

四川大学

硕士学位论文

题 目 人乳头瘤病毒的基因分型及 HPV16 亚型 L1、E6
和 E7 基因的克隆和序列分析

作 者 朱一剑 完成日期 2007 年 4 月

培养单位 四川大学

指导教师 丁显平 教授

专 业 遗传学

研究方向 医学遗传与分子生物学

授予学位日期 年 月 日

声 明

本人声明所呈交的学位论文记述了本人在丁显平老师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，本论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得四川大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与和我一起工作的老师和同学对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本学位论文成果是本人在四川大学读书期间在丁显平老师指导下取得的，本论文成果归四川大学所有，特此声明。

本人签字：朱一全

导师签字：[Signature]

2007 年 4 月

人乳头瘤病毒的基因分型及 HPV16 亚型 L1、E6 和 E7 基因的克隆和序列分析

专业：遗传学

研究生：朱一剑

指导教师：丁显平 教授

摘要

背景

人乳头瘤病毒是一类特异感染人皮肤、粘膜的双链环状 DNA 病毒,属乳多空病毒科多瘤病毒亚科,其分子量大约为 8000bp。目前已有 100 多种 HPV 亚型被鉴定,其中约 40 余种与人类生殖器皮肤黏膜病变有关。根据其对于生殖系统的致癌性,可将其分为低危型和高危型,前者包括 HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 等,以 HPV6,11 最为常见,主要引起尖锐湿疣等良性病变;后者包括 HPV16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,72,82 等,其中以 HPV16,18 最为常见,常引起恶性病变,如宫颈癌^[2]。由于 HPV 的致病性与其亚型密切相关,所以对其进行检测和分型对于临床诊断具有重要意义。

另外,对 HPV16 亚型 HPV 病毒 E6, E7, L1 基因突变的研究表明特定位点的突变会使病毒更易诱导产生癌变及增大再次感染或从宿主免疫系统逃逸的机会。如 HPV16 型 E6 蛋白 83 位的亮氨酸残基变为缬氨酸(碱基突变 T350G)的突变株在瑞典妇女宫颈癌组织中出现的比例远大于野生型,一些研究认为在部分人群中,该突变与组织癌变进程相关。不同的变异导致的氨基酸的变化可影响宿主对病毒的免疫应答,进而与细胞恶性转化的危险性相关。因此对宫颈癌组织中 HPV16 亚型基因组突变的研究对宫颈癌疫苗研制策略及 HPV 致癌机理的研究 also 具有重要意义。

目的

1. 探讨各种妇科疾病与人乳头瘤病毒感染的关系,建立不同妇科疾病和不同年龄段妇女人乳头瘤病毒感染的流行病学资料库。
2. 了解中国西南地区 HPV16 亚型基因的一级结构特点,为临床诊断、治疗由 HPV16 亚型感染引起的疾病特别是宫颈癌提供理论依据。

方法

1. 应用反向点杂交技术分别对疾病组 1512 例病人标本和正常组 500 例标本进行 HPV 检测, 所得数据用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。

2. 收集宫颈癌组织标本, 针对 HPV16 亚型分别设计 L1、E6 和 E7 基因特异性引物, 用 PCR 方法从宫颈癌组织中获得各基因的全长序列, 并构建克隆载体 pMD18-T, 进行序列分析, 同时分别以 L1、E6 和 E7 基因序列进行进化分析。

结果

1. 正常组 500 例标本中, 阳性标本 101 例, 感染率为 20.2%; 疾病组 1512 例标本中, 阳性标本 523 例, 感染率为 34.6%, 其中双重感染 82 例, 占阳性标本的 15.7%, 多重感染 34 例, 占阳性标本的 6.5%, 而高危感染 340 例, 感染率为 22.5%, 占阳性标本的 65.0%, 其中单纯 HPV16 亚型感染 155 例, 占有阳性标本的 29.6%; 不同年龄段、不同性生活史、不同妇科疾病以及不同首次性生活年龄的 HPV 感染检出率都有显著性差异。

2. 与德国标准株相比, 四个标本中总共发现 20 个突变位点, 其中 8 个为四个标本所共有: 131(G-A) (Gly-Arg)、178(T-G) (Asp-Glu)、350(G-T) (Val-Leu)、647(A-G) (Asn-Asp)、846(T-C) (同义突变)、L1 基因第 966 (C-T) (同义突变)、L1 基因第 1302(C-T) (同义突变) 和 L1 基因第 1434(A-G) (同义突变)。

结论

1. 正常组和疾病组的 HPV 感染率有显著性差异($\chi^2=36.37, P<0.01$)。在 HPV 感染的普查当中可以有重点的选择高危人群, 这样更加有针对性, 从而大大降低普查成本。

2. 在所检测的 23 种亚型种, 高危型 HPV16 亚型所占比例最高, 提示我们 HPV16 亚型对于宫颈疾病的发生具有重要的作用, 需要我们对它进行深入的研究。

3. 与标准序列比较, 中国成渝地区 HPV16 亚型 L1、E6 和 E7 基因存在一定范围的变异, 提示我们, 在预防治疗成渝地区妇女宫颈癌病人以及研制开发针对成渝地区预防宫颈癌的 HPV 疫苗时, 需要注意这些位点的变异, 特别是一些引起氨基酸变异的位点。

关键词: 人类乳头瘤病毒, 反向点杂交, 分子流行病学, 宫颈癌, 序列分析

Genotyping of Human papillomavirus in clinical samples and Cloning and Sequence-analyzing of HPV16 Type L1、E6 and E7 Gene

Major: Genetics

Student: Zhu Yijian

Tutor: Prof. Ding Xianping

Abstract

Background Human papillomaviruses (HPVs) are DNA viruses with a genome size of about 8000 base-pairs. There are more than 100 HPV types defined on the basis of DNA homology, of which more than 40 infect the anogenital tract[2]. Genital HPV types are typically divided into two groups according to their presumed oncogenic potential. HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59 and 68 are considered to be of high oncogenic risk. The remaining genital types - types 6, 11, 42, 43 and44 - are considered of low or no oncogenic risk. Subclinical and clinical genital warts, also known as condylomata acuminata, and virtually all squamous cell cancers of the anogenital tract are caused by specific HPV types. More than 20 types of human papillomavirus, especially HPV type 16 and 18, have been associated with cervical cancer, the second cause of cancer related mortality in women globally. The advent of molecular biology tools in HPV diagnosis has allowed us to identify HPV infection, differentiate HPV types, and discriminate groups of the population with different risks of infection.

Objective

1. To obtain the epidemiological data of Human papillomaviruses infection among women with different ages and gynecologic disease.
2. To obtain the structure of the E6、E7 oncogene the and the major capsid protein L1 gene of human papillomavirus type 16 for the exploring of the clinical analysis and treatment of HPV infection.

Methods

1. Specimens(normal group and abnormal group) from women who wanted to do HPV detection were detected with the assay of reverse dot blot. The data was analyzed with the statistical software SPSS13.0.

2. E6、E7 and L1 gene were amplified from human cervical carcinoma by PCR.The products of PCR were ligated into pMD18-T Vector and used to transform *E.coli* DH5 α . At last, the sequence of the insert was determined by an automated DNA sequencer.

Results

1. For the normal group,20.2%(101/500) specimens were detected positive for HPV infection.1512 women were included in the abnormal group and 523(34.6%) specimens were detected positive for HPV DNA, including 407(77.8%) one-type infection, 82(15.7%) duplex infection and 34(6.5%) multiple infection. Of 523 positive specimen, 340(65.0%) were high-risk HPV infection, including 155(45.6%) HPV 16 type. The difference between the HPV infection of normal group and abnormal group was significant($\chi^2=36.37$, $P<0.01$). And there was significant difference of HPV infection among women with different ages, sexual history, gynecologic diseases and the ages of first sex behavior.

2. Compared with the European-Germany131, 20 mutations were detected, of which 8 mutations were detected from all the 4 biopsies: 131(G-A)(Gly-Arg), 178(T -G) (Asp-Glu), 350(G-T)(Val-Leu), 647(A-G)(Asn-Asp), 846(T-C)(synonymous mutation) , L1 966th (C-T) (synonymous mutation), L1 1302nd(C-T) (synonymous mutation) and L1 1434th(A-G) (synonymous mutation).

Conclusions

1. In the screening of HPV infection, we can select the high-risk population so as to decrease the cost of screening.

2. Among the 23 HPV types, HPV16 type was the most prevalent, which suggested that HPV 16 type played an important role in the progression of cervical diseases and we should pay a lot attention to the research of the virus.

3. Compared with other HPV16 reference sequence, nucleotide sequencing analysis of the HPV16 E6, E7 and L1 gene from Cervical Carcinoma Biopsis in

Chengdu city and Chongqing of China consistently shows point mutations, including synonymous mutation and nonsynonymous mutation. This research will be helpful in preventing cervical cancer and designing vaccines which is specific for the women in the two regions of China.

Key Words Human Papillomaviruses, reverse blot hybridization, molecular epidemiology, cervical cancer, sequence analysis

前言

人乳头瘤病毒 (Human Papillomaviruses, HPV) 属乳头瘤多空病毒科乳头瘤病毒属, 人是其唯一宿主, 皮肤、黏膜上皮为 HPV 的易感部位。HPV 基因组编码 8 个参与病毒侵染、繁殖复制和包装的功能蛋白, 有 8 个开放式阅读框(图 2)^[1]。含 ORF 的编码 DNA 链, 按功能可分为三个结构域, 早期蛋白编码区(Early region, ER)、晚期蛋白编码区(Late Region, LR)和上游调控区(Upstream Regulatory Region, URR), E 区分为 E1-E7 开放阅读框架, 主要编码与病毒复制、转录、调控和细胞转化有关的蛋白。L 区分 L1 和 L2, 分别编码主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白。URR 位于 E 区与 L 区之间, 长约 1kb, 含有病毒基因组 DNA 的复制起点和基因表达所必须的调控元件^[2]。

根据 HPV 基因的序列变异可将其分为多种亚型, 目前确定的 HPV 型别约有 100 余种, 其中有约 40 种可以感染人的生殖器官。在我国由 HPV 感染引起的尖锐湿疣居性传播性疾病的第二位, 发病年龄以 20-34 岁为最多, 宫颈尖锐湿疣在性活跃的妇女中高度流行^[3,4]。研究还发现, 在宫颈癌、宫颈原位癌、阴茎癌、外阴癌、肛周癌、喉乳头瘤等肿瘤组织中均可检出 HPV-DNA, 大约有 99.7% 的宫颈癌和 HPV 感染有关, 其中 HPV16 型感染率最高, 约 50% 的宫颈癌患者肿瘤组织的 DNA 为 HPV16 型。因 HPV 感染性疾病是难治性、复发性、具有潜在致癌性的疾病, 逐渐引起人们的重视。而研制有效的 HPV 疫苗, 预防 HPV 感染和进行免疫治疗已成为国内外学者研究的热点。但是, HPV16 亚型的基因序列又具有一定的地域性, 不同大洲、不同国家甚至是一个国家的不同地区都存在一定的变异株^[5]。对 HPV16 亚型 HPV 病毒 E6, E7, L1 基因突变的研究表明特定位点的突变会使病毒更易诱导产生癌变及增大再次感染或从宿主免疫系统逃逸的机会。如 HPV16 型 E6 蛋白 83 位的亮氨酸残基变为缬氨酸(碱基突变 T350G)的突变株在瑞典妇女宫颈癌组织中出现比例远大于野生型, 一些研究认为在部分人群中, 该突变与组织癌变进程相关。不同的变异导致的氨基酸的变化可影响宿主对病毒的免疫应答, 进而与细胞恶性转化的危险性相关。因此对宫颈癌组织中 HPV16 亚型基因组突变的研究对宫颈癌疫苗研制策略及 HPV 致癌机理的研究也具有重要意义^[6,7]。

本论文针对西南地区 HPV16 亚型的主要基因进行克隆和多态性分析,

为其相应蛋白表达的后续工作奠定坚实基础，并为进一步应用到临床判断 HPV 感染患者预后以及开发出具有预防功能的生物制剂和疫苗都具有广阔的前景和重大意义。

第一部分 临床标本中人乳头瘤病毒的基因分型

1 材料

1.1 样本采集

样本主要通过四川省生殖健康研究中心附属医院、阳光妇科医院、成都康桥医院和成都市锦江区妇幼保健院医师合作协议采集,采集对象为随机前来医院妇产科门诊就诊的成年女性患者。从2005年4月到2006年6月的期间,由以上三家医院妇产科提供标本2012例。实验分为两组,即疾病组和正常组。疾病组(1512例)标本采纳标准为:患有一种或几种宫颈疾患,病人没有作过宫颈切除手术,在采集标本时没有怀孕,不处于月经期。对疾病组的每一个病人做详细的信息调查,包括病人的年龄、职业、怀孕次数、首次性生活年龄、文化程度以及婚姻状况,同时登记病人的具体妇科疾病症状。正常组(500例)标本采纳标准:主要是正常体检人员,临床上没有任何妇科疾病症状,没有作过宫颈切除手术,在采集标本时没有怀孕,不处于月经期。细胞学异常样本的采集过程主要包括:1)用宫颈取样专用宫颈刷采集患者宫颈脱落细胞样本,2)将宫颈细胞样本涂片进行细胞学形态镜检,3)对镜检发现细胞学异常的患者进行阴道镜检查并做出初步诊断,4)对部分阴道镜检查者取宫颈组织活检样品做进一步的组织病理诊断。全部样本采集前均由医师征得了患者的知情同意并承诺保护患者隐私权,样本采集后隔离保存于宫颈脱落细胞收集管中(试剂盒提供),并尽可能于样本到达后的当天进行DNA分离处理,少数当日来不及处理的样品置于 -20°C 冰箱中保存直至第二天处理。

1.2 仪器和试剂

FYY-3 型分子杂交仪	兴化市分析仪器厂
PCR扩增仪	中国杭州朗基有限公司
HPV DNA 分型基因芯片检测的 DNA 抽提试剂盒	亚能生物技术有限公司
基因芯片检测用 UNG 酶	同上
基因芯片检测 GP-PCR 生物素标记引物	同上
基因芯片检测 RDBH 探针	同上
其他试剂为国产分析纯	

表1-1 亚能基因芯片检测试剂盒组成（50人份）

	组成成分	数量	组成成分	数量
试剂盒 I（-20℃保存）	PCR Mix	50 管		
	膜条	50 张	裂解液	50 人份
试剂盒 II（℃保存）	POD 母液	1 管 (100μL)	无菌纯水	1 管
	TMB	1 瓶 (2mg/mL)	矿物油	1 管 (20mL)

2 实验原理

采用反向膜杂交技术，针对 HPV L1 基因设计 23 种 HPV 亚型的特异性探针，并固定在固相支持物（硝酸纤维素膜）上，然后以一对标记了生物素的通用引物扩增该区段序列，其 PCR 产物与膜条进行杂交，再通过过氧化物同工酶（POD）的信号放大作用即可进行检测。详见下图

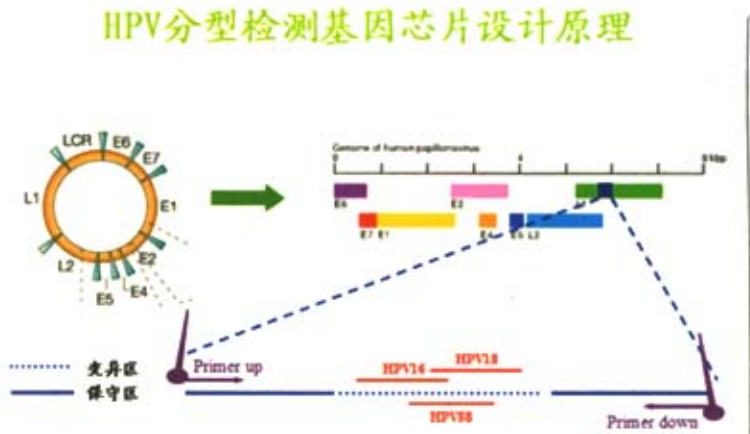


图1 HPV分型检测基因芯片设计原理

、Figure 1 The design principle of HPV gene chip

3 实验方法

3.1 临床样品HPV DNA获取和处理。

3.1.1 临床样本获取

宫颈表皮脱落细胞及活检组织(用棉拭子或宫颈脱落细胞采集器取得)。于女性宫颈口使用宫颈脱落细胞采集器采样,用宫颈刷紧贴宫颈口,转动两周,取得脱落细胞,将刷子从刻痕处折断,放入装有洗脱液的套管中保存。对于生殖器或肛周疣体增生(怀疑为尖锐湿疣)患者,采集疣体表皮脱落细胞。用生理盐水浸润棉拭子,用力来回擦拭疣状组织表面几次,取得脱落细胞。对其他可疑感染者则采集女性宫颈口。将取样后的棉拭子放入备有1mL无菌生理盐水的试管中,充分漂洗后将棉拭子贴壁挤干丢弃。样本在室温放置不超过2小时,4℃保存不超过24小时,-20℃保存不超过3个月,避免反复冻融。

3.1.2 样本处理

将漂洗过棉拭子的生理盐水或洗脱液全部转移到1.5mL微量离心管中,13000rpm离心10分钟,弃去上清,保留管底的细胞块。加入50μL细胞裂解液悬浮沉淀,100℃加热10分钟。13000rpm离心10分钟,保留上清待用。

3.2 HPV DNA片段的PCR扩增

根据HPV L1基因设计23种亚型的特异性探针,针对这一片段设计通用引物,同时以人类基因组的看家基因beta-globin作为PCR对照。按PCR常规标准加入反应缓冲液(含MgCl₂)、dNTP、引物、无菌双蒸水,而后分别加入已提取的待测样品DNA 5μL,反应总体系为25μL。按以下条件进行扩增:50℃ 15min; 95℃ 10min; 94℃ 30s, 42℃ 90s, 72℃ 30s, 40 cycles; 72℃ 5min。

3.3 杂交和显色

1) 取15 mL 塑料离心管,标明编号,放入标有同样编号的膜条(应在膜条的一角用铅笔标记),加入A液(2×SSC, 0.1%SDS, pH 7.4) 6 mL及所有PCR产物,将盖拧上,但不要过紧。将塑料管放入沸水浴中加热10分钟(确保杂交液液面完全位于水浴液面之下),取出拧紧盖子,放入杂交箱51℃杂交1.5小时。同时取50mL塑料管,加入40mLB液(0.5×SSC, 0.1%SDS, pH 7.4)于杂交箱或水浴箱中预热至51℃。

2) 取出膜条,移至装有预热B液的50 mL管中,于51℃轻摇洗涤15分钟。

3) A液配制1: 2000的POD(过氧化物同工酶)溶液,室温轻摇浸泡膜条30

分钟。弃去POD溶液。用A液室温轻摇洗两次，每次5分钟。然后再用C液（0.1M 柠檬酸钠，pH5.4）室温洗膜1-2分钟。同时配制显色液（显色液需新鲜配制：19mL 0.1M柠檬酸钠，1mL TMB，10 μ L 3%H₂O₂），将膜条浸泡于显色液中避光显色10分钟左右即可见斑点显现，若显色较弱可适当延长显色时间，显色完毕将膜条浸泡在水中清洗，最后取出膜条于4℃保存。

3.4 结果判定

本试验可以同时检测 23 种不同亚型的 HPV，5 种低危亚型和 18 种高危亚型。判断时，膜条在哪一位点出现蓝色斑点，就说明标本感染了这一位点所代表的 HPV 亚型，每次试验都做阴性和阳性对照。本试剂盒所能检测 HPV 型别见下表 2：

表 2 HPV 分型基因芯片所能检测的 HPV 型别

Table 2 The HPV types that can be detected by the HPV gene chip

HPV6	HPV11	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV39
HPV42	HPV43	HPV45	HPV51	HPV52	HPV53	HPV56	HPV58
HPV44	HPV59	HPV66	HPV68	HPV73	HPV83	HPV MM4	PC

3.5 统计方法

首先分别统计正常组和疾病组的 HPV 感染率，然后统计疾病组不同年龄阶段、不同妇科疾病、不同怀孕次数以及不同首次性生活年龄的 HPV 感染率进行统计。一切数据采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。

4 结果

疾病组 1512 例标本中，阳性标本 523 例，感染率为 34.6%，其中双重感染 82 例，占阳性标本的 15.7%，多重感染 34 例，占阳性标本的 6.5%，而高危感染 340 例，感染率为 22.5%，占阳性标本的 65.0%，其中单纯 HPV16 亚型感染 155 例，占有所有阳性标本的 29.6%（包括混合感染），占高危阳性标本的 45.6%。正常组 500 例标本中，阳性标本 101 例，感染率为 20.2%，高危型所占比例为 41.6%。

4.1 正常组和疾病组 HPV 感染的比较以及 HPV 感染与相关疾病的关系

疾病组和正常组的 HPV 感染率有显著性差异($\chi^2=36.37, P<0.01$)。另外，不同妇科疾病的 HPV 感染率有显著性差异($\chi^2=39.079, P<0.01$)而且其高危型

所占比例也有显著性差异($\chi^2=33.760, P<0.01$)。见表 3 、 4

表3 HPV感染与不同宫颈疾患的关系以及与正常组的比较

TABLE 3 Comparison of the prevalence of HPV infection in abnormal and normal group

症状	检测例数	阳性数	阴性数	总感染率 (%)	高危所占比例 (%)
宫颈炎	455	152	303	33.4	75.9
宫颈糜烂	404	137	267	33.9	81.4
尖锐湿疣	206	120	86	58.3	49.1
其他疾病*	447	114	333	20.8	51.1
合计	1512	523	989	34.6	65.8
正常组	500	101	399	20.2	41.6

* 其他疾病包括阴道炎等其他妇科疾病

表4 不同妇科疾病患者感染HPV型别的比较

TABLE 4 Distribution of high-risk and low-risk HPV genotypes in different gynecological diseases

症状(例数)	感染状况		
	仅高危(%)	高危和低危 (%)	仅低危(%)
宫颈炎(152)	103(67.8)	11(7.2)	38(25.0)
宫颈糜烂(137)	110(80.3)	20(14.6)	7(5.1)
宫颈尖锐湿疣(120)	50(41.7)	6(5.0)	64(53.3)
其它(114)	52(45.6)	14(12.3)	48(42.1)
合计(523)	315(60.2)	51(9.8)	157(30.0)

4.2 HPV感染与年龄的关系

不同年龄段的 HPV 感染率有显著性差异($\chi^2=27.543, P<0.01$)。见表 5

4.3 首次性生活年龄以及怀孕次数与HPV感染的关系

HPV 感染率与不同首次性生活年龄有很大的关系, 首次性生活年龄越小, 感染率越高($\chi^2=34.732, P<0.01$)。同时, HPV 感染率与怀孕次数也有很大的关系, 随着怀孕次数的增加感染率有显著性增加($\chi^2=19.116, P<0.01$), 见表

表5 HPV感染与病人年龄、首次性生活年龄、怀孕次数以及文化程度的关系
TABLE5 Prevalence of HPV infection in specimens with selected characteristics

参数	阳性数	阴性数	合计	HPV 感染率 (%)	χ^2	P 值
年龄						
15-24	48	78	126	38.1	42.350	<0.001
25-34	255	370	625	40.8		
35-44	133	257	390	34.1		
45-54	68	160	228	29.8		
>55	19	124	143	13.3		
合计	523	989	1512	34.6		
首次性生活 年龄						
15-18	128	124	252	50.8	49.183	<0.01
19-21	196	315	511	38.4		
22-24	143	389	532	26.9		
25-	56	161	217	25.8		
合计	523	989	1512	34.6		
怀孕次数						
1	43	126	169	25.4	19.116	<0.01
2	103	249	352	29.1		
≥ 3	194	280	474	40.9		
合计	340	655	995	34.2		

5 讨论

目前 HPV 的检测方法主要有以下几种：血清学方法、DNA 印迹法、原位杂交法、聚合酶链反应法 (PCR)、杂交捕获法等，但以上各种方法都存在一定的缺点，比如：血清学方法检测灵敏度较低，DNA 印迹操作麻烦、耗时、费用高，原位杂交法的杂交率低，大大降低了其临床应用价值。而反向点杂交方法，在很大程度上克服了以上缺点，作为基因芯片的基础技术，它具有以下优点：敏感性高、特异性强、检测结果准确可靠；操作简单：通过一次杂交检测不仅可以判断待检样品中是否存在 HPV 感染，而且还可以鉴定出是哪种型别的 HPV 感染；针对性强：对样品中的 HPV DNA 直接进行检测，可以检出 HPV 的潜伏期感染；同时检测多种 HPV 型别，对多重 HPV 感染的判断一目了然，克服了其他 HPV 检测方法难以判断混合感染或操作繁琐的缺点^[5,6]。

根据 HPV 基因的序列变异可将其分为多种类型,目前确定的 HPV 型别约有 100 余种,其中有约 40 种可以感染人的生殖器官,根据其感染后的致癌性与否又分为高危型和低危型,低危型 HPV 如 HPV6, 11, 42, 43, 44 等,常引起外生殖器湿疣等良性病变包括宫颈上皮内低度病变(CIN1),高危型 HPV 如 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59 等与宫颈癌及宫颈上皮内高度病变(CIN2/3)的发生相关,尤其是 HPV16 和 18 亚型。本试验对疾病组 1512 例临床标本进行了 HPV 检测,523 例为 HPV 阳性,阳性感染率为 34.6%,其中高危感染率为 22.5%。而正常组 500 例标本中,阳性率为 20.2%,高危感染率为 8.4%。疾病组和正常组比较,不论是总感染率还是高危感染率,疾病组明显高于正常组。另外,本实验疾病组的 HPV 感染率也明显高于国内其他的研究数据^[7, 8]。

5.1 HPV感染与相关妇科疾病的关系

本次试验疾病组的对象都是患有某些妇科疾病的患者,其中宫颈炎、宫颈糜烂和尖锐湿疣所占比例最多,其感染率分别为:33.4%、33.9%和 58.3%,明显高于其他疾病(如阴道炎等)的患者(20.8%),其中高危型感染所占比例分别为:75.9%、81.4%、49.1%和 51.1%,很显然,宫颈炎和宫颈糜烂 HPV 阳性患者中,高危感染率远远高于其他妇科疾病患者($\chi^2=33.760$, $P<0.05$),而流行病学资料显示,在 99.7%的宫颈癌组织中存在 HPV DNA,且主要为 4 种高危型 HPV(16、18、31 和 45)感染,其中 50%的宫颈癌与 HPV16 感染有关^[9]。还有研究表明,宫颈炎与高度宫颈上皮瘤变有关,慢性炎症下调细胞免疫,从而使 HPV 不易被清除而持续存在^[10]。这就提示我们的医疗工作者,在宫颈癌的初步筛查中应该有重点地选择高危人群。

5.2 HPV感染与年龄的关系

本研究中发现,20-30 这个年龄段感染率最高(40.8%),随着年龄的不断增加,感染率也在降低,这可能是由于青年女性性生活频繁,免疫系统并未能被致敏,易受 HPV 感染,如果是持续地感染高危 HPV,很有可能进一步导致宫颈恶性病变,所以这个年龄段的妇女也就成为重点筛查对象。Torres^[11]等研究还发现,年轻妇女更容易感染高危型 HPV 进而发展为宫颈癌,预后差。

5.3 首次性生活年龄以及怀孕次数与HPV感染的关系

Velema^[12]等研究发现 20 以上开始性生活的妇女患 CIN 的风险较 16 岁

以前开始者降低 50%以上, 16 岁以前开始性生活的妇女宫颈癌发病是 20 岁以后者 2 倍多。本次研究中, 首次性生活在 15-18 年龄段的妇女的感染率为 50.8%, 明显高于其他年龄组。另外, HPV 的感染与怀孕次数也有很大的关系, 感染率随着孕次的增加而增加, 这可能是因为育龄妇女多次人工流产, 导致宫颈受损, 从而增加了 HPV 的易感性。

第二部分 利用悬浮点阵技术对反向膜杂交技术进行评价

1 材料

随机抽取经过反向膜杂交技术检测的 50 例患者标本（包括宫颈脱落细胞,疣体组织）; Taq DNA 聚合酶、配套的 PCR 反应缓冲液、dNTP 购自 TaKaRa 公司;连接生物素的引物及氨基化修饰的探针由 TaKaRa 公司合成;表面羧基化的荧光编码微球购自 Luminex 公司。

2 原理

液相芯片是基于 Luminex xMAP System 的技术平台开发的一种临床应用型生物芯片.其原理是把 $5.6\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球用两种荧光染料染色,调节两种荧光染料的比例可获得 100 种不同的微球,每个微球具有特定的光谱地址.然后将每种颜色的微球经共价结合携带一种针对相应待测物的生物探针（如:抗原、抗体、核酸、配体、酶等）.(图 3)由于每种微球都有其特定的光谱地址,所以可在一个反应管内同时完成多达 100 种不同的生物学反应.第三种荧光染料与报告分子结合可以量化发生在微球表面的生物学反应.最后用 Luminex100 进行分析,仪器通过两束激光分别识别编码微球和检测微球上报告分子的荧光强度,分别对待测物进行定性、定量检测^[13]

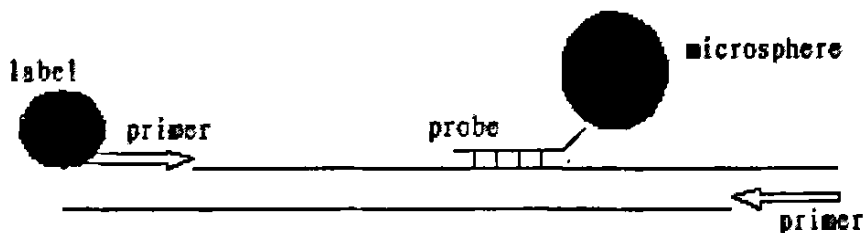


图 2 Luminex 检测原理
Fig. 2 The detection principle of Luminex

3 方法

3.1 标本DNA提取

将漂洗过棉拭子的生理盐水或洗脱液全部转移到 1.5mL 微量离心管中,13000r/min 离心 10min,弃去上清,保留管底的细胞块.加入 50mL 细胞裂解液悬浮沉淀,100℃加热 10min.13000r/min 离心 10min,保留上清待用.

3.2 PCR扩增

采用 GP5+(5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3') 和 5'-biotinylated GP6+(5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3')引物对 HPV DNA 26 种亚型(6,11,16,18,26,31,33,35,39,40,42,44,45,51,52, 53,54, 55,56, 58,59,61,66,68,73,83)进行标本 DNA 扩增.PCR 反应体系为:总体积 20μL,包括约 200 ng 的模板 DNA,800 μM dNTPs,1.5 mM Mg²⁺,每条引物 5 pM 以及 1.5U Taq 酶.PCR 反应条件为:95℃预变性 5min,95℃ 30s,55℃ 1min,72℃ 1min,循环 40 次,72℃延伸 5min.

3.3 探针设计

根据 Genebank 中 26 种 HPV 亚型序列,利用 Oligo6.0 等生物信息学软件设计型特异的探针,并经 BLAST 最终确定 26 种探针序列.各种型别探针具体序列见表 6

表 6 HPV 亚型探针序列

Table 6 HPV type-specific oligoprobes

HPV 亚型	探针序列 5' → 3'
6	TCCGTA ACTACATCTTCCA
11	TCTGTGTCTAAATCTGCTAC
16	CATTATGTGCTGCCATATC
18	TGCTTCTACACAGTCTCCT
26	GTACATTATCTGCAGCATC
31	GCAATTGCAAACAGTGATAC
33	TGCACACAAGTAACTAGTGA
35	CTGCTGTGTCTTCTAGTGA
39	ATAGAGTCTTCCATACCTTC
40	AGTCCCCACACCAACC
42	TGGTGATACATATACAGCTG

44	TACTAGTGAACAATATAAGCA
45	TAATTTAACATTATGTGCCTC
51	TGCTGCGGTTTCCCCAA
52	GAATACCTTCGTCATGGC
53	TGTCTACATATAATTCAAAGC
54	CACGCAGGATAGCTTTAAT
55	TCAGTCTCCATCTACAACAT
56	CAGAACAGTTAAGTAAATATG
58	TATGCACTGAAGTAACTAAG
59	TCTACTACTGCTTCTATTCC
61	CCCCCCTGTATCTGAAT
66	AGCTAAAAGCACATTAACATA
68	CTGAATCAGCTGTACCAAT
73	ACAGGCTAGTAGCTCTACT
83	TACACAGGCTAATGAATACA

3.4 杂交

杂交反应体系包括 22 μ L 寡核苷酸探针偶联微球（包括 26 种微球）的微球杂交液及 3 μ L PCR 产物。将杂交检测混合物混匀，99 $^{\circ}$ C 热变性 5min，然后在 48 $^{\circ}$ C 杂交 15min；加入 75 μ L SA-PE，混匀后置于 48 $^{\circ}$ C 孵育 5min。最后在 Luminex 100 多功能流式点阵分析仪及 Luminex Data Collector Version1.7 数据收集软件上进行读数检测。

上述 50 例标本 DNA 用反向点杂交方法（深圳亚能公司试剂盒）检测 23 种 HPV DNA 亚型（6,11,16,18,31,33,35,39,42,43,44,45,51,52, 53,56, 58,59, 66, 68,73, MM4,83）。具体方法见论文第一部分。

4 结果与分析

4.1 液相芯片检测结果

在 50 例标本中，检测出各种 HPV 亚型的阳性标本 26 例，检出率为 52%，包括：HPV6,11,16,31,33,39,43,52,58 等。其中单一亚型感染 20 例占 40%，以 HPV16,11,6 型为主；多重感染 6 例占 12%，包括 HPV6/33,

HPV11/35,HPV6/16/58, HPV16/33,HPV16/43,HPV11/16/52 (图 1) .

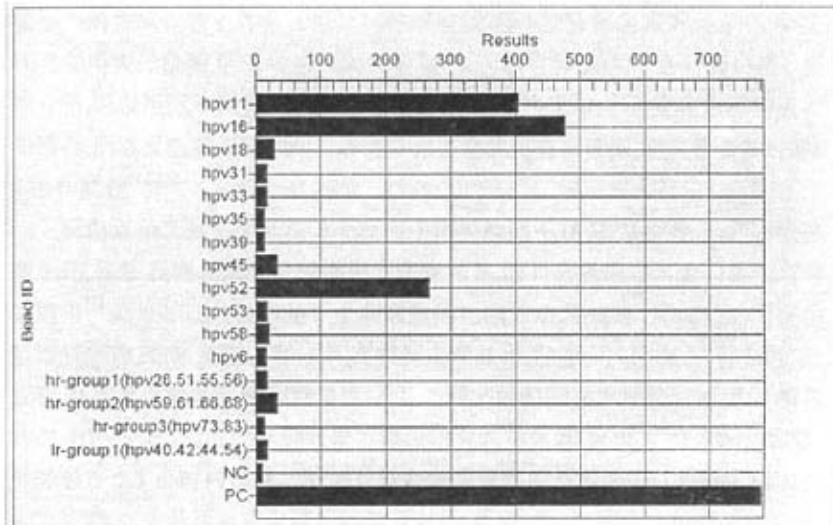


图 3 HPV11/16/52 多重感染

Figure 3 Multiple infection for HPV11/16/52

NC 为阴性内对照,PC 为 β -globin 做阳性内对照,信号值>200 判定为阳性.

4.2 反向点杂交检测结果

在 50 例标本中,检测出各种 HPV 亚型的阳性标本 26 例,阳性占有率为 52 %,包括:HPV6,11,16,31,33,39,43,58 等.其中单一亚型感染 22 例占 44 %,以 HPV16,11, 6 型为主,多重感染 5 例占 10 %,包括 HPV6/33, HPV11/16, HPV11/35, HPV6/16/58.

4.3 两种方法检测结果的比较

液相芯片法检测的 50 例标本中阳性率为 52 %,与反向点杂交的阳性结果相同,但比反向点杂交具有更高的敏感性,能更有效的检测 HPV 多重感染情况.反向点杂交检测出的两例 HPV16 的单重感染,在液相芯片中检出为 HPV16/33、HPV16/43 多重感染.反向点杂交检测出 HPV11/16 的双重感染,而液相芯片则检出 HPV11/16/52 三重感染.

5 讨论

液相芯片技术具有以下特点: 1.高通量: 可以同时对待测样本中多种不同的目的分子进行定性和定量分析; 2.高灵敏度: 每个微球上都可以以共价键结合的方式包被上许多抗原、抗体或核酸.因为探针密度高,产生的信号强,加上使用荧光检测,所以敏感性大大提高; 3.灵活性好:适用于各种蛋白质、核酸分析,可以根据不同待测项目自行组合; 4.反应快速:由于杂交在悬浮的液相中进行,所以反应需要时间短,杂交后无需清洗可直接读数,能大量节省时间; 5.操作简便^[14-16].

反向点杂交虽然也能在一个反应中同时检测不同 HPV 亚型,但它的敏感性不高.另外,反向点杂交只能提供半定量结果,因为它通过人为的观察来判断结果^[8].而液相芯片技术是一个高通量的检测方法,能快速、简便的对所有生殖道致病的 HPV 亚型进行分型,并得到定量结果.它能一次检测 26 种 HPV 的亚型,具有高度的敏感性和特异性,并且还能节约检测成本和检测时间.液相芯片对 HPV 分型检测的定量数据可以使研究人员估算 PCR 扩增产物的数量.并能够在 2.5 小时内快速、简便且具有高重复性的分析近 100 份临床标本的 PCR 产物.对大量标本进行流行病学及 HPV 疫苗的研究都能在短时间内完成.这个技术的另一优点在于从 DNA 样品的制备到 PCR 扩增,杂交及最后的检测都是自动化的.而且检测成本和费用也相对便宜^[17].尽管如此,反向膜杂交方法仍不失为一种有效的 HPV 检测方法,值得大范围推广。

综上所述,液相芯片用于 HPV 分型检测,在检出率和特异性方面均显著高于传统的检测方法.它不仅可以进行临床筛查,还对大范围的流行病学调查及 HPV 疫苗的研究提供可靠的资料,具有重要的临床意义.

第三部分 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

1 材料

1.1 实验标本

取自四川省肿瘤医院妇产科以及重庆第四人民医院妇瘤科宫颈癌患者手术切除标本, 经病理确诊为浸润性宫颈癌 (包括腺癌和鳞癌), 所采用标本经反向膜杂交检测确定为 HPV16 单重感染, 排除其他型别感染以及多重感染标本。

1.2 载体和菌株

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α

本实验室保存

pMD18-T Vector(结构如下)

购自宝生物 (大连) 工程有限公司

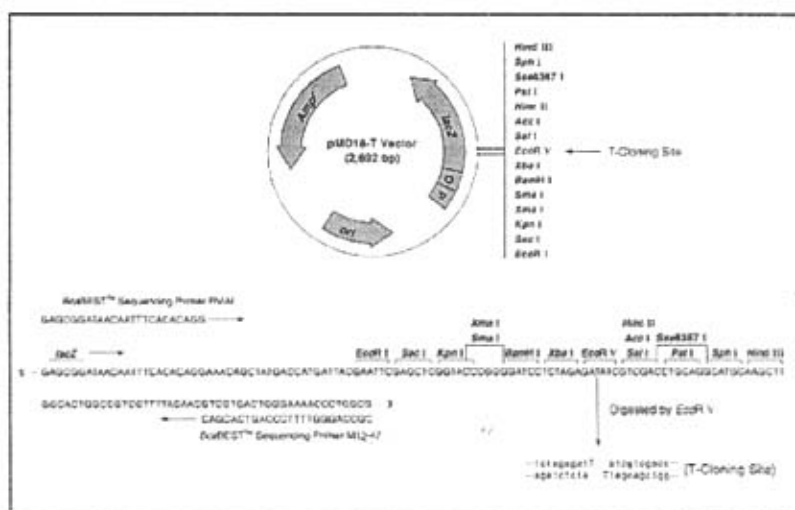


图 4 pMD18-T 载体的质粒图谱
Figure 4 Map of pMD18-T Vector

1.3 工具酶及生化试剂

限制性内切核酸酶

购自宝生物 (大连) 工程有限公司

DNA Marker DL2000、1Kb ladder	同上
Taq DNA 聚合酶 IPTG X-gal	同上
凝胶回收试剂盒	OMEGA
质粒提取试剂盒	同上

其他常规试剂为国产分析纯试剂

1.4 试剂配方

(1) LB 固体培养基 (1L)

Tryptone 10g

Yeast 5g

NaCl 10g

琼脂糖 15g

加入 900ml 双蒸水, 用 5M NaOH 调 pH7.4, 定容至 1L, 高压灭菌 15min。

(2) LB 液体培养基 (1L) :

Tryptone 10g

Yeast 5g

NaCl 10g

加入 900ml 双蒸水, 用 5M NaOH 调 pH7.4, 定容至 1L, 高压灭菌。

(3) SOB 培养基 (1L) :

Tryptone 20g

Yeast 5g

NaCl 0.5g

加入 900ml 双蒸水, 0.25M KCl 10ml, 用 5M NaOH 调 pH7.0, 定容至 1L, 高压灭菌。使用前加入 5ml 2M 的 MgCl₂, 混匀。

(4) TB 缓冲液 (100ml)

1M KCl 20ml

0.45M MnCl₂ 12ml

0.5M CaCl₂ 3ml

0.5M K-MES 2.5ml

去离子双蒸水 62.5ml

2 方法

2.1 宫颈癌组织DNA的提取

取黄豆大小新鲜临床宫颈癌标本，剪碎后加入 pH8.0 的 TE 缓冲液 400 μ l，以匀浆器研磨至不见组织块。转入 1.5ml 微量离心管中，以 100 μ l TE 缓冲液冲洗匀浆器一并转入离心管。然后加入 20%SDS 至终浓度为 1%。混匀加蛋白酶 K 至终浓度为 100-200 μ g/ml，混匀后放入 37 $^{\circ}$ C 水浴 20h，中间振摇数次。之后，假如 500ul Tris-平衡酚/氯仿/异戊醇倒转混匀，5000g 离心 10min,取上层水相再重新抽提一次。吸取水相以氯仿/异戊醇抽提一次。5000g 离心 10min 取上清加入 1/10 体积 3M 乙酸钠和 2.5 倍体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷的乙醇，14000g 离心 5min。弃上清，以 70%乙醇洗涤 1 次，自然风干，以 100 μ l 水溶解沉淀，测取 OD 值达到要求后，-20 $^{\circ}$ C 存放备用。

2.2 型别鉴定

采用反向膜杂交技术对收集宫颈癌标本进行检测，具体方法见论文第一部分。

2.3 引物的设计与合成

根据Genebank里面已经发表的HPV16序列，采用Primer 5.0、Oligo 6.0等生物信息学软件，对HPV16 E6、E7和L1开放阅读框特异引物自行设计，经BLAST后，由上海英骏公司合成，具体引物序列见表7

表 7 PCR 扩增引物
Table 7 Primers used for PCR amplification

开放阅读框	引物名称	起始位点	引物序列	产物长度
E6	HPV16E6F	81	5'-TTATGCACCAAAAGAGAACTGCA -3'	498
	HPV16E6R	578	5'-GGTGTATCTCCATGCATGATTACAG -3'	
E7	HPV16E7F	559	5'-ATCATGCATGGAGATACACCTACATTG-3'	320
	HPV16E7R	878	5'-GCAGGATCAGCCATGGTAGATT-3'	
L1 ^a	HPV16L11F	5500	5'-ACCAAGCTCCTTCATTACTTCCT-3'	545
	HPV16L11R	6044	5'-GCATAAGCACTAGCATTCTGT-3'	
	HPV16L12F	5955	5'-GGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAG-3'	597
	HPV16L12R	6551	5'-TGGGCATCAGAGGTAACCATAGAAC-3'	
	HPV16L13F	6529	5'-TCTATGGTTACCTCTGATGCC-3'	660
	HPV16L13R	7188	5'-ACAAACAACACTGAGTCAACA-3'	

a: 由于 L1 基因序列太长，为方便序列分析和引物设计，将 L1 基因分成三段进行测序。

2.4 PCR扩增HPV16亚型E6、E7和L1基因

2.4.1 PCR 反应体系

PCR 反应体系 (25 μ l) 为: dNTP 2.5mmol/L, 引物各 50 μ mol/L, MgCl₂ 25 mmol/L, Taq 酶 2.5 U, 加 H₂O 至 25 μ l。

2.4.2 扩增参数设定

95 $^{\circ}$ C 5min 变性; 94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 后进行 35 个循环; 末次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

2.5 扩增产物的观察与回收

将上面 PCR 扩增产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 mg/ml 溴化乙锭染色。以手术刀片切下含目的片段的凝胶, 放入 1.5 ml 微量离心管, 用核酸纯化试剂盒回收 DNA 片段, 操作步骤严格按照 OMEGA 胶回收试剂盒说明书进行:

1). 切胶: 切胶时, 紫外线照射最好不超过 30s, 以避免 DNA 的降解。尽量切除多余凝胶。

2). 将切下的胶块放入经高压灭菌处理的 1.5ml EP 管中, 并称其重量, 按照 1g/ml 的标准加入 Binding Buffer, 然后在 55 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C 的水浴 10min, 并每隔 2-3min 摇动 EP 管直到胶完全融化。

3). 将胶液全部转移到一个 2ml 的收集管中 (试剂盒提供), 10 000g 室温离心 1min。

4). 弃去管中的液体, 加入 300 μ l Binding Buffer, 10 000g 离心 1min。

5). 加入 700 μ l 无水乙醇饱和的 SPW Buffer, 静置 2-3min, 10 000g 室温离心 1min。

6). 重复上一步, 弃去管中液体, 对空柱子 10 000g 离心 1min, 以使柱子尽量干燥。

7). 将柱子置于一经高压灭菌处理的 1.5ml EP 管中, 加入 30-50 μ l 双蒸去离子水, 37 $^{\circ}$ C 放置 10min, 13 000g 离心 10min。-20 $^{\circ}$ C 保存备用

2.6 利用pMD18-T载体克隆所需基因片段

2.6.1 制备感受态细胞(DH5a)

将低温保存的菌种划线后, 挑取单菌落接种于 50ml 无抗菌素的 SOB 培养液中, 18 $^{\circ}$ C 培养过夜或者 37 $^{\circ}$ C 培养 2-3 小时至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.5; 3500rpm 冷冻离心 10min, 去上清, 加入 15ml 预冷的 TB 缓冲液, 轻轻混匀, 冰上放置 10min; 3500rpm 冷冻离心 10min, 去上清, 加入 4ml 预冷 TB 缓冲液和

280 μ l DMSO, 轻轻混匀, 置入液氮罐 10min, 分装后于-70 $^{\circ}$ C 冻存储备用。

2.6.2 DNA 的连接反应

连接体系 (10 μ l), 按照 Takara pMD18-T 载体试剂盒说明书建立:

连接体系	反应体积
pMD18-T 载体	1 μ l
PCR 回收片段	所加体积使得其与载体的摩尔比在 2-10: 1
去离子双蒸水	补加至 5 μ l
Solution I	5 μ l

16 $^{\circ}$ C 反应过夜

2.6.3 转化实验

- 1) 全量 (10 μ l) 加入至 100 μ l JM109 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。
- 2) 42 $^{\circ}$ C 加热 45 秒钟后, 再在冰中放置 1 分钟。
- 3) 加入 890 μ l LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 60 分钟。
- 4) 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。

2.6.4 重组克隆的筛选与鉴定:

- 1) 将过夜培养的平板在 4 $^{\circ}$ C 放置半小时待蓝色充分显出后, 挑取琼脂平板上的白色菌落, 接种于 5ml 含 100 μ g/ml Amp 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。
- 2) 每个试管取出 1.5 ml 菌液提取质粒, 具体步骤严格按照试剂盒说明书进行。
- 3) 于 20 μ l 反应体系中加入限制性内切酶作双酶切。
- 4) 1.2% 琼脂糖电泳, 5V/cm, 溴化乙锭染色紫外灯下观察。酶切片段与预期相符者即为阳性重组克隆。

2.6.5 重组质粒的序列测定

将通过菌落 PCR 法确认含有正反向插入片段的两种大肠杆菌菌落接种于 LB + Amp^r 液体培养基种, 37 摄氏度, 225 转/分钟振荡培养过夜。加入甘油保存菌液, 送上海英骏公司测序, 每个样本都重复测一次。

2.6.6 片段的序列测定和分析, 筛选出变异菌株

HPV16 系统进化分析, 利用 Phylip3.65、MEGA3.0 等进化分析软件, 分别以 E6、E7、L1 以及 E6 + E7 + L1 序列为分析对象, 对所测标本以及

EG131(European Germany 131)(AF536179)、EA(East Asia)(AF534061)、AA(Asia-American)(AF402678)和 Af-1(African-1)(AF536180)进行系统进化分析。

3 结果

3.1 反向膜杂交结果

在12例标本中, 11例为HPV阳性, 感染率为91.7%, 其中4例为HPV16单重感染, 另外7例中, 3例为单重感染, 2例为双重感染, 2例为三重感染, 详见表8

表8 12例宫颈癌标本经反向膜杂交之后的HPV感染情况

Table 8 Prevalence of HPV types identified by reverse blot assay in the 12 biopsies collected

标本编号 ^a	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV58	其他 ^b
CC-01	-	-	-	-	-	-	-
CC-02	+	-	-	-	-	-	-
CC-03	-	-	+	-	-	-	-
CC-04	-	-	-	-	-	-	+
CC-05	+	-	-	+	-	-	-
CC-06	+	-	-	-	-	-	-
CC-07	-	-	-	-	-	-	-
CC-08	-	+	-	-	-	-	-
CC-09	-	-	-	-	-	+	-
CC-10	-	+	-	-	+	-	-
CC-11	+	-	-	-	-	-	-
CC-12	+	-	-	-	-	-	-

“+”: 表示阳性; “-”: 表示阴性

a: CC: Cervical Carcinoma 编号 01—12 为浸润性宫颈癌 (包括腺癌和鳞癌)

b: “其他” 包括本实验所用反向膜杂交试剂盒所能检测的其他类型

3.2 宫颈癌组织中 HPV16 E6、E7、L1 ORFs DNA 片段的扩增

基因片段扩增后, 片段回收后凝胶电泳检测如图 5 所示。由电泳图可看出, 各个基因片段与 Genbank 上所报道的 HPV16 亚型基因编码区大小相符。

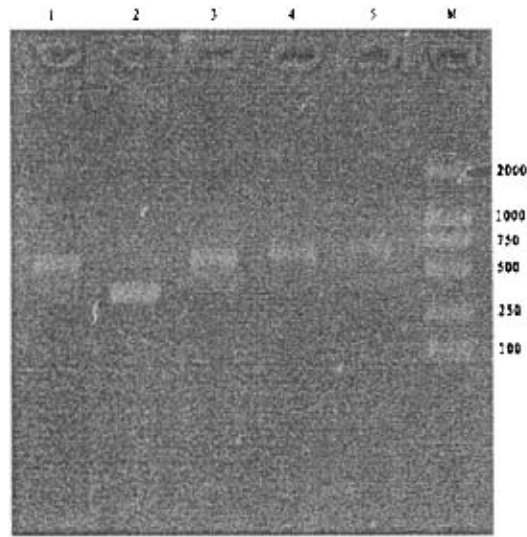


图 5 HPV16 亚型 E6、E7 和 L1 编码序列 PCR 扩增电泳图

Figure 5 Gel electrophoresis of HPV 16 type E6,E7 and L1 PCR product

M: DNA molecular weight marker (DL 2,000)

1-5: HPV16 type E6,E7,L1-1,L1-2,L1-3 PCR product

3.3 pMD18-T/HPV16 E6、E7、L1 ORFs重组质粒的构建

当 pMD18-T 多克隆位点处有外源基因插入时，阻断了 lacZ 基因的表达，因此不能在 IPTG 的诱导下水解 X-Gal，在含有 Amp/IPTG/X-Gal 的 LB 平板上将出现白色菌落。将回收的基因片段与 pMD18-T 载体连接后转化 DH5 α 菌株（含有 α 互补系统），过夜培养后平板上有白色和蓝色菌落长出，选取白色菌落扩大培养，提取质粒，经酶切鉴定，重组质粒含有目的片段。酶切图见图 6

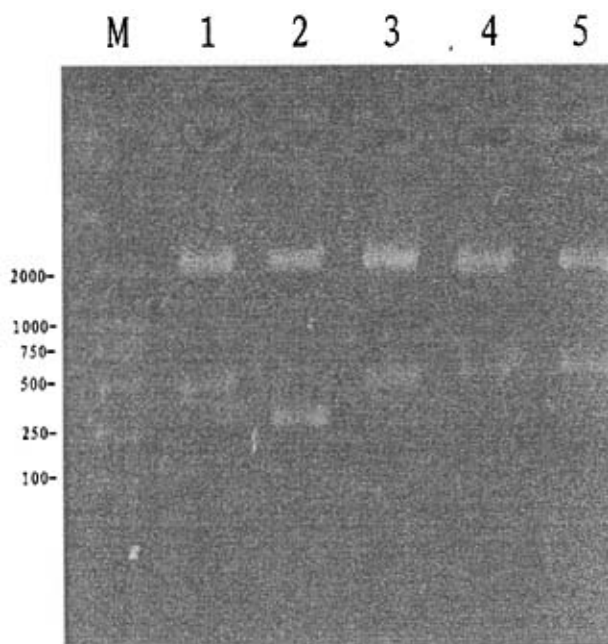


图 6 重组质粒的双酶切鉴定

Figure 6 Electrophoresis of pMD18- double restriction enzyme digest

M: DNA molecular weight marker (DL 2,000)

1-5: pMD18-HPV16 (E6,E7,L1-1,L1-2,L1-3) recombinants double restriction enzyme digests

3. 4 HPV16致癌基因E6、E7以及衣壳蛋白决定基因L1的序列变异分析

4个HPV16单独感染的标本中的HPV16致癌基因E6E7以及衣壳蛋白决定基因L1经序列测定，并且与标准株比较，其中与标准株不同的位点被视为变异位点。与EG131相比，四个标本中总共发现20个突变位点，其中8个为四个标本所共有。详细情况见表9

CLUSTAL multiple sequence alignment

CC-06 ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTACCA

CC-12 ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA
 CC-02 ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA
 EA ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA
 CC-11 ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA
 EG131 ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCGAAAGTTACCA
 AA ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA
 Af-1 CTGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCACAAAGTTACCA

CC-06 CAGTTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTA CTGC
 CC-12 CAGTTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTA CTGC
 CC-02 CAGTTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTA CTGC
 EA CAGTTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTA CTGC
 CC-11 CAGTTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTA CTGC
 EG131 CAGTTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTA CTGC
 AA CATTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTA CTGC
 Af-1 GATTTATGCACAGAGCTGCAACAACCTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTA CTGC

* *****

CC-06 AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTA
 CC-12 AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTA
 CC-02 AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTA
 EA AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTA
 CC-11 AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTA
 EG131 AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTA
 AA AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTA
 Af-1 AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTA

CC-06 TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTAAAGTTTATTCTAAAGTT
 CC-12 TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTAAAGTTTATTCTAAAGTT

CC-02 TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAATT
EA TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAATT
CC-11 TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAATT
EG131 TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAATT
AA TATAGAGATGGGAATCCATATGCAGTGTGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAATT
Af-1 TATAGAGATGGGAATCCATATGCAGTGTGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAATT

***** ** *****

CC-06 AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC
CC-12 AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC
CC-02 AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC
EA AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC
CC-11 AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC
EG131 AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC
AA AGTGAGTATAGATATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC
Af-1 AGTGAGTATAGATATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC

***** ***** *****

CC-06 AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA
CC-12 AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA
CC-02 AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA
EA AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA
CC-11 AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA
EG131 AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA
AA AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA
Af-1 AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAA

***** *****

CC-06 GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC
CC-12 GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC
CC-02 GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC

EA	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC
CC-11	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC
EG131	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC
AA	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC
Af-1	GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC

CC-06	GGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAATG
CC-12	GGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAATG
CC-02	GGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAATG
EA	GGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAATG
CC-11	GGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAATG
EG131	GGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAATG
AA	GGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCGAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAATG
Af-1	GGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAATG

***** *****

CC-06	CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGAT
CC-12	CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGAT
CC-02	CATGGAGATACACCTAGATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGAT
EA	CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGAT
CC-11	CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGAT
EG131	CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGAT
AA	CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGAT
Af-1	CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGAT

CC-06	CTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA
CC-12	CTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA
CC-02	CTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA
EA	CTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA

CC-11	CTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA
EG131	CTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA
AA	CTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA
Af-1	CTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCA

CC-06	GCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT
CC-12	GCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT
CC-02	GCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT
EA	GCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT
CC-11	GCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT
EG131	GCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT
AA	GCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTCTGTTGCAAGTGT
Af-1	GCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGT

CC-06	GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACCGTAGACATTCGTACTTTGGAAGAC
CC-12	GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACCGTAGACATTCGTACTTTGGAAGAC
CC-02	GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACCGTAGACATTCGTACTTTGGAAGAC
EA	GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACCGTAGACATTCGTACTTTGGAAGAC
CC-11	GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACCGTAGACATTCGTACTTTGGAAGAC
EG131	GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACCGTAGACATTCGTACTTTGGAAGAC
AA	GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACCGTAGACATTCGTACGTTGGAAGAC
Af-1	GACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACCGTAGACATTCGTACGTTGGAAGAC

CC-06	CTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAAATGCAG
CC-12	CTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAAATGCAG
CC-02	CTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAAATGCAG
EA	CTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAAATGCAG
CC-11	CTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAAATGCAG

EG131 CTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAAAATGCAG
AA CTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAAAATGGAG
Af-1 CTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAAAATGGAG

***** ** ***** **

CC-06 GTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCAT
CC-12 GTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCAT
CC-02 GTGACTTTTATTTGCATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCAT
EA GTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCAT
CC-11 GTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCAT
EG131 GTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCAT
AA GTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCAT
Af-1 GTGACTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCAT

CC-06 ATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTGACTTGCCTCCTGTC
CC-12 ATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTC
CC-02 ATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTC
EA ATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTC
CC-11 ATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTC
EG131 ATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTC
AA ATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTC
Af-1 ATTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTC

CC-06 CCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCAT
CC-12 CCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCAT
CC-02 CCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCAT
EA CCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCAT
CC-11 CCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCAT
EG131 CCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCAT

AA	CCAGTATCTAAAGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCAT
Af-1	CCAGTATCTAAAGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCAT

CC-06	GCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAACCTAAC
CC-12	GCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAACCTAAC
CC-02	GCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAACCTAAC
EA	GCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAACCTAAC
CC-11	GCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAACCTAAC
EG131	GCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAACCTAAC
AA	GCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAACCTAAC
Af-1	GCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAACCTAAC

CC-06	AATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACAT
CC-12	AATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACAT
CC-02	AATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACAT
EA	AATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACAT
CC-11	AATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACAT
EG131	AATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACAT
AA	AATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATATAT
Af-1	AATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATATAT
	***** **
CC-06	TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAG
CC-12	TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAG
CC-02	TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAG
EA	TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAG
CC-11	TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAG
EG131	TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAG
AA	TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTTACAATCCAGATACACAG

Af-1	TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTCTTCCTGACACCTCATTTACAATCCAGATACACAG *****
CC-06	CGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGC
CC-12	CGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGC
CC-02	CGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGC
EA	CGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGC
CC-11	CGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGC
EG131	CGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGC
AA	CGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGC
Af-1	CGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGC *****
CC-06	ATTAGTGGCCATCCTTTATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCA
CC-12	ATTAGTGGCCATCCTTTATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCA
CC-02	ATTAGTGGCCATCCTTTATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCA
EA	ATTAGTGGCCATCCTTTATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCA
CC-11	ATTAGTGGCCATCCTTTATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCA
EG131	ATTAGTGGCCATCCTTTATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCA
AA	ATTAGTGGCCATCCTTTATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCA
Af-1	ATTAGTGGCCATCCTTTATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCA *****
CC-06	GCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTG
CC-12	GCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTG
CC-02	GCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTG
EA	GCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTG
CC-11	GCAAATGCAGGTGTGGTAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTG
EG131	GCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTG
AA	GCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTG
Af-1	GCAAATGCAGGTGTGGATAATAGGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTG

CC-06	TGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACC
CC-12	TGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACC
CC-02	TGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACC
EA	TGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACC
CC-11	TGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACC
EG131	TGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACC
AA	TGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTAAC
Af-1	TGTTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTAAC

CC-06	AATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAG
CC-12	AATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAG
CC-02	AATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAG
EA	AATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAG
CC-11	AATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTGATAAACACAGTTATTCAG
EG131	AATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAG
AA	AATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAG
Af-1	AATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAG

CC-06	GATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAAC
CC-12	GATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAAC
CC-02	GATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAAC
EA	GATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAAC
CC-11	GATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAAC
EG131	GATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAAC
AA	GATGGTGATATGGTTGATACCGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAAC
Af-1	GATGGTGATATGGTTGATACCGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAAC

CC-06	AAAAGTGAAGTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAA
CC-12	AAAAGTGAAGTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAA
CC-02	AAAAGTGAAGTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAA
EA	AAAAGTGAAGTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAA
CC-11	AAAAGTGAATTCCTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAA
EG131	AAAAGTGAAGTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAA
AA	AAAAGTGAAGTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAA
Af-1	AAAAGTGAAGTCCACTGGATATTTGTACGTCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAA

CC-06	ATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTT
CC-12	ATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTT
CC-02	ATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTT
EA	ATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTT
CC-11	ATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTT
EG131	ATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTT
AA	ATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTT
Af-1	ATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTATTTACGAAGGGAACAAATGTTT

CC-06	GTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTGGTGAAAAATGTACCAGACGATTTATAC
CC-12	GTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTGGTGAAAAATGTACCAGACGATTTATAC
CC-02	GTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTGGTGAAAAATGTACCAGACGATTTATAC
EA	GTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTGGTGAAAAATGTACCAGACGATTTATAC
CC-11	GTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTGGTGAAAAATGTACCAGACGATTTATAC
EG131	GTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTGGTGAAAAATGTACCAGACGATTTATAC
AA	GTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTGGTGAAAAATGTACCAGACGATTTATAC
Af-1	GTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTGGTGAAAAATGTACCAGACGATTTATAC

CC-06 ATAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTCTACACCTAGT
 CC-12 ATAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTCTACACCTAGT
 CC-02 ATAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTCTACACCTAGT
 EA ATAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTCTACACCTAGT
 CC-11 ATAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTCTACACCTAGT
 EG131 ATAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTCTACACCTAGT
 AA ATAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTCTACACCTAGT
 Af-1 ATAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTATTTCTACACCTAGT

CC-06 GGTTCATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCA
 CC-12 GGTTCATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCA
 CC-02 GGTTCATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCA
 EA GGTTCATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCA
 CC-11 GGTTCATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCA
 EG131 GGTTCATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCA
 AA GGTTCATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCA
 Af-1 GGTTCATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCA

***** ***** ***** *****

CC-06 CAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTGTTACTGTTGTTGATACT
 CC-12 CAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTGTTACTGTTGTTGATACT
 CC-02 CAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTGTTACTGTTGTTGATACT
 EA CAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTGTTACTGTTGTTGATACT
 CC-11 CAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTGTTACTGTTGTTGATACT
 EG131 CAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTGTTACTGTTGTTGATACT
 AA CAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTGTTACTGTTGTTGATACT
 Af-1 CAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTGTTACTGTTGTTGATACT

CC-06 ACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA

CC-12	ACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA
CC-02	ACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA
EA	ACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA
CC-11	ACACGCAGTACAAATATGTCATTATGCGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA
EG131	ACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA
AA	ACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACCTACATATAAA
Af-1	ACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA

CC-06	AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTT
CC-12	AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTT
CC-02	AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTT
EA	AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTAAGTTTATTTTT
CC-11	AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTT
EG131	AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTT
AA	AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTT
Af-1	AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTT

CC-06	CAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCC
CC-12	CAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCC
CC-02	CAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCC
EA	CAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCC
CC-11	CAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTGTATGAATTCC
EG131	CAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCC
AA	CAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGTCATACATACATTCTATGAATTCC
Af-1	CAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCC

CC-06	ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGAT
CC-12	ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGAT

CC-02 ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGAT
 EA ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGAT
 CC-11 ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGAT
 EG131 ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCCCCCAGGAGGCACACTAGAAGAT
 AA ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTTTACAACCTCCTCCAGGAGGCACACTAGAAGAT
 Af-1 ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTTTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGAT
 ***** ** *****

CC-06 ACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCT
 CC-12 ACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCT
 CC-02 ACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCT
 EA ACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCT
 CC-11 ACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCT
 EG131 ACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCT
 AA ACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCT
 Af-1 ACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCT

CC-06 AAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCT
 CC-12 AAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCT
 CC-02 AAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCT
 EA AAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCT
 CC-11 AAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCT
 EG131 AAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCT
 AA AAAGAAGATCCCCTTAAAAAATATACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCT
 Af-1 AAAGAAGATCCCCTTAAAAAATATACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCT

CC-06 GCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTAAAGGCC
 CC-12 GCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTAAAGGCC
 CC-02 GCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTAAAGGCC

EA	GCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTAAGGCC
CC-11	GCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTAAGGCC
EG131	GCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTAAGGCC
AA	GCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTAAGGCC
Af-1	GCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTAAGGCT

CC-06	AAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACA
CC-12	AGACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACA
CC-02	AAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACA
EA	AAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACA
CC-11	AAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACA
EG131	AAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACA
AA	AAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACA
Af-1	AAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACA

* *****

CC-06	ACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA
CC-12	ACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA
CC-02	ACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA
EA	ACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA
CC-11	ACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA
EG131	ACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA
AA	ACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA
Af-1	ACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

3.4.1 E6基因 对于E6基因，四个标本中总共发现四个突变位点，其中三个为四个标本共有，它们分别是：131(G-A) (Gly-Arg)、178(T-G) (Asp-Glu) 和350(G-T) (Val- Leu)。320(A-G) (Ile-Val)为CC-06所独有。

3.4.2 E7基因 对于E7基因，四个标本中共发现三个突变位点，其中两个位点为四个标本所共有，它们分别是：647(A-G) (Asn-Asp)和846(T-C) (同义突

变)。另外一个843(T-C) (同义突变)。

3.4.3 L1基因 对于L1基因，共发现13个突变位点，三个为四个标本共有：第966 (C-T) (同义突变)、第1302(C-T) (同义突变)和第1434(A-G) (同义突变)。七个为CC-11所独有：第503(A-G) (Asp-Gly)、第620(A-C) (Asn-Thr)、第627(T-C) (同义突变)、第648(A-G) (同义突变)、第736(G-A) (Val-Ile)、第1113(T-C) (同义突变)和第1256 (C-G) (Ser-Cys)。第20(A-G) (Thr-Cys) 为CC-02所独有。第112(T-G) (Thr-Asp) 为HUANG所独有。第1508(A-G) (Lys-Arg) 为CC-12所共有。

	E6 ^a	E7 ^a	L1 ^b
			1111111111111111
	11112233345	67788	11333556666677899001112223344555
	34478823533	48944	2913035010224835169011364590013002
	13586905032	79536	40928411305078766469873513642504687
AA	ACTTAGATGAG	ACGTT	GATTATTCAAACCTACGACTTTATCATCTTTTACAA
AF1	AGTTAGATTGA	ACGTT	GACTATCCAGAATACGGTTTAGTAACTTCTATAG
EG131	GCGTTAACGGA	ATTTT	CATTGCTTAACATATGATCCTATAGACCCCCACAA
EA	ACGGTAACTGA	GTTTC	CATTGCTTAACCTATGATTCTATAGACCTCCGCAA
CC-02	ACGGTAACTGA	GTTTC	CGTTGCTTAACATATGATTCTATAGACCTCCGCAA
CC-11	ACGGTAACTGA	GTTTC	CATTGCTTGACCCGTAATTCTACAGAGCTCCGCAA
CC-06	ACGGTAGCTGA	GTTTC	CATGGCTTAACATATGATTCTATAGACCTCCGCAA
CC-12	ACGGTAACTGA	GTTCC	CATTGCTTAACATATGATTCTATAGACCTCCGCGA

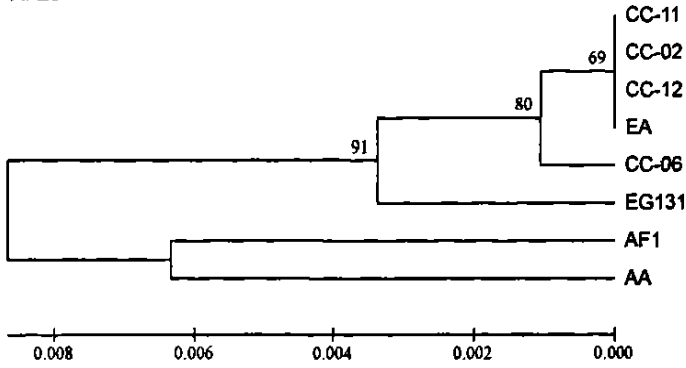
表 9 HPV 16 E6、E7 和 L1 基因序列分析
Table 9 Nucleotide sequence variations in HPV 16 E6, E7, L1 ORFs
AA: Asia-american; AF1: African-1;EA: East Asia; EG131:European-Germany 131

a: 由于EG131、AA、AF1和EA的E6和E7开放阅读框范围均为83-559、562-858，因此仍然采用原始位点顺序编码，而其对于L1基因的起始范围不同但长度相同，为方便统计和比较，从L1基因的第一个核苷酸序列开始计算。

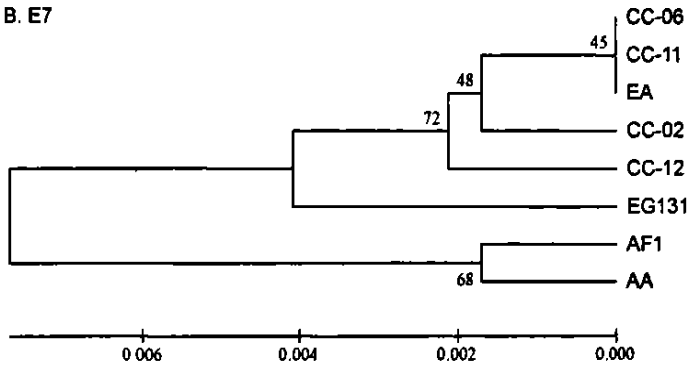
3.5 系统进化分析

分别根据E6、E7、L1以及E6-E7-L1序列进行进化分析，其结果如图7所示

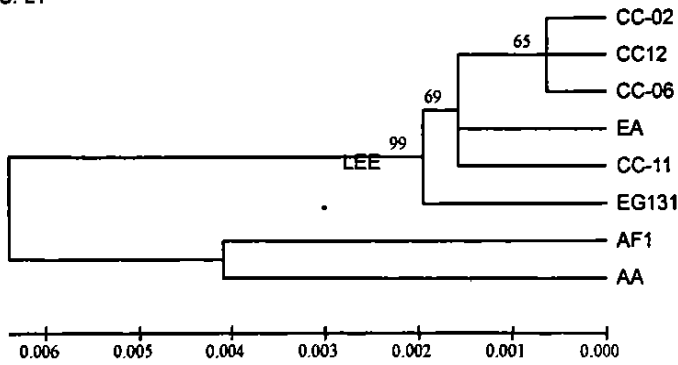
A. E6



B. E7



C. L1



D. E6-E7-L1

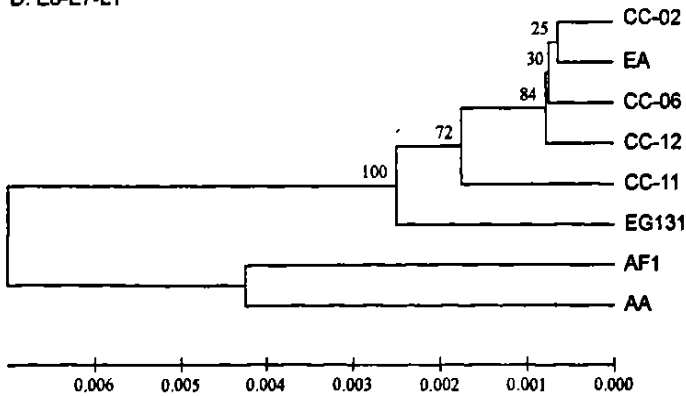


图7 E6、E7、L1 以及 E6-E7-L1 所作的系统分析图。

AA: Asia-american; AF1: African-1; EA: East Asia; EG131: European-Germany 131

4 讨论

世界范围内, 宫颈癌的发病率仅次于乳腺癌而居第二位, 每年约有10万宫颈癌新发病例, 其中80%在发展中国家, 我国每年约有新发病例13.15万, 占全世界新发病例的28.8%。近年来宫颈癌发病年龄趋向年轻化, 从原来的40-50岁提前到35岁左右。人乳头瘤病毒 (HPV) 感染是诱发宫颈癌的首要启动因素, 99%以上的宫颈癌组织携带高危HPV DNA, 其中HPV 16型占60%以上^[5]。由于HPV是宫颈癌发病的关键因素, 对于预防宫颈癌来说, 首先还是从根源上切断HPV的感染, 由此引起世界各国研究HPV疫苗的热潮, 但是由于HPV各种亚型以及不同地区的同种亚型的基因具有高度多态性, 这就要求不同地区必须针对本地区HPV16亚型基因的特点来研制针对本地区的HPV疫苗^[18]。本文主要探讨中国西南地区宫颈癌患者中HPV16亚型主要基因的序列变异特点。

在我们的研究中, 在12例标本中, 11例为HPV阳性, 感染率为91.7%, 其中4例为HPV16单重感染, 另外7例中, 3例为单重感染, 2例为双重感染, 2例为三重感染。HPV的多重感染是否增加或促进宫颈病变的发生一直是学者们关注的问题。多数人认为, 多重感染并不增加宫颈癌的发生。在IARC 的研究中, 病例组多重感染为81.1 %, 对照组为13.19%, 对照组多重感染率较高。Kay等^[19] 对南非宫颈癌和CIN2-3 的患者进行研究发现, CIN2-3中HPV 双重感染为12.4 %, 宫颈癌中为16 %, 认为多重感染与宫颈病变的级别无关。多重感染并不增加宫颈癌的发生率^[20]。但也有学者认为, 多重感染促进宫颈病变的发生, 且多重感染的宫颈癌患者对放疗的敏感性较差^[21]。有学者发现HPV16 是双重感染中最常见的感染亚型。HPV16 、18 、33 常有双重感染, 故认为HPV 的多重感染与感染的HPV亚型有关^[22]。

HPV16E6、E7基因是病毒的主要转化基因, 其编码的E6蛋白及E7蛋白均为含“Cys-X-X-Cys” 锌指结构的DNA结合蛋白, E6蛋白的N端及C端各形成2个锌指结构, 可分别结合、降解抑癌基因p53。体外研究表明, 一些E6突变蛋白对p53的降解能力大大降低, 另外的一些变异则导致潜在的T细胞受体或者HLA结合区域的氨基酸变化; E7蛋白的C端也存在2个锌指结构, N端37个氨基酸残基与AdE1A和SV40T抗原蛋白相似, 可与抑癌基因蛋白Rb结合, 为E7蛋白的转化活性区^[23,24]。Fujnaga等通过PCR法测序分析发现, 大多数侵袭性宫颈癌及

癌前病变都检出了HPV16E7序列变异株。对于E6E7基因, 本研究四例标本中共发现7个突变位点, 没有发现任何缺失或插入突变, 在7个突变位点中, 5个为四例标本共有: 131(G-A) (Gly-Arg)、178(T-G) (Asp-Glu)和350(G-T) (Val- Leu)、647(A-G) (Asn-Asp)和846(T-C) (同义突变)。其中350(G-T) (Val- Leu)、647(A-G) (Asn-Asp)在国内其他研究[12, 13, 14]中也有报道。

L1基因为结构基因, 编码病毒的衣壳蛋白L1蛋白, L1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, L1基因序列具有保守性, 同时具有型特异性特征, 而且个亚型之间因地域的不同也存在一定的变异性^[25]。Touze^[26]选取源于世界不同地区的6个HPV 16病毒株, 与原型病毒株比较, 发现L1蛋白氨基酸的变异可多达15个, 其在杆状病毒表达体系中VLP的产量是1-79倍不等。而在我们研究的四例标本中共发现13个突变位点, 未发现插入或缺失。在13个突变中, 三个为四个标本共有, 但均为同义突变。七个为LEE所独有: 其中第627(T-C)、第648(A-G)和第1113(T-C)为同义突变; 第503(A-G) (Asp-Gly)、第620(A-C) (Asn-Thr)、第736(G-A) (Val-Ile)和第1256(C-G) (Ser-Cys)。第20(A-G) (Thr-Cys)为CHEN所独有。第112(T-G) (Thr-Asp)为HUANG所独有。第1508(A-G) (Lys-Arg)为ZHOU所共有。另外, L1基因的不同缺失突变体对VLP的形成也有重要的影响, 但是本研究中并没有发现任何缺失或者插入突变。

HPV病毒无法在体外培养, 在体内也不能被诱导出易于检测的免疫反应。因此无法采用血清学检测的方法对其进行分型。HPV分型主要是依靠病毒核酸的杂交试验及病毒基因组的物理图谱分析等方法来确定, 通常以50%的同源性作为分型的标准。近年来, 国际病毒界又提出以病毒L1、E6和E7基因的同源性作为分型标准。如果不同毒株间上述核苷酸序列的同源性低于90%, 则被认为属于不同的型别。尽管各HPV16型之间同源性很接近, 但是根据来自不同地方(欧洲、亚洲、非洲、南美洲和北美洲)的地方株的序列特点又分为5个分支: E(European), As(Asian), AA(Asian-American), Af-1(African-1)和Af-2(African-2)^[27]。本文采用phyliip3.6进化分析软件, 分别以E6、E7、L1以及E6-E7-L1为序列依据, 初步探讨中国西南地区宫颈癌组织中HPV16亚型的进化关系, 结果发现, 单独以E6基因序列即可明显区分出中国西南地区HPV16亚型与其他分支。

由于人乳头瘤病毒的巨大危害性，目前设计特异性的疫苗势在必行，而设计疫苗一般都是针对HPV16特异的基因序列进行的，所以对HPV16亚型各主要基因进行序列分析十分必要。本项目针对中国西南地区HPV16亚型的主要基因进行克隆和多态性分析，为其相应蛋白表达的后续工作奠定坚实基础，并为进一步应用到临床判断HPV感染患者预后以及开发出具有预防功能的生物制剂和疫苗都具有广阔的前景和重大意义

参考文献

- [1] Bosch FX, Munoz N, Chichareon S *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer¹ *J Clin Pathol*, 2002, 55:244
- [2] Joel M.Palefsky and Elizabeth A.Holly. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epi,Bio&Pre*, 1995,1:415-428
- [3] J del Amo, C Gonzalez and J Losana *et al.*Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sex. Transm. Inf.* 2005,81:79-84
- [4]Eduardo L. Franco, Eliane Duarte-Franco and Alex Ferenczy. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001;164(7):1017-25
- [5] Hubbard RA. Human papollomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2003,127(8):940-945
- [6] F. Xavier Bosch, Mark Schiffman, Diane Solomon. Introduction: Future research directions in the Epidemiology of Human Papillomavirus and Cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*.2003, 31:1-2
- [7] Zhao Fanghui, Li Nan, Ma Junfei *et al.* Study of the association between human papillomavirus infection and cervical cancer in Xiangyuan county, Shanxi province. *Chin J Epidemiol*. 2001,22(5): 375-378
- [8] 谭晓燕, 赵静, 刘小宁, 等。珠海市正常人群妇女宫颈人乳头瘤病毒感染情况分析。中国妇幼保健, 2005, 20: 1726—1727
- [9] Burd EM. Human papollomavirus and cervical cancer.*Clin Micribio Rev*, 2003, 16(1):1-17
- [10] Castle, Philip E. Beyond human papillomavirus the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer. *The American Society for Colposcopy and Cervical Path*, 2004,8(3):224-230
- [11] Torres LA, Rojo HG, Torres RA, *et al.* Cervical cancer current view of its epidemiology and risk factors. *Gynecol Obstet Mex*, 2004,72:466-474
- [12] Velema JP, Ferrer A, Figueroa M, *et al.* Burning wood in the kitchen

increases the risk of cervical neoplasia in HPV-infected women in Honduras. *Int J Cancer*, 2002, 97 (4):536-541

[13] Schmitt M, Bravo I G, Snijders P J F, et al. Bead-Based Multiplex Genotyping of Human Papillomaviruses. [J] *J. Clin. Microbiol*, 2006, 44(2):504.

[14] Ugozzoli L A. Multiplex Assays with Fluorescent Microbead Readout: A Powerful Tool for Mutation Detection. [J] *Clin. Chem*, 2004, 11:1963.

[15] Munoz N, Bosch F X, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. [J] *N. Engl. J. Med*, 2003, 348:518.

[16] Dunbar S A. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. [J] *Clin. Chim. Acta*, 2006, 363.

[17] Martins T B, Burlingame R, von Muhlen C A, et al. Evaluation of Multiplexed Fluorescent Microsphere Immunoassay for Detection of Autoantibodies to Nuclear Antigens.

[J] *Clin. Diagn. Lab. Immun*, 2004, 11(6):1054.
Physician, 2003, 32(5):311.

[18] Bosch FX, Munoz N, Chichareon S *et al*. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55:244

[19] Kay P , Soeters R , Nevin J , et al . High prevalence of HPV 16 in South African women with cancer of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia[J]. *J Med Virol* , 2003 , 71 (2) : 265-273

[20]An HJ , Cho NH , Lee SY, et al . Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method[J]. *Cancer* , 2003 , 97 (7) : 1672-1680

[21]Levi J E , Kleter B , Quint WG, et al . High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil[J] . *J Clin Microbiol* , 2002 , 40 (9) : 3341-3345.

[22] J del Amo, C Gonzalez and J Losana et al. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain[J]. *Sex. Transm. Inf.* 2005,81:79-84

[23] Zenb I , Wilander E , Delius H , et al . Human papillomavirus 16 E6 variants

are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype [J] . Cancer Res ,1998, 58 :829- 833.

[24] Lochmuller H , Johns T , Shoubridge E A. Expression of the E6 and E7 genes of human papillomavirus (HPV16) extends the life span of human myoblasts[J] . Exp Cell Res ,1999 ,248 (1) :186 - 193.

[25] Torres LA, Rojo HG, Torres RA, et al. Cervical cancer current view of its epidemiology and risk factors[J]. Gynecol Obstet Mex, 2004,72:466-474

[26] Antoine Touze, Slimane El Mehdaoui, Pierre-Yves Sizaret et al. The L1 Major Capsid Protein of Human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system[J]. J. Clin. Microbiol, 1998, 36:2046-2051

[27] de Villiers, E. M. and C. Fauquet, et al . Classification of papillomaviruses[J]. Virology 2004.324:17-27

文献综述 人乳头瘤病毒的研究进展

1 人乳头瘤病毒的生物学简介

1.1 人乳头瘤病毒的基本结构

HPV 是一类分子量较小的双链环状 DNA 病毒, 专性侵染和寄生人体生殖器官及其它组织器官的上皮细胞^[1-2]。在病毒分类上, HPV 属于乳头瘤病毒科乳头瘤病毒属, 包含 100 多个专性侵染人类的病毒类型。HPV 基因组是一双链闭环 DNA, 分子量 5000kD, 各型 HPV 基因组 DNA 的长度在 7200-8000bp 之间^[3-5]。HPV 属于乳头瘤病毒超家族(Superfamily)的成员。这个超家族的病毒成员在长期的进化过程中还形成了专性侵染猴 (MPV)、牛 (BoPV)、狗(CPV)、兔(RPV)等哺乳动物的类型。这类病毒的共同特征是基因组结构比较简单, 编码 8 个自身复制所必须的蛋白, 病毒没有 RNA 阶段: 不携带反转录酶基因, 只能借助宿主细胞的反转录酶及其它必须宿主因子完成复制。侵染不同物种的乳头瘤病毒形态差别不大。

HPV 病毒在其生活史的晚期, 即将离开被侵染的宿主细胞时启动自身 L2 和 L1 蛋白基因表达, 形成包被病毒 DNA 的衣壳蛋白并自动完成装配。成熟的 HPV 病毒为圆形颗粒, 直径 52-55nm, 外壳主要由 72 个呈五角星形状的 L1 蛋白质五聚体组成, 基因组 DNA 包含在衣壳蛋白形成的外壳之中, 没有囊膜^[5]。由于该病毒迄今为止不能在离体细胞中培养繁殖, 有人通过表达病毒重组衣壳蛋白基因的方法在体外制成了外部形态结构与病毒几乎完全一样的类病毒颗粒 (Virus Like Particles, VLP)^[6]。VLP 颗粒在电子显微镜下的结构如图 8 所示。

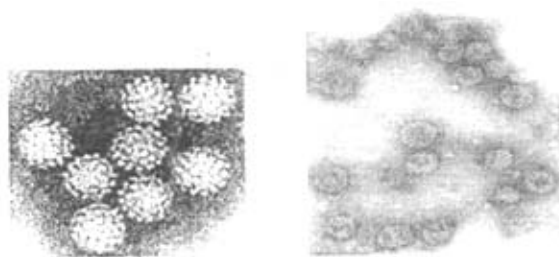


图 8 HPV 病毒颗粒及其类病毒颗粒在电子显微镜下的结构
Figure 8 The structure of the virus particles and virus like particles under the electron microscope

HPV 基因组编码 8 个参与病毒侵染、繁殖复制和包装的功能蛋白, 有 8 个开放式阅读框(图 2)。含 ORF 的编码 DNA 链, 按功能可分为三个结构域, 早期蛋白编码区(Early region, ER)、晚期蛋白编码区(Late Region, LR)和上游调控区(Upstream Regulatory Region, URR), E 区分为 E1-E7 开放阅读框架, 主要编码与病毒复制、转录、调控和细胞转化有关的蛋白。L 区分 L1 和 L2, 分别编码主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白。URR 位于 E 区与 L 区之间, 长约 1kb, 含有病毒基因组 DNA 的复制起点和基因表达所必须的调控元件^[7,8]。HPV 病毒的基因组结构及基因位置示意图如图 2。

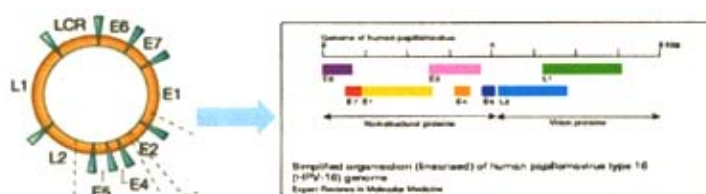


图 2 HPV 病毒的基因组结构及基因位置示意图
Figure 2 The genome structure and gene location of HPV

1.2 人乳头瘤病毒的生活史

HPV 病毒的生活周期大致可概括为侵染细胞—基因激活—DNA 复制—病毒包装—释放—侵染新的宿主细胞几个阶段, 该病毒和所感染的宿主角化细胞的分化程度相关联。上皮细胞微小的创伤使基层细胞暴露, 病毒便有机会入侵感染。导致病毒进入细胞内部的受体(Receptor)目前还不清楚, 但肝素硫酸盐(Heparin sulfate)似乎介导病毒与细胞最初的接触^[10]。感染的细胞可导致病毒基因的表达活化, 每个受感染的细胞大致可有 20-100 个病毒拷贝。在未分化的基层细胞内, 病毒的拷贝数保持相对稳定。最先被表达的蛋白 E1, E2 是病毒 DNA 的复制因子, 这些蛋白形成复合体和病毒复制的起始序列结合, 调集细胞的聚合酶和辅助蛋白介导复制^[11-13]。E1 蛋白同时有解旋酶的活性, 可以将病毒的 DNA 链在复制体形成之前解旋^[14]。E2 是结合在病毒 DNA 链特定位点的蛋白, 负责把 E1 调集到复制的起始序列, 同时调节病毒从早期启动子开始的转录^[15]。在低水平表达时, E2 结合它的识别序列, 活化早期启动子, 高水平表达时, 它抑制细胞的转录因子^[16]。由于 E1 和 E2 复制因子也是由早期启动子表达, E2 活化或抑制表达可以控制病毒在未分

化细胞内的拷贝数。E6 和 E7 蛋白在高危型 HPV 是病毒的癌蛋白,低危型 E6, E7 没有此功能。高危型 HPV 的 E6 与肿瘤抑制蛋白 p53,细胞内的连接酶 E6AP 形成三聚体,导致 p53 快速的失去抑癌作用^[17,18]。

E7 结合眼癌(Rb)家族的肿瘤抑制因子,和其他蛋白一样参与细胞周期的调节^[19,20]。在未感染病毒的上皮细胞内,当细胞离开基底层时经常会导致上基部细胞核苷酸的损失。当感染的细胞离开基底层时,由于 E7 蛋白的作用,在细胞的周期内仍然保持活性^[21],高度分化的细胞重新进入 S 期,活化细胞复制因子以满足病毒复制的需要。不仅病毒的癌蛋白需要细胞的永生化,延长细胞周期的分化能力,而且也需要在未分化的基层细胞保持染色体外病毒 DNA 的存在,这个机制是如何发生的尚不清楚^[22]。E4 和 E5 蛋白的功能还没有完全明白,但是他们都参与调节病毒的晚期功能^[23]。L1 和 L2 蛋白在晚期组合自发形成 20 面体衣壳。随着病毒粒子的进一步组装,成熟的病毒粒子从最上层的上皮细胞中释放出来^[24]。仍然不清楚宿主细胞的分化是如何活化病毒生产的生活周期。最可能的机制是病毒晚期启动子活化表达,引起高水平转录编码病毒复制蛋白的 E1 和 E2 基因和编码晚期蛋白的基因。不同于早期启动子,晚期启动子由 E2 蛋白调节,在细胞分化基础上高水平的表达导致病毒 DNA 的复制^[16]。模板数量的增加进一步导致复制蛋白表达的增加,可能是细胞内的因子或其他的病毒因子在正向调节细胞的分化,这些因子导致病毒基因晚期功能的活化,在低程度的感染时,高危型 HPV 的基因组是游离的,随着发展成高度的损害或癌,病毒的基因往往与宿主细胞的基因融合,融合是发生在 E2 ORF 内,导致 E2 抑制活性的失去,引起 E6 和 E7 高水平的表达^[25-30]。

在分化的上皮细胞内 HPV 基因表达的调控:在病毒生活周期的前期和晚期,有两个主要的启动子引导 HPV ORFs 的表达。多数 HPV mRNAs 为多顺反子,携带 3 个或更多的 ORFs 病毒早期基因表达的调节部分是通过选择性剪切机制。高危型 HPV 的早期启动子在 E6 ORF 的上游位点启动转录。调控早期启动子的转录因子结合位点位于 E6 上游 1 kb 的区域,这个区域可以叫长控制区或上游调控区域(URR)。不同 HPV 病毒亚型的 URR 区域有一些共同的转录因子结合位点^[31],也有一些是特异的转录因子结合位点,如在 URR 区就发现了角质化细胞特异的增强子。有一种观点认为正因为组成因子与特异形增强子的共同作用决定了病毒 mRNA 的细胞类型特异性表达。

角质化细胞在 URR 区域特异的增强子使得 HPV 有组织趋向性。推测这是在癌症里起作用的决定细胞特异性表达的普遍因素^[4]。感染生殖器的 HPV 亚型由位于 E7 ORFs 起始位点起始在上皮细胞分化时病毒后期的转录。病毒晚期基因的表达和上皮细胞分化的紧密联系暗示着特异性分化的细胞因子调控着这一程序。这些因子几乎没有发现,但是在上皮细胞分化时期,在晚期启动子区域有染色体重排的发生^[31]。

1.3 人乳头瘤病毒的类型划分

HPV 在长期的进化过程与人类宿主的免疫系统相互作用,形成了多种变异类型。人类的免疫系统保护人体免受有害微生物如病毒的侵害,能够在病毒入侵人体后通过特异的免疫反应清除病毒。而病毒则通过自身基因序列的突变逃避免疫系统的识别。那些逃避了免疫攻击的变异病毒在流行过程中重新被免疫系统识别,迫使病毒产生新一轮的变异。到目前为止,已经发现了上百种 HPV 的类型^[32-35]。可以说,HPV 众多的类型是病毒基因自身随机突变在宿主免疫系统选择压力之下相互作用的综合结果。

根据病毒的毒性或对人体致病力的强弱,HPV 病毒被分为低危型(Low risk)和高危型(High Risk)两个大的类群。低危型的病毒可以感染人体导致局部产生瘤疣等病变痛苦,但不造成对宿主致命的危害。这个类群的占 HPV 类型的大多数,典型代表有 HPV6, HPV11 型等等^[36]。高危险型 HPV 基因 E6, E7 能够干扰宿主细胞正常的细胞分裂调控机制,抑制或破坏肿瘤抑制基因 p53, RB 家族的活性而能够在侵染人体后导致宿主细胞发生癌变,直接威胁受感染者的生命。这个类群是 HPV 导致宫颈癌的病原和 HPV 防治的重点,其代表有 HPV16, 18, 31, 33, 58, 70 等型^[35-37]。

关于 HPV 类型的详细化分, Bosch et al.^[15]等人及 Bonnex and Reichman^[12]分别在文献综述及 HPV 的专著里有细致的描述。Bleen Burd 综合以前的结果,根据 HPV 侵染造成的危害疾病及部位把人们已知的 HPV 类型做了一个系统的化分总结。

HPV 病毒分型的主要依据之一是根据病毒 E6, E7 以及 L1 开放阅读框核苷酸碱基序列的变异程度^[38]。根据 Torrisi (2000 Eur. J. Gynecol. Oncol. 21:168-172.)的观点,当一个新的 HPV 病毒在关键序列区域(E6, E7 及 L1)的碱基变化之和与已知的 HPV DNA 序列的区别超过 10%时,或者说两个 HPV DNA 序列的同源性低于 90%时,就不再属于同一型。

也有学者认为 HPV 分型的主要依据应该是病毒免疫学的特征^[39, 40]。即当着某一特定序列的 HPV 诱导产生的抗体不能识别另一种 DNA 序列上有差别的 HPV 抗原时, 两种 HPV 则属于不同的类型。这种分类方法强调 HPV 病毒抗原表位氨基酸差异导致的免疫学及生物学差异、同时也与病毒 DNA 序列的差异程度相互对应更为合理。然而, 人体 HPV 抗体类型由于目前缺少相应特异抗原而很难实际区分, 这种分型方法目前尚不具有实际操作的意义。

当 HPV 间的基因组核苷酸碱基序列差异在 90-98%之间时, 即序列同源性小于 98%但大于 90%时, 两种 HPV 成为一个类型之内的不同亚型(Subtypes)^[38]。例如, 从世界各地收集到的 HPV16 的 DNA 序列有很多变异, 其同源性高于 90%, 属于 HPV16 型: 同时又被分为多个序列之间有 2-9%差异的组, 每一个组被认为是 HPV16 的一个亚型。这些 HPV16 亚型是否能够被同一 HPV16 的抗体识别尚属未知。

1.4 人乳头瘤病毒造成的疾病

HPV 感染在人群中较为普遍, 大部分人在性生活开始后, 都感染过该病毒, 由于 HPV 感染引起的疾病更是种类繁多, 并且不同的 HPV 型别会引起不同的疾病, 具体疾病与 HPV 亚型的关系见表 10, 表 11

表 10 由 HPV 引发的疾病
Table 10 The diseases caused by HPV

部位	皮肤	肛门和泌尿生殖道	呼吸道	口腔和消化道
	寻常疣	尖锐湿疣	喉乳头瘤	口腔尖锐湿疣
	扁平疣	宫颈疣	喉鳞状细胞癌	口腔寻常疣
	跖疣	女阴癌	扁桃体鳞状细胞癌	口腔乳头瘤
疾病	皮肤鳞状细胞癌	宫颈癌	癌	口腔鳞状细胞癌
		阴茎癌	肺鳞状细胞癌	口咽癌
		睾丸癌和直肠癌		食道鳞状细胞癌

表 11 不同 HPV 亚型与疾病的关系
Table 11 The relationship of different HPV types and diseases

疾病	HPV 病毒亚型	特性	传播途径	地区分布
宫颈鳞状上皮癌	16、18、31、 35、45	恶性肿瘤	性交	世界性
宫颈上皮内细胞 癌	16、18、31、 35、45	宫颈癌前期	性交	世界性
女阴、阴道、肛 门、阴茎癌	16、18	恶性肿瘤	性交	世界性
寻常疣	2、27、57、 78 等	皮肤角化	接触	世界性
扁平疣	3、4、10、 41 等	皮肤扁平狡猾的囊状 损害	接触	世界性
跖疣	1、63	足底超角化斑	接触	世界性
瘰癧疣	7	病理学上类似寻常疣	接触	世界性
生殖道疣（尖锐 湿疣）	6、11、16、 18、70、83	女阴、阴茎癌	性交	世界性
喉乳头瘤	6、11、30、57	喉癌	围产期感染	世界性
疣状表皮发育障 碍	5、8	斑丘疹进行性皮肤癌	不明	世界性

子宫颈癌

HPV 对人类健康造成的最大已知危害是高危类型 HPV 直接导致成年女性的子宫颈癌。病毒基因组携带的 E6 和 E7 基因是典型的致癌基因，在侵入人体表皮细胞之后，E6 和 E7 基因产物在病毒复制的早期阶段表达。E6 和 E7 蛋白与宿主细胞负责细胞分裂周期调控的蛋白在结构上有类似性，不仅严重干扰宿主的正常细胞周期调控，而且抑制肿瘤抑制因子 p53 的活性，所以，高危型的 HPV 反复侵染容易导致宫颈组织的细胞发生细胞形态异常，

最后演变成可以向身体其它组织部位扩散的恶性癌变。从一开始感染 HPV 到恶性肿瘤的发生一般都要经过 10 年或者更长的时间, 因此, 很少在年龄低于 25 岁的妇女中发现宫颈癌, 而宫颈癌的发生从 25 岁开始增多, 一直到 40 岁达到最高峰, 见图 9, 图 10。有关 HPV 导致子宫颈癌的可能性早就被临床医生指出, 但直到 1999 年才拿到确切的证据并得到了学术界的普遍承认^[41-43]。1999 年以后由于检测技术的进步, 在宫颈癌变组织样本中 HPV 高危型的检出率接近 100 %^[44,45]。迄今为止在所有危害人类的癌症中, 子宫颈癌是唯一明确了由 HPV 导致的癌症。

在全世界范围内, 每年大致有 50 万浸润性子宫颈癌被诊断出来, 在全部癌症人数里占第七位, 占有所有癌症新发病例的 5%。其中 80% 的病例发生在发展中国家, 占妇女所有癌症人数的 10%, 在妇女癌症人数里为第二位, 仅次于乳腺癌^[1]。我国地域广阔、人口众多, 每年仍有新发病例约 13.15 万, 占世界宫颈癌新发病例总数的 28.8%。近几年来, 据一些国家和地区报道, 宫颈癌的发病率和死亡率处于稳定水平且有增长的趋势, 尤其是年轻的宫颈癌患者开始增加。在我国也出现了宫颈癌的年轻病例逐年增加的趋势^[46]。

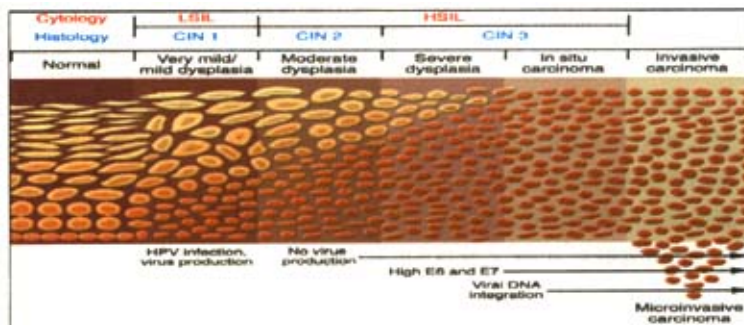


图 9 从良性宫颈瘤变到浸润性子宫颈癌的发展过程示意图。致癌型 HPV, 尤其是 HPV16 亚型的感染可以直接导致良性疣状病变、低度异常增生甚至是早期高度瘤变。原位癌一般在感染之后的几年里不会发生。HSIL(highgrade squamous intraepithelial lesion):高度; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion.

Figure 9 Progression from a benign cervical lesion to invasive cervical cancer. Infection by oncogenic HPV types, especially HPV16, may directly cause a benign condylomatous lesion, lowgrade dysplasia, or sometimes even an early high-grade lesion. Carcinoma in situ rarely occurs until several years after infection. HSIL, highgrade squamous intraepithelial lesion; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion.

其他癌症

除了子宫颈癌，越来越多的证据表明 HPV 还和其他严重危害人民生命健康的癌症相联系。临床检验发现 HPV 病毒在多种与上皮细胞组织相关的癌症样本中检出，包括直肠癌、结肠癌、口腔癌、食管癌、咽癌、皮肤癌等^[47-54]。

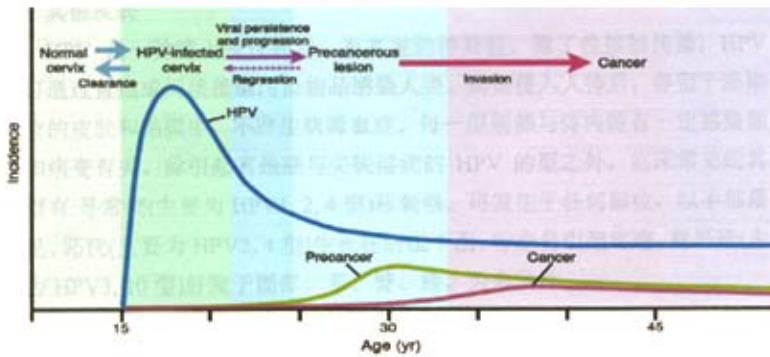


图 10 从宫颈 HPV 感染到癌前病变再到癌症发生的发展关系
Relationship among incidences of cervical HPV infection, precancer, and cancer.

这些癌症的病因学目前还不是十分清楚，HPV 对上述这些癌症致病性也需要更多实验证据来加以确定。但是，有一个现象不可忽视，这就是所有上述癌症都与上皮组织有关，而 HPV 有感染鳞状上皮细胞的组织趋向性，感染部位是特异地局限在含有鳞状细胞的上皮及其它组织。如果加上所有已知携带具有致癌能力的 E6 和 E7 癌基因的 HPV，HPV 在这些癌症中的致病地位是非常值得重视的。事实上，人们已经把直肠癌与 HPV 直接联系到了一起，因为在直肠癌中 HPV 的检出率已经很高^[48]。此外，HPV 病毒分别在水门、阴道、阴茎、口腔、咽等多种部位含鳞状上皮细胞的部位中检出。目前人们对 HPV 与许多癌症的致病关系的研究还在深入之中，还有很多未知等待回答和解释。例如，HPV 特定类型与这些癌症是否有一定联系，是否还有我们目前尚未知的其它高危类型等等。有可能 HPV 对人类健康的危害比我们目前知道的更为严重。

尖锐湿疣

尖锐湿疣(Genital warts, Condylomata acuminata,CA)又名性疣(Venereal

warts),肛门生殖器疣(anogenital warts),是由某些特定类型的 HPV 感染所引起的男女生殖器、会阴和肛门部位的表皮瘤样增生,多发生于青壮年男女^[55, 56]。本病流行于全世界,是目前欧美及非洲国家最常见的性传播疾病(STD)之一^[55, 57, 58]。CA 在我国的发病率较高,近年又迅速增加,成为仅次于淋病的第二大性病^[57, 59]。

其他疾病

HPV 是一种嗜上皮性病毒,有高度的特异性,除了性接触传播,HPV 还可通过直接或间接接触污染物品感染人类。病毒侵入人体后,停留于感染部位的皮肤和粘膜中,不产生病毒血症。每一型别都与体内特有一定感染部位和病变有关。除引起宫颈癌与尖锐湿疣的 HPV 的型之外,临床常见的其他型有:寻常疣(主要为 HPV1, 2, 4 型)称刺瘊,可发生于任何部位,以手部最常见。跖疣(主要为 HPV2, 4 型)生长在胼胝下面,行走易引起疼痛。扁平疣(主要为 HPV3, 10 型)好发于面部、手、臂、膝,为多发性。

1.5 HPV的致病机理

子宫颈癌是已知的少数几个由病毒侵染导致癌症的典型例子。HPV 致癌的分子机理研究相对比较深入,其核心是病毒携带的 E6, E7 等致癌基因干扰宿主细胞正常的周期调控。

E6 致癌蛋白的功能高危型和低危型 HPV 病毒的 E6 蛋白大致有 150 个氨基酸,包括两个有基序 Cys-X-X-Cys 的锌指结合区域,HPV 高危型的 E6 蛋白分布在细胞核和细胞质,已知它和 12 个以上的蛋白结合^[60],见图 11。高危型 HPV E6 的单独表达可引起 NIH 3T3 细胞的转化和人乳房上皮细胞的永生化^[61, 62]。相反,人角质化细胞有效的永生化需要 E6, E7 的共同表达^[63]。E6 蛋白功能的最初研究是因它和 p53 的相互作用开始的,p53 是一个肿瘤抑制因子,可调节参与细胞周期调控蛋白的表达,包括细胞周期蛋白激酶的抑制子 p21 一旦发现损坏的 DNA, p53 开始活化引起 p21 高水平的表达,引起细胞周期停止,凋亡^[64]。感染的细胞就是通过细胞凋亡的机制,阻止病毒蔓延到临近细胞。许多病毒就是通过参与此机制阻止细胞凋亡,有时就会引起恶性肿瘤。为阻止凋亡前 p53 的活化,使细胞周期继续进行, E6 和 p53, E6AP 连接酶组成三聚体^[65],引起 p53 的遍在蛋白化(Ubiquitination), 26S 蛋白酶体(Proteasome)的退化,导致 p53 的半衰期在角质化细胞里从几个小时减到少于 20min^[66, 67]。

E6 还可通过 p53 的共激活剂 p300/CBP 间接下调 p53 的活性^[68, 69]因为 p53 调节细胞周期 G1/S 和 G2/M 的检测点, 它的快速降低, 导致这些调控的失去, 引起染色体复制和中心体异常^[70-72]。E6 的突变体 E6*是剪切的结果, 可以阻止 E6, E6AP 结合^[73, 74], E6*可能可以阻止 p53 的退化, 因此细胞永生化的只有通过全长 E6 蛋白的调节^[75]。HPV-16 的 E6 突变体不能使 p53 退化, 但可保持乳房上皮细胞的永生化的, 类似的其他 E6 的突变体保持对 p53 的降解, 但是失去了永生化的能力^[76, 77]。这些暗示着细胞的永生化的蛋白的相互作用而小是与 p53 的作用。另一个重要的相互作用是 E6 与 PDZ 蛋白家族的作用, PDZ 蛋白作为分子骨架支持信号的转导^[78, 79], PDZ 家族成员结合在高危型 E6 蛋白 C 末端, 可引起 PDZ 蛋白的降解^[80-83], 同样通过野生型转基因小鼠表达的 E6 蛋白没有与 PDZ 蛋白的结合区域, 小鼠小不能活化 p53, 但也小能进行上皮细胞的增生^[84], 不清楚是否是信号转导途径受 E6 和 PDZ 蛋白的结合的作用还是 PDZ 蛋白的家族成员对于这些显型的重要性。

高危型 E6 蛋白对于细胞永生化的另一个重要功能是可活化表达端粒酶的催化亚基 hTPRT^[85-87], 端粒酶是一个有四个亚单位的酶, 能够给染色体端粒序列添加 6 个碱基单位的重复序列。端粒酶的活性通常局限在胚胎细胞, 在体细胞缺乏。缺少端粒酶的活性可导致端粒缩短, 随后细胞分化, 最终衰老, 相反, 在大多数癌症 hTPRT 表达重新活化, 可引起端粒酶活性恢复^[88], E6 活化 hTPRT 的转录是通过和 Myc, Sp-1 的联合作用^[89-93]。最近的研究显示 E6 可以结合 Myc 和它的共同作用因子 Max, 引起 hTPRT 的启动子转录^[94]。分析 E6 的突变体降解 p53 和活化 hTPRT 证明, 活化 hTPRT 对细胞的

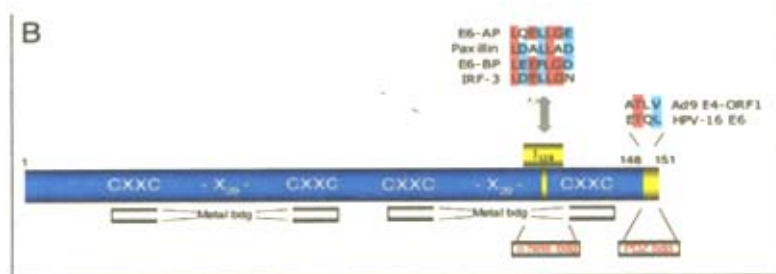


图 11 HPV16 亚型 E6 致癌蛋白结构示意图。

Figure 11 Schematic representation of the HPV-16 E6 oncoprotein.

E7 致癌蛋白（见图 12）的功能

高危型和低危型 E7 蛋白主要在细胞核，大约有 100 个氨基酸。E7 的单独表达可以转化永生化的 NIH 3T3 鼠细胞，永生化的自然宿主细胞角质化细胞的频率很低^[97, 98]，有效的永生化的角质化细胞需要高危型 E6, E7 蛋白的共同作用^[97]。转基因小鼠在单独表达 E7 时可有低度的损害和可发展成恶性肿瘤的高度子宫颈发育异常，同时 E6 转基因小鼠仅仅发展成低度的 hyperproliferative 损害^[98]。E7 蛋白的主要活性是他们和 Rb 蛋白家族结合的能力^[99]。Rb 家族的蛋白包括 Rb, p107, p130, 这些蛋白在细胞周期里有不同程度表达^[99-101]。当 Rb 在细胞的整个周期组成型表达时，p107 主要在 S 期合成，p130 主要在 G0 期合成^[101]。非磷酸化形式的 Rb 家族与 F2F/DP1 转录因子组成复合体与参与细胞 S 期进行或凋亡的启动子结合，抑制转录^[102, 103]。从 G1 期进入 S 期，细胞周期蛋白激酶与磷酸化的 Rb 家族形成复合体，导致 Rb 家族与 F2F 转录因子复合体脱离，转录基因参与 DNA 的合成，E7 结合 Rb 家族，Rb 家族与 F2F/DP1 转录因子不分离，引起相应的基因构成性的活化^[102, 103]，同时 E7 与 Rb 家族结合，可介导 Rb 家族通过泛素蛋白体通路降解^[100, 102, 104, 105]，E7 与 Rb 结合在未分化的细胞内，对于 HPV31 型游离基因拷贝数的保持是重要的^[106]。低危型 E7 和 Rb 家族也结合，只是结合方式不同于高危型。抑制 F2F 转录因子诱导的启动子不仅通过和 Rb 的结合，也需要和高危型 E7 蛋白结合的蛋白组氨酸脱乙酰基酶(HDACs)结合^[107, 108]。HPV 感染为阴性的细胞，Rb 家族和 HDACs 结合，将其聚集到 F2F 转录因子诱导的启动子，HDACs 在所有组织中表达，可以将组蛋白赖氨酸富集的末端乙酰基去掉，因此 HDACs 可直接脱去 F2F 转录因子的乙酰基，使其失去功能^[109]。

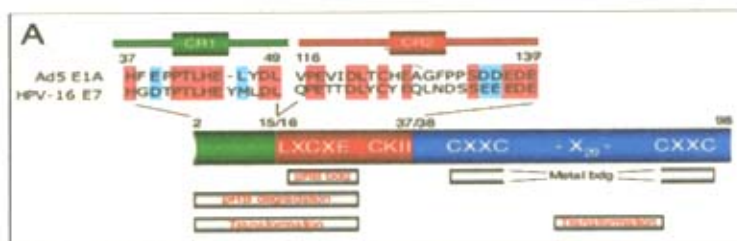


图 12 HPV16 亚型 E7 致癌蛋白结构示意图。

Figure 12 Schematic representation of the HPV-16 E7 oncoprotein.

E1 和 E2 复制蛋白 所有乳头瘤病毒最保守的 ORFs 编码 E1 蛋白, E1 蛋白大约有 68 kDa 大小, 在 HPV 感染为阳性的细胞内呈低水平表达, E1 蛋白的功能在于识别起点, 同时有 ATPase 和 3'-5'解旋酶的活性^[113-115]。E1 蛋白在 HPV 复制的起始点识别 AT 富集的序列^[116-118], 和 E2 结成复合体后, 才能牢固的与起始序列相结合^[119-122]。在 E2 上的结合位点临近 E1 的识别序列, 因此 E2 可将 E1 作用于起始序列, 一旦结合, E1 形成六聚体(hexamers), 从而和 DNA 有更高的亲和力^[123]。伴随着其它解旋酶, 病毒 DNA 通过 E1 六聚体的中心^[124]。在伴随蛋白的辅助下, E1 蛋白复合体解开超螺旋 DNA, 同时和 DNA 聚合酶结合, 使细胞的复制复合体到病毒复制的起始位点^[125-127]。同时 E1 的 DNA 结合区域的晶体结构可以识别 DNA 延伸的环和螺旋^[128]。E1 在分化的细胞内是如何进行调节的仍然不清楚。

E2 蛋白可调节病毒 DNA 的复制和转录^[129], 大致有 50 kDa 大小, 以二聚体形式起作用, 感染 HPV 后, 早期基因的转录主要通过 URR 区的细胞转录因子结合序列的活化^[130], 低浓度时 E2 进一步活化早期基因的表达, 高浓度时, 通过干扰转录因子和识别序列的结合来抑制早期基因的表达^[131,132]。调节病毒表达可控制未分化细胞内的拷贝数, 在分化状态, 未被 E2 抑制的晚期启动子活化, 引起 E1 和 E2 蛋白表达量上升, 病毒 DNA 开始复制^[133]。E2 可以与 C/EBP 转录因子形成复合体, 调节参与细胞分化的许多基因的启动子^[134]。E2 蛋白的过表达可通过 p53 的独立机制引起细胞凋亡^[135,136]。

E1-E4 和 E5 早期蛋白 HPV 的 E4 和 E5 ORFs 在病毒生活周期早期的表达, 只是作为多顺反子第三和第四 ORFs 进行转录, 相反, 在分化上皮细胞内的表达是作为晚期转录物的第一和第二 ORFs。这些蛋白的合成主要是在 HPV 生活周期的前期, E4 在所有的 HPV 蛋白里, 表达量最高。F4 的 ORF 的转录是剪接转录, 和 F1 的前 5 个氨基酸融合, 产生 E1-E4 的融合蛋白, E4 的 ORF 缺少 AUG 起始密码子, 利用 E1 序列起始翻译蛋白^[137], 所有的乳头瘤病毒在病毒生活的早期表达 E1-E4。E4 蛋白有调节基因表达的功能并且可与 RNA 解旋酶 E4-DBD 相作用, E4-DBD 参与 mRNA 剪切, 转运, 和起始翻译^[138]。HPV-11 和 HPV-16 的 E1-E4 的过表达, 可引起小同类型的细胞在 G2 期停止^[139]。E5 蛋白是小的疏水性蛋白, 功能还未确定, 蛋白位于 endosomal 膜和高尔基体, 偶尔在细胞膜可以发现^[140]。HPV 的 E5 蛋白在分

化的上皮细胞内可能主要在病毒生活周期的早期表达,在分化细胞内,E5的缺失,可引起病毒后期功能的活性减退^[141]。

高危型 HPV 的致癌机理见图 13 所示。

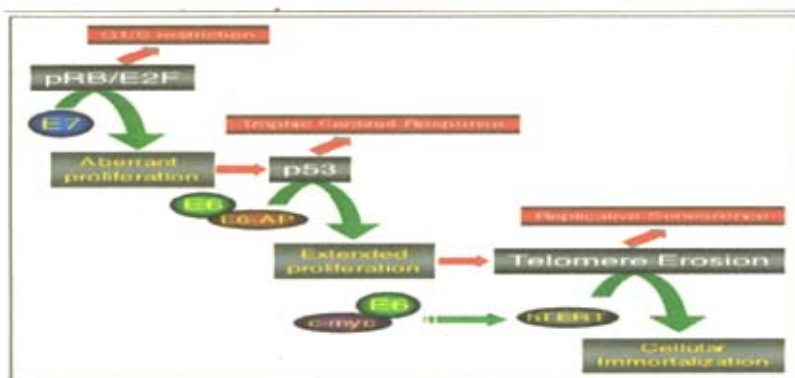


图 13 高危型 HPV 致癌机制示意图。pRB 和 p53 肿瘤抑制途径的失活以及接触性端粒酶亚单位 hTERT 的表达是其致癌途径中关键的步骤,而且体外试验已经证明这些步骤对于人上皮细胞的完全转化是必需的。

Figure 13 Schematic outline of critical steps of high-risk HPV-induced carcinogenesis. Inactivation of the pRB and p53 tumor suppressor pathways and expression of the catalytic telomerase subunit hTERT constitute a subset of the steps that have been shown to be necessary for the generation of fully transformed human epithelial cells in vitro.

1.6 HPV的流行病学研究

HPV 传染主要是通过皮肤的接触,流行病学的研究显示生殖器部位 HPV 的感染和宫颈癌的形成主要通过性活动,非性活动的传染也可以发生,例如长久的共用污染的衣物,HPV 病毒对热和干燥有很大的抵抗力^[142]。一个人如果有多个性伴侣,或者他(她)的性伴侣有多个性伴侣,感染 HPV 的危险性就高。避孕套不能充分的保护而不受 HPV 的感染。年龄是 HPV 感染的危险性的重要决定因素^[143,144]。多数宫颈癌是发生在柱状细胞和鳞状细胞的结合处,位于宫颈内膜柱状上皮和宫颈外鳞状上皮之间,在这个位点,有组织转化(metaplastic)的变化,HPV 感染的最大危险是伴随着最大组织转化的行为,例如青春期,第一次怀孕。HPV 的感染在性活动活跃的 18-30 岁的年轻妇女是最普遍的,30 岁以后感染率急剧降低,然而宫颈癌多发生在 35 岁以后的妇女,可能是在年轻一些的时候感染了 HPV,逐渐转化成癌,高危致癌的

HPV 型的持续感染是宫颈癌发生的重要决定因素,检测高危型 HPV 的感染是必须的,但高危型 HPV 的感染也不足以发展成宫颈癌,研究显示一个妇女是否发展成宫颈癌,依赖于其他因素与高危型 HPV 的共同作用,对 HPV 感染的初级免疫反应是细胞介导的,破坏细胞免疫例如肾移植或免疫缺陷性病毒病可增加 HPV 感染的危险性^[145,146,148]。长期使用口服避孕药、吸烟、多次妊娠可使宫颈疾病程度加深^[143,149]。由吸烟引起的局部免疫抑制和香烟里的诱导有机体突变的物质可以使 HPV 持续存在于宫颈细胞里,引起癌变,类似于在肺里作用的结果^[150]。吸烟对深度的宫颈疾病是独立于 HPV 感染的最重要危险因素^[143]。

曾经认为在宫颈癌的发生上,一些性传播病毒起协同作用,例如痘疹病毒 2 型在宫颈癌的初始可能起作用^[151]。巨细胞病毒 Cytomegalovirus (CMV),人痘疹病毒 human herpesvirus 6, 7 型(HHV-6, HHV-7)也能在宫颈中检测到,共同感染使这些病毒与 HPV 相互作用。CMV 和 HHV-6 曾被假定为癌基因及转化因素,但是病毒数据并不支持这一假定^[152-155]。用 PCR 法检测异常的宫颈细胞内的 CMV, HHV-6, HHV-7 病毒,显示在宫颈癌的形成上不是共同作用因素^[156]。

1976 怀疑 HPV 有致癌的作用^[157],1978 年第一个感染生殖器 HPV 型被确认^[158],1981 年 Zur Hausen et al.报道在宫颈肌瘤中检测到 HPV 的 DNA,在 1989 年发现高危型 HPV-16 的 E6, E7 蛋白能永生化人角质细胞^[159],80 年代末,发现几乎 100%的宫颈鳞状细胞癌,70%的宫颈腺癌有 HPV DNA 的存在^[160],1991 年 11 月国际癌症研究组织(IARC)和国际健康组织(WHO),基于流行病学和实验室的数据,总结出 HPV 和宫颈癌的关系是不容置疑的,感染 HPV 是引起宫颈癌产生的原因^[161]。

曾经认为病毒的数量和病的严重程度有直接关联。用定量的型特异型 PCR 检测 HPV 16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV6, HPV 11 显示 HPV16 可以有比其他型更高的病毒量,只有 HPV16 HPV 病毒量的增加可以增加宫颈疾病的严重程度^[162,163]。所有的高危型即使量很低,也能导致恶性肿瘤^[164]。

在宫颈肌瘤的形成中一个重要的因素是 HPV 突变体的作用^[165]。HPV 突变体在生物学,化学特性,致病性上是有区别的^[159,166]。依据 HPV16 的 L1, L2, LCR 区域序列上的变异,HPV-16 分为五个亚型:欧洲,亚洲,亚洲-美洲,

非洲-1, 非洲-2。型内序列的变异在 HPV16 的 E2, E4, E5, E6, E7 基因也能发现, 因为 LCR 包含有几个 E2 结合的位点, 几个转录因子的结合位点, 所以在 LCR, E2, E6, E7 基因的核苷酸序列的突变, 可能有功能上的意义。HPV 特异型突变体的癌基因在地域上和种族的起源上有区别, 欧洲人群 HPV 在 LCR 结合区域的点突变, 比欧洲原型的转录活性提高^[167]。对 Costa Rica 的 10, 000 名妇女的一个大的临床研究可以看到欧洲 HPV16 的原型和三种突变体^[168], 一个最主要的突变体 EP, 有单个点的突变, 不会引起疾病, 第二突变体是 HL (CHSILs) 有关, 另一突变体 NE 在 LCR 基因内有多点替换, 和 HSIL 及癌变相联系。型内的序列变异同时在其他高危型, 中度危害的型, 低危型 HPV6, HPV 11 做了研究, 发现低危型的型内序列变异不会提高启动子的活性及 E6, E7 蛋白表达^[165]。多重基因型 HPV 的感染可以发生, 可以使宫颈疾病更严重^[169, 170]。

检测细胞样品里存在的 HPV DNA 的技术得到了发展, 逐渐多的证据证明 HPV 参与相当多的癌症: 阴门癌, 肛管癌, 肛周癌, 阴茎癌, 直肠癌, 结肠癌, 口腔癌, 食管癌, 头颈部的癌, HPV 几乎和所有的宫颈癌前病变及浸润性的宫颈癌有关系^[171], 80 种 HPV 已被测序, 从部分测序的 DNA 片段看, 可能存在着 200 多种 HPV。其中大致有 40 多种 HPV 特异地感染男性女性生殖器, 其中三分之二作为高危型: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 52, 54, 56, 58, 59, 68, 69, 等型别。在大多数国家, HPV16 在宫颈癌中超过 50-60%, HPV18 占 10-12%, HPV31 和 HPV45 各为 4-5%^[172], 有坚实的证据支持, 宫颈癌的发病机制, 首先要有高危型 HPV 的感染, HPV 感染的平均过程, 高危型 HPV 大约为一年, 低危型更少^[173]。很多妇女有暂时的 HPV 感染会引起细胞学异常 CIN I, 大多可自行恢复, CIN III 的损伤和宫颈癌很少能自我恢复。

国内对 HPV 和宫颈癌的相关性, 及 HPV 感染率进行了有益的探索, 中国医学科学院肿瘤研究所等, 对宫颈癌组织中 HPV16 型 DNA 相关序列进行检测研究: 江西医学院采用 PAP 免疫酶染色法, 对各类宫颈组织进行 HPV 特异性抗原的检测, 均提示宫颈癌的发病与 HPV 感染有关。有关 HPV 感染的现患率研究, 由于检测标本的来源、使用的 HPV 检测技术、检测 HPV 的型别以及研究地区人群差异等各有不同, 各研究报道的 HPV 感染阳性率高低不一。许多应用直接检测法如核酸印迹原位杂交或斑点印迹杂交法其感染率大约在 10-20%, 而用 PCR 法结果更高。1996 年郑云忠等应用通用引物聚

合酶链反应(GP PCR)技术对 818 例泌尿生殖道标本进行人乳头瘤病毒(HPV)总检出率为 37.65%^[174]。1996 年李昭等对 253 例妇科感染患者用 PCR 方法 HPV 分型, HPV 总阳性率为 52.3 %^[175], 1999 年王金花等应用聚合酶链反应检测荷兰 155 名子宫颈普查的妇女子宫颈刮片中的 HPV DNA, 应用线样探针分析法(LiPA)进行, 包括 HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56 和 58 的基因分型。总检出率为 60%, 其中在宫颈细胞学检查正常或仅有炎症病变的妇女中 HPV DNA 阳性率为 43%, 而在宫颈细胞增生小良或宫颈细胞癌的妇女其阳性率为 81.2%^[176]。2002 年汪凡军等基因杂交捕获法高危型 HPV DNA 检测检出阳性标本 53 例, 阳性率 30.1%^[177]。2003 年中国医学科学院等利用 Hybrid Capture 2 test (HC II)法对山西襄垣县, 阳城县的 9683 名 30-50 岁的妇女进行 HPV DNA 筛查, HPV 的感染率为 27.5%^[178]。

2 HPV 检测方法的研究进展

HPV 病毒无法在体外培养, 在体内也不能被诱导出易于检测的免疫反应。因此无法采用血清学检测的方法对其进行分型。HPV 分型主要是依靠病毒核酸的杂交试验及病毒基因组的物理图谱分析等方法来确定, 通常以 50% 的同源性作为分型的标准。近年来, 国际病毒界又提出以病毒 L1, E6 和 E7 基因的同源性作为分型标准。如果不同毒株间上述核苷酸序列的同源性低于 90%, 则被认为属于不同的型别。HPV 检测广泛用于 HPV 相关恶性病变的自然史和病因学研究, 目前它正在成为宫颈癌的另一种或是附加的筛检方法, 对宫颈癌的预防及治疗有着非常重要的意义。^[179-182]

2.1 传统的细胞学检测

在细胞学检查相对非常昂贵的地区, 肉眼检查 (VIA) 后立即采取冷冻疗法是一种可行的替代细胞学检查的方法, 即在肉眼检查后, 将组织暴露于极低温度下以根除异常细胞。

2.1.1 细胞学技术

细胞学技术是检测 HPV 感染的一种简便而经济的方法, 常用于 HPV 的过筛检查。它通过 HPV 感染所致宿主细胞发生的形态学改变而推断 HPV 感染的发生。临床上应用较多的是传统的巴氏涂片法, 目前巴氏分级法由于其局限性已逐渐被 TBS 分类法代替, TBS 分类法相比巴氏分级法有明显的优点, 其不但要对细胞病理学检查情况有概述性的诊断, 而且要有具体的详细描述, 同时还对标本取材、涂片制作提出要求, 对送检标本质量做出评价。但实际

工作中由于刮片、固定方法或阅片技术等多种因素的影响常造成较高的假阴性率。且细胞学技术不能直接检测到HPV 本身,无法对HPV 进行分型。

近年来,随着标本采集及制片、阅片技术的进步出现了薄层液基制片技术、计算机辅助检测技术等,主要有:TCT法、PAPNET法等。TCT 法是通过将宫颈拭子收集的标本置于Thinprep PC 缓冲液中,用于HPVDNA 检测。研究认为TCT法对检测子宫颈腺癌比普通的细胞学检查有较高的敏感度(87 % VS 55 %)。此法被美国食品与药物管理局(FDA) 批准用于筛查HSIL 和LSIL。PAPNET 法是应用宫颈脱落细胞薄层涂片自动筛查系统检测HPV感染的方法。该方法是在计算机辅助下对宫颈细胞学涂片进行自动化快速图像分析,极大的提高了特异性和敏感性,诊断的敏感性为90~100%,阳性预测值为34 %~94%,阴性预测值为89%~100%但这些方法仍有不足之处,即检查所需费用高,需额外工作量,操作人员须专门的训练等。^[183, 184]

2.1.2 阴道镜

阴道镜在放大10~40 倍作用下检查宫颈和下生殖道上皮病变,通过对HPV 所致子宫颈病变的观察及对典型部位的组织进行活检以诊断HPV 感染的发生。它可对生殖道上皮病变,尤其是子宫颈上皮病变进行定位,而且能对局部病变进行活检的同时予以治疗。弥补了细胞学检查的不足,敏感性也大大提高,对于诊断外生湿疣和CIN I级的假阴性率均为5%。有学者认为对于检出CIN 最经济有效的方法仍是标准的细胞学检查和阴道镜指导下的宫颈活检。但阴道镜形态与病毒类型之间无明显的联系,不能对HPV 进行分型检测,且阴道镜检查的准确性通常受病人自身及检查者经验和水平的影响。^[185]

2.1.3 组织病理学

大多数病理学家认为“挖空细胞”对诊断HPV 感染有特异性但并非唯一的诊断依据。如今已发现“挖空细胞”作为组织学诊断标准,其特异度为95.26%,灵敏度为77.93%,假阳性率为4.74%,假阴性率为22.0%。因此须结合其他镜下形态综合分析以作出正确诊断。

2.1.4 血清学方法

HPV 感染的血清学检测包括免疫组织化学法、放射免疫沉淀法、酶联免疫吸附法等。免疫组织化学法通过抗L1蛋白抗体与外壳蛋白反应检测HPV。放射免疫沉淀法测定CIN和宫颈癌患者血清中HPV16抗体水平。酶联免疫吸附试验(ELISA) 测定针对型特异性L1 类病毒颗粒(VLP) 的IgM 和IgG抗体。

HPVVLPA ELISA 的灵敏度为50 %~60 % ,特异性超过90 %。HPV 血清学检测属于型特异性,用来提示既往或当前感染。但是,因为缺少标准化和重复性,作为过去和现今HPV 感染标志检测的血清学试验并未被临床广泛采用。

[186,187]

2.2 分子生物学方法

2.2.1 直接杂交分析

2.2.1.1 原位杂交

宫颈刮片或活检标本的 HPV 可通过原位杂交来检测,该法或与其它标志物一起能对感染样品中的 HPV 进行单独或共同定位,但 HPV 分型鉴定仍需不同型特异性探针进行多次的原位杂交分析。此方法的敏感性高,特异性中等,但操作繁琐,极为费时。[188]

2.2.1.2 Southern 印迹杂交或斑点杂交法

该方法是将 HPV DNA 从临床标本中直接分离出来,通过 Southern 印迹或斑点杂交进行检测。但检测不能达到临床所需的灵敏度,且操作繁琐,费时耗力,不适合于高通量临床样品的筛查,目前较少使用。[189]

2.2.2 基于 PCR 的检测方法

PCR 方法包括 HPV DNA 模板的制备、PCR 扩增和产物的分析 3 个步骤。

2.2.2.1 HPV DNA 的 PCR 扩增

PCR 是目前应用最为广泛的基因扩增方法。对于 HPV DNA 的检测,有两种不同的 PCR 方法,即型特异或通用引物 PCR。型特异的 PCR,此方法是基于应用共有或通用的 PCR 引物来扩增广谱基因型。HPV DNA PCR 引物常设计在不同基因型 HPV 最保守的 L1 区,有的也设计在 E1 区(见图 2)。

目前有 3 种不同的通用引物设计方案用于扩增广谱 HPV DNA。包括(1)在基因组保守序列区设计一对只完全匹配一种或几种 HPV 基因型的引物,如 1995 年 Jacobs 等设计的 GPS+/6+,为了弥补它与其他 HPV 亚型间的错配,PCR 必须在较低的退火温度下进行。(2)采用一组简并引物如 MY09/11}, PCR 也必须在较低的退火温度下进行。该组引物中含有简并碱基,因在其合成时掺入某个核苷酸有很大的随机性,故很难保证各批引物间的均一性,从而影响其扩增的效率和重复性;(3)在病毒基因组的同一位置设计几对正向/反向引物,且这些引物不含简并碱基但含黄嘌呤,如 SPF10 和 PG-MY09/11。因黄嘌呤可和任何碱基匹配,故合成的引物具有较好的重复性,且 PCR 可

在优化的退火温度下进行。因此,无论对较新的 HPV 基因型还是对已知的生殖道 HPV PGMY 和 SPF10 的扩增效率要比 MY09/11 高。此外,待扩增片段的大小也影响 PCR 扩增的效率。总的来讲,PCR 效率随着扩增片段的延长而降低。加之有些临床标本经过甲醛固定、石蜡包埋等处理后,其中的 DNA 也遭到不同程度的降解,这对产生大片段扩增产物的引物不利。因此,在上述这些引物中,SPF10 扩增 HPV DNA 的效率最高(65bp)、GPS+/6+次之(150bp)、PGMY 位列第三 (450bp)。

上述这些 PCR 扩增方法均不能进行病毒载量的定量分析,且在 PCR 扩增后尚需要大量的检测工作要做。目前已有实时 PCR 用于 HPV DNA 检测的报道,即型特异 PCR 引物与型特异的荧光标记探针相结合用于实时监测。PCR 产物可通过通用的荧光染料如 SYBR Green 进行检测,但其特异性不高且易产生假阳性结果。因为序列的异质性,单个荧光探针无法检出广谱 PCR 扩增产物中不同的 HPV 基因型,需要一组探针;加之这些探针各自都有不同的特性,故对它们不易进行标准化。基于同样的原因,通过实时 PCR 对 HPV DNA 进行定量也只局限于型特异的 PCR 产物。^[190,191]

2.2.2.2 扩增产物的检测和分析

PCR 产物的凝胶电泳或测序分析也可用于 HPV DNA 的检测或基因分型,扩增产物的杂交分析可大大提高其分析的灵敏度和特异性。Southern 印迹分析被认为是最经典、最好的方法,但该方法费时耗力,不适合于临床常规应用和高通量分析。现就这些方法分述如下:

PCR 产物直接测序法

可用于 HPV DNA 分型,但同时分析多个扩增产物中不同的 DNA 序列时,不是十分灵敏,特别是对 HPV 混合感染的临床样品更是如此。

PCR RFLP 法

用适当的限制性内切酶消化 PCR 产物,从而产生大小不同的 DNA 片段,再通过凝胶电泳分离这些片段,根据电泳的带型就可区别不同的 HPV 基因型。该法简单但操作繁琐且需要适当的限制性内切酶;对混合感染的临床标本分析更为复杂,同时也不易检出含拷贝数少的某些基因型。

PCR ELISA(PCR enzyme-linked immunosorbent assay)

一条 PCR 引物用生物素标记,扩增后的 PCR 产物被抗生物素一链霉菌白包被的微孔板所捕获,再同一组地高辛标记的混合探针杂交,随后再加入

抗地高辛-酶结合物和底物, 根据所显颜色的深浅或所测的 O.D 值就可判断 HPV DNA 存在与否。依所检测的 HPV 基因型不同, 该法检测 HPV 的灵敏度可达 10200 拷贝, 然而单个 HPV 基因型的鉴定尚需在单个孔中进行, 因而需要大量的 PCR 产物。目前 Roda 等已建立了 PCR-化学发光酶免疫分析法, 他们制造了一种新型的聚乙烯微孔板。该板有 24 个主孔, 每个主孔又含有 7 个小孔, 这样就可同时检测 7 种 HPV 基因型, 同时使 PCR 产物的用量大为减少。

反向杂交法

它允许 PCR 产物同时与多个寡核苷酸探针杂交, 为 HPV 基因分型提供了一种迷人的分子诊断工具, 目前报道最多, 应用最广。该法是将多个寡核苷酸探针固定在固相上, 然后将之同液相中的 PCR 产物进行杂交, 通过一次杂交分析就可同时检出若干个 HPV 基因型。目前有线状探针分析(LiPA)、线杂交分析和反向线杂交 3 种方法。这些方法大同小异, 只是在鉴定 HPV 基因型的数量和检测某些 HPV 基因型的敏感性方面有所不同而已。^[192,193]

2.2.3 HPV DNA 直接捕获法

杂交捕获(HC, Hybrid Capture Systems, DigeneCorp., USA)采用分子杂交+化学发光+信号放大原理, 此系统应用两组不同的混合 RNA 探针(即所谓的鸡尾酒探针), 一组含有 HPV6, 11, 42, 43 和 44 型 5 种低危型探针, 而另一组则含有 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 和 68 型 13 种高危型探针。利用一种非同位素信号放大系统并基于 HPV DNA 杂交到溶液中标记 RNA 探针的方法, 结合后的 DNA-RNA 杂交体被微孔板所捕获并被随后所加的特异性单克隆抗体和化学发光底物所检测。该法为目前唯一以商品化试剂盒提供的检测方法, 且有足够的科学证据支持其应用于临床的检测系统, 并得到美国 FDA 认证, 已成为许多国家的标准方法被广泛应用于临床研究中。

但此方法也有一些不足。最近, Poljak 等采用 PCR-RFLP 法对 HC 进行了方法学评价。结果发现, 两法的诊断符合率为 89.7% HC 漏检率为 10.3%。此外, HC 的检测下限约为 500 个基因组 HPV DNA, 且只能进行分组鉴定而不能进行个体基因分型, 两组混合探针间存在的交叉反应也影响其检测的准确性。由于 HPV 感染的状态要求对特定基因型 HPV 进行鉴定, 故该法不能用于诸如型特异性疫苗或型特异性药物的研究和疗效观察。^[194]

2.2.4 基因芯片技术

该技术是近几年随着人类基因组计划(HGP) 的研究发展应运而生的, 又称 DNA 芯片, 是指将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针, 有规律地排列固定于支持物上, 然后与待测的标记样品的基因按碱基配对原理进行杂交, 同时检测比较生物样品中多个已知或未知序列的表达情况, 再通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描, 并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号作出比较和检测, 从而迅速得出所要的信息。它具有多样品并行处理能力、分析速度快、所需样品量少、污染少等优点。近几年, 基因芯片技术发展迅速, 取得了长足进步, 目前已有检测 23 个基因型的芯片。但基因芯片技术需昂贵的尖端仪器, 在软件上也存在一些问题如样品准备复杂, 技术较难掌握, 且检测的敏感度低。尽管如此, DNA 芯片技术作为临床 HPV DNA 高通量筛查试验具有不可小视的应用前景, 有可能使 HPV 检测技术焕然一新。^[190,195]

2.2.5 HPV 液态悬浮芯片分型检测方法^[196]

HPV 液态悬浮芯片分型检测方法是以美国 Luminex 公司的液态生物芯片为平台而建立的, 该技术平台是美国 FDA 批准的作为唯一一种准许上市的“生物芯片”。本研究所建立的方法是将用通用引物 GPS/GP6 扩增的 PCR 产物, 与分别偶联有 13 种型别的 HPV 探针的 13 种荧光微球杂交, 经过仪器检测可分辨每一种荧光微球上的信号, 从而确定 HPV 的型别。该方法具有高通量, 高灵敏的, 省时省力等优点, 因而具有广阔的市场前景。

HPV 感染的量、型和持续时间都成为 HPV 检测的重要内容。大量 HPV 病毒感染有可能增加发生 HPV 相关宫颈损害的危险性, 但常规病毒量检测的临床意义还不很清楚, 主要因为检测的方法学存在着很大的差异。

参考文献

- [1] Villa LL, Bernard HU, Kast M, et al. Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference-HPV 2001. *Virus Res.* 2002;89: 163-173
- [2] Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin* 2002;52:342-362
- [3] http://www.who.int/reproductive-health/cancers/cervical_cancer_prevention_control_programs.pl.pdf
- [4] Chang, Y. E., and L. A. Laimins. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 2000. 74:4174-4182.
- [5] Baker, T. S., W. W. Newcomb, N. H. Olson, et al. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 1991.60:1445-1456.
- [6] Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, L, Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell.* 2000.5:557-567
- [7] Howley, P. M. Papillomaviridae: the viruses and their replication, In B. N. Fields, D Knipe, 1996: 947-978.
- [8] Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 1985.145 (1): 181-185
- [9] Apt, D., R. M. Watts, G. Suske, and U. Bernard. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transcription correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology* 1996.224:281-291.
- [10] Joyce, J. G., J. S. Tung, C. T. Przysiecki, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. 1999.
- [11] Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, et al. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human

DNA polymerase alpha/primase. *J. Biol. Chem.*1999. 274:2696-2705.

[12] Frattini, M. G, and L. A. Laimins. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994.91:12398-12402.

[13] Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, et al. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990. 250:1694-1699.

[14] Hughes, F. J., and M. A. Romanos. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21:5817-5823.

[15] Cripe, T. P., T. H. Haugen, J. P. Turk, et al. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 1987. 6:3745-3753.

[16] Steger, G, and S. Corbach. Dose-dependent regulation of an early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.*1997. 71:50-58.

[17] Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990. 63:1129-1136.202.

[18] Werness, B. A., A. J. Levine, and P. M. Howley. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.*1990.248:76-79.

[19] Dyson, N., P. M. Howley, K. Monger, and E. Harlow. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* .1989.243: 934-937

[20] Monger, K., B. Werness, N. Dyson, et al. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 1989. 8:4099-4105.

[21] Cheng, S., D. Schmidt-Grimminger, T. Murrant, T, et al. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1997.9:2335-2349.

[22] Thomas, J. T., W. G. Hubert, M. N. Ruesch, et al. Human papillomavirus

type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999.96:8449-8454.

[23] Fehrman, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins. Human papillomavirus type 31 ES protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* 2003. 77:2819-2831.

[24] Hummel, M., J. B. Hudson, and L. A. Laimins. Differentiation induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 1992. 66:6070-6080.

[25] Androphy, E. J., N. L. Hubbert, J. T. Schiller, et al. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J.* 1987.6:989-992.

[26] Baker, C. C., W. C. Phelps, V. Lindgren, M. J. , et al. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 1987.61:962-971.

[27] Banks, L., P. Spence, E. Androphy, N. , et al. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *J. Gen. Virol.* 1987.68:1351-1359.

[28] Jeon, S., B. L. Allen-Hoffmann, and P. F. Lambert. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* 1995.69:2989-2997.

[29] Schneider-Gadicke, A., and E. Schwarz. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* 1986.5:2285-2292.

[30] Schwarz, E., U. K. Freese, L. Gissmann, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985. 314:111-114.

[31] Del Mar Pena, L. M., and L. A. Laimins. Differentiation-dependent chromatin rearrangement coincides with activation of human papillomavirus type 31 late gene expression. *J. Virol.* 2001.75:10005-10013.

[32] Bioscience Division, Los Alamos National Laboratory, the Regents of the

University of California. HPV sequence database: HPV types and hosts database online. Available at: <http://hvp-web.lanl.gov/stdgen/virus/cgi-bin/hpvorganisms.cgi?dbname-hpv>. Accessed August 23, 2004.

[33] Chan, S. Y, H. Delius, A. L. Halpern, and H. U. Bernard. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* 1995.69:3074-3083.

[34] Kleter, B., L. van Doorn, L. Schrauwen, A. et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 1999.37:2508-2517.

[35] zur Hausen, H. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1996.1288:F55-F78.

[36] Jacobs, M. V, A. M. de R. Husman, A. J. C. van den Brule, et al. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.* 1995.33:901-905.

[37] Kataja, V, S. Syrjanen, R. Mantyhjarvi, M. et al. Prognostic factors for cervical human papillomavirus infections. *Sex. Transm. Dis.* 1992.19:154-160.

[38] Torrisi, A., A. Del Mistro, G. L. Onnis, et al. Colposcopy, cytology and HPV testing in HIV-positive and HIV-negative women. *Eur. J. Gynecol. Oncol.* 2000. 21:168-172.

[39] Christensen, N. D., and J. W. Kreider. Antibody-mediated neutralization in vivo of infectious papillomaviruses. *J. Virol.* 1990.64:3151-3156.

[40] Christensen, N. D., J. W. Kreider, K. V. Shah, and R. F. Rando. Detection of human serum antibodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions. *J. Gen. Virol.* 1992. 73:1261 — 1267

[41] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995. 87:796-802

[42] Walboomers JMM, Meijer CJLM. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol* 1997. 181:253-4.

- [43] Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999. 189:12-9.
- [44] Mu.N, Bosch FX, Desanjose S, Tafur L, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992.52:743-9.
- [45] Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993.85:958-64.
- [46] 中国肿瘤数据库/子宫颈癌/宫颈癌流行病学
- [47] Ther Umsch. Human papillomaviruses 2003 60(10):595-604.
- [48] 曹建彪, 李世荣, 朱秋屏等, 人乳头瘤病毒与结直肠癌相关性的研究. *世界华人消化杂志* 2000. 8(1):111-112
- [49] Frisch, M., and R. Biggar. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet* 1999.354:1442-1443.
- [50] Hemminki, K., C. Dong, and M. Frisch. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur. J. Cancer Prev.* 2000. 9: 433-437
- [51] 马群凤, 江红, 冯永强等, 人食管鳞状细胞癌标本中乳头状瘤病毒 DNA 的检测. *世界华人消化杂志* 2000. 8(11):1218-1224
- [52] U. Ribeiro Jr, M. C. Posner, A. V. Safatle-Ribeiro & J. C. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Reynolds British Journal of Surgery* 1996. 83(9) :1174.
- [53] D Dreau, C Culbertson, S Wyatt, WD Holder Jr. et al. Human papillomavirus in melanoma biopsy specimens and its relation to melanoma progression. 2000 .231(5):664-671.
- [54] H zur Hausen. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996. 1288(2):F55-F78.
- [55] http://www.cnstd.com.cn/sex_disease/shiyou.htm
- [56] [http://www.msdcchina.com.cn/manual/section 13/13 — 164/k 16. html](http://www.msdcchina.com.cn/manual/section_13/13_164/k_16.html)
- [57] Frega A, Stentella P, Tinari A, et al. Giant condyloma acuminatum or

buschke-Lowenstein tumor: review of the literature and report of three cases treated by CO₂ laser surgery. A long-term follow-up. *Anticancer Res.* 2002, 22:1201-1204.

[58] <http://www.hpv88.com/wenku/Article/hpv/200406/104.html>

[59] <http://www.merck.com/mmhe/sec17/ch200/ch200i.html>

[60] zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* .2002.2:342-350.

[61] Kiyono, T., S. A. Foster, J. I. Koop, J. K. et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*. 1998. 396:84-88.

[62] Liu, Y., J. J. Chen, Q. Gao, S. Dalal, Y. et al. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol.* 73 : 7297-7307

[63] Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. et al. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.*1989.8:3905-3910.

[64] Ko, L., and C. Prives. p53:puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996.10: 1054-1072.

[65] Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.*1991.10:4129-4135.

[66] Hubbert, N. L., S. A. Sedman, and J. T. Schiller. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.* 1992.66:6237-6241.

[67] Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.*1993.13:775-784.

[68] Lechner, M. S., and L. A. Laimins. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* 1994.68:4262-4273.

[69] Zimmermann, H., R. Degenkolbe, H. U. Bernard, et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by

- targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.*1999.73:6209-6219.
- [70] Foster, S. A., G. W. Demers, B. G. Etscheid et al. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.*1994. 68:5698-5705.
- [71] Kesis, T. D., R. J. Slebos, W. G. Nelson, M. B. Human papillomavirus16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1993. 90:3988-3992.
- [72] Thompson, D. A., G. Belinsky, T. H. Chang, D. L. et al. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic1997.15 : 3 025-3 03 5.
- [73] Pim, D., A. Storey, M. Thomas, P. Massimi, and L. Banks. Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene* 1994.9:1869-1876.
- [74] Scheffner, M., J. M. Huibregtse, and P. M. Howley. Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994.91:8797-8801.
- [75] Bedell, M. A., K. H. Jones, S. R. Grossman, and L. A. Laimins. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J. Virol.* 1989. 63:1247-1255.
- [76] Kiyono, T., S. A. Foster, J. I. Koop, J. K. et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.*1998. 396:84-88.
- [77] Kao, W. H., S. L. Beaudenon, A. L. Talis, J. M. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J. Virol.*2000. 74:6408-6417.
- [78] Craven, S. E., and D. S. Bredt. PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell.* 1998. 93:495-498.
- [79] Gomperts, S. N. Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* .1996.84:659-662.

- [80] Kiyono, T., A. Hiraiwa, M. Fujita, Y. et al. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.1997. 94:11612-11616.
- [81] Lee, S. S., B. Glaunsinger, F. Mantovani, L. Multi — PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4- ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol*.2000.74:9680-9693.
- [82] Lee, S. S., R. S. Weiss, and R. T. Javier. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*1997. 94:6670-6675.
- [83] Nakagawa, S., and J. M. Huibregtse. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Bio*1.2000.20:8244-8253.
- [84] Nguyen, M. L., M. M. Nguyen, D. Lee, A. E. et al. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J. Virol*. 2003.77:6957-6964.
- [85] Klingelhutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*.1996.380:79-82.
- [86] Meyerson, M., C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. hEST2, the telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization.. *Cell*. 1997. 90:785-795.
- [87] Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* .1997.277:955-959.
- [88] Liu, J. P. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J*. 1999.13:2091-2104.
- [89] Greenberg, R. A., R. C. O'Hagan, H. Deng, Q. Xiao, S. R et al. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene*. 1999. 18:1219-1226.
- [90] Kyo, S., M. Takakura, T. Taira, T. Kanaya, H. Spl cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene

(hTERT). *Nucleic Acids Res.* 2000. 28:669-677

[91] Oh, S. T., S. Kyo, and L. A. La 17. imins. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Spl binding sites. *J. Viro*1.2001.75:5559-5566.

[92] Wang, J., L. Y. Xie, S. Allan, D. Myc et al. activates telomerase. *Genes Dev.* 1998.12:1769-1774.

[93] Wu, K. J., C. Grandori, M. Amacker, N. et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat. Genet.* 1999.21:220-224.

[94] Veldman, T., X. Liu, H. Yuan, and R. Schlegel. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003.100:8211-8216.

[95] Oh, S. T., M. S. Longworth, and L. A. Laimins. 2004. Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11 .*J. Virol.* 78:2620-2626.

[96] Thomas, J. T., W. G. Hubert, M. N. Ruesch Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1999. 96:8449-8454.

[97] Meyerson, M., C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* .1997.90:785-795.

[98] Riley, R. R., S. Duensing, T. Brake, K. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 2003. 63:4862-4871.

[99] Dyson, N., P. M. Howley, K. Monger, and E. Harlow. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* . 1989. 243:934-937

[100] Berezutskaya, E., B. Yu, A. Morozov, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family

- proteins by the HPV 16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ.* 1997. 8:1277-1286.
- [101] Classon, M., and N. Dyson. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.* 2001. 264:135-147.
- [102] Edmonds, C., and K. H. Vousden. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virol.* 1989. 63:2650-2656.
- [103] Weintraub, S. J., K. N. Chow, R. X. Luo, S. H. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* .1995. 375: 812-815.
- [104] Jewers, R. J., P. Hildebrandt, J. W. Ludlow, B. Kell, et al. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol.* 1995. 66:1329-1335.
- [105] Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri, et al Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene.* 2001. 20:4740-4749.
- [106] Longworth, M. S., and L. A. Laimins. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 2004. 78:3533-3541.
- [107] Brehm, A., E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. et al Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* .1998. 391:597-601.
- [108] Ciccolini, F., G. Di Pasquale, F. Carlotti, L. et al. Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* 1994. 9:2633-2638.
- [109] Marks, P., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 2001. 1:194-202.
- [110] Hurford, R. K., Jr., D. Cobrinik, M. H. Lee, and N. Dyson. pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev.* 1997. 11:1447-1463.
- [111] Hashida, T., and S. Yasumoto. Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J. Gen. Virol.* 1991. 72:1569-1577
- [112] Solinas-Toldo, S., M. Durst, and P. Lichter. Specific chromosomal

imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997.94:3854-3859.

[113] Hughes, F. J., and M. A. Romanos. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.*1993. 21:5817-5823.

[114] Seo, Y. S., F. Muller, M. Lusky, and J. Hurwitz. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993.90:702-706.

[115] Yang, L., I. Mohr, E. Fouts, D. A. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*1993. 90:5086-5090.

[116] Frattini, M. G, and L. A. Laimins. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*1994. 91:12398-12402.

[117] Frattini, M. G, and L. A. Laimins. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 1994.204:799-804.

[118] Muller, F., T. Giroglou, and M. Sapp. Characterization of the DNA binding activity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J. Gen. Virol.*1997. 78:911-915.

[119] Dixon, E. P., G. L. Pahel, W. J. Rocque, J. A. et al. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 2000.270:345-357.

[120] Frattini, M. G, and L. A. Laimins. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*1994.91:12398-12402.

[121] Lu, J. Z., Y. N. Sun, R. C. Rose, W. et al Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J. Virol.*1995. 67:7131-7139.

[122] Sun, Y. N., J. Z. Lu, and D. J. McCance. Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication

- p>of the origin.
- Virology*
- .1996.216:219-222.
- [123] Sedman, J., and A. Stenlund. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.*1998. 72:6893-6897.
- [124] Liu, J. S., S. R. Kuo, A. M. Makhov, D. M. et al Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.*1998. 273:30704-30712.
- [125] Amin, A. A., S. Titolo, A. Pelletier, D. et al Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology*2000. 272:137-150.
- [126] Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, L. T. Human papillomavirus DNA replication. interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J. Biol.Chem.*1999. 274:2696-2705.
- [127] Masterson, P. J., M. A. Stanley, A. P. Lewis, et al .A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J. Virol.* 1998.72:7407-7419.
- [128] Enemark, E. J., G. Chen, D. E. Vaughn, A. et al .Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol. Cell* 2000.6:149-158.
- [129] Laimins, L. A. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses, In D. J. McCance (ed.) 1999:201-223.
- [130] Steger, G, and S. Corbach. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* 1997.71:50-58.
- [131] Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.*1997. 71:9343-9349.
- [132] Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 1991.5:1657-1671.
- [133] Klumpp, D. J., and L. A. Laimins. Differentiation-induced changes in

- promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* 1999. 257:239-246.
- [134] Hadaschik, D., K. Hinterkeuser, M. Oldak, H. J. The papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J. Virol.* 2003.77:5253-5265.
- [135] Dowhanick, J. J., A. A. McBride, and P. M. Howley. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Viro.* 1995. 69:7791-7799.
- [136] Goodwin, E. C., E. Yang, C. J. Lee, H. W. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97:10978-10983.
- [137] Remm, M., A. Remm, and M. Ustav. Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *J. Virol.* 1999.73:3062-3070.
- [138] Yoshioka, N., H. Inoue, K. Nakanishi, K. Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K- ras. *J. Virol.* 2000.74:1008-1013.
- [139] Davy, C. E., D. J. Jackson, Q. Wang, K. Identification of a G2 arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 2002.76:9806-9818.
- [140] Conrad, M., V. J. Bubb, and R. Schlegel. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Viro.* 1993. 67:6170-6178.
- [141] Fehrman, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Viro.* 2003. 77:2819-2831.
- [142] Roden, R. B., D. R. Lowy, and J. T. Schiller. Papillomavirus is resistant to dessication. *J. Infect. Dis.* 1997. 176:1076-1079.
- [143] Adam, E., Z. Berkova, Z. Daxnerova, J. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am. J.Obstet.Gynecol.* 2000.182:257-264.

- [144] J del Amo, C Gonzalez and J Losana et al. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sex. Transm. Inf.* 2005,81:79-84
- [145] Burk, R. D., P. Kelly, J. Feldman, J. Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* 1996.23:333-341.
- [146] Calore, E. E., S. M. M. Pereira, and M. J. Lavalieri Progression of cervical lesions in HIV-seropositive women: a cytological study. *Diagn. Cytopathol.* 2001.24:117-119.
- [147] Cubie, H. A., A. L. Seagar, G. J. Beattie, S. A longitudinal study if HPV detection and cervical pathology in HIV infected women. *Sex. Transm. Infect.* 2000.76:257-261.
- [148] Torrisi, A., A. Del Mistro, G. L. Onnis, F. Colposcopy, cytology and HPV testing in HIV-positive and HIV-negative women. *Eur. J. Gynecol. Oncol.* 2000.21:168-172.
- [149] Brisson, J. K. Morin, M. Fortier, M. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low and high-grade lesions. *Am. J. Epidemiol.* 1994. 40:700-710.
- [150] Yang, X., G. Jin, Y. Nakao, M. Malignant transformation of HPV-16 immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. *Int J. Cancer* 1996. 65:338-344.
- [151] Zur Hausen, H. Human genital cancer: synergism between two virus infections and or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet* 1982. ii:1370-1372.
- [152] Chen, M., N. Popescu, C. Woodworth, Z. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J. Viro.* 1994. 68:1173 — 1178.
- [153] Razzaque, A., O. Williams, J. Wang, and J. S. Rhim. Neoplastic transformation of immortalized human epidermal keratinocytes by two HHV-6 DNA clones. *Virology* 1993.195:113 — 120.
- [154] Romano, N., F. M. Romano, E. Viviano, F. Rare association of human

herpesvirus 6 DNA with human papillomavirus DNA in cervical smears of women with normal and abnormal cytologies. *J. Clin. Microbiol.* 1996. 34:1589-1591.

[155] Shen, C. Y., M. S. Ho, S. F. Chang, M. S. et al. High rate of concurrent genital infections with human cytomegalovirus and human papillomaviruses in cervical cancer patients. *J. Infect. Dis.* 1993. 168:449-452.

[156] Chan, P. K., M. Y. Chan, W. W. Li, D. P. Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors? *J. Clin. Pathol.* 2001. 54:48-53.

[157] Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 1976. 36:(2 pt 2):530.

[158] Orth G, Favre M, Jablonska S, et al. Viral sequences related to the human papillomavirus in genital warts. *Nature.* 1978. 275:334-336.

[159] Monger K, Phelps WC, Bubb V, et al. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 1989. 63 :4417-4423.

[160] Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol.* 1999. 189:12-19.

[161] Bosch FX, Munoz N, Shah KV, et al. Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. *Int J Cancer.* 1992. 52:171-173.

[162] Swan, D. C., R. A. Tucker, G. Tortolero-Luna, M. F. et al Human papilloma(HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.* 1999. 37:1030-1034.

[163] Zerbini, M., S. Venturoli, M. Cricca, G. et al 2001. Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. *J. Clin. Pathol.* 54:377-380.

[164] Zur Hausen, H. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1996. 1288:55-78.

[165] Giannoudis, A., and C. S. Herrington. Human papillomavirus variants and

- squamous neoplasia of the cervix. *J. Pathol.* 2001.193:295-302.
- [166] Veress, G, K. Szarka, X.-P. Dong, L. et al Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* 1999. 80:1053-1043.
- [167] Dong, X.-P., F. Stubenrauch, E. Beyer-Finkler, et al 1994. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer* 58: 803-808.
- [168] Hildesheim, A., M. Schiffman, C. Bromley, S. et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer*, 2001.Inst. 93 :315-318.
- [169] Jacobs, M. V., P. J. Snijders, A. J. van den Brule, T. J. et al .A general primer P5_/GP6()-mediated PCR enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings.*J. Clin. Microbiol.* 1997.35:791-795.
- [170] Quint, W. G. V., G. Scholte, L. J. Van Doorn, BComparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF 10 PCR and HPV genotyping. *J. Pathol.* 2001.194:51-58.
- [171] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-265.
- [172] Bosch FX, de Sanjose S. Chapter Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:3-13.
- [173] Schiffman M, Kjaer SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:14-19.
- [174] 郑云忠, 林光, 黄以兰等应用通用引物聚合酶链反应技术检测生殖道人乳头瘤病毒, 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9 (2):166
- [175] 李昭张士伟刘静, 女性生殖道人乳头瘤病毒感染与宫颈癌前病变和宫颈癌的关系, 中国肿瘤临床, 1999 ; 26 (2) :109
- [176] 王金花, Judith Bakkers, Willem J. Melethers G子宫颈刮片中人乳头瘤病毒的基因分型. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999;13(1):9 [177] 汪凡军, 薛耀

华, 刘颢微等基因杂交捕获法检测高危型人乳头瘤病毒在宫颈癌筛查中的应用, 中华临床医药杂志 2002, 5

[178] 乔友林、章文华、李凌等。子宫颈癌筛查方法的横断面比较研究。中国医学科学院学报, 2002 年第 24 卷第 1 期, 第 50-53 页。

[179] Herrero R , Hildesheim A , Bratti C , et al . Population - based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural costa rica. Natl Cancer Inst , 2000 ;92 :464-474

[180] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev , 2003 ;16 :1-175

[181] Keating JT , Ince T , Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. Adv Anat Pathol ,2001 ;8 :83-92

[182] Da Silva DM, Eiben GL , Fausch SC , et al . Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. J Cell Physiol , 2001 ; 186(2) :169-182

[183] Schorge JO , Saboorian MH , Hynan L , et al . Thinprep detection of cervical and endometrial adenocarcinoma : a retrospective cohort study .Cancer , 2002 ;96 :338-343

[184] Obwegeser JH , Brack S. Does liquid - based technology really improve detection of cervical neoplasia ?A prospective , randomized trial comparing the thinprep pap test with the conventional pap test , including follow- up of HSIL cases. Acta Cytol , 2001 ;45 :709-714

[185] Duensing S , Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. Prog Cell CycleRes , 2003 ; 5 :383-391

[186] Josephine A , Catherine HK, Cecile TB , et al . Genmic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. J Infec Dis , 2004 ;190 (1) :46-52

[187] Petoh J , Gilham C , Deacon J , et al . Cervical HPV infection and neoplasia in a large population - based prospective study : the manchest cohort. J British Cancer , 2004 ;91 (5) :942-953

[188] Tucker RA , Unger ER , Holloway BP , et al . Real time PCR-Based fluorescent essay for quantitation of human papillomavirus types 6 , 11 ,16 and 18. Mol Diagn , 2001 ;6(1) :39-47

[189] Yang H , Yang K, Khafagi A , et al . Sensitive detection of human papillomavirus in cervical , headPneck , and schistosomiasis - associated bladder malignancies. Proc Natl Acad Sci USA , 2005 ; 102(21) :7683-7688

[190] Sherman ME , Lorincz AT , Scott DR , et al . Baseline cytology , human papillomavirus testing , and risk for cervical neoplasia : a 10 - year cohort analysis. J Natl Cancer Inst , 2003 ;95 :46-52

[191] Levert M, Clavel C , Graesslin D , et al . Human papillomavirus typing in routine cervical smears : results from a series of 3778 patients.Gynecol Obstet Fertil , 2000 ;28 (10) :722-728

[192] Solomon D , Schiffman M, Tarone R , et al . Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of

underdetermined significance : baseline results from a randomized trial. J Natl Cancer Inst , 2001 ;93 (4) :293-299

[193] Schneider A , Hoyer H , Lotz B , et al . Screening for high – grade cervical intra - epithelial neoplasia and cancer by testing for high -risk HPV , routine cytology or colposcopy. Int J Cancer , 2000 ;89(6) :529-534

[194] Clavel C , Masure M , Levert M, et al . Human papillomavirus detection by the hybrid capture 2 assay : a realiable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. Diagn Moi Pathol , 2000 9(3) 145-150

[195] Christopher P , CrumJ , Beach L , et al . Dynamics of human papillomavirus infection between biopsy and excision of cervical intraepithelial neoplasia: results from the ZYC101a protocol. J Infec Dis , 2004 ; 189 (4) :1348-13

[196] Ugozzoli L A. Multiplex Assays with Fluorescent Microbead Readout: A Powerful Tool for Mutation Detection. [J] Clin. Chem, 2004, 11:1963.

在读期间发表论文及待发表的论文

- 1.朱一剑,丁显平,周仲春等. 妇科疾病患者中人乳头瘤病毒(HPV)感染的分子流行病学调查. 中国妇幼保健, 已接受
- 2.刘思瑶,丁显平,朱一剑等. 液相芯片技术在人乳头瘤病毒检测和分型中的应用. 四川大学学报(自然科学版), 已接受
- 3.朱一剑,丁显平,王旭东等. 中国西南地区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. 中华医学遗传学杂志, 已投稿

致 谢

四川大学研究生三年的学习生涯中，老师的指导和关怀，同学的友情和帮助，家人的支持与关爱一直是我学习、生活的动力，使我三年的学习生活过得充实而快乐。未来的日子里，我将永不忘怀在我学习生活中关爱我的人们。

首先，我要衷心地感谢我的导师丁显平教授在学习和生活上给予我的无微不至的关怀。本论文是在导师丁显平教授的悉心指导和大力支持下完成的。丁老师广博的学识、敏捷的思维、严谨的治学态度以及对科学的献身精神令我终身受益。丁老师豁达、正直、诚实的处事之道为我树立了典范。在生活中，丁老师对我亦给予无微不至的关怀，丁老师时常叮嘱我们注意身体健康，时常关心我们的情绪状况，经常主动帮助我们解决生活困难。在我研三的一年里，丁老师更是多次和我谈心，帮助我铺平未来的道路。在此，谨表示我最衷心的感谢和诚挚的敬意，祝愿老师万事如意，身体健康。

另外，在我完成论文的过程中，还得到了很多老师和同学的关心和支持。真诚地感谢四川省肿瘤医院张科同志，重庆市肿瘤医院妇瘤科黄裕老师，四川省生殖健康研究中心附属医院、成都市锦江区妇幼保健院、成都阳光妇科医院、成都康桥医院以及维多利亚女子医院检验科的同志们，他们在标本的采集及病理学鉴定等方面给予了很大的帮助；另外，由衷地感谢本实验室的李郑、魏霞、赵跃梅等工作人员，以及我的师弟师妹：周仲春、魏萍、倪虹、曾索、聂涌、邓莉、王欢等，他们对我的实验都给予了宝贵的意见和极大的帮助，在此一并致谢。

最后，特别感谢我的父亲、母亲、姐姐、姐夫，因为有了他们的支持和鼓励，我才能顺利完成我的学业，是他们在遇到困难时给予了我无限的精神支持和莫大鼓舞。

人乳头瘤病毒的基因分型及HPV16亚型L1、E6和E7基因的克隆和序列分析

作者: [朱一剑](#)
学位授予单位: [四川大学](#)

本文读者也读过(8条)

1. [任茁, 吴宏伟, 宋杰, REN Zhuo, WU Hong-wei, SONG Jie](#) 人乳头瘤病毒16型E6和E7基因特征分析[期刊论文]-[中华实验和临床病毒学杂志](#)2009, 23(2)
2. [孙肖红, 孙亚洲](#) 杆状病毒表达系统及其在HPV预防疫苗研究中的应用[期刊论文]-[国外医学\(肿瘤学分册\)](#)2009, 28(2)
3. [罗京资, 宇丽, 周羽竝, 刘红, 刘萍, 李发涛, 李冬艳, 马团, LUO Jing-zi, YU Li, ZHOU Yu-bing, LIU Hong, LIU Ping, LI Fa-tao, LI Dong-yan, MA Tuan](#) 广东地区宫颈癌组织HPV18L1基因的克隆及序列分析[期刊论文]-[暨南大学学报\(自然科学与医学版\)](#)2009, 30(2)
4. [熊光武, 袁杨, 李萌, 郭红燕, 张小为, XIONG Guang-Wu, YUAN Yang, LI Meng, GUO Hong-Yan, ZHANG Xiao-Wei](#) 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[期刊论文]-[遗传](#)2010, 32(4)
5. [赵继红, 卢义生, 王晓文, 尹有群](#) 高危型人类乳头瘤病毒的检测在宫颈癌筛查中的应用[期刊论文]-[海南医学](#)2009, 20(6)
6. [晋红中, 王家璧, 王宏伟](#) 宫颈鳞状细胞癌及尖锐湿疣中 HPV 16-E6、 HPV16-E7蛋白的表达[期刊论文]-[临床皮肤科杂志](#)2001, 30(2)
7. [曹毅, 庄亦仁](#) HPV感染与细胞免疫[期刊论文]-[浙江临床医学](#)2000, 2(4)
8. [曲蓓蕾](#) 基于PsV中和技术的新疆伽师县某乡维族妇女HPV16和HPV18流行现状研究[学位论文]2010

引用本文格式: [朱一剑](#) 人乳头瘤病毒的基因分型及HPV16亚型L1、E6和E7基因的克隆和序列分析[学位论文]硕士
2007