在冲突^[36, 61-65]。而且在瑞典,发现L83V与浸润性宫颈癌有关^[57,58],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^[59-60]。另一个常见突变是E6 D25E,其在日本以及多个亚洲国家可以广泛检测到,但几乎没有在西方国家发现过。在日本,研究发现D25E与浸润性宫颈癌有相关性,而与HPV16原型相比,感染此变异型的宫颈组织不容易由癌前病变恢复到正常组织^[66]。而在韩国,D25E是突变频率最高的型别,但其与宫颈癌的发生发展没有相关性^[61]。

泰国妇女中,某个E7突变与E6 D25E突变密切相关,使得E7第29氨基酸由asp变为ser^[64]。E7 N29S和E6 L83V存在变异共存现象。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。因此,E7 N29S突变在宫颈癌样本中有较高的频率^[67]。Chan等研究了中国香港地区220例HPV58阳性标本中的E6变异,发现变异频率最高的位点为A388C(K93N),与宫颈病变严重程度呈负相关;最多见的E7变异为C632T(T201)和G760A(G63S),其发生能够促进宫颈病变的发生发展,并导致CIN3或浸润性宫颈癌的发病年龄提前^[68]。国内吴玉萍等检测了我国南昌和珠海地区223例宫颈癌组织中HPV16 E6和E7基因变异,亦发现发生率最高的E6和E7基因突变分别为D25E和N29S^[69],但并没有发现基因变异与宫颈病变发生发展有明确相关性。

LCR区内有细胞型特异性增强子(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转录的水平。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结合区发生突变(如C7450T)可以通过下调E2的表达促进宫颈癌的发生。

尽管L1基因相对保守,但现有研究证实,不同地域间HPV16 L1基因存在变异。

Ortiz 等人报道了西班牙人群宫颈癌组织 L1 基因有 8 处突变,其中有义突变在 6695 处氨基酸有 T→P^[70]。印度宫颈病变组织中,L1 主要突变位点为 C6240G,6901insATC , 6950delGAT, C5562G, C5682T, C6163A, A6178C, A6693 和 G7058T^[71]。与之相对比的是, Pande 等人研究了印度北部地区宫颈癌组织,发现了 13 处变异,其中包括 4 处新变异。错义突变共有 5 处,突变频率最高的为之前并没有检测到的 A6695C^[72]。巴西的研究发现 7 处主要变异位点 (A6695C, G6721A, A6803T, C6854T, C6865T, C6970T, G6994A)^[73]。希腊学者检测到的主要突变位点包括 A6694C, A6695C, A6803T, T6824C, T6824G 和 C6888T^[74]。而 L1 基因在加拿大的主要突变位点为 6240 和 6432^[75]。

对 L1 基因多态性课题在国内也有部分研究结果。新疆南部地区宫颈癌组织 L1 基因有多处突变位点,其中 6240, 6432, 6901-6902 及 6951-6953 都是高频突变位点,并在此基础上形成 6 中核苷酸突变模式,4 种氨基酸突变模式^[76]。安静等^[77]的研究也支持 6240 位是一个突变热点,该位核苷酸由 C→G,氨基酸由 His 突变为 Asp,使 L1 的自组装效率大大增加。成渝地区^[78]研究发现有七处点突变,一处插入突变和一处缺失突变。扬州地方株与德国标准株在核苷酸序列上又 7 处不同,其中 4 处由于核苷酸的改变其编码的氨基酸也相应发生变化,分别为 6240, 6432, 6903-6905, 6954-6956。而且扬州地方株与中国株之间也存在核苷酸的不同^[79]。温州地方株在 8 个位点发生突变,其中 6432 位的突变是主流型。虽然氨基酸有相应改变,但其编码蛋白在亲水性、表面可及性及抗原性上与标准株相比较无明显变化^[80]。广东分离株 HPV L1 基因序列与德国标准株相比有 16 处不同,其编码的氨基酸序列有 8 处发生改变;与中国株比较有 9 处不同,氨基酸序列有 4 处改变;突变位点为 5649, 5652, 5654, 5657, 5692, 5693^[81]。从珠海和南昌采集的宫颈标本中,检测到突变位点为 T6687G, A6717G, A6692C, A6902G 和 A6693C^[69]。而中国东北各城市的研究表明当地 L1 基因主要突变位点为 A5883C, G6085A, A6164G, A6180C, C6938G 和 A7142C^[82]。由此可见,L1 基因多态性具有明显的地区差异,但是,目前仍然缺乏关于 L1 基因的多态性与宫颈癌发展的相关程度上的研究。

对其他型别 HPV 基因多态性研究较少,但也存在矛盾的结论。HPV18 E2 基因核苷酸多态性提示存在一种致癌潜能降低的亚型^[83]。然而,其他对 LCR、E2、E6/E7 基因多态性的研究并没有发现 HPV18 型基因变异与宫颈病变程度有相关性^[84-85]。北美和墨西哥 HPV18 阳性标本中发现的变异表明,宫颈病变组织学类型和特定基因变异有关。HPV16/18 非欧洲型的变异在腺癌中更常见^[47,86]。激素水平的变化也许可以解释这种现象^[33]。HPV33, 35, 52 及 58 型中,均没有发现基因多态性与病毒感染持续性 & 宫颈病变程度的相关性。

综合上述结论,在流行病学意义上,HPV16,18以及其他型别基因多态性所表现出的致癌潜能各不相同,不论在种族还是地区上均如此。Hildesheim及其合作者们^[48]在对HPV16欧洲型和非欧洲型变异研究中,没有发现种族特异性,认为非欧洲型增加宫颈癌患病风险。而另一方面,非白种人较白种人感染HPV16后更容易变异^[49]。HPV52的样本研究显示,白种人较容易感染原型病毒,而不是变异体病毒。而具有非洲血统的女性,则较容易感染变异体病毒^[42]。HPV52病毒原型是从一名美国女性活检组织中检测到的。关于HPV31,33和35原型或变异体的种族感染关系也有相关报道^[44]。然而,包括Hildesheim在内的所有此类研究,均是以皮肤颜色作为种族划分标准,但这并不是决定个体间基因相关性的理想标准。仍需要进行更进一步的研究,以便确定或排除种族和病毒多态性之间的关联。即便检测到明确的病毒变异在种族中分布的特异性,这种不同分布也可以解释为由于人群中人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)的多态性造成。HLA等位基因与种族的相关性已被广泛证明,这种相关性可能促进或者削弱某种HPV分子变异体的感染性。

4.3 基因多态性与免疫反应

在HPV感染时最有效的免疫反应是细胞免疫,T淋巴细胞对HPV病毒多肽的识别是控制感染和宫颈损伤发展的关键因素。因此,病毒多肽对T细胞的暴露程度是由两方面影响的,HPV病毒和宿主的HLA。

在美国新墨西哥州,对于那些基因型为HLA DRB1*1501/DQB1*0602而又感染了HPV16病毒的妇女,其病变发展成宫颈癌的危险性将大大增加。然而,在挪威,使危险性加大的是HLA DRB1*0301的基因型^[87]。在基因型为HLA DR/DQ 0401/0301和0101/0301的妇女中可以检测到更高频率的HPV16型E2的变异亚型^[85]。进一步的研究表明,在日本,由HPV16型E6原型感染的妇女,其DRB1*1501和DQB1*0602都有显著性的升高,而由D25E亚型感染的妇女DRB1*1502则更为常见^[88]。另外的研究表明,G131E6亚型与HLA-B7基因型的不良预后有密切的关系。计算机模型显示E6基因的变异改变了HLA-B7结合肽,使得细胞毒性T细胞的免疫反应受到影响。而且,这种相关性并没有得到进一步的实验证明^[89]。另有一些实验观察到HLA基因型与HPV多态性没有关系。这些实验的数据有些是相互冲突的,这说明除了HLA多态性之外还有其他因素可能与宫颈癌进展中的病毒基因变异有关。最终揭示HLA在HPV引起的宫颈病变中的作用及其多态性的关系仍然需要大规模的流行病学研究。

参考文献

- [1]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, 1997:306-308.
- [2]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, 2002,24:50-52.
- [3]李降玉, 李诚信等. 宫颈疾病的预防及普查. 中国实用妇科与产科杂志, 2003,19:151-153.
- [4]Marc S, Eliane DF. Human papillomavirus infection epidemiology and pathophysiology. Gynecol Oncol, 2007,107: S2-S5.
- [5]Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1:Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003,31:3-13.
- [6]Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. Acta Cytol, 1976, 20: 505-509.
- [7]Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. Acta Cytol, 1977, 21: 379-390.
- [8]Gissmann L, zur HH. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). Int J Cancer 1980, 25: 605-609.
- [9]Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. J Virol 1982, 44: 393-400.
- [10]Durst M, Gissmann L, Ikenberg H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci U S A 1983, 80: 3812-3815.
- [11]Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J 1984, 3: 1151-1157.
- [12]Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB. HPV in the etiology of human cancer. Vaccine 2006, 24: 391-310.

- [13]Mattson MP, Cheng B, Burke RE, et al. Growth factor protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *J Stroke*,1993,24:136-138.
- [14]Demeret C, Gareia-Carranca A, Thierry F, *et al.* Transcription independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *J Oncogene*, 2003, 22: 168-175.
- [15]Wsierska GJ, Horky M. How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its reactivation. *Ann N Y Acad Sci*, 2003,10:266-272.
- [16]Boulet G, Horvath C, Broeck DV, et. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J B C* ,2007,39:2006-2011.
- [17]徐铃.人乳头瘤病毒 E5 基因. 国外医学分子生物学分册.1998,20:52-54.
- [18]Feng YQ, Yan XJ, Su CZ. Cloning and sequence analysis of L1 major capsid protein gene of human papillomavirus type 11. *J Fourth Mil Med Univ*,2001,22:493-496.
- [19]黄婴, 吴令英. 人乳头瘤病毒变异株与宫颈疾病. *癌症进展杂志*, 2006,4:136-142.
- [20]Johnson KM, Kines RC, Roberts JN. Role of heparin sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol*, 2009,83:2067-2074.
- [21]Lenz P, Day PM, Pang YY, et al. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol*,2001,166:5346-5355.
- [22]Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. *Cancer Res* ,2003,63:3478-3482.
- [23]Da Silva DM, Velders MP, Nieland JD. Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *Int Immunol* ,2001,13:633-641.
- [24]McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Path*,2001,82:15-33.
- [25]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.

100:372-378.

[26]Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 2006, 24: 42-51.

[27]Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 2006, 24:42-51.

[28]Peto J, Gilham C, Deacon J, et al. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br J Cancer*, 2004, 91: 942-953.

[29]Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*, 1997, 102: 3-8.

[30]Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 2006, 24 : 16-22.

[31]Woo YL, van den HM, Sterling JC, et al. A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer*, 2010, 126: 133-141.

[32]de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004, 324:17-27.

[33]Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther*, 2002, 7: 219-237.

[34]Chen Z, Terai M, Fu L. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol*, 2005, 79: 7014-7023.

[35]Ho L, Chan SY, Burk RD. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*, 1993,67:6413-6423.

[36]Yamada T, Manos MM, Peto J. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997, 71: 2463-2472.

[37]Ong CK, Chan SY, Campo MS, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*, 1993, 67:6424-6431.

- [38]Heinzel PA, Chan SY, Ho L, et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol*,1995, 33:1746-1754.
- [39]Deau MC, Favre M, Orth G. Genetic heterogeneity among human papillomaviruses (HPV) associated with epidermodysplasia verruciformis: evidence for multiple allelic forms of HPV5 and HPV8 E6 genes. *Virology*, 1991,184: 492-503.
- [40]Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94: 1249-1253.
- [41]Prado JC, Calleja-Macias IE, Bernard HU, et al. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology*,2005, 340: 95-104.
- [42]Aho J, Hankins C, Tremblay C, et al. Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J Infect Dis*, 2004, 190: 46-52.
- [43]Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, et al. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*, 2004, 319: 315-323.
- [44]Gagnon S, Hankins C, Tremblay C. Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect Dis*, 2004, 190: 1575-1585.
- [45]Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2959-2968.
- [46]Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, et al. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aborigines from Argentina. *J Med Virol*, 2003, 69: 546-552.
- [47]Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 1325-1330.
- [48]Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 315-318.
- [49]Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus

type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11: 343-351.

[50]Xi LF, Demers W, Koutsky LA. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. *J Infect Dis*, 1995, 172: 747-755.

[51]Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, 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: 3388-3393.

[52]Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, et al. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res*, 1998, 58: 3839-3844.

[53]Londesborough P, Ho L, Terry G. 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.

[54]Zur HH. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:690-698.

[55]Nead MA, Mc Cance DJ. Activitie of the Transforming proteins of human papillomaviruse. *J Human Tumor Viruses*, 1998, 5: 225-251.

[56]Laimins LA. Regulation of transcription and replication by human papillomavirus. *J Human Tumor Viruses*, 1998, 4: 201-223.

[57]Blachon S, Demeret C. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are proapoptotic. *J Biochimie*, 2003, 85: 813-819.

[58]Pang T, Hu X, Mazurenko N. Multiple variants of HPV16 E6 gene in cervical invasive squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 2002, 22: 1011-1016.

[59]Sathish N, Abraham P, Peedicayil A. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia. *Cancer Lett*, 2005, 229: 93-99.

[60]Tomesello ML, Duraturo ML, Salatiello I. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol*,

2004,74:117-126.

[61]Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, 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.

[62]Kang S, Jeon YT, Kim JW, et al. Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical tissues of Korean women. *Int J Gynecol Cancer*, 2005,15: 107-112.

[63]Nindl I, Rindfleisch K, Teller K. Cervical cancer, HPV 16 E6, variant genotypes, and serology. *Lancet*, 1999, 353: 152.

[64]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.

[65]Zehbe I, Voglino G, Delius H. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*, 1998, 352: 1441-1442.

[66]Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett*, 2000, 156: 159-165.

[67]Song YS, Kee SH, Kim JW, et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol*. 1997, 66: 275-281.

[68]Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer*, 2001, 94:711-716.

[69]Wu Y, Chen Y, Li L. 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.

[70]Ortiz M, Torres M, Munoz L, et al. Oncogenic Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution and HPV Type 16 E6 Variants in Two Spanish Population Groups with Different Levels of HPV Infection Risk. *J Clin Microbiol*. 2006,44:1428-1434.

[71]Pillai MR, Hariharan R, Janki MB. Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer

in Indian population. *Int J Cancer*, 2009, 125:91-103.

[72]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 Clin Microbiol*, 2008, 46:1060-1066.

[73]Marcio RC, Daniela MC, Waldenor BC. Prevalence of Human Papillomavirus Type 16 Variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004, 99:281-282.

[74]Chara KN, Christine K, Aikaterini C. Genetic Variability and Phylogeny of High Risk HPV Type 16, 18, 31, 33 and 45 L1 Gene in Greek Women. *Int. J. Mol. Sci*, 2012, 13:1-17.

[75]K. Lee, I. Magalhaes, C. Clavel. Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Research*, 2008, 131:106-110.

[76]马正海, 张富春, 梅新娣等. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型 L1 基因突变谱分析. *中华医学杂志*, 2004, 84:987-991.

[77]安静, 余黎, 席亮等. 人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白的克隆及表达. *微生物免疫学进展*, 2007, 35:26-29.

[78]陈良, 丁显平, 朱一剑等. 成渝两地宫颈癌患者中人乳头瘤病毒 16 亚型 L1、E6 和 E7 基因的分离克隆和序列分析. 2010, 31:217-219.

[79]高慧, 黄正芳, 徐向明等. 扬州地方株 HPV16 L1 基因的克隆及序列分析. *东南大学学报*, 2005, 24:17-20.

[80]陈俊, 董海艳, 朱珊丽等. 温州地方株 HPV16 型 L1 基因多态性及蛋白特性分析. *温州医学院学报*, 2009, 39:538-545.

[81]刘红, 宇丽等. 广东地区 HPV16 型 L1 基因的序列分析及其毕赤酵母表达载体的构建. *暨南大学学报*, 2008, 29:115-120.

[82]Qinglong Shang, Yan Wang, Yong Fang. Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Identification of Cervical Carcinomas in Patients in Northeast China. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49:2656-2663.

[83]Hecht JL, Kadish AS, Jiang G. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2

gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer*, 1995, 60: 369-376.

[84]Rose B, Steger G, Dong XP, et al. Point mutations in SPI motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen Virol*, 1998, 79: 1659-1663.

[85]Terry G, Ho L, Cuzick J. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *Int J Cancer*, 1997, 73: 651-655.

[86]Burk RD, Teraï M, Gravitt PE, et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res*, 2003, 63: 7215-7220.

[87]Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res*, 2002, 89: 229-240.

[88]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. *Int J Cancer*, 2003, 106: 919-922.

[89]Etherington IJ, Ellis JR, Luesley DM. Histologic and immunologic associations of an HPV16 variant in LSIL smears. *Gynecol Oncol*, 1999, 72: 56-59.

攻读学位期间的研究成果

1. 孙欣, 王言奎, 刘佳. 青岛地区宫颈病变组织中人乳头瘤病毒 16 型 L1 基因多态性分析. 2012, 已排版待发表.

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

三年研究生时光，弹指一挥间，如白驹过隙，还未及细想，已近毕业。遥想 8 年前，刚刚步入医学殿堂的我们犹带青涩的面庞，医学生誓言仍回响耳畔。时间在课堂上老师讲解生化反应生理过程解剖结构中流淌，在实验室里消化组织提取核酸扩增基因中消逝，在医院里敲打的病历锋利的手术刀上飞驰……我们的面庞已不再青涩，但是目光依旧坚定，坚定地面对医学道路上的挫折坎坷；我们的思想已不再幼稚，但是心态依旧潇洒，潇洒地面对临床医疗中的残酷淡漠。借此毕业之际，对在三年研究生生涯中给我帮助的所有老师、朋友，献上我最真挚的感谢。

感谢我尊敬的导师王言奎教授，以其渊博的学识和独有的人格魅力，培养我高尚的医德，教授广博的医学知识，端正严谨的做学问态度，训练扎实的临床基本功，提高灵巧的手术操作技巧……虽然现在的我离老师的要求远不及万一，但是这些已经沉淀成为我为之不懈奋斗的目标。感谢车艳辞老师、牛兆园老师、张磊老师、田甜老师、王宁老师、于风胜老师、栾笑天师姐、李明霞师姐、殷广洁师姐，感谢全体妇产科老师在我临床实习中给予的帮助和关怀。

感谢罗兵老师，在实验和论文撰写中给予我的悉心指导；感谢刘老师，在标本收集中提供的无私帮助；感谢同窗刘佳，在实验的瓶颈和困难面前给我鼓励，与我携手共同渡过。

毕业是学生生活的终结，更是工作生涯的开始。医疗工作是严肃、严谨的，“健康所系、性命相托”的事业，需要“博学笃志、明德求真、守正出奇”的作风，需要“衣带渐宽终不悔，为伊消得人憔悴”的态度，更需要“长叹息以掩涕兮，哀民生之多艰”的胸襟。“路漫漫其修远兮，吾将上下而求索”。

青岛地区宫颈病变组织中人乳头瘤病毒16型L1基因多态性分
析

作者：[孙欣](#)
学位授予单位：[青岛大学](#)



引用本文格式：[孙欣](#) [青岛地区宫颈病变组织中人乳头瘤病毒16型L1基因多态性分析](#)[学位论文]硕士 2012