

石河子大学

硕士学位论文

新疆维、汉族妇女宫颈癌人乳头瘤病毒基因分型及HPV16型E6、
E7基因变异研究

姓名：刘伟

申请学位级别：硕士

专业：医学妇产科学

指导教师：周瑾

2011-06

摘 要

目 的: (1) 了解新疆维、汉族妇女宫颈癌病变中 HPV 的感染情况, 并进一步探讨其与 HPV 感染的关系。(2) 了解新疆地区宫颈癌病变中 HPV16 型 E6 和 E7 基因变异情况, 筛选出热点变异。

方 法: (1) 应用反向点杂交技术分别对 60 例宫颈鳞癌标本 (其中维吾尔族 30 例, 汉族 30 例) 进行 HPV 检测, 所得数据用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。(2) 收集宫颈鳞癌标本, 针对 HPV16 型单一感染标本设计 E6 和 E7 基因特异性引物, 用 PCR 方法从宫颈鳞癌组织中获得各基因的全长序列, 并构建克隆载体 pUCm-T, 进行序列分析, 并与德国标准株对比, 筛选出热点变异。

结 果: (1) ①60 例宫颈鳞癌组织中 HPV 的阳性率为 95%(57/60), 其中维吾尔族宫颈鳞癌 HPV 的阳性率为 96.6%(29/30), 汉族宫颈鳞癌 HPV 的阳性率为 93.3%(28/30), 两个民族 HPV 阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。②60 例宫颈鳞癌组织中共检测到 6 种 HPV 基因型, 分别为 HPV16, 56, 58, 18, 68, 35 均为高危型感染, 其中 HPV16 最常见, 检出率为 91.7%(55/60), 其次是 HPV56, 23.3%(14/60); 另外, 60 例宫颈鳞癌中共检测到 HPV 多重感染 23 例, 检出率 38.3%(23/60)。30 例维吾尔族宫颈鳞癌样本中, 多重感染 12 例, 多重感染率为 40%, 30 例汉族宫颈鳞癌样本中, 多重感染 11 例, 多重感染率为 36.67%, 二者比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。(2) ①与德国标准株相比, 10 例标本中共发现 20 个突变位点, E6 基因有 12 个突变位点, E7 基因有 8 个突变位点。其中 178(T→G)(Asp→Glu)、350(T→G)(Leu→Val)、647(A→G)(Asn→Ser)、846(T→C)(同义突变)四个位点突变率较高, 其突变率分别为 30% (3/10)、30% (3/10)、40% (4/10)、40% (4/10); 且 107(T→C)(Phe→Leu)、133(A→C)(Gly→Ser)、168(C→G)(Thr→Ser)、310(T→C)(同义突变)、321(T→C)(同义突变)、341(T→C)(Cys→Leu)、375(A→G)(Gln→Arg)、410(T→A)(Cys→Ser)、499(G→T)(Trp→Thr)、548(A→G)(Thr→Ala)、608(A→G)(Gln→Arg)、632(G→A)(Cys→Tyr)、635(A→G)(Tyr→Cys)、731(T→C)(Phe→Ser)、812(T→C)(Met→Thr) 15 个位点的变异国内尚未见报道。②5 例汉族标本共发现 14 个突变位点, 其中 E6 基因 7 个, E7 基因 7 个; 5 例维吾尔族标本共发现 10 个基因突变位点, 其中 E6 基因 7 个, E7 基因 3 个。③5 例汉族和 5 例维吾尔族标本二者都突变的 E6 基因位点有: 178(T→G)(Asp→Glu)、350(T→G)(Leu→Val); 都突变的 E7 基因位点有: 647(A→G)(Asn→Ser)、846(T→C)(同义突变)。

结 论: (1) 新疆维吾尔族、汉族妇女宫颈癌的 HPV 感染谱不同; (2) 高危型 HPV16 感染无论在维吾尔族还是汉族宫颈癌中所占比例都是最高, 且 HPV56 感染可能是新疆维吾尔族妇女宫颈癌较易感染的型别; (3) 新疆维吾尔族、汉族妇女宫颈癌中存在 HPV 多重感染, 多重感染中以二重感染为主, 且多重感染类型以 HPV16 合并其他型别感染为主; (4) 与德国标准株比较, 新疆维吾尔族、汉族妇女宫颈癌病变中 HPV16 型 E6 和 E7 基因存在一定范围的变异; (5) 178(T→G)(Asp→Glu)、350(T→G)(Leu→Val)、647(A→G)(Asn→Ser)、846(T→C)(同义突变)为新疆维吾尔族、汉族妇女宫颈癌病变中的热点突变;

关键词: 宫颈癌, 人乳头瘤病毒, 基因分型, HPV16E6/E7 基因, 基因变异

论文类型: A (基础研究)

Abstract

Objective: (1)To understand the condition of HPV infection on Uygur and Han Cervical cancer in Xinjiang and to further approach the relationship between HPV infection and cervical cancer. (2)To understand HPV16 type E6 and E7 genetic variation in cervical cancer in Xinjiang and screen hot spot mutations.

Methods: (1)To apply of reverse hybridization technique detect HPV for 60 samples of cervical squamous cell carcinoma, Include 30 Uygur and 30 Han Cervical squamous cell carcinoma,the data were analyzed with SPSS13.0. (2)The specimens of Cervical squamous cell carcinoma were collected and then design E6 and E7 gene specific primers for specimens which single infected HPV16.E6 and E7 gene were amplified from human cervical squamous cell carcinoma by PCR.The products of PCR were ligated into pUCm-T Vector and used to transform *E.coli* DH5 α .At last,the sequence of the insert was determined by an automated DNA sequencer,And compared with the German standard strain, selected hot variations.

Results: (1) ①The positive rate of HPV in 60 cases of cervical squamous cell carcinoma was 95%(57/60),the positive rate of HPV in Uygur was 96.6%(29/30),while 93.3% (28/30) in Han.There was no significant difference between two nations($P>0.05$).②60 specimens were detected in six kinds, including HPV16,56,58,18,68,35,all of which were high risk of infection.HPV16 was the most common type,the rate could reach 91.7%(55/60),and the second was HPV56, the rate could reach 23.3%(14/60).In addition, 38.3%(23/60) cervical squamous cell carcinoma cases were detected with double infection of HPV. The rate of double infection of HPV was 40%(13/30) in 30 Uygur cervical squamous cell carcinoma;The rate of double infection of HPV was 36.67%(10/30) in 30 Han cervical squamous cell carcinoma.There was no significant difference between two nations($P>0.05$). (2) ①Compared with the Germany,20 mutations were detected, E6 gene 12 mutations were detected in 10 specimens. E7 gene 8 mutations were detected in 10 specimens.178(T→G)(Asp→Glu),350(T→G)(Leu→Val),647(A→G)(Asn→Ser),846(T→C) (synonymous mutation) are hot mutation sites,The mutation rates were 30%(3/10), 30%(3/10),40%(4/10),40%(4/10).And107(T→C)(Phe→Leu),133(A→C)(Gly→Ser),168(C→G) (Thr→Ser),310(T→C)(synonymous mutation),321(T→C)(synonymous mutation),341(T→C) (Cys→Leu),375(A→G)(Gln→Arg),410(T→A)(Cys→Ser),499(G→T)(Trp→Thr),548(A→G)(Thr→Ala),608(A→G)(Gln→Arg),632(G→A)(Cys→Tyr),635(A→G)(Tyr→Cys),731(T→C)(Phe→Ser),812(T→C)(Met→Thr) 15 sites of variation are not reported.② In 5 Han specimens,They were found 14 mutations,E6 gene was found 7 mutations,E7 gene was found 7 mutations. In 5 Uygur specimens,They were found 10 mutations,E6 gene was found 7 mutations, E7 gene was found 3 mutations.③ In 5 cases of Han and in 5 specimens of Uygur, both mutation of E6 gene were 178 (T→G) (Asp→Glu), 350 (T→G) (Leu→Val); both mutation of E7 gene were: 647 (A→G) (Asn→Ser), 846 (T→C) (synonymous mutation).

Conclusions: (1) HPV Infection spectrum of cervical cancer on Uygur and Han in Xinjiang are different. (2) High-risk HPV16 has the the highest infection rate, both in Uighur or Han cervical cancer. And HPV56 may be the more susceptible type in Xinjiang Uygur cervical cancer,which reflects the Specificity of Uygur women's infection with HPV in Xinjiang. (3) Multi-infection types are mainly HPV16 combined with other types in Xinjiang Uygur and Han cervical

cancer, and multiple infections are mainly double infection. (4) Variation of HPV16 E6 and E7 genes exists in cervical cancer in Xinjiang. (5) 178(T→G)(Asp→Glu), 350(T→G)(Leu→Val), 647(A→G) (Asn→Ser), 846(T→C)(synonymous mutation) are hot mutations in Xinjiang Uygur and Han cervical cancer.

Key Words: Cervical cancer, Human papillomavirus, Genotyping, HPV E6/E7 gene, Gene mutation

Type of thesis: A (Basic Research)

表 1 英文缩略词表

英文缩写	英文全名	中文译名
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
ER	Early region	早期蛋白编码区
LR	Late region	晚期蛋白编码区
URR	Upstream Regulatory Region	上游调控区
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
Taq DNA	Taq DNA polymerase	TaqDNA 聚合酶
IGFBP-3	Insulin-like growth factor-binding protein-3	胰岛素样生长因子结合蛋白-3
SCC	Squamous cell carcinoma	鳞状细胞癌
ICC	Invasive cervical cancer	浸润性宫颈癌
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤变
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance	不明意义的不典型鳞状上皮细胞
HC	Hybrid Capture	杂交捕获法
TCT	Thinprep cytologic test	新柏氏液基细胞学技术
TruScreen	Cervical cancer screening system	宫颈癌筛查系统
VLPs	Virus-like particles	病毒样颗粒
CIAP-2	Cellular inhibitor of apoptosis-2	抗凋亡基因细胞凋亡抑制因子 2
CFS	Chromosomal fragile site	染色体脆性部位
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase	人端粒酶逆转录酶

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅。有权将学位论文的内容编入有关数据进行检索。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

前言

(Introduction)

在全球妇女中宫颈癌是仅次于乳腺癌的常见妇科恶性肿瘤,据世界范围内统计,每年大约有 50 万宫颈癌新发病例,其中 40 万发生在发展中国家,为发展中国家妇女死亡的主要原因^[1]。在我国每年宫颈癌新发病例约 13.15 万,占世界宫颈癌新发总例数的 1/3。宫颈癌严重威胁了女性的健康和生命,近年来其发病率呈现不断上升且年轻化趋势。新疆南部是我国宫颈癌高发地区,其患病率高达 459/10 万~590/10 万,死亡率达 15.78/10 万^[2~3]。因此,在新疆预防宫颈癌的发生迫在眉睫。

高危型人乳头瘤病毒(Human papillomavirus HPV)持续感染是女性宫颈癌的主要因素。HPV 属乳多空病毒科多瘤病毒亚科,其分子量约为 8000bp,是一类特异性感染人皮肤、粘膜的双链环状 DNA 病毒。流行病学及临床资料分析显示在目前已被鉴定的 100 多种 HPV 亚型中,其中有 40 余种与女性生殖道病变有关^[4]。根据 HPV 致病力大小及不同宫颈病变中 HPV 感染分布的情况,将其分为低危型 HPV 和高危型 HPV 两大类,低危型主要包括 HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 等,以 HPV6, 11 最为常见,常引起低度宫颈上皮内瘤变及尖锐湿疣等良性病变^[5],高危型主要包括 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,主要引起高度宫颈上皮内瘤变及宫颈癌等恶性病变^[6]。根据病理组织学,宫颈癌分为宫颈鳞状细胞癌、宫颈腺癌及宫颈鳞腺癌三种,其中宫颈鳞状细胞癌占宫颈癌的 80%-85%。由于 HPV 的致病性与其基因型密切相关,所以对新疆地区维吾尔族、汉族宫颈癌病变中 HPV 进行分型检测,不仅对临床宫颈疾病的诊断具有重要意义,还可为今后进一步预测受检者的发病风险度,决定其筛查间隔提供理论依据。

此外, Zehbe I 等^[7]对 HPV 病毒 16 亚型的 E6 和 E7 基因突变进行研究,结果表明某些特定位点的突变可能会使病毒更易诱导产生癌变,并增大再次感染宿主机会或逃逸宿主免疫系统的机会。同时 E6 和 E7 基因突变株的致癌危险性具有地域性,即同一基因突变类型在不同国家及地区的致癌危险性存在明显的差异。如在欧美地区流行的 HPV16 E6 变异株主要是 G350(L83V)^[8],东亚地区主要是 G178(D25E)^[9]。Eschl 等^[10]通过研究也证实存在 HPV16E7 变异株,并且认为 E7 变异株具有地域特点。E6 及 E7 基因不同位点的变异所导致的氨基酸变化可影响宿主对 HPV 病毒的免疫应答反应,进而影响细胞转化,且特定位点的突变与细胞恶性转化的危险性相关。HPV16 早期基因 E6/E7 基因在宫颈癌组织中持续表达,并为癌组织恶性表现型维持所必须,阻断其表达后可使瘤细胞的恶性型逆转, E6、E7 具有免疫原性,可以诱导机体产生特异性体液免疫和细胞免疫,

因此，可作为宫颈癌及其癌前病变的治疗性疫苗的靶抗原，但是，HPV16 存在许多具有地域特征的地方变异株，研究表明这些变异株可以引起包括免疫原性在内的生物学活性的差异，这给 HPV16 治疗性疫苗的研制带来了一定的困难，本研究探讨新疆地区宫颈癌组织中 HPV16E6/E7 序列多态性及同源性，旨在为获得能诱发较高特异性免疫水平的针对新疆地区地方株 HPV16 治疗性疫苗打下基础。

本课题拟运用反向点杂交技术对新疆维吾尔族及汉族妇女宫颈癌标本进行 HPV 检测，以了解新疆维、汉族妇女宫颈癌组织中 HPV 的感染情况，并进一步探讨其与 HPV 感染的关系，同时对单一感染 HPV16 型宫颈癌标本通过设计 E6、E7 基因特异性引物，采用 PCR 方法从维、汉族妇女宫颈癌组织中获得 E6、E7 基因的全长序列，并构建 pUCm-T 克隆载体进行序列分析，将所测基因序列与德国标准株对比，从而了解新疆维、汉族妇女宫颈癌病变中 HPV16 型 E6、E7 基因的变异情况，并筛选出热点变异，为判断 HPV 感染患者预后的临床应用以及今后开发针对新疆地区宫颈癌预防和治疗性的疫苗提供理论依据。

第一部分 维、汉族妇女宫颈癌标本中人乳头瘤病毒的

基因分型

材 料 与 方 法

(Materials & Methods)

1 材 料

1.1 材料收集

收集从 2007 年 6 月~2009 年 12 月兰州军区乌鲁木齐总医院妇产科门诊活检及住院手术病人 60 例为研究对象, 均经病理组织学检查证实为宫颈鳞癌, 所有标本术前未进行放化疗。实验分为两组, 维吾尔族组 (30 例), 汉族组 (30 例)。上述新鲜组织收集后均装入冻存管中放入液氮中速冻, 24 小时内转置 - 70 °C 冰箱中保存 (临床资料详见附录)。

1.2 仪器和试剂

HPV 基因分型试剂盒	亚能生物技术有限公司 (深圳)
细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型)	百泰克生物技术有限公司 (北京)
SLAN 荧光定量 PCR 检测系统	宏石医疗科技有限公司产品 (上海)
FYY-3 型分子杂交仪	兴化分析仪器厂产品 (江苏)

表 1 亚能基因芯片检测试剂盒组成 (25 人份)

Table 1 Yaneng gene chip test kit components (25 persons)

	组成成分	数量	规格	保存条件
试剂盒 I	PCR 反应液	25管	20ul	-18℃ 以下
	膜条	25张		
	POD	1管	75ul	
试剂盒 II	TMB	1瓶	10ml	
	矿物油	1管	0.5ml	2~8℃
	裂解液	1管	1.5ml	
	3% H_2O_2	1管	75ul	

配套试剂:

1. 20×SCC (PH 7.0)

NaCl 175.3g

柠檬酸钠 88.2g

加蒸馏水 800ml 溶解, 用浓 HCL 调 pH 值至 7.0, 最后定容至 1000ml, 并高压灭菌保存。

2. 10% SDS (PH 7.0)

SDS 20g

加蒸馏水 180ml 溶解, 用 1N HCL 调 pH 值至 7.0, 最后定容至 200ml。

3. 1 M 柠檬酸钠 (PH 5.0)

柠檬酸钠 294.1g

加蒸馏水 700ml 溶解, 用浓 HCL 调 pH 值至 5.0, 最后定容至 1000ml。

4. A 液 (2×SCC, 0.1% SDS)

20×SCC 100ml

10% SDS 10ml

加蒸馏水定容至 1000ml。

5. B 液 (0.5×SCC, 0.1% SDS)

20×SCC 25ml

10% SDS 10ml

加蒸馏水定容至 1000ml。

6. C 液 (0.1 M 柠檬酸钠)

1 M 柠檬酸钠 100ml

加蒸馏水定容至 1000ml。

7. 显色液 (新鲜配制使用, 按顺序加入以下溶液)

C 液 19ml

TMB 1ml

3% H_2O_2 2ul

2 实验原理

HPV 基因分型试剂盒采用 PCR 体外扩增和 DNA 反向点杂交相结合的 DNA 芯片技术，利用 HPV 的基因特点设计特异引物，可以扩增出包含 23 种 HPV 基因型的目标片段，再将扩增产物与固定在膜条上的包括 18 种高危型和 5 种低危型在内的分型探针进行杂交，依据杂交信号的有无来判断是否有 HPV 基因型的存在。

3 实验方法

3.1 宫颈癌组织中的 DNA 提取

运用细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）提取 DNA。(1)从 -70℃ 冰箱中取出宫颈癌标本，剪取约 30mg 癌组织，将癌组织用剪刀剪切成浆状，装入 1.5ml 离心管中并加入 200ul 组织裂解液，用大口径枪头吹打均匀，加入蛋白酶 k (20mg/ml) 20ul 漩涡器振荡混匀。(2)将裂解物置于 55℃ 水浴中 1 小时直至组织消化完全，期间轻柔振荡几次帮助裂解，加入 200ul 结合液漩涡器振荡混匀，置于 70℃ 水浴箱中 10 分钟。(3)从水浴箱中取出待冷却后加入异丙醇 100ul，漩涡器振荡混匀，用 1ml 的枪头吸取上述混合物，加入到 AC 吸附柱中 10000rpm 离心 30 秒，弃去收集管中的废液。(4)加入 500ul 抑制物去除液，12000 rpm 离心 30 秒，弃废液，然后加入 700ul 漂洗液 12000 rpm 离心 30 秒，弃去废液，再加入 500ul 漂洗液后 12000 rpm 离心 30 秒，弃去废液。(5)将 AC 吸附柱放回空收集管中，13000rpm 离心 2 分钟，尽量除净漂洗液，以免漂洗液中残留的乙醇抑制下游反应。(6)取出吸附柱 AC 放入干净的离心管中，于吸附膜的中心加入 100ul 洗脱缓冲液（洗脱缓冲液事先在 65~70℃ 预热），室温放置 3 分钟后 12000rpm 离心 1 分钟，将得到的溶液重新加入离心吸附柱 AC 中，室温放置 2 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟。将提取的 DNA 放置于 -20℃ 冰箱保存备用。

3.2 HPV DNA 扩增

将装有 PCR 反应体系 20ul (体系中含有 HPV 通用引物)的反应管做好标记，5000rpm 离心 2 秒钟，分别加入已提取的待测样本 DNA 5ul，反应体系总体积为 25ul，最后加入 1 滴矿物油，轻轻混匀后 5000rpm 离心数秒，按以下条件进行扩增。

PCR 反应条件：

UNG 酶消化	50℃	15min	
预变性:	95℃	10 min	
变性:	94℃	30 s	} 40 C
复性:	42℃	90 s	
延伸:	72℃	30 s	
修复延伸:	72℃	5 min	

3.3 杂交、洗膜、显色

在杂交管中加入6ml A液(2×SSC, 0.1%SDS, pH7.4), 放入标有编号的膜条(应在膜条编号处用中性笔标记), 加入所有(25μl) 的PCR扩增产物, 混匀后置沸水浴中加热10min; 置于51℃杂交箱内杂交1.5h; 将膜条转移至已预热到51℃的40ml B液(0.5×SSC, 0.1%SDS, pH7.4)离心管中, 51℃轻摇洗涤15min。将膜条转移至1:2000 POD溶液中室温轻摇浸泡30min; 用A液室温轻摇洗涤2次, 每次5min, 再用C液(0.1M柠檬酸钠, pH5.0)室温轻摇洗涤膜条2min; 显色液(19ml 0.1M柠檬酸钠, 1ml TMB, 10ul 3% H_2O_2)中避光浸泡30min; 蒸馏水洗膜一次。

3.4 结果判读

1.根据膜条上蓝色斑点显现的位置, 读取相应位置上标注的基因型信息, PC为显色质控点: 仅一个基因型位点出现蓝色斑点, 则为相应基因型的单一感染; 多个基因型位点出现蓝色斑点, 则为相应基因型的混合感染。2.临床样本检测结果若只有PC位点显色而其他位点均不显色, 表明被检出中未感染HPV, 或感染了本试剂盒检测范围之外的HPV, 或病毒拷贝数在本试剂盒检出下限以下, 即小于 1.0×10^3 copies/ml。

表 2 HPV分型基因芯片所能检测的HPV型别

Table 2 HPV genotyping chip can detect the HPV types

HPV42	HPV43	HPV44	HPV53	HPV66	HPV73	HPV83	HPVMM4
HPV6	HPV11	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV39
HPV45	HPV51	HPV52	HPV56	HPV58	HPV59	HPV68	PC

3.5 统计学方法

使用 SPSS13.0 统计学软件进行统计学分析, 维吾尔族组和汉族组 HPV 感染

率的比较, 采用 Fisher 确切概率法; 维吾尔族组和汉族组 HPV 多重感染率的比较, 采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

4 结果

4.1 HPV 各亚型在宫颈鳞癌中的分布情况

60 例宫颈鳞癌组织中, 其中 HPV 阳性 57 例, 阳性率为 95%(57/60)。60 例宫颈鳞癌组织中共检出 HPV 基因型 6 种, 分别为 HPV16, 56, 58, 18, 68, 35, 6 种亚型均为高危型。以 HPV16 最常见, 占宫颈鳞癌患者的 91.7%(55/60), 占 HPV 阳性的 96.49%(55/57), 其次是 HPV56, 占宫颈鳞癌患者的 23.33%(14/60), 占 HPV 阳性的 24.56%(14/57); HPV58 占宫颈鳞癌患者的 15%(9/60), 占 HPV 阳性的 15.79%(9/57); HPV18 占宫颈鳞癌患者的 5%(3/60), 占 HPV 阳性的 5.26%(3/57), HPV68 占宫颈鳞癌患者的 3.33%(2/60), 占 HPV 阳性的 3.51%(2/57), HPV35 占宫颈鳞癌患者的 1.67%(1/60), 占 HPV 阳性的 1.75%(1/57)。HPV 不同亚型在 60 例宫颈鳞癌和 57 例 HPV 阳性患者中的分布频率见表 3。

表 3 HPV 各亚型在 60 例宫颈鳞癌及 57 例 HPV 阳性患者中的频率分布[例(%)]

Table 3 the frequency distribution of HPV subtypes in 60 cases of cervical squamous cell carcinoma and 57 cases of HPV-positive patients, [cases (%)]

HPV 亚型	宫颈鳞癌 (n=60)	HPV 阳性的宫颈鳞癌 (n=57)
HPV16	55(91.7)	55 (96.49)
HPV56	14 (23.33)	14 (24.56)
HPV58	9 (15)	9 (15.79)
HPV18	3 (5)	3 (5.26)
HPV68	2 (3.33)	2 (3.51)
HPV35	1(1.67)	1(1.75)

4.2 维、汉宫颈鳞癌组织中 HPV 的感染率及各基因型的感染率情况

30 例维吾尔族宫颈鳞癌标本中共检出 HPV 阳性 29 例, 其感染率为 96.6%(29/30), 30 例汉族宫颈鳞癌标本中共检出 HPV 阳性 28 例, 其感染率为 93.3%(28/30), 两组 HPV 感染率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 见表 4。

表4 维吾尔族组和汉族组宫颈鳞癌组织中HPV感染率比较

Table 4 The comparison of HPV infection in Uighur groups and Han group cervical squamous cell carcinoma

组 别	HPV 阳性	HPV 阴性	合计	HPV 感染率 (%)
维吾尔族组	29	1	30	96.6
汉 族 组	28	2	30	93.3
合 计	57	3	60	95

30 例维吾尔族宫颈鳞癌组织中，共检出 6 种 HPV 基因型，分别为 HPV16, 56, 58, 18, 68, 35，其阳性感染率分别为 90%(27/30)，36.67%(11/30)，6.67%(2/30)，6.67%(2/30)，3.33%(1/30)，3.33%(1/30)。而在 30 例汉族宫颈鳞癌组织中共检出 5 种 HPV 基因型，分别是 HPV16, 56, 58, 18, 68，其阳性感染率分别为 93.33%(28/30)，10.71%(3/30)，23.33%(7/30)，3.33%(1/30)，3.33%(1/30)，未检出 HPV35 感染。维、汉宫颈鳞癌组织中 HPV 基因型感染率的比较见图 1。

维、汉宫颈鳞癌组织HPV各基因型感染率比较

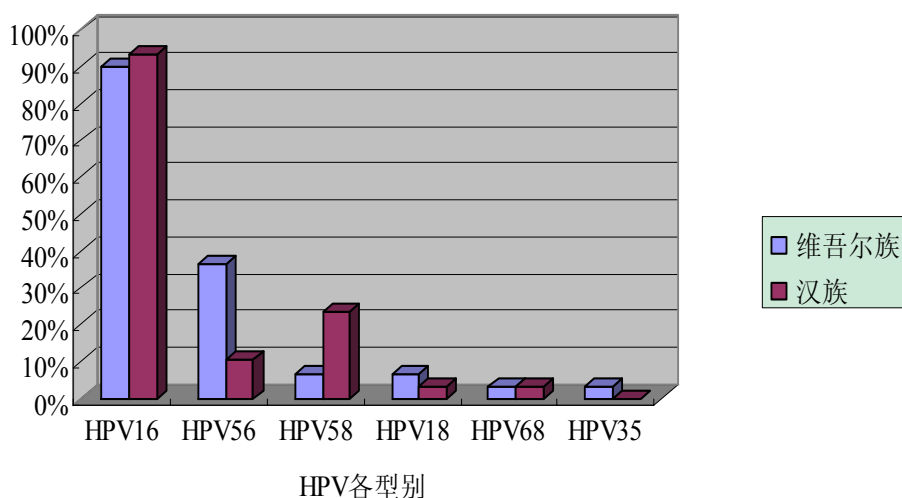


图 1 维、汉宫颈鳞癌组织中 HPV 各基因型感染率的比较

Figure 1 The comparison of HPV genotypes infection rates in Uighur and Han cervical squamous cell carcinoma

4.3 维、汉宫颈鳞癌组织中 HPV 多重感染情况

在 60 例宫颈鳞癌标本中，共检出 HPV 多重感染 23 例，占宫颈鳞癌患者的

38.33% (23/60), 占 HPV 阳性宫颈鳞癌的 40.35% (23/57)。HPV 的多重感染中以二重感染为主, 占多重感染的 86.95% (20/23), 三重感染占 8.70% (2/23), 四重感染仅占 4.35% (1/23)。多重感染基本上以 HPV16 与其他亚型合并感染为主。

30 例维吾尔族宫颈鳞癌标本中, HPV 多重感染 12 例, 占维吾尔族宫颈鳞癌患者的 40% (12/30), 占维吾尔族 HPV 阳性宫颈鳞癌的 41.38% (12/29)。30 例汉族宫颈鳞癌标本中, HPV 多重感染 11 例, 占汉族宫颈鳞癌患者的 36.67% (11/30); 占汉族 HPV 阳性宫颈鳞癌的 39.28% (11/28)。两组 HPV 多重感染率比较差异无统计学意义 ($\chi^2=0.071$, $P>0.05$)。见表 5

表5 维吾尔族组和汉族组宫颈鳞癌组织中HPV多重感染率比较

Table 5 The comparison of HPV multiple infection rate in Uighur groups and Han group cervical squamous cell carcinoma

组别	HPV 多重感染	HPV 单一感染	合计	HPV 多重感染率(%)
维吾尔族组	12	18	30	40
汉族组	11	19	30	36.67
合计	23	37	60	38.33

30 例维吾尔族宫颈鳞癌标本中, 多重感染也以二重感染为主, 其中以 HPV16 合并 HPV56 感染最为多见。并且在维吾尔族宫颈鳞癌中检出 1 例三重混合感染和 1 例四重混合感染。30 例汉族宫颈鳞癌标本中, 多重感染以二重感染为主, 其中最常见的是 HPV16 合并 HPV58, 只检出一例三重混合感染, 没有发现四重混合感染。HPV 各亚型在多重感染中的分布情况见表 6

表 6 HPV 各亚型在多重感染中的分布

Table 6 the distribution of HPV subtypes in multiple infections

HPV 亚型	例数	汉族	维吾尔族
HPV16;18	1	0	1
16;68	1	1	0
16;35	1	0	1
16;56	11	3	8
16;58	6	6	0
16;18;58	1	1	0
16;56;58	1	0	1
16;18;58;68	1	0	1

4.4 HPV 基因分型扫描图

1 例 HPV 二重感染的基因芯片扫描图，结果显示该病例同时感染了高危型 HPV16 和 HPV56。见图 2

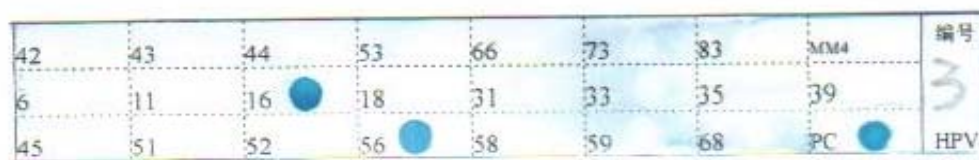


图 2 HPV 二重感染的基因芯片扫描图
(PC 为阳性质控)

Figure 2 the gene chip scanned photo of double infection of HPV
(PC is positive control)

5 讨论

5.1 HPV 感染与宫颈癌

自 20 世纪 70 年代 Laverty 在电镜下观察到 HPV 颗粒存在于宫颈癌活检组织中，继而 ZurHausen 学者推测 HPV 感染与宫颈癌的发生有关后，国内外许多学

者进行了大量研究,并证实了 HPV 感染是宫颈癌发病的必需因素。HPV 是一类分子量为 8000bp 大小的双链环状 DNA 病毒,能够特异性侵染和寄生女性生殖器官的上皮细胞^[11]。HPV 不仅能够在女性生殖器官的鳞状上皮中复制,而且它的存活、复制均与鳞状上皮细胞的分化及基因表达密切相关。有研究表明,机体鳞状上皮上移至中层和表层时是 HPV 的生长、复制、整合以及组装等一系列的过程顺利完成的基本条件^[12]。Cheah PL 研究^[13]发现,HPV 可以通过女性生殖道黏膜的微创伤而感染基底层上皮细胞,游离的 HPV 病毒基因组随细胞染色体复制而复制,而病毒 DNA 整合入宿主细胞染色体则是晚期事件,并且与宿主细胞的恶性转化有关。HPV 病毒进入宿主细胞后,其生存状态可能有以下几种:(1)病毒 DNA 以游离体形式存在,位于宿主细胞染色体外,并与宿主细胞染色体同步复制,建立隐匿感染状态;(2)病毒从隐匿状态转为复制状态,产生完整的 HPV 病毒颗粒;(3)病毒 DNA 整合入宿主细胞的染色体后,随细胞染色体共同复制,从而使宿主细胞恶性转化。高危型 HPV DNA 整合入宿主细胞是宫颈癌发生的起始因素,有研究显示在约 90% 的宫颈癌组织中,存在 HPV DNA 整合^[14]。

5.2 维吾尔族、汉族宫颈癌组织中 HPV 感染谱

研究^[15]发现,约 20 种高危型 HPV 感染与妇科恶性肿瘤的发生密切相关,如宫颈癌等^[16]。Bulk 等^[17]研究发现,HPV16 感染与宫颈鳞状细胞癌的发生密切相关,而 HPV18 感染则与宫颈腺癌相关。Ault 等^[18]研究发现,HPV16 和 HPV18 约 70% 可引起宫颈癌。本研究运用可检测 23 种 HPV 基因型的反向点杂交技术对 60 例宫颈鳞癌组织进行检测,结果发现 HPV 阳性 57 例,其阳性率达 95% (57/60),与目前普遍认为宫颈癌组织中 HPV 阳性率达 90% 以上的观点相符^[19]。另外,吴玉萍等^[20]研究发现,在宫颈癌新鲜标本中 HPV 的感染率达 95.1%,与本研究所得到的 95% 非常相近。30 例维吾尔族组宫颈鳞癌组织中检测出 HPV 阳性 29 例,HPV 阳性率为 96.6% (29/30),30 例汉族组宫颈鳞癌组织中共检测出 HPV 阳性 28 例,HPV 阳性率为 93.3% (28/30),两组 HPV 阳性率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。从而表明,HPV 感染不仅是维吾尔族宫颈鳞癌主要原因,也是汉族宫颈鳞癌的主要原因,可能与新疆维、汉两个民族关系不大。

一项全球性宫颈浸润癌组织中 HPV 型别分布的研究表明:宫颈癌中 HPV 型别与地理区域的变化以及种族、民族的差异都有很大的关系^[21~23]。2003 年有学者^[24]对全球 10058 例宫颈癌组织中 HPV 型别分布进行研究分析,发现 HPV16 为全球最主要的感染基因型,其感染率为 51%,而其他基因型的地区分布各有差异,如 HPV45 在非洲相对较多,HPV33 在欧洲较多,而 HPV58 和 52 在亚洲较多。Lo 等^[25]研究发现宫颈癌感染的主要 HPV 基因型是 HPV16、18、58、52,其构成比分别为 79.6%、7.5%、3.8% 和 2.6%。HPV 基因型在各地区、种族及民

族中的差异可能与不同地区的种族和民族的遗传特点相关。本研究通过对 30 例维吾尔族宫颈鳞癌组织 HPV 基因型的检测,共检出 6 种 HPV 基因型,分别是 HPV16, 56, 58, 18, 68, 35, 其阳性感染率分别为 90%(27/30), 36.67%(11/30), 6.67%(2/30), 6.67%(2/30), 3.33%(1/30), 3.33%(1/30)。而在 30 例汉族宫颈鳞癌组织中共检出 5 种 HPV 基因型,分别是 HPV16, 56, 58, 18, 68, 其阳性感染率分别为 93.33%(28/30), 10.71%(3/30), 23.33%(7/30), 3.33%(1/30), 3.33%(1/30), 未检出 HPV35 型感染。这与刘开江等^[26]研究报道有差别。表明同一地区不同民族 HPV 致病亚型也存在较大的差异,可能与不同民族的遗传特点有关。HPV16 感染无论是在维吾尔族宫颈鳞癌中还是汉族宫颈鳞癌中都是最常见的基因型,这就可以表明 HPV16 感染是维吾尔族和汉族较易感染的型别。且在维吾尔族宫颈鳞癌组织中 HPV56 的检出率较高,HPV56 感染可能是新疆维吾尔族妇女宫颈癌较易感染的型别,有待于扩大样本进一步研究。

5.3 维吾尔族、汉族宫颈癌与 HPV 多重感染

HPV 多重感染与性生活频率、性伴侣数量以及初次性生活年龄等因素有一定的关联。当机体免疫系统清除病毒不利时,HPV 多重感染就会增加。研究发现 HPV 混合感染在癌前病变及宫颈癌组织中检出率较高,且不同地区、不同民族的 HPV 混合感染的基因型别不同,其最终所导致的病情发展及转归也会有所不同^[27]。同一部位的感染多种 HPV 基因型别,可能与 HPV 各基因型之间没有相互免疫有关^[28]。

HPV 多重感染在宫颈癌前病变及宫颈癌组织中并不少见,然而各研究所报道的检出率情况并不一致,除了与研究的不同人群及地域有关外,可能还与不同研究所使用的检测方法有关^[29]。有研究^[27]报道,HPV 的多重感染率在宫颈癌中为 14.0%,亦有研究^[28]报道,宫颈癌中 HPV 多重感染率为 28.9%。在 HPV 多重感染中 HPV16 是最常见的基因型,HPV18、33 也常合并多重感染,因此,认为 HPV 多重感染的发生可能与 HPV 基因型别有关^[30]。由于宫颈组织可以感染单一 HPV 型别也可同时感染多个 HPV 型别,但对于 HPV 多重感染是否会增加并促进宫颈病变的程度,目前研究观点尚不一致。章涛等^[31]通过采用导流杂交法,在 304 例宫颈脱落细胞标本中检测到 HPV 多重感染 30 例,并且随着宫颈病变程度的加重,HPV 多重感染的检出率呈上升趋势,提示宫颈癌的发生发展与 HPV 多重感染密切相关。Lee 等^[32]研究认为 HPV 多重感染导致宫颈癌的危险性比 HPV 单一感染者高。亦有研究显示:HPV 多重感染是宫颈组织中病毒持续感染的主要危险因素,因此,HPV 多重感染可能更易发展为宫颈癌^[33]。

本研究发现 30 例维吾尔族宫颈鳞癌中 HPV 多重感染率亦高达 40%,其中以 HPV16 合并 HPV56 感染最多见,这与张苏琴等^[34]研究中所报道的有差异。30

例汉族宫颈鳞癌中 HPV 多重感染率为 36.67%，其中以 HPV16 合并 HPV58 感染最多见。虽然，维吾尔族宫颈鳞癌组织多重感染率比汉族宫颈鳞癌组织多重感染率高，但统计学上二者无显著性差异 ($P>0.05$)，可能与样本量较少等其它因素有关，需要进一步研究。并且在维吾尔族宫颈鳞癌组织中发现有 1 例四重混合感染，而在汉族宫颈鳞癌组织中未发现，造成这种现象的原因可能与其生活习惯、婚姻、生育及生活环境等因素有关。

综上所述，HPV16 感染不仅是维吾尔族妇女宫颈鳞癌的主要病因，同时也是汉族宫颈鳞癌的主要病因。且 HPV56 感染在维吾尔族妇女宫颈鳞癌组织中检出率高，可能为新疆维吾尔族妇女较易感染的基因型，有待于扩大样本进一步研究。维、汉族宫颈鳞癌中 HPV 各高危亚型感染特点的不同，可能与他们的遗传特点有关，也可能是新疆维吾尔族妇女宫颈癌高发的原因之一。宫颈癌预防性及治疗性的疫苗已经诞生，但关键在于任何国家及地区，在研发和投放疫苗之前应该先了解本国家及地区 HPV 流行的特点，才能真正做到有的放矢^[35]。本研究通过对 HPV 各亚型在新疆维吾尔族和汉族宫颈鳞癌中的分布情况及特点的对比性分析，可为今后针对本地区疫苗研究及治疗提供重要的理论依据。

第二部分 维、汉族妇女宫颈癌病变中人乳头瘤病毒 16 型

E6、E7 基因变异研究

材 料 与 方 法

(Materials & Methods)

1 材料

1.1 材料收集

收集从2007年6月~2009年12月在兰州军区乌鲁木齐总医院妇产科门诊活检及住院手术病人，经病理组织学检查证实的宫颈鳞癌10例（其中维吾尔族5例和汉族5例）为研究对象，所有标本术前未进行放化疗。上述新鲜组织收集后均装入冻存管中放入液氮中速冻，24小时内转置-70℃冰箱中保存。

1.2 实验仪器

PCR 反应扩增仪	加拿大 BBI 公司
3730 测序列分析仪	美国 ABI 公司
SW-CJ-1D 洁净工作台	江苏苏洁净化设备厂
DK-8D 型电热恒温水槽	上海森信实验仪器有限公司
DYY-8 型稳压稳流电泳仪	上海琪特分析仪器有限公司
YXJ-2 离心机	湘仪离心机仪器有限公司
H6-1 微型电泳槽	上海精益有机玻璃制品仪器厂
凝胶成像系统	Gene Genius 公司
U-3010 紫外-可见分光光度计	Hitachi 公司
移液器	加拿大 BBI 公司

1.3 主要试剂

DNA 提取试剂盒	北京百泰克生物技术有限公司
NaHSO ₃ 分析纯	上海生工

氢醌	上海生工
TaqDNA 聚合酶及 dNTP	上海生工
PCR 产物纯化回收试剂盒	上海生工 SK1261
质粒抽提试剂盒	上海生工 SK1191
感受细胞制备试剂盒	上海生工 SK2301
pUC18-T	上海生工

2 方法

2.1 宫颈鳞癌组织 DNA 的提取

运用细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）提取组织 DNA，具体方法见第一部分。

2.2 HPV 型别的鉴定

采用反向点杂交技术对所收集的宫颈鳞癌标本进行检测，选取经反向点杂交技术检测确定为 HPV16 型单一感染，排除其他基因型感染及多重感染的标本。具体 HPV 型别检测方法见第一部分。

2.3 引物的设计与合成

根据 Genbank 已经发表的 HPV16 序列，采用 Primer 5.0、Oligo 6.0 等生物学信息软件，对 HPV16 型 E6 和 E7 基因开放阅读框自行设计特异引物，经 BLAST 后，由上海生工公司合成引物，具体引物序列见表 7

表 7 HPV16E6、E7 基因 PCR 扩增引物

Table 7 HPV16E6, E7 gene PCR primers

引物名称	起始位点	引物序列	产物长度
E6 HPV16E6F	81	5' - TTATGCACCAAAAGAGAACTGCA - 3'	498
HPV16 E6R	578	5' - GGTGTATCTCCATGCATGATTACAG - 3'	
E7 HPV16 E7F	559	5' - ATCATGCATGGAGATACACCTACATTG - 3'	320
HPV16 E7R	878	5' - GCAGGATCAGCCATGGTAGATT - 3'	

2.4 PCR 扩增 HPV16 型 E6 和 E7 基因

50 μ l 体系的配制

模板(μ l)	3
引物 f (μ l)	1
引物 R (μ l)	1
dNTP(μ l)	1
Taq Buffer(μ l) 10 $\times$ PCR Buffer(with Mg ²⁺): 100 mM Tris-HCl(pH 8.8 at 25 °C), 500 mM KCl, 15mM MgCl ₂ , 0.8%(v/v)Nonidet P40	5
Taq 酶(μ l) 5U/ μ l	0.8
水(μ l)	38.2
Total Volume	50 μ l

PCR 反应条件:

预变性:	98°C	4 min	
变性:	94°C	45 s	} 35 C
退火:	56°C	45 s	
延伸:	72°C	1 min	
修复延伸:	72°C	8 min	

2.5 扩增产物的观察与回收

从 1%琼脂糖凝胶中回收 DNA 步骤如下:

(1). 将目的 DNA 片段通过琼脂糖凝胶电泳与其他 DNA 尽可能分开, 然后用干净的手术刀切取含需回收 DNA 的琼脂块, 将其放入 1.5ml 离心管中, 在判定 DNA 片段的位置时, 尽可能使用长波长紫外光, 尽可能缩短在紫外光下照射的时间。切胶时亦尽可能减少胶的体积。

(2). 称量凝胶的重量, 以 2mg=1 μ l 换算凝胶的体积。

(3). 按照凝胶浓度, 加入相应比例的 Binding Buffer II。

(4). 置于 60°C 水浴中 10 分钟, 使胶彻底融化, 加热融胶时, 每 2 分钟混匀一次。

(5). 将融化的胶溶液转移到套放在 2ml 收集管内的 UNIQ-10 柱中, 室温下放置 2 分钟。12,000rpm 室温离心 1 分钟。

(6). 取下 UNIQ-10 柱, 倒掉收集管中的废液, 将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中, 加入 500 μ l Wash Solution, 12,000rpm 室温离心 1 分钟。

- (7).重复步骤 6 一次。
- (8).取下 UNIQ-10 柱，弃去收集管中的废液，将 UNIQ-10 柱放回收集管中，12,000rpm 室温离心 2 分钟。
- (9).将 UNIQ-10 柱放入一根新的 1.5ml 离心管中，在柱子膜中央加 40ul Elution Buffer 放置 5 分钟。
- (10).12,000rpm 室温下离心 1 分钟后，回收离心后所得 DNA 片段，可立即使用或保存于-20℃冰箱。

2.6 PCR 纯化产物连接到 pUCm-T 载体

2.6.1 制备感受态细胞

- (1).取 1ml A_{600nm} 约 0.5ml 的菌到 1.5ml 的微量离心管中。
- (2).4,000rpm 离心 5 分钟后，彻底弃去上清液，再加 0.1ml 预冷的 SSCS 溶液轻轻悬浮菌体（此时亦可冷冻保存于-70℃冰箱待用）。
- (3).加入 100pg 用于转化 DNA。
- (4).将 DNA 和细胞混匀，在冰上放置 30 分钟后，然后在 42℃水浴热激 90 秒，再在冰上放置 15 分钟。
- (5).加 0.8ml 的 LB 培养基到离心管中而后在 37℃，200rpm 下培养 1 小时。
- (6).将细胞涂布于相应抗性的平板上。

2.6.2 连接反应体系：

按照 TA pUCm-T Vector 试剂盒说明书建立

1μl	10×Ligation Buffer
1μl	50%PEG
50ng (0.5ul)	pUCm-T Vector
0.2 pmol(4ul)	PCR Product
3μl	H2O
<u>2.5U (0.5ul)</u>	<u>T4 DNA Ligase</u>
Final Volume	10μl
18℃连接过夜	

2.6.3 转化连接产物

- (1).提取 100ul 感受态细胞，置于冰上，完全解冻后将细胞轻轻均匀悬浮。
- (2).加入 5ul 连接液，轻轻混匀后，冰上放置 30 分钟。
- (3).42℃ 水浴热激 90 秒，冰上放置 15 分钟。
- (4).加 400ul SOC 培养基，37℃ 200rpm 振荡培养 1 小时。
- (5).室温下 4000rpm 离心 5 分钟后，用枪头吸去 400ul 上清液，然后用剩余的培养基将细胞悬浮。
- (6).将细菌涂布在预先用 20ul 100mM IPTG 和 100ul 20mg/ml X-gal 涂布的氨苄

青霉素平板上。

(7).将平板在 37℃ 下正向放置 1 小时以便吸收过多的液体,然后倒置培养过夜。

2.6.4 重组克隆的筛选

选择在X-gal/IPTG 平板上生长的白色菌落,用牙签挑至含氨苄青霉素的液体培养基上,37℃培养过夜。

2.6.5 质粒提取

(1). 将过夜培养的 1.5ml 细菌经 12,000rpm 离心 15 秒后,彻底去除上清。

(2).加入 250ul Solution I , 用枪头充分悬浮细菌。

(3).加入 250ul Solution II , 立即温和混匀(将离心管倾斜 45 度角,顺一个方向慢慢旋转),使细菌充分裂解,室温放置 2 分钟。

(4).加入 350ul SolutionIII,立即将离心管上下颠倒 10 次,使之充分中和,室温下放置 5 分钟。

(5).12,000rpm 离心 10 分钟。

(6).将上清液转移到套放于 2.0ml 收集管内的 UNIQ-10 柱中,室温下放置 2 分钟后,8,000rpm 室温下离心 30 秒。

(7).弃去收集管中的废液,将 UNIQ-10 柱放回收集管中,吸取 500ul Wash Solution 到 UNIQ-10 柱,10,000rpm 室温离心 1 分钟。

(8).重复步骤 7.

(9).弃收集管中的废液,将 UNIQ-10 柱放回收集管中,12,000rpm 室温下离心 2 分钟,以便彻底去除 Wash Solution。

(10).将 UNIQ-10 柱放入新的洁净 1.5ml 离心管中,加 50ul Elution Buffer,室温放置 2 分钟,10,000rpm 室温离心 1 分钟。离心管中的溶液即为所抽提的质粒 DNA。

2.6.6 重组质粒的序列测定

将通过菌落PCR方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+Ampr液体培养基中,37℃下225转/分钟振荡培养过夜。然后加入甘油保存菌液,送上海生工公司进行测序,每个样本都重复测一次,以保证测序结果的准确性。

2.6.7 片段的序列测定和分析,筛选出变异菌株

HPV16型E6、E7基因测序分析,利用DNAMAN version 5.2.2软件,对所测标本与德国标准株进行比对分析。

3 结果

3.1 宫颈癌组织中 HPV16 型 E6 和 E7 基因 DNA 片段的扩增

E6、E7基因片段扩增及片段回收后凝胶电泳检测如图所示。由电泳图可以看出E6、E7基因片段与Genbank所报道的基因编码区大小相符。

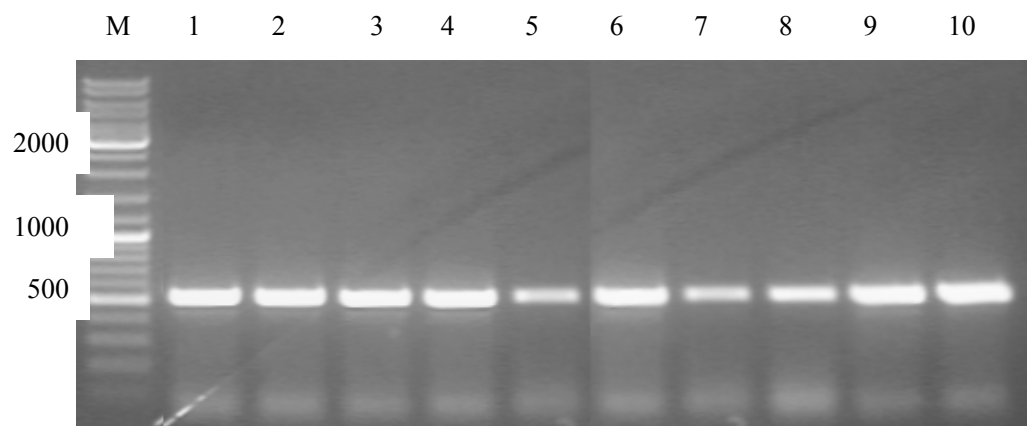


图3 HPV16 型 E6 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 3 Gle electrophoresis of HPV 16 type E6 PCR product

M:DNA molecular weight marker (DL 2000)

1-10:HPV16 type E6 PCR product

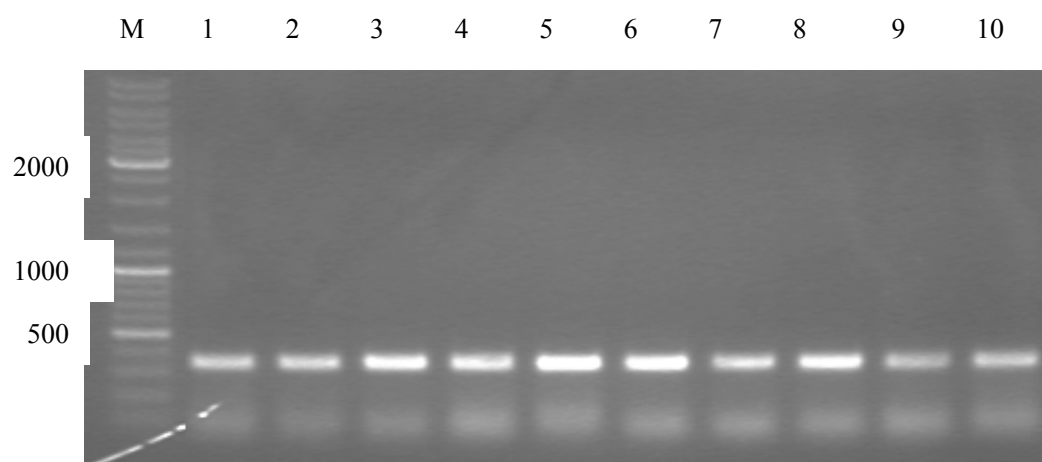


图4 HPV16 型 E7 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 4 Gle electrophoresis of HPV 16 type E7 PCR product

M:DNA molecular weight marker (DL 2000)
1-10:HPV16 type E7 PCR product

3.2 HPV16 致癌基因 E6、E7 序列变异分析

10例HPV16单一感染的标本中的HPV16型E6和E7致癌基因经序列测定，其测定序列相当于HPV16型E6和E7基因原始序列，E6基因从第81位到578位共498个碱基，E7基因从559位到878位共320个碱基，并且与德国标准株比较后，其中不同的位点被视为变异位点。详见如下：

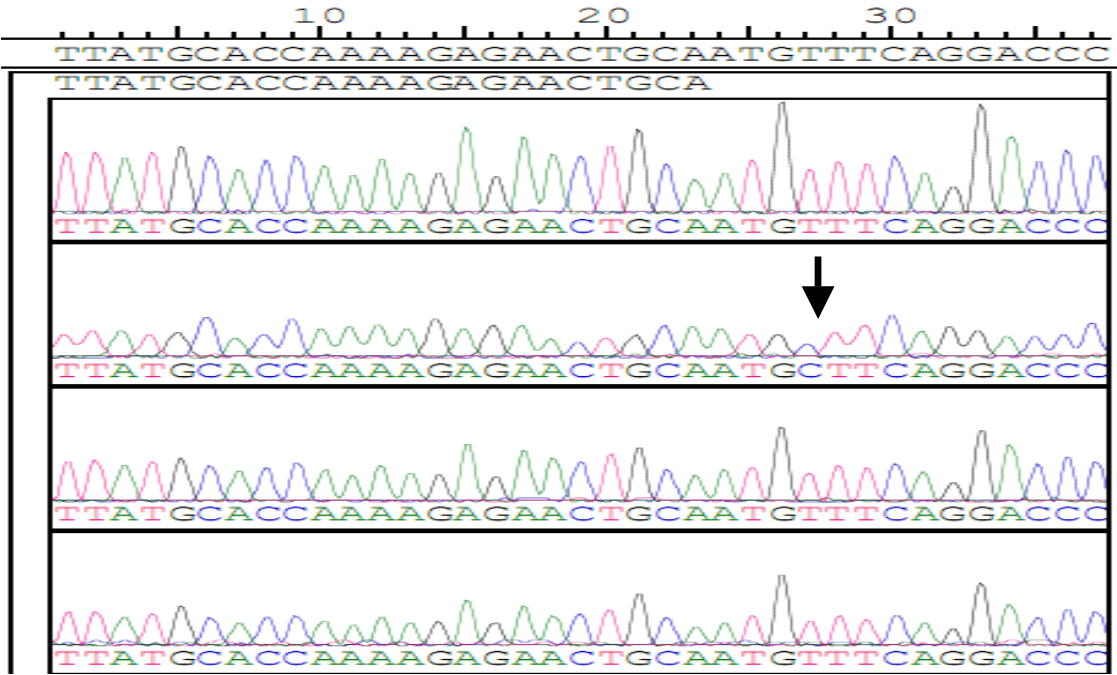


图5 为E6部分测序结果

箭头部分显示：在107位发生(T→C)突变；氨基酸由(Phe→Leu)

Figure 5 Partial sequencing results for the E6

Arrow show: the mutation occurred at 107 (T→C) amino acid (Phe→Leu)

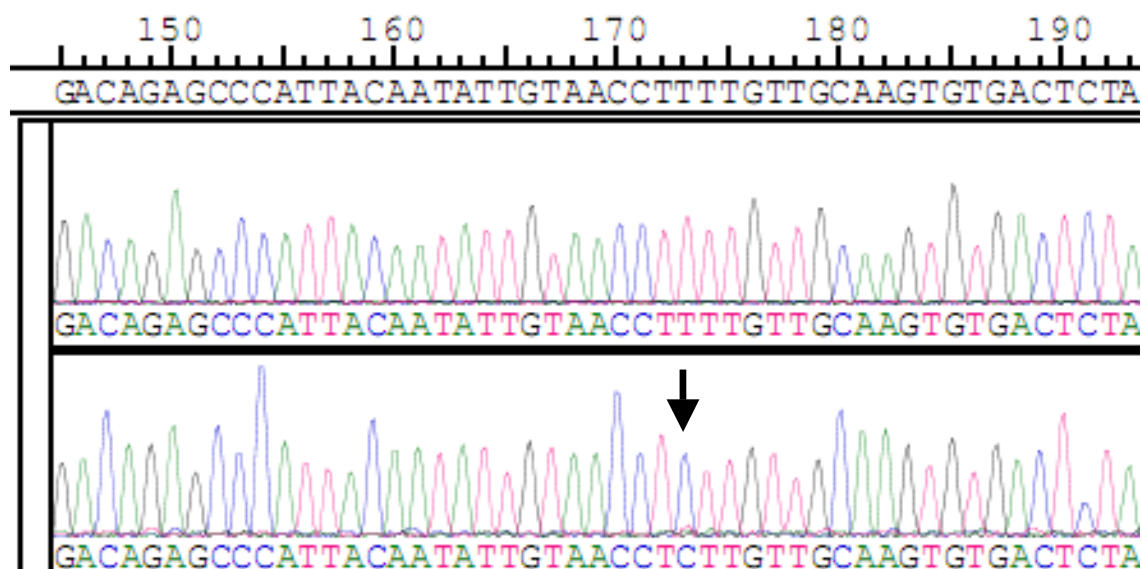


图6 为E7部分测序结果

箭头部分显示：在731位发生 (T→C) 突变；氨基酸由 (Phe →Ser)

Figure 6 Partial sequencing results for the E7

Arrow show: the mutation occurred at 731 (T→C) amino acid (Phe →Ser)

3.2.1 HPV16 型 E6、E7 基因测序结果用 DNAMAN (5.2.2.0)软件与德国标准株比对分析结果

CLUSTAL multiple sequence alignment

```

German e6      --ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-10         TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-1          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-2          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGCTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-3          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-4          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGCAAGTTAC
e6-5          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-6          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-7          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-8          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
e6-9          TTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC
               *****
German e6      CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-10         CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-1          CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACT

```

e6-2	CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-3	CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-4	CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAAGTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-5	CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-6	CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-7	CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-8	CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTACT
e6-9	CACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACT

German e6	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-10	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-1	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-2	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-3	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-4	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-5	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-6	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-7	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-8	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG
e6-9	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAG

German e6	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-10	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTCTATTCTAAAA
e6-1	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-2	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-3	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-4	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-5	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-6	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-7	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-8	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA
e6-9	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAA

German e6	TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA

e6-10 TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA
e6-1 CTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA
e6-2 TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTGTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA
e6-3 TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA
e6-4 TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTGTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA
e6-5 TTAGTGAGTATAGACATTATCGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA
e6-6 TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTGTGTATGGAACAACATTAGAACAGCGATACA
e6-7 TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA
e6-8 TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA
e6-9 TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA

German e6 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-10 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-1 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGAGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-2 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-3 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-4 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-5 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-6 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-7 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-8 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG
e6-9 ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG

German e6 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-10 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-1 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-2 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-3 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-4 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGTA
e6-5 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-6 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-7 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-8 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA
e6-9 AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGA

German e6	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA-
e6-10	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT
e6-1	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT
e6-2	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT
e6-3	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT
e6-4	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT
e6-5	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAGCCAGCTGTAAT
e6-6	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT
e6-7	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT
e6-8	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT
e6-9	CCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAAT

German e7	---ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-10	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-1	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-2	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCGACCAGAGACA
e7-3	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-4	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-5	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-6	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-7	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-8	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA
e7-9	ATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA

German e7	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-10	ACTGATCTCTACTATTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-1	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-2	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-3	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-4	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-5	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-6	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-7	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
e7-8	ACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT

e7-9	ACTGATCTCTACTGTTGTGAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT ***** ** *****
German e7	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-10	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-1	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-2	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTCTTGTTC
e7-3	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-4	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-5	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-6	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-7	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-8	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC
e7-9	GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTC *****
German e7	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-10	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-1	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-2	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-3	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-4	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-5	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-6	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-7	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-8	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG
e7-9	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTG *****
German e7	GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA
e7-10	GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA
e7-1	GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA
e7-2	GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAA
e7-3	GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA
e7-4	GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA
e7-5	GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAA
e7-6	GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA

```

e7-7      GAAGACCTGTTAACGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAA
e7-8      GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCCAGAAACCATAA
e7-9      GAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA
          *****

```

3.2.2 HPV16E6、E7 基因突变引起的氨基酸改变用 DNAMAN (5.2.2.0)软件与德国标准株比对分析结果

```

German E6  ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHDI
E6-10      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHDI
E6-1      -----MHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHDI
E6-2      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMLQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHDI
E6-3      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHDI
E6-4      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTSIHDI
E6-5      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHEI
E6-6      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHDI
E6-7      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHEI
E6-8      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHEI
E6-9      ATAAPSMAYBEDNAPSFRABASESMWMHQKRTAMFQDPQERPGKLPQLCTELQTTIHDI
          *****

```

```

German E6  ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSLYGT
E6-10      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSLYGT
E6-1      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYSKTSEYRHYCYSLYGT
E6-2      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSVYGT
E6-3      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSLYGT
E6-4      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSVYGT
E6-5      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYRYSLYGT
E6-6      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSVYGT
E6-7      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSLYGT
E6-8      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSLYGT
E6-9      ILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLFYISKISEYRHYCYSLYGT
          *****

```

```

German E6  TLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCRSSRTR
E6-10      TLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCRSSRTR
E6-1      TLEQQYNKPLCDLLIRSINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCRSSRTR
E6-2      TLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCRSSRTR
E6-3      TLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCRSSRTR

```


E7-3	APSMAYBEDNAPSFRAABASESMWIMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEE
E7-4	APSMAYBEDNAPSFRAABASESMWIMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEE
E7-5	APSMAYBEDNAPSFRAABASESMWIMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLSDSSEEE
E7-6	APSMAYBEDNAPSFRAABASESMWIMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEE
E7-7	APSMAYBEDNAPSFRAABASESMWIMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLSDSSEEE
E7-8	APSMAYBEDNAPSFRAABASESMWIMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLSDSSEEE
E7-9	APSMAYBEDNAPSFRAABASESMWIMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCCEQLNDSSEEE

German E7	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-10	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-1	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-2	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTSCCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-3	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-4	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-5	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-6	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-7	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLTGTGIVCPICS
E7-8	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS
E7-9	DEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICS

German E7	QKP-----
E7-10	QKPSTMADP
E7-1	QKPSTMADP
E7-2	QKPSTMADP
E7-3	QKPSTMADP
E7-4	QKPSTMADP
E7-5	QKPSTMADP
E7-6	QKPSTMADP
E7-7	QKPSTMADP
E7-8	QKPSTMADP
E7-9	QKPSTMADP

3.2.3 描述性统计分析10例宫颈鳞癌病变中HPV16E6、E7基因突变情况

与德国标准株相比，10例标本中共发现20个突变位点，分别是107(T→C)(Phe→Leu)、133(A→C)(Gly→Ser)、168(C→G)(Thr→Ser)、

178(T→G)(Asp→Glu)、310(T→C)(同义突变)、321(T→C)(同义突变)、341(T→C)(Cys→Leu)、350(T→G)(Leu→Val)；375(A→G)(Gln→Arg)、410(T→A)(Cys→Ser)、499(G→T)(Trp→Thr)、548(A→G)(Thr→Ala)、608(A→G)(Gln→Arg)、632(G→A)(Cys→Tyr)、635(A→G)(Tyr→Cys)、647(A→G)(Asn→Ser)、731(T→C)(Phe→Ser)、760(T→C)(同义突变)、812(T→C)(Met→Thr)、846(T→C)(同义突变)。见表 8 及表 9

标本序号	突变位点											
	107	133	168	178	310	321	341	350	375	410	499	548
German	T	A	C	T	T	T	T	T	A	T	G	A
SCC①						C				A		
SCC②	C							G				
SCC③												
SCC④		C	G					G			T	
SCC⑤				G			C					G
SCC⑥								G	G			
SCC⑦				G								
SCC⑧				G								
SCC⑨												
SCC⑩					C							

表 8 HPV16 新疆株 E6 基因核苷酸序列与标准株的同源性比较结果

(标本①、③、⑤、⑥、⑧为维吾尔族；②、④、⑦、⑨、⑩为汉族)

Table 8 Comparison result of the Nucleotide Acid Sequence of HPV16 E6 gene

Between Xinjiang strain and the standard strain(①、③、⑤、⑥、⑧

are Uyгур specimens;②、④、⑦、⑨、⑩ are Han specimens)

标本序号	突变位点							
	608	632	635	647	731	760	812	846
German	A	G	A	A	T	T	T	T
SCC①								
SCC②	G			G	C			C
SCC③						C		
SCC④								
SCC⑤				G				C
SCC⑥								
SCC⑦				G			C	C
SCC⑧				G				C
SCC⑨			G					
SCC⑩		A						

表 9 HPV16 新疆株 E7 基因核苷酸序列与标准株的同源性比较结果

(标本①、③、⑤、⑥、⑧为维吾尔族；②、④、⑦、⑨、⑩为汉族)

Table 9 Comparison result of the Nucleotide Acid Sequence of HPV16 E7 gene

Between Xinjiang strain and the standard strain(①、③、⑤、⑥、⑧

are Uygur specimens;②、④、⑦、⑨、⑩ are Han specimens)

3.2.4 维、汉妇女宫颈鳞癌 HPV16 亚型 E6 和 E7 基因测序结果对比

5 例汉族标本共发现 14 个突变位点，其中 E6 基因 7 个，分别是 107(T→C)(Phe→Leu)、133(A→C)(Gly→Ser)、168(C→G)(Thr→Ser)、178(T→G)(Asp→Glu)、310(T→C)(同义突变)、350(T→G)(Leu→Val)、499(G→T)(Trp→Thr)。E7 基因 7 个，分别是 608(A→G)(Gln→Arg)、632(G→A)(Cys→Tyr)、635(A→G)(Tyr→Cys)、647(A→G)(Asn→Ser)、731(T→C)(Phe→Ser)、812(T→C)(Met→Thr)、846(T→C)(同义突变)。5 例维吾尔族标本共发现 10 个基因突变位点，其中 E6 基因 7 个，分别是 178(T→G)(Asp→Glu)、321(T→C)(同义突变)、341(T→C)(Cys→Leu)、350(T→G)(Leu→Val)、375(A→G)(Gln→Arg)、410(T→A)(Cys→Ser)、548(A→G)(Thr→Ala)；E7 基因 3 个，分别是 647(A→G)(Asn→Ser)、760(T→C)(同义突变)、846(T→C)(同义突变)。其中 E6 基因突变位点仅发生在汉族标本的有 5 个分别是：107(T→C)(Phe→Leu)、133(A→C)(Gly→Ser)、168(C→G)(Thr→Ser)、310(T→C)(同义突变)、499(G→T)(Trp→Thr)；E6 基因突变位点仅发生在维吾尔族标本的有 5 个分别是：321(T→C)(同义突变)、341(T→C)(Cys→Leu)、375(A→G)(Gln→Arg)、410(T→A)(Cys→Ser)、

548(A→G)(Thr→Ala)。E7 基因突变位点仅发生在汉族标本的有 5 个分别是：608(A→G)(Gln→Arg)、632(G→A)(Cys→Tyr)、635(A→G)(Tyr→Cys)、731(T→C)(Phe→Ser)、812(T→C)(Met→Thr)；E7 基因突变位点仅发生在维吾尔族标本的有 1 个是：760(T→C)(同义突变)。5 例汉族和 5 例维吾尔族标本二者都突变的 E6 基因位点有：178(T→G)(Asp→Glu)、350(T→G)(Leu→Val)；都突变的 E7 基因位点有：647(A→G)(Asn→Ser)、846(T→C)(同义突变)。

4. 讨 论

4.1 HPVE6、E7 基因与宫颈癌

大量的研究表明，HPV感染是引起宫颈癌的主要因素，且近99%的宫颈癌组织中都可检出HPV DNA的存在^[36]。高危型HPV感染是宫颈癌发生发展的重要原因之一，其中以HPV16型感染最为常见。HPV基因组分为3个部分：早期基因区（E区）编码E1、E2、E4、E5、E6、E7蛋白；晚期基因区（L区）编码L1和L2蛋白；位于早期基因区与晚期基因区之间的长调控区（Long control region, LCR）不编码蛋白，主要负责控制病毒的转录。早期基因区与细胞恶性转化有关的基因主要为E6和E7基因^[37~38]。研究发现HPV16型的两个早期编码框架E6/E7基因的表达产物E6/E7原癌蛋白，无论在肿瘤的发生、细胞周期调控以及凋亡调节中都起重要作用，是导致宫颈癌发生的主要原因^[39]。

Burkhard TA研究^[40]发现E6蛋白可结合P53蛋白，并通过活化泛素蛋白酶体途径使P53蛋白降解。亦有报道^[41]证实，高危型HPV16型E6可以与含有PDZ结构域的p52结合，两者结合形成的复合物，可以激活抗凋亡基因细胞凋亡抑制因子2（Cellular inhibitor of apoptosis-2, CIAP-2）的转录，对抗由TNF- α 引起的细胞凋亡信号。E6蛋白的另一个主要功能是它能激活端粒酶催化亚基表达^[42]，Nair等^[43]发现在宫颈癌和宫颈高级别瘤变中，E6蛋白组织中端粒酶表达增加，这提示HPV感染可能通过激活宫颈组织中的端粒酶而最终导致宫颈癌的发生。Gewin等^[44]研究认为HPVE6蛋白对维持端粒酶表达的也是必不可少的。E6蛋白还可以通过Myc、Sp-1作用激活人端粒酶逆转录酶（Human telomerase reverse transcriptase hTERT）的转录^[45]，从而使细胞永生。此外，E6蛋白还可以增强外源DNA整合和细胞基因突变，使中心粒异常和染色体不稳定，阻断干扰素的产生与结合，并降低P16蛋白水平等功能及其他生化特性^[46]。

Lowy等^[47]研究表明HPV16 E7基因，是导致宫颈癌发生的关键基因之一，也是维持肿瘤恶性表型的必需因素，其在恶性肿瘤中呈持续表达和分泌。E7基因的主要功能是通过与Rb蛋白家族结合并通过泛素-26S蛋白酶途径使pRb家族蛋白降解^[48]。McLaughlin等^[49]研究表明高危型HPVE7可以优先结合G1特异性pRb，导

致pRb/E2F复合物无法形成，从而促进细胞从G1期到S期的转变并加快细胞分裂增殖。此外，HPV16 E7也可以与pRb非依赖性的E2F-6相互作用，HPV16 E7与E2F-6结合后，可使E2F-6的转录抑制作用失活，使感染HPV细胞的S期延长^[50]。亦有研究^[51]表明，胰岛素样生长因子结合蛋白3（Insulin-like growth factor-binding protein-3，IGFBP-3）是一种具有促进凋亡作用的抑癌基因产物，HPV16的 E7蛋白可以与其结合，并使胰岛素样生长因子结合蛋白3失活而抑制细胞凋亡。

4.2 HPV E6、E7基因突变与宫颈癌的关系

一些国家和地区对HPV16分子流行病学调查结果表明，E6基因突变可以通过降解p53和活化hTERT，从而增强高危型HPV的致癌性；E6蛋白氨基酸点突变与p53蛋白结合实验结果表明，E6蛋白N端2~12及78~82，111~115，118~132等区域为p53与E6蛋白的结合区域，这些位置的氨基酸突变能够引起E6蛋白与p53蛋白的结合能力^[52~53]。L.Gao等^[54]研究发现，E6蛋白 86~95，96~100，111~120，136~140，141~146及146~150等区域为E6蛋白抗原决定簇区域。Matlashhewski等^[55]发现HPV18 E6蛋白N端23个残基也具有E6蛋白免疫原性，这些位点的突变可能改变病毒免疫原性。同时，E6基因突变株的致癌危险性具有地域性，即同一E6基因突变类型在不同地区的致癌危险性存在明显差异。Sathish等^[56]研究发现70%的印度宫颈癌患者HPV E6基因为350G，30%为350T，而正常对照组中HPV E6基因85%为350T，两组间比较差异有统计学意义，从而提出HPV E6基因350位T到G的突变是宫颈癌高危因素。Berumen J等^[57]研究发现，HPV16 E6 350G突变体在墨西哥妇女HPV16阳性的浸润性宫颈癌中占93.5%。Grodzki M等^[58]研究证实，HPV E6基因的350G突变体较350T原型更易导致宫颈癌。亦有研究^[59]表明，变异的E7基因可能从两个方面发挥致癌作用：（1）E7基因的错义突变可以改变其蛋白水平的作用，从而影响其转化活性；（2）E7基因某些位点的突变，可能改变E7基因的转录与表达。在以往的研究中，通过对各地区E7基因序列及氨基酸序列比较，发现其同源性都在99%以上，可见HPV E7基因相对E6基因较为保守。但国外一些学者发现HPV16 E7基因仍然存在微小变异，并且各国、各地区流行株之间存在差异，如Fuinage等研究^[60]发现HPV16 E7序列变异株存在于大多数侵袭性宫颈癌及癌前病变中；并且Icenogle等^[61]通过研究发现，HPV16 E7的变异株存在于世界不同地区宫颈癌患者组织中。

本研究采用HPV16 E6、E7特异性引物对10例宫颈鳞癌组织DNA进行PCR扩增，并构建克隆载体pUCm-T，对其进行双向测序分析，最大限度地减少了测序中可能存在的模板错配，且双向测序具有一定的校对功能，保证了序列的正确性和结果的准确性，消除了由实验造成的核苷酸序列改变的可能性，研究结果显示，10例标本中共发现20个突变位点，分别是107(T→C) (Phe→Leu)、133(A→C) (Gly→Ser)、168(C→G) (Thr→Ser)、178(T→G) (Asp→Glu)、310(T→C) (同义突变)、

321(T→C)(同义突变)、341(T→C)(Cys→Leu)、350(T→G)(Leu→Val)、375(A→G)(Gln→Arg)、410(T→A)(Cys→Ser)、499(G→T)(Trp→Thr)、548(A→G)(Thr→Ala)、608(A→G)(Gln→Arg)、632(G→A)(Cys→Tyr)、635(A→G)(Tyr→Cys)、647(A→G)(Asn→Ser)、731(T→C)(Phe→Ser)、760(T→C)(同义突变)、812(T→C)(Met→Thr)、846(T→C)(同义突变)。没有发现任何缺失或插入突变。其中178(T→G)(Asp→Glu)、350(T→G)(Leu→Val)、647(A→G)(Asn→Ser)、846(T→C)(同义突变)四个位点突变率较高,其突变率分别为30%(3/10)、30%(3/10)、40%(4/10)、40%(4/10); HPV16E6原型和350nt突变型是宫颈癌组织中的主要分布型,但其在不同国家和地区宫颈癌组织中的分布有较大的差异。已有的研究报道,如350(T→G)(Leu→Val)在墨西哥妇女浸润性宫颈癌中占93.5%^[62],而在北美洲E6基因原型与350nt突变型分别为53%和40%,在欧洲分别为40%和44%,而在美洲中部及南美洲分别为25%和52%,在非洲分别为8%和2%,在东南亚分别为54%和6%^[63],在日本分别为40%和28%^[64]。在本研究中350(T→G)(Leu→Val)原型占70%(7/10),变异型占30%(3/10),其分布与北美洲及日本接近。另外据文献^[65]报道,在一些国家和地区妇女宫颈癌患者感染的 HPV16中不同程度的存在647(A→G)(Asn→Ser)和846(T→C)(同义突变)两个突变位点,在日本妇女宫颈癌患者感染 HPV16中,647(A→G)(Asn→Ser)的突变率为60%(9/15),846(T→C)(同义突变)的突变率为46.7%(7/15);在香港妇女宫颈癌患者感染的 HPV16中,647(A→G)(Asn→Ser)和846(T→C)(同义突变)的突变率分别为58%和52.9%^[66],二者都高于本研究647(A→G)(Asn→Ser)的突变率40%(4/10),846(T→C)(同义突变)的突变率40%(4/10);从而表明,同一位点突变率在不同国家和地区亦有差异。本研究10例宫颈鳞癌标本中共发现12个E6基因突变位点,8个E7基因突变位点,这与^[65-74]研究报道不同,且107(T→C)(Phe→Leu)、133(A→C)(Gly→Ser)、168(C→G)(Thr→Ser)、310(T→C)(同义突变)、321(T→C)(同义突变)、341(T→C)(Cys→Leu)、375(A→G)(Gln→Arg)、410(T→A)(Cys→Ser)、499(G→T)(Trp→Thr)、548(A→G)(Thr→Ala)、608(A→G)(Gln→Arg)、632(G→A)(Cys→Tyr)、635(A→G)(Tyr→Cys)、731(T→C)(Phe→Ser)、812(T→C)(Met→Thr) 15个位点的变异国内尚未见报道,这些位点的变异可能为新的突变类型或是不具有规律性的个体突变,且这些突变位点是否与新疆地区人乳头瘤病毒的高感染率及高度致癌能力有关,有待于我们扩大样本进一步研究。

5例汉族标本共发现14个突变位点,其中E6基因7个,107(T→C)(Phe→Leu)、133(A→C)(Gly→Ser)、168(C→G)(Thr→Ser)、178(T→G)(Asp→Glu)、310(T→C)(同义突变)、350(T→G)(Leu→Val)、499(G→T)(Trp→Thr)。E7基因7个,分别是608(A→G)(Gln→Arg)、632(G→A)(Cys→Tyr)、635(A→G)(Tyr→Cys)、647(A→G)(Asn→Ser)、731(T→C)(Phe→Ser)、812(T→C)(Met→Thr)、846(T→C)(同义突变)。5例维吾尔族标本共发现10个基因突变位点,

其中 E6 基因 7 个, 分别是 178(T→G)(Asp→Glu)、321(T→C)(同义突变)、341(T→C)(Cys→Leu)、350(T→G)(Leu→Val)、375(A→G)(Gln→Arg)、410(T→A)(Cys→Ser)、548(A→G)(Thr→Ala); E7 基因 3 个, 分别是 647(A→G)(Asn→Ser)、760(T→C)(同义突变)、846(T→C)(同义突变), 这与^{[70][73][74]}研究报道有差异。E6 基因突变位点仅发生在汉族标本的有 5 个分别是: 107(T→C)(Phe→Leu)、133(A→C)(Gly→Ser)、168(C→G)(Thr→Ser)、310(T→C)(同义突变)、499(G→T)(Trp→Thr); E6 基因突变位点仅发生在维吾尔族标本的有 5 个分别是: 321(T→C)(同义突变)、341(T→C)(Cys→Leu)、375(A→G)(Gln→Arg)、410(T→A)(Cys→Ser)、548(A→G)(Thr→Ala)。E7 基因突变位点仅发生在汉族标本的有 5 个分别是: 608(A→G)(Gln→Arg)、632(G→A)(Cys→Tyr)、635(A→G)(Tyr→Cys)、731(T→C)(Phe→Ser)、812(T→C)(Met→Thr); E7 基因突变位点仅发生在维吾尔族标本的有 1 个是: 760(T→C)(同义突变)。5 例汉族和 5 例维吾尔族标本二者都突变的 E6 基因位点有: 178(T→G)(Asp→Glu)、350(T→G)(Leu→Val); 都突变的 E7 基因位点有: 647(A→G)(Asn→Ser)、846(T→C)(同义突变)。这种维、汉族宫颈鳞癌组织中 HPV16 型 E6 和 E7 基因突变的差异性, 是否表明 E6 和 E7 基因突变位点在两民族之间有差别, 有待于我们扩大样本进一步研究。

4.3 HPV 疫苗与宫颈癌

宫颈癌是世界上最常见妇科恶性肿瘤, 严重威胁女性生殖健康和生命, 随着对宫颈癌致病因素的逐步阐明, 除了传统的治疗方法外, 一种新兴的疫苗治疗也正在蓬勃发展, 并走向临床^[75]。HPV 疫苗有预防性和治疗性两种。现有的预防性疫苗是由病毒衣壳蛋白 L1 或 L1 与 L2 组成, 预防性疫苗能够在细胞内可自我组装成病毒样颗粒 (Virus-like particles VLPs), 并通过激发机体的 CD4 + T 细胞介导的体液免疫应答, 从而刺激机体产生高效价保护性中和抗体。因此, VLPs 是一种合理的预防性疫苗。人类首个宫颈癌疫苗已经于 2006 年 6 月获 FDA 批准上市, 该疫苗分 3 剂, 要在 6 个月内注射完毕, 在注射第一针后的第 2、6 个月注射完毕。有研究表明^[76], 预防性注射 HPV6、HPV11、HPV16 和 HPV18 疫苗可使 HPV 感染率降低 90%。而治疗性疫苗尚处于研究阶段, 主要是针对高危型 HPV 的 E6、E7 蛋白, 诱导机体细胞免疫。由于 HPV E6、E7 原癌蛋白具有免疫原性, 能刺激机体产生抗肿瘤的免疫反应, 因此, 针对 E6、E7 蛋白的预防性及治疗性疫苗研究已成为热点。但是由于 HPV16 存在许多具有地域特征的变异株, 有研究^[77]表明这些变异株可引起生物学活性的差异, 因此不同地区须针对本地区 HPV16 型基因的特点来研制针对性的 HPV 疫苗。本课题通过对 HPV16E6、E7 基因变异的研究, 提示我们, 今后研制开发针对新疆地区预防性和治疗性的 HPV 疫苗时, 需注意这些位点的变异, 特别是一些引起氨基酸变异的位点。

结 论

(Conclusions)

- (1) 新疆维吾尔族、汉族妇女宫颈癌的 HPV 感染谱不同;
- (2) 高危型 HPV16 感染无论在维吾尔族还是汉族宫颈癌中所占比列都是最高, 且 HPV56 感染可能是新疆维吾尔族妇女宫颈癌较易感染的型别;
- (3) 新疆维吾尔族、汉族妇女宫颈癌中存在 HPV 多重感染, 多重感染中以二重感染为主, 且多重感染类型以 HPV16 合并其他型别感染为主;
- (4) 与德国标准株比较, 新疆维吾尔族、汉族妇女宫颈癌病变中 HPV16 型 E6 和 E7 基因存在一定范围的变异;
- (5) 178(T→G)(Asp→Glu)、350(T→G)(Leu→Val)、647(A→G)(Asn→Ser)、846(T→C)(同义突变)为新疆维吾尔族、汉族妇女宫颈癌病变中的热点突变;

参考文献

- [1] Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002[J]. Int J Cancer, 2006, 118(12):3030-3044.
- [2] 拉莱, 苏祖克. 不同民族妇女中 2727 例子宫颈癌的统计学分析[J]. 新疆医学院学报, 1990, 9: 48.
- [3] 李庭芳, 古丽娜·库尔班, 王涛, 等. 新疆伽师县夏普桃勒乡妇女子宫颈癌防治研究[J]. 新疆医学院学报, 1996, 19(3):199-203.
- [4] Castellsague X, Draz M, de Sanjose S, et al. Worldwide human papillomaviruses etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention [J]. J Natl Cancer Inst. 2006, 98:303-315.
- [5] Faras AJ, Krzyzek RA, Ostrow RS et al. Genetic variation among Papillomavirus Ann New York Acad of sciences, 1980
- [6] Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus [J]. J Formos Med Assoc, 2008, 107:198-217.
- [7] Zehbe I, Wilander E, Delius H. et al. Cancer Res. [J], 1998, 58: 829-833.
- [8] Del Refugio González-Losa M, Laviada Mier y Teran MA, Puerto-Solis M, et al. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer[J]. J Clin Virol. 2004 Feb; 29(2):95-8.
- [9] Kang S, Jeon YT, Kim JW, et al. Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical tissues of Korean women[J]. Int J Gynecol Cancer. 2005 Jan-Feb; 15(1):107-12.
- [10] Eschle D, Dürst M, ter Meulen J, et al. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16[J]. J Gen Virol. 1992, 73 (Pt 7):1829-32.
- [11] 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.
- [12] Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia[J]. Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Jun; 68(2):362-72.
- [13] Cheah PL, Looi LM. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review[J]. Malays J Pathol. 1998 Jun; 20(1):1-10.
- [14] Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? [J]. J Pathol. 2007 Aug; 212(4):356-67.
- [15] Castellsague X, Draz M, de Sanjose S, et al. Worldwide human papillomaviruses etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention [J]. J Natl Cancer Inst. 2006, 98:303-315.
- [16] Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus [J]. J For-

- mos Med Assoc,2008,107:198-217.
- [17] Bulk S,Berkhof J,Bulkmans NW,etal.Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in the Northern lands[J].Br J Cancer,2006,94(1):171-175.
- [18] Ault KA,Giuliano AR,Edwards RP,etal.A phase I study to evaluate a human papillomavirus (HPV) type 18 L1 VLP vaccine[J].Vaccine,2004,22(23-24):3004-3007.
- [19] Bosch FX,Lorinoz A,Munoz N,etal.The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J].Clin Pathol,2002,55(4):244-265.
- [20] 吴玉萍,陈裕隆,李隆玉,等.宫颈癌患者人乳头瘤病毒 (HPV) 主要型别及感染研究[J].病毒学报,2005,21(4):269-273.
- [21] World Health Organization,International Agency for Research on Cancer:IARC Handbooks of Cancer Prevention[M].Cervix Cancer Screening,Lyon 2005:10.
- [22] Becker TM,Wheeler CM,Megough NS,etal.Cervical papillomavirus infection and cervical dysplasia in Hispanic,Native American and non-hispanic white women In New Mexico [J]. American Journal of Public Health, 1991,81(5):582-586.
- [23] Guzhalinuer.ABLZ,Peng Zhi-lan,Wang He,etal.HPV subtype express difference between Han Chinese women's cervical cancer in the north-west Sichuan and Uygur women's cervical cancer in southern Xinjiang[J].Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(5):408(In Chinese).
- [24] Clifford GM,Smith JS,Aguado T,etal.Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer:ameta analysis[J].Br J Cancer,2003,89:101-105.
- [25] Lo KW,Wong YF,Chan MK,etal.prevalence of human papillomavirus in cervical cancer:amulticenter study in China[J].Int J Cancer,2002,100:327-331.
- [26] 刘开江,赵莉,刘继文,等.新疆维、汉妇女宫颈癌与人类乳头瘤病毒的关系研究[J].新疆医科大学学报,2008,31(10):1338-1341.
- [27] Schellekens MC,Dijkman A,Aziz MF,etal.Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta Indonesia[J].Gynecol Oncol,2004,93(1):49-53.
- [28] Huang LW,Chao SL,Chen PH,etal.Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues[J].J Clin Virol ,2004,29(4):271-276.
- [29] Mejlhede N, Bonde J, Fomsgaard A.High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women.APMIS. 2009 Feb;117(2):108-14.
- [30] Khair MM, Mzibri ME, Mhand RA,etal.Molecular detection and genotyping of human papillomavirus in cervical carcinoma biopsies in an area of high incidence of cancer from Moroccan women[J]. J Med Virol. 2009 Apr;81(4):678-84.
- [31] 章涛,娄雪玲,李彦,等.宫颈疾病HPV混合型感染的检测与分析[J].现代妇产科进展,2009,18(1):11-13.
- [32] Lee SH,Kang D,Seo SS,etal.Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV

- DNA chip[J].Cancer Letter,2003,198(2):187-192.
- [33] Wang PD,Lin RS,Risk factors for cervical epithelial neoplasia in Taiwan[J].Gynecol Oncol,1996,62(1):10-18.
- [34]张苏琴, 库尔班尼沙·亚合甫, 古扎丽努尔·阿不力孜, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌与人乳头瘤病毒多重感染的关系研究[J].新疆医科大学学报,2009,32(5):525-528.
- [35] Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M,etal.Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)[J]. MMWR Recomm Rep. 2007 Mar 23;56(RR-2):1-24.
- [36] Cuzick J, Szarewski A, Terry G,etal.Human papillomavirus testing in primary cervical screening[J]. Lancet. 1995 Jun 17;345(8964):1533-6.
- [37] Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE,etal.HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6[J]. Virology. 2006,350(1): 216-27.
- [38]高艳娥,郭金珠,张菊,等.宫颈癌患者 HPV16 型 E6 蛋白的表达纯化及血清抗体检测[J].癌症,2006,25(11):1374-1379.
- [39] 徐波,胡丽娜,顾美礼,人乳头瘤病毒 E6、E7 原癌蛋白致癌的机制[J].国外医学妇产科分册,2001,28(4):198-201.
- [40] Burkhard TA,Willingham M,Ga YC,etal.The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes[J].VirologyM,1989,170:334-339.
- [41] James MA, Lee JH, Klingelhutz AJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner[J].J Virol. 2006 Jun;80(11):5301-7.
- [42] Riley RR,Duensing S,Brake T,etal.Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse of cervical carcinogenesis[J].Cancer Res,2003,63:4862.
- [43] Nair P, Jayaprakash PG, Nair MK,etal.Telomerase, p53 and human papillomavirus infection in the uterine cervix[J].Acta Oncol. 2000;39(1):65-70.
- [44] Gewin L, Galloway DA.E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc[J]. J Virol. 2001 Aug;75(15):7198-201.
- [45] Nakamura TM,Morin GB,Chapman KB,etal.Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J].Science,1997,277:955.
- [46] Zur Hausen H.Papillomaviruses causing cancer:evasion from hostcell control in early events in carcinogenesis[J].J Natl cancer Inst,2000,92(9):690-698.
- [47] Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT.Genital human papillomavirus infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Mar 29;91(7):2436-40.
- [48] Berezutskaya EB,Yu B,Morozov P,etal.Differentiation regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein[J].Cell Growth Differ,1997,8:1277-1286.

- [49] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein[J]. Virology. 2009,384(2):335-44.
- [50] McLaughlin-Drubin ME, Huh KW, Münger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6[J]. J Virol. 2008,82(17):8695-705.
- [51] Santer FR, Moser B, Spoden GA, et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits apoptosis mediated by nuclear insulin-like growth factor-binding protein-3 by enhancing its ubiquitin/proteasome-dependent degradation[J]. Carcinogenesis. 2007 Dec;28(12):2511-20.
- [52] Crook T, Tidy J. A, Vousden K. H. Pitx2a Binds to Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein and Inhibits E6-mediated P53 Degradation in HeLa Cells. Cell[J], 1991, 67: 547-556.
- [53] Foster SA, Demers GW, Etscheid B. G. 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. [J], 1994, 68: 5698-5705.
- [54] L. Gao, B. Chain, C. Sinclair, L. Crawford, J. Zhou, J. Morris, X. Zhu and Stauss, H. (1994). Immune response to human papillomavirus type 16 E6 gene in a live vaccinia vector. J. Gen. Virol. 75:157-164.
- [55] Matlashewski, G., Banks, L, Wu-Liao, J, Spence, P, Pim, D and Crawford, L. (1986) The expression of human papillomavirus type 18 E6 protein in bacteria and the production of anti-E6 antibodies. J. Gen. Virol. 67:1909-1916.
- [56] Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, et al. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia[J]. Cancer Lett, 2005, 229(1): 93-99.
- [57] Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study[J]. J Natl Cancer Inst. 2001 Sep 5;93(17):1325-30.
- [58] Grodzki M, Besson G, Clavel C, et al. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Apr;15(4):820-2.
- [59] Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papilloma virus polypeptides E6 E7 are Zinc-binding proteins[J]. J Virol, 1988, 63(3):1404-1407.
- [60] Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias[J]. Virus Genes. 1994, 9(1):85-92.
- [61] Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, et al. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16[J]. Virology. 1991, 184(1):101-7.
- [62] Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38:3388-3393.
- [63] Yamada T, Manos MM, Peto M, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in

- cervical cancers:a worldwide perspective[J].J Virol, 1997,71:2463-2472.
- [64] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population[J]. Cancer Lett, 2000, 156: 159-165.
- [65] Kuroda T, Yoshinari M, Okamura K, et al. Sequence Variation of Human papillomavirus Type 16 E7 in Preinvasive and Invasive Cervical Neoplasias[J]. Virus Genes, 1994, 9(1): 85-92.
- [66] Chan PK, Lam CW, Cheung TH. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China[J]. J Infect Dis. 2002 Sep 1; 186(5): 696-700.
- [67] 王华, 蔡红兵, 丁晓华. 湖北地区宫颈癌组织 HPV16E7 和 E5 转化基因变异分析[J]. 武汉大学学报(医学版), 2009, 30(6): 759-762.
- [68] 任茁, 吴宏伟, 宋杰. 人乳头瘤病毒 16 型 E6 和 E7 基因特征分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(2): 88-90.
- [69] 杨英捷, 赵健, 廖秦平. 北京地区人乳头瘤病毒 16 型感染及其 E6E7 基因变异与宫颈病变的相关性研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21(1): 32-34.
- [70] 马正海, 张富春, 梅新娣等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 E6 基因突变分析[J]. 癌症, 2004, 23(9): 1016-1020.
- [71] 张茂祥, 张富春, 蹇晓红等. 人乳头瘤病毒 16 型 (新疆株) E7 基因的克隆与突变研究[J]. 生物技术, 2003, 13(6): 4-6.
- [72] 王华, 蔡红兵, 丁晓华. 湖北地区宫颈癌组织 HPV16E7 和 E5 转化基因变异分析[J]. 武汉大学学报(医学版), 2009, 30(6): 759-762.
- [73] 马正海, 钱东, 马纪等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型 E6 基因的克隆和序列分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(3): 400-404.
- [74] 刘欣, 刘国炳, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16E7 序列多态性分析[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(10): 1272-1275.
- [75] 徐波, 胡丽娜, 顾美礼, 宫颈癌治疗性疫苗研究进展[J]. 国外医学妇产科分册, 2000, 27(6): 353-356.
- [76] Villa L L, Costa R L, Petta C A, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(5): 271-278.
- [77] Chen L, Ashe S, Brady WA, et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4[J]. Cell. 1992 Dec 24; 71(7): 1093-102.

综 述

人乳头瘤病毒与宫颈癌关系研究进展

刘 伟 综述 周 瑾 审校

摘 要：宫颈癌是一种严重危害女性健康的恶性肿瘤，其发病率较高，位居女性恶性肿瘤的第二位，仅次于乳腺癌。自从 1977 年德国学者 ZurHausen 等从宫颈癌标本中发现了人乳头瘤病毒（Human papillomavirus HPV）DNA，并推测 HPV 感染与宫颈癌发生有关后，许多学者对 HPV 与宫颈癌的相关性进行了大量的研究，并证实 HPV 感染是宫颈癌发病的必需因素。目前，对于宫颈 HPV 感染检测有多种手段，其中聚合酶链反应（PCR）和捕获杂交技术在实验室中应用较广泛。在宫颈癌筛查中联合应用 HPV 检测和细胞学，不仅可以提高敏感性，而且还可以减少随诊频率，从而大大降低了宫颈癌的发生。

关键词：人乳头瘤病毒；宫颈癌

宫颈癌是女性生殖系统的常见恶性肿瘤，据世界范围内的统计，每年大约有 50 万新发的宫颈癌病例，其中有 80% 发生在发展中国家，是发展中国家妇女死亡的主要原因之一^[1]。我国每年新发病例约计 13.15 万，占世界宫颈癌新发病例总数的 28.8%。宫颈癌严重威胁女性的健康和生命，近年来其发病率不但上升且有年轻化趋势^[2]。近年来流行病学和分子生物学的研究已经证实 HPV 与宫颈癌的发生密切相关，尤其是高危型 HPV。本文就 HPV 与宫颈癌关系的研究进展综述如下。

1 HPV 的生物学特性及致癌机制

1.1 生物学特性

HPV 属于乳头瘤病毒科乳头瘤病毒属，是一类分子量较小的双链环状 DNA 病毒，基因组含 8000bp，由 DNA 核心和蛋白衣壳组成，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^[3]，引起局部上皮增生，增厚或呈乳头状，在宫颈则引起宫颈上皮不典型增生及宫颈癌。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 个开放读码框架(ORF)，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），其中早期区含有 6 个基因（E1，E2，E4，E5，E6 和 E7），是维持病毒复制、编码病毒蛋白和细胞内病毒高拷贝数的基因。晚期区有 2 个基因即 L1 和 L2，分别编码主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白。上游调控区位于 E 区和 L 区之间，长约 400bp，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^[4]。

1.2 致癌机制

1.2.1 HPV 整合的部位及特点

HPV 如何引起肿瘤发生发展的, 一般认为在良性病变中 HPV 以游离形式存在, 而在恶性肿瘤中以单拷贝或多拷贝与宿主细胞整合, 整合是肿瘤发生的前提^[5]。整合可发生在 HPV DNA 的不同部位。有报道在宫颈癌细胞系 SiHa 中整合有 95% 的 HPV16 基因组, 整合发生在 E2 和 E4 之间, 缺失 251bp, 并发现病毒整合在第 13 号染色体上^[6]。Kalantari 等^[7]研究浸润性宫颈癌 (ICC) 标本, 发现 84% (31/37) 的 ICC 中有 HPV16 DNA 的整合, 其整合部位在细胞的 1q²⁵、3q²⁸、6q²⁵、11q¹³、18q²²。Thorland 等^[8]发现, 宫颈癌中 HPV16 多整合于染色体的脆性部位 (Chromosomal fragile site CFS) 如 FRA3B、FRA6C、FRA17B。近期的研究又发现^[9]FRA13C(13q²²)也是 HPV16 在宫颈癌中的整合点。HPV DNA 整合到细胞基因组是一件不可逆转的事件^[10]。

1.2.2 E2、E6 和 E7 基因

目前认为, 整合后的 DNA 发生致癌作用的主要基因为 E2、E6 和 E7^[11]。E2 蛋白约 50kDa, 在病毒 DNA 的复制中起重要作用。E2 病毒基因编码两种具有转化调节功能的蛋白质。E2 蛋白在 N 末端有转录活性域, C 末端有 DNA 结合域, 完整的 E2 蛋白是一个阳性调节因子, 而仅有 DNA 结合域的蛋白质则是一个抑制因子。完整长度的 E2 蛋白诱发细胞停留在 S 期, 允许病毒 DNA 复制, 同时也导致细胞 DNA 的增加^[12]。E2 蛋白识别和结合在 E1 蛋白结合位点邻近的 DNA 复制起点序列上, 促进 E1 蛋白到位和提高 E1 蛋白对复制起点的结合力, 从而参与启动病毒 DNA 的复制^[13]。

E6 蛋白约为 150 个氨基酸大小, 包含有 4 个 Cys-X-X-Cys 的保守序列, 参与该蛋白的结合锌和细胞转化功能。已发现 E6 可结合多种蛋白, 其中最重要的是结合 P53 蛋白, 并通过与之结合的 E6-AP 蛋白而活化泛素蛋白酶体途径降解 P53 蛋白^[14]。P53 蛋白具有肿瘤抑制的特性, 它的主要功能是控制细胞周期 G1/S 和 G2/M 两个关卡。一旦 DNA 损伤, P53 激活并诱导 P21, 抑制细胞从 G1 期进入 S 期, 使损伤的 DNA 在复制之前有足够的时间修复。如果 DNA 损伤过重, P53 便激活 Bak, bax-1 和 fas 等受体基因, 诱导细胞死亡。E6 蛋白的另一个主要功能是它们能激活端粒酶催化亚基表达^[15], 而端粒酶的活性通常只限于在胚胎细胞, 体细胞一般无活性, 端粒酶活性的丧失引起端粒酶缩短, 使细胞连续分裂最终导致细胞衰老死亡。然而, 大多数的研究表明: 在癌症中, hTERT 表达的再激活导致端粒酶活性的恢复。E6 还可以通过与 Myc、Sp-1 作用激活 hTERT 转录^[16], 使细胞永生化。此外, E6 还有增强外源 DNA 整合和细胞基因突变性, 使中心粒异常和染色体不稳定, 阻断干扰素的产生、结合并降低 P16 蛋白水平等

功能及其他的生化特性^[17]。

E7 蛋白约 100 个氨基酸大小，有三个保守区（CR）。CR1 位于 N 端、CR2 含有 LXCXE 结构域、CR3 含两个锌指样结构域。E7 的主要功能就是通过与 Rb 蛋白家族（PRb、P107、P130）结合并通过泛素-26S 蛋白酶途径降解 PRb 家族蛋白^[18]。Rb 蛋白家族处于细胞周期 G1/S 关卡环节。在去磷酸化状态下 Rb 蛋白结合转录因子 E2F 蛋白，阻止 E2F 蛋白激活众多的与 DNA 复制有关的蛋白因子，从而抑制 DNA 合成和细胞周期进展，使细胞处于 G0/G1 期和进行细胞分化。当 E7 蛋白结合并降解 Rb 蛋白，释放 E2F 蛋白使其激活许多相关的 DNA 合成的蛋白因子，从而加快 DNA 复制和细胞分裂繁殖，促进细胞的转化。Caldeiro 等^[19]用 5 种不同型别（10, 32, 48, 54, 77）的 HPVE7 来研究 E7 与 pRb 家族蛋白结合的能力同 E7 刺激细胞生长的关系。他们发现，不同型别的 E7 与 pRb 和 P107 的结合力是不同的，但所有的 E7 均增高了体外培养的永生化啮齿类成纤维细胞的增殖率，此能力与其与 pRb 和 p107 结合的能力无关。

2 HPV 的型别与宫颈癌

HPV 在长期的进化过程中与人类宿主的免疫系统相互作用，形成了多种变异类型。在已发现的 100 多种不同 HPV 亚型中约 40 种可感染生殖道，约 20 种与肿瘤发生有关^[20]。根据 HPV 的结构、功能和致病性的不同，将 HPV 分为高危型和低危型。低危型包括 HPV6, 11, 32, 40, 42, 44 等主要引起皮肤粘膜的良性增生性病变，如寻常疣、尖锐湿疣和低度宫颈上皮内瘤样病变（CIN I）等，一般不诱发癌变^[21]。高危型包括 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 等可诱发全身多部位癌变如 CIN II、CIN III 和宫颈癌等^[22]。Ault 等^[23]研究发现，HPV16 和 HPV18 约 70% 可引起宫颈癌。Bulk 等^[24]报道，HPV16 与鳞状细胞癌的发生密切相关，而 HPV18 则与腺癌相关。Mattheus 等^[25]报道，99.7% 的宫颈癌患者可检出高危型的 HPV。

3 HPV 感染与宫颈癌的发生

大量的流行病学资料以及研究证据已经确定 HPV 与宫颈癌的病因关系。HPV 感染的疾病通常划分为潜伏感染期、亚临床感染期、临床症状期和 HPV 相关的肿瘤期。性行为造成皮肤或黏膜的轻微损伤，基底层细胞暴露，病毒进入机体建立低复制游离病毒基因组并随细胞染色体共同复制。并不是所有的 HPV 感染者都会进展为癌，能否进展到高度宫颈上皮内瘤变和癌症，主要取决于三方面的因素：病毒、宿主和环境因素。临床与实验研究显示，人体感染 HPV 后有 3 种演变可能：（1）部分人感染 HPV 后，因为宿主体内抗体的保护作用，经过一段时间后，HPV 感染可逐渐消失，即一过性感染。（2）部分人感染 HPV 后，HPV 可长期停留在皮肤黏膜中，不引起任何临床症状与不适。（3）部分人持续性感染 HPV 后，经过一段潜伏期后进一步发展成有临床表现的病变，如尖锐湿疣、肿

瘤等。一般认为高危 HPV 的感染过程更容易成持续性,尤其是 HPV16。HPV16 感染后病毒清除率较低,致高级别的宫颈上皮内瘤变的危险性高,且治疗后病灶残留率和复发率高^[26]。宫颈癌是否发生除了取决于 HPV 的持续感染外,还取决于被感染者的机体免疫反应状况。研究显示^[27],免疫功能受损或免疫缺陷的女性要比正常女性更容易出现 HPV 持续感染,这为宫颈癌的发生创造了有利的条件。卢洪胜等^[28]研究发现,HPV 感染是宫颈癌及癌前病变的主要致病因素,尤其是 HPV16、18 与宫颈癌密切相关。

4 HPV DNA 的检测与宫颈癌的筛查

4.1 HPV DNA 的检测

HPV DNA 的检测是发现宫颈癌和癌前病变的有效手段,HPV DNA 是宿主感染 HPV 的主要和直接的证据。目前常用的检测方法有细胞学法、斑点印迹法、原位杂交法、核酸印迹原位杂交法、聚合酶链式反应(PCR)法和杂交捕获(HC)法,各种方法的敏感性和特异性各不相同。细胞学法敏感性和特异性低、斑点印迹由于有放射性,故二者在临床上很少使用。原位杂交由于无信号放大,故敏感性较低,临床上也较少使用。目前用于临床的主要有美国 Digene 的杂交捕获第二代(HC II)和聚合酶链式反应(PCR)技术。HC II 是目前唯一被美国 FDA 批准的 HPV DNA 检测技术,它能同时检出 13 种高危型及 5 种低危型,阴性预测值高达 99%,检出的敏感性和特异性分别为 95%和 85%^[29]。但其缺点在于仅能定量不能进行准确的 HPV 分型,且检测成本昂贵。PCR 是近年来发展的基因芯片技术,它利用高通量特性达到对某种基因的同时检测和筛查,具有简化检测步骤,缩短检测时间、价格低廉并能够对 HPV DNA 准确分型的优点。但由于其敏感性较 HC II 差,用于筛查宫颈癌前病变尚存在一定得漏诊率,还有待于大样本临床实验的验证^[30]。

4.2 宫颈癌筛查

自 1941 年 Papanicolaou 首先提出子宫颈和阴道细胞检查方法以来,世界各国都将巴氏涂片法作为宫颈癌筛查的一种手段引入临床,从而使筛查人群宫颈浸润癌的发病率降低了 70%。但巴氏涂片筛查的敏感性和特异性低,且假阴性率高。20 世纪 80 年代后期,随着计算机技术的发展,液基薄层细胞学检查(Thinprep cytology test TCT)技术应运而生,它是利用现代计算机技术与物理学技术相结合,采用专门的宫颈刷和液基保存技术对细胞成分进行取材和固定保存,能够将收集到得细胞几乎 100%保存在固定液体中。标本制片薄而均匀、涂片清晰、阅片容易,提高了宫颈癌前病变及早期宫颈癌筛查的灵敏度和特异度,从而避免了传统的制片技术存在的材料太厚、细胞重叠、背景模糊等缺陷^[31]。近年来,许多研究表明^[32],宫颈脱落细胞学(TCT)检测联合 HPV DNA 检测在宫颈癌的早期筛查中具有很大的优越性。它不仅可以避免单独使用细胞学造成的 15~30%

左右的漏诊率,同时还可准确处理细胞学结果为 ASCUS/ACUS 的对象,同时还可以有效的降低阴道镜转诊率。邹单东等^[33]研究表明,HPV 基因分型检测与细胞学联合,是最佳的宫颈癌筛查的方案。由此可以看出,将 HPV 检测与宫颈脱落细胞学相结合筛查宫颈癌,既提高了筛查的质量又节约大量不必要的人力和财力。

宫颈癌筛查系统(TruScreen)是一种检测宫颈癌及癌前病变的新技术,它利用光电特性通过探头轻触宫颈表面,以低强度的电和光探测宫颈直接找出宫颈组织内癌变或癌前病变细胞。Singer 等^[34]报告了对 TruScreen、宫颈涂片以及 TruScreen 和宫颈涂片联合的敏感性所作的比较,总共有 651 位妇女参加了这 10 个中心的试验,结果显示 TruScreen 对 CIN II 和 CIN II/III 的敏感性分别为 67%和 70%,而 TruScreen 联合宫颈涂片对 CIN II 和 CIN II/III 的敏感性分别为 87%和 93%,且差异有统计学意义。吕斯迹等^[35]的研究中显示 TruScreen 的效果评价高于 LCT。在我国,TruScreen 作为一种新的宫颈病变筛查技术可能会达到较好的筛查效果。

5 HPV 疫苗

开发 HPV 疫苗的理论基础是 HPV 感染能诱导体液免疫和细胞免疫,使病程不发展,最终 HPV 消失。目前对 HPV 疫苗的研究主要针对高危型 HPV。因此宫颈癌 HPV 疫苗包括预防性和治疗性疫苗两大类。预防性疫苗主要通过诱导有效的体液免疫应答来抵抗 HPV 感染;治疗性疫苗主要通过刺激细胞免疫应答以清除病毒感染或已变异的细胞。预防性和治疗性疫苗主要有 3 组病毒蛋白可诱导机体产生有效的免疫应答:①病毒癌基因 E6 和 E7,两者可在宫颈癌中持续表达;②其他早期蛋白,如 E1、E2、E4 和 E5;③病毒衣壳蛋白 L1 和 L2,可表达于上皮基底层。多数预防性疫苗由衣壳蛋白 L1 和 L2 组成的 VLPs 作为靶抗原,诱导机体产生特异性中和抗体达到预防效果,这种疫苗是一种理想的亚单位疫苗,它不含有病毒 DNA 或癌蛋白,类似于乙型肝炎病毒疫苗,VLPs 具有较高的免疫原性和安全性^[36]。

预防性疫苗是一种亚单位疫苗。现有的此类疫苗是由病毒衣壳蛋白 L1 或 L1 与 L2 组成,在细胞内可自我组装成 VLPs。VLPs 具有与完整病毒相同的抗原空间表位,可激发机体的 CD4 + T 细胞介导的体液免疫应答,刺激机体产生高效价保护性中和抗体。因此,VLPs 是一种合理的预防性疫苗。有研究表明^[37],预防 HPV6、HPV11、HPV16 和 HPV18 感染的疫苗可使其感染率降低 90%。高危型 HPV16/18 早期表达的 E6、E7 基因是引起宫颈上皮细胞转化最重要的癌基因,因此,针对 E6、E7 蛋白的治疗性疫苗已成为近年研究热点。目前研究的治疗性疫苗主要分为 3 种:(1)重组疫苗;(2)多肽疫苗,多肽疫苗部分已进入临床实验,并取得了一定的效果;(3)核酸疫苗,优点是制备简单、安全、性质稳定,但对裸 DNA 疫苗而言,其免疫源性并不满意^[38]。

6 展望

尽管宫颈癌的发生是多因素共同作用的结果，然而它的病因比较明确，主要与高危型 HPV 感染有关。因此，它是可以预防、可以治愈的疾病。HPV 预防性的疫苗研制成功，给人们战胜宫颈癌带来了希望。尽管 HPV 疫苗种类很少、且价格比较高，难以推广应用。但是，随着科学技术的不断发展及宫颈癌疫苗的广泛应用，我们相信在不久的将来宫颈癌必将成为人类历史上第一个可以真正防治的恶性肿瘤。

参考文献

- [1] Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002[J]. Int J Cancer, 2006, 118(12):3030-3044
- [2] 万磊, 万建平, 张燕玲, 等. 子宫颈癌年轻化趋势的临床分析[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(10):547
- [3] 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
- [4] Seedorf K, Krammer G, Durst M. Human Papillomavirus type 16 DNA sequence. Virology, 1985, 145(1):181-185
- [5] Wiener JS, Walther PJ, Norman T, et al. A high association of oncogenic human papillomavirus with carcinoma of the female urethra: Polymerase chain reaction-based analysis of multiple histological types. J Urol, 1994, 151(1):49-53
- [6] Poprdvu NC, Zimonjic D, Dipaolo JA. Viral integration, fragile sites, and protooncogenes in human neoplasia[J]. Hum Gen, 1990, 84:383-386
- [7] Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, et al. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. Diagn-Mol-Pathol, 2001; 10(1):46-54
- [8] Thorland EC, Myers SL, Persing DH, et al. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. Cancer-Res, 2000; 60(21):5916-21
- [9] Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, et al. Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. J Virol, 2003; 77(6):3531-41
- [10] Wentzensen N, Vinokurov S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the male lower genital tract[J]. Cancer Res, 2004, 64:3878-3884
- [11] Senior K. Cervical cancer research focuses on the HPV E7 gene[J]. Lancet, 2002, 360(9237):585
- [12] Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. J Virol, 1995; 69(12):7791-9
- [13] Laimins LA. Regulation of transcription and regulation by human papillomavirus [M]//McCance DJ. Human tumor viruses. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1998:201-223
- [14] Burkhard TA, Willingham M, Ga YC, et al. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes[J]. Virology, 1989, 170:334-339

- [15]Riley RR,Duensing S,Brake T,etal.Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse of cervical carcinogenesis.Cancer Res,2003,63:4862
- [16]Nakamura TM,Morin GB,Chapman KB,etal.Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human.Science,1997,277:955
- [17] Zur Hausen H.Papillomaviruses causing cancer:evasion from hostcell control in early events in carcinogenesis[J].J Natl cancer Inst,2000,92(9):690-698
- [18]Berezutskaya EB,Yu B,Morozov P,etal.Differentiation regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein[J].Cell Growth Differ,1997,8:1277-1286
- [19]Caldeira S,de-Villiers EM,Tommasino M.Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein.Oncogene.2000;19(6):821-8266
- [20] Castellsague X,Dtaz M,de Sanjose S,etal. Woddwide human papillomavims etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention [J].J Natl Cancer Inst. 2006,98:303-315
- [21] Faras AJ Krzyzek RA,ostrow RS etal.Genetic variation among PaPillomavirus Ann New York Aced of sciences, 1980
- [22] Hoory T,Monie A,Gravitt P,etal.Molecular epidemiology of human papillomavirus [J]. J Formos Med Assoc,2008,107:198-217
- [23]Ault KA,Giuliano AR,Edwards RP,etal.A phase I study to evaluate a human papillomavirus(HPV) type 18 L1 VLP vaccine[J].Vaccine,2004,22(23-24):3004-3007
- [24]Bulk S,Berkhof J,Bulkmans NW,etal.Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocaicinoma of the cervix compared to women with normal cytology in the Northern lands[J].Br J Cancer,2006,94(1):171-175
- [25]Mattheus-Greer J,Rivette D,Reyes R,etal.Human papillomavirus detection:verfication with cervical cytology[J].Clin Lab Sci,2004,17(1):8-11
- [26]Gök M,CoupéVMH,Berkhof J.HPV16 and increased risk of recurrence after treatment for CIN[J]Gynecol Oncol,2007,104(2):273-275
- [27]Gonalves MA,Soares EG,Ferandes APM,etal.Langerhans cell count and HLA class II profile in cervical intraepithelial neoplasia in the presence or absence of HIV infection[J].Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2004,114(2):221-227
- [28]卢洪胜,石卫武,叶明,等.HPV 感染与宫颈癌及癌前病变关系的研究[J].肿瘤学杂志,2008,14(9):706-708

- [29]Schiffman MH,Herrero R,Hildesheim A,etal.HPV DNA testing in cervical cancer screening[J].JAMA,2000,283(1):87-93
- [30]Hwang TS,Jeong JK,Park M,etal.Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray[J].Gynecol Cancer,2003,90(1):51-56
- [31]孙耕田.细胞病理学技术进展述评[J].中华病理学杂志, 2003,32(3):283-285
- [32]乔友林,章文华,李凌,等.山西子宫颈癌筛查方法的横断面比较研究[J].中国医学科学院学报,2002,24(1):50-53
- [33] 邹单东,巢薇,杨柳光.膜杂交技术检测 HPV 基因分型联合液基细胞学在宫颈筛查中的应用[J].中国优生与遗传杂志,2009,17(4):25-26
- [34] Singer A, Coppleson M,Canfell K,etal.Areal time optoelectronic device as an adjunct to the Pap smear for cervical screening: amulticenter evaluation[J]. Int J Gynecol Cancer,2003,13: 804-811
- [35] 吕斯迹,黄莉霞,赵鑫,等.宫颈癌筛查系统及液基细胞学检测在宫颈病变筛查中的对比研究[J].现代妇产科进展,2009,2,(18):90-93
- [36] Frazer I,Galloway D,Gissmann L, etal . Technical workshop on cellularmediated immunity to HPV:Prospects for vaccine development, 18 3/19 April 2005. www. who. int/ vaccines – documents/ (EB)
- [37] Villa L L, Costa R L, Petta C A, etal. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial [J] .Lancet Oncol, 2005, 6 (5) :271– 278.
- [38]凌斌. 子宫颈癌诊断与治疗的新进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2007,23(1): 23-25.

附录：临床病理资料一览表

编号	族别	年龄	住院号	临床诊断	病理诊断	HPV 分型结果
1	汉	32	130016	宫颈鳞癌 IIIa 期	低分化鳞癌	HPV16
2	汉	79	142015	宫颈鳞癌 IIb 期	中分化鳞癌	HPV16/56
3	汉	52	136342	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16
4	汉	46	149411	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16/56
5	汉	55	121456	宫颈鳞癌 IIa 期	中分化鳞癌	HPV16
6	汉	65	149965	宫颈鳞癌 IIIb 期	低分化鳞癌	(-)
7	汉	54	145868	宫颈鳞癌 Ib 期	高分化鳞癌	HPV16/56
8	汉	34	084225	宫颈鳞癌 Ib 期	高分化鳞癌	HPV16
9	汉	42	146112	宫颈鳞癌 Ib 期	高分化鳞癌	HPV16
10	汉	72	148723	宫颈鳞癌晚期转移	低分化鳞癌	HPV16/58
11	汉	27	146118	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16/58
12	汉	28	127976	宫颈原位鳞癌	高分化鳞癌	HPV16/58
13	汉	63	132116	宫颈鳞癌 IIIa 期	中分化鳞癌	HPV16/58
14	汉	46	133421	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16/58
15	维	51	125379	宫颈鳞癌 IIa 期	中分化鳞癌	HPV16
16	汉	58	129865	宫颈鳞癌 Ia 期	中分化鳞癌	HPV16
17	汉	63	133026	宫颈鳞癌 IIIa 期	低分化鳞癌	HPV16/58
18	维	52	134323	宫颈鳞癌 IIa 期	中分化鳞癌	HPV16/56/58
19	维	62	137321	宫颈鳞癌 IIb 期	中分化鳞癌	HPV16/18
20	维	54	137325	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16
21	维	54	140843	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16
22	维	27	132427	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16
23	维	42	133512	宫颈鳞癌 IIa 期	中分化鳞癌	HPV16
24	汉	54	139082	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16/68
25	汉	69	130143	宫颈鳞癌 IIa 期	低分化鳞癌	HPV16/18/58
26	维	72	134532	宫颈鳞癌 IIIa 期	低分化鳞癌	HPV16/18/58/68
27	汉	31	137786	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16
28	维	55	139209	宫颈鳞癌 Ia 期	高分化鳞癌	HPV16/56
29	汉	51	140231	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	HPV16

新疆维、汉族妇女宫颈癌人乳头瘤病毒基因分型及 HPV16 型 E6、E7 基因变异研究

30	维	46	142331	宫颈鳞癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV16/56
31	维	51	142912	宫颈鳞癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV56
32	维	45	144123	宫颈鳞癌 IIb 期	高分化鳞癌	HPV16
33	维	42	147354	宫颈鳞癌 IIb 期	中分化鳞癌	HPV16/56
34	维	33	148079	宫颈鳞癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV56
35	汉	49	148286	宫颈鳞癌 IV a 期	中分化鳞癌	HPV16
36	维	70	148492	宫颈鳞癌 IIb 期	中分化鳞癌	HPV16
37	维	66	149297	宫颈癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV16/56
38	维	50	149561	宫颈鳞癌 IIIb 期	低分化鳞癌	HPV16/56
39	汉	42	141876	宫颈鳞癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV16
40	维	47	150467	宫颈鳞癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV16
41	维	56	151123	宫颈鳞癌 IIIb 期	低分化鳞癌	HPV16/56
42	汉	70	142074	宫颈鳞癌 IIIb 期	低分化鳞癌	HPV16
43	维	47	151865	宫颈鳞癌 IIa 期	低分化鳞癌	HPV16
44	维	35	152431	宫颈鳞癌 IIb 期	中分化鳞癌	HPV16/56
45	汉	54	148841	宫颈鳞癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV16
46	维	38	153408	宫颈鳞癌 IIIb 期	低分化鳞癌	(-)
47	汉	51	147541	宫颈鳞癌 IIa 期	中分化鳞癌	HPV16
48	汉	48	141154	宫颈鳞癌 IIa 期	中分化鳞癌	HPV16
49	汉	57	143635	宫颈鳞癌 IIIb 期	低分化鳞癌	HPV16
50	维	43	157231	宫颈鳞癌 IIIb 期	低分化鳞癌	HPV16/35
51	维	58	152742	宫颈鳞癌 IIa 期	低分化鳞癌	HPV16/56
52	汉	31	150032	宫颈鳞癌 IIa 期	中分化鳞癌	HPV16
53	维	59	151123	宫颈鳞癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV16
54	维	54	156989	宫颈鳞癌 IIIb 期	中分化鳞癌	HPV16
55	维	61	156328	宫颈鳞癌 IIIa 期	中分化鳞癌	HPV16
56	汉	35	147974	宫颈鳞癌 Ia 期	高分化鳞癌	HPV16
57	维	51	157938	宫颈鳞癌 IIIa 期	中分化鳞癌	HPV16
58	维	52	155037	宫颈鳞癌 IIb 期	中分化鳞癌	HPV16
59	汉	29	149112	宫颈鳞癌 Ib 期	中分化鳞癌	(-)
60	维	48	155864	宫颈鳞癌 IIa 期	中分化鳞癌	HPV16

致 谢

(ACKNOWLEDGMENTS)

三年的学习时光转瞬即逝，能顺利完成本课题的研究与石河子大学全体老师、同学们的帮助密不可分。在此，我衷心地向大家表示我最真挚的谢意！在论文完成之际，首先我要感激我的导师周瑾副教授，从开始选题到最终论文的修改，无不凝聚着导师的辛劳、悉心培养和一如既往的宽容。导师求实的治学作风，对科研的执著追求，忘我的工作精神，无时无刻不在影响着我、感动着我，并将使我终生受益！衷心地感谢导师在学习工作中对我的谆谆教诲、在生活上给予的种种关怀，使我终生难忘。在此，我诚恳地向导师致以最崇高的敬意！

由衷地感谢兰州军区乌鲁木齐总医院临床研究所的余伍忠主任、邹红云副主任、王瑞、桂俊豪、刘鸿春、黄国香、杨柳及何江老师在实验和生活上对我的热情帮助，并衷心感谢新疆大学马正海教授对我的热情帮助，使得实验顺利进行。

非常感谢 2008 级全体同学在实验和论文完成过程中给予的大力帮助，尤其感谢我的好友吴清明、夏小艳、李文婷、吕锡芳、刘芳芳、徐跃勋、柳和华及易俐萍在实验和生活方面给予的支持和帮助；同时感谢我的师妹刘莹及魏薇在实验和生活上的支持和帮助，她们温暖的友情我会永远铭记在心。

我永远感激我的父母、爱人、哥哥姐姐，是他们在困难的时候给了我无私的关爱和坚定的支持。

再次向所有关心和帮助我的家人、老师及朋友致以深深的谢意和崇高的敬意！

研究生：刘伟

2011 年 6 月

作者简历

刘伟，女，生于 1980 年 4 月，籍贯江苏省邳州市。2007 年毕业于石河子大学，获医学学士学位。2008 年起在石河子大学医学院攻读硕士研究生，专业为妇产科学，主要从事妇科肿瘤及内镜的研究。

在学期间主要参与的研究项目

参加周瑾副教授主持的兰州军区项目《新疆地区宫颈癌人乳头瘤病毒基因分型及 E6、E7 变异研究》的科研工作（项目编号：LXH-2006032）

在学期间发表的文章

1. 刘伟,周瑾,余良宽,等.维、汉妇女宫颈鳞癌组织中人乳头瘤病毒基因分型研究[J].现代肿瘤医学,2010,18(8): 1488-1491.
2. 刘伟,周瑾.人乳头瘤病毒与宫颈癌关系研究进展[J].现代生物医学进展,2010,10(2):372-375.

新疆维、汉族妇女宫颈癌人乳头瘤病毒基因分型及HPV16型E6、E7基因变异研究



作者：[刘伟](#)
学位授予单位：[石河子大学](#)

引用本文格式：[刘伟](#) [新疆维、汉族妇女宫颈癌人乳头瘤病毒基因分型及HPV16型E6、E7基因变异研究](#)[学位论文]硕士 2011