

单位代码: 10183

学 号: 2003341009

吉林大学博士学位论文

邵爱东

分类号: R392.11

密级:

四川地区宫颈癌患者组织中高危型人乳头瘤病毒的
分子流行病学研究

Molecular epidemiologic studies on high risk Human
papillomavirus in cervical cancer isolated from Sichuan

邱 爱 东

指导教师姓名 孔维 教授 吉林大学生命科学院

专 业 名 称 生物化学和分子生物学

论文答辩日期 2006. 06. 09

授予学位日期

答辩委员会主席 王明

论文评阅人 王明 金荣花

2006 年 5 月

吉林大学博士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：邱爱东

日期：2006年06月06日

提 要

宫颈癌在妇女恶性肿瘤发生中居第二位，每年全球大约新增病例 50 万，我国近 13 万，占世界新增病例的 28.8%。因此，宫颈癌仍然是世界性的公共卫生问题。自 1973 年科学家提出 HPV 感染和宫颈癌的相互关系，到 1995 年 WHO 和 IARC 将 HPV 正式确定为是宫颈癌的病因，此间大量的研究显示，HPV 感染在不同的地区和人群中感染率及其感染亚型存在差异性。而 HPV 感染宫颈组织并不是都进展为浸润癌，它和 HPV 型别、型内基因突变及 HPV 基因组整合宿主基因组等因素密切相关。迄今为止，对型内基因突变以及 HPV 基因组的整合研究，从地理区域和人种上，还存在不足；而它是否影响宫颈癌的进展，也一直存有争议。所以，丰富的流行病学资料就显得很重要，不仅仅提供相关争议的论据，更为重要的是为宫颈癌预防和治疗性疫苗的设计提供有意义的信息。我国在 HPV 型内基因的突变以及 HPV 基因组整合的研究上非常有限，对 HPV 感染亚型的主要流行株则几乎没有报道。

本论文将四川地区宫颈癌患者作为研究对象，从核酸水平上，调查了该地区 9 种高危 HPV 亚型的感染及其分布。结果显示，在该地区 HPV 感染主要以 HPV16 为主，其次是 HPV58；并且除 HPV35 外都有感染病例。通过对 HPV16 E6 基因的突变分析，明确了该地区高危型 HPV16 感染以欧洲株及其欧洲变异体为主。我们重点分析了四川地区感染 HPV 高危亚型 E6 区的基因变异，和以前的研究比较，发现了许多新的变异。其中 240 位的 C→G 突变，正好位于某些抑癌基因如 P53 和免疫细胞的功能结合区。通过对 HPV DNA 整合的研究，我们的结果和国外的某些研究相反，在该组宫颈癌病例中，完全整合到宿主细胞基因组的 HPV DNA，所占比例仅 7%，相对较低。在临床上，尽管有人认为检测 HPV 物理状态可能作为一种肿瘤标志，而我们的结果也显示这种整合大多出现在高级别损伤中，但其应用意义，还应该深入研究。

英文缩写词表

英文缩写	英文全称	中文名称
AA	Asia America	亚美株
AC	adenocarcinoma	腺细胞癌
Af	Africa	非洲株
bp	base pair	碱基对
CC	cervical cancer	宫颈癌
CDKs	Cyclin Dependent Kinase	细胞周期素依赖激酶
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤
E	Europe	欧洲株
FIGO	The International Federation of Gynecology and Obstetrics	国际妇产科学联合会
FISH	fluorescein in situ hybridization	荧光素原位杂交
GP5+/GP6+	general primer	HPV L1 片段内的 PCR 通用引物
HC II	hybridization capture II	杂交捕获二代
HIV	Human immunodeficiency virus	人免疫缺陷病毒
HLA	human leucocyte antigen	人类白细胞抗原
HPV	human papillomavirus	人乳头瘤病毒
HSV	herpes simplex virus	单纯疱疹病毒
IARC	international agency for research on cancer	国际癌症研究署
ICC	invasive cervical cancer	浸润性宫颈癌
IFN	interferon	干扰素
ORF	open reading frame	开放性阅读框
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
SCC	squamous cell carcinoma	鳞状细胞癌
SIL	squamous intraepithelial lesion	鳞状上皮内病变
URR	upper regulatory region	上游调节区
VLP	Virus Like Particle	病毒样颗粒

目 录

第一章 前 言	1
一、宫颈癌（CC）与人乳头瘤病毒（HPV）的关系	2
1. HPV 感染是宫颈癌的主要流行因素	2
2. HPV 感染在宫颈癌疾病自然史中的作用	4
二、宫颈癌流行病学综述	5
1. 宫颈癌的发病率	5
2. 感染途径	6
3. 危险因素	6
三、HPV 病毒概述	12
1. 一般特征	12
2. 基因组结构与功能	13
3. 致病机理	17
4. 检测分型	23
四、宫颈癌的预防和治疗	25
五、本论文的设计思想	26
第二章 材 料 与 方 法	28
第一部分 高危 HPV 亚型在四川地区宫颈癌组织中的分布 ..	28

一、实验材料	28
二、实验方法	30
1.临床样品和资料信息的获取.....	30
2.组织 DNA 提取	30
3.检测 HPV 的 PCR.....	31
4. PCR 产物的回收纯化.....	33
5. HPV 感染率测定与分型.....	33
6. 核酸序列测定	34
第二部分 HPV E6 基因碱基突变分析.....	35
一、实验材料	35
二、实验方法	35
第三部分 HPV16 DNA 在宿主中存在状态的分析.....	36
一、实验材料	36
二、实验方法	37
1. pT-16E ₁₊₂₊₆ 质粒构建	37
2. pT-16E ₁₊₂₊₆ 质粒 E2/E6 比值的测定	41
3. HPV16E2 巢式 PCR 的扩增.....	41
4. HPV16E2 ORF 阳性样品 E2/E6 比值的测定.....	41
5. HPV DNA 在宿主基因组中存在状态的判定	41

第三章 结 果 与 讨 论	42
第一部分 高危 HPV 亚型在四川地区宫颈癌组织中的分布 ..	42
一、结果	42
1. 临床样本信息	42
2. 样品基因组提取	43
3. HPV 总体感染率和亚型分布	43
4. HPV 感染在各年龄组和 FIGO 级别中的分布	47
二、讨 论	48
三、小 结	51
第二部分 HPV E6 基因碱基突变分析	52
一、结果	52
1. HPV18 型 E6 基因碱基突变分析	52
2. HPV33 型 E6 基因碱基突变分析	52
3. HPV45 型 E6 基因碱基突变分析	53
4. HPV52 型 E6 基因碱基突变分析	53
5. HPV58 型 E6 基因碱基突变分析	54
6. HPV59 型 E6 基因碱基突变分析	55
7. HPV16 型 E6 基因碱基突变分析	55
二、讨 论	60

三、小 结	65
第三部分 HPV16 DNA 在宿主中存在状态的分析	66
一、结果	66
1. pT-E ₁₊₂₊₆ 质粒的构建	66
2. pT-E ₁₊₂₊₆ 质粒 E2/E6 比值的测定	68
3. HPV16 E2 ORF PCR 扩增结果	68
4. HPV16 E2 巢式 PCR 扩增结果	68
5. HPV16 DNA 在宿主中状态的分析	69
二、讨 论	70
三、小 结	72
参 考 文 献	73
致 谢	1
中 文 摘 要	1
ABSTRACT	1
作 者 简 历	1

第一章 前 言

在世界范围内，宫颈癌在妇女恶性肿瘤发生中居第二位，仅次于乳腺癌。据世界卫生组织的统计资料表明，每年全球大约新增病例 50 万，80%在发展中国家 (Parkin D., 2001)。我国是宫颈癌的高发地区，每年约 13 万新增病例，占世界新增病例的 28.8%。近年来，宫颈癌的发病率和死亡率处于稳定水平且有增长趋势 (Anttila A., 1999)，尤其令人忧虑的是宫颈癌患者有明显的年轻化趋势 (于冬雁. 2003; 沈宏伟. 2003)。因此，宫颈癌作为妇女健康杀手已引起人们的广泛关注。

迄今为止，已发现的 HPV 有 100 个以上的型别 (de Villiers E.M., 1997)。其中有 40 种 HPV 可以感染生殖道 (de Villiers E.M., 2000)，与宫颈癌密切相关的有 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 和 69 等 15 种高危型 (Burd E.M., 2003)。大量研究报告显示，在不同的国家和地区，不同的地理环境和种族之间，感染 HPV 型别存在差异 (Clifford, 2003; S Farjadian, 2003; IARC 1995)；而 HPV 感染率也因检测方法、地理环境和人群特征的不同，从 22%到 100%显示出很大的不同 (IARC 1995)。

以前对 HPV 感染率和分型的研究多采用通用型 L1 引物并结合杂交等方法，忽视了 HPV DNA 整合宿主基因组可能导致 L1 部分断裂或缺失的因素；一些研究也采用型特异性引物，但通常只进行单轮扩增，由于采用的标本多为蜡块包埋组织，提取的基因组量偏低，降低了检出的灵敏性。目前，人们的研究热点集中于 HPV 基因的突变、对宿主基因组的整合和宫颈癌之间的关系上。有研究认为 HPV 型内基因的突变在持续感染宿主细胞中扮演重要的角色。但这种突变对宫颈癌的进展以及预后是否具有意义，一直存在争论。而另一方面 Pirami L 认为 HPV16 DNA 整合

宿主基因组是肿瘤进展的潜在的重要机制 (Pirami L., 1997)。这些研究由于缺乏地域广度以及样本数量, 至今还没有明确的结论。

本研究以四川地区为调查范围, 以临床宫颈癌患者为研究对象, 采用 L1 的 GP5+/6+ 普式引物、HPV 型特异性 E6 引物、L1 巢式 PCR 法及 16 型 E6 特异性巢式 PCR 法等不同方法并结合序列测定, 检测宫颈癌组织中 HPV 的感染率和亚型分布, 这种应用不同方法间各自的优点, 相互补充的方法, 使获得的结果更加接近实际; 采用 E6 相关序列测定结合 NCBI BLAST 比对分析和进化分析 MEGA3.0 软件, 确定了该地区 HPV 感染以 16、58 和 18 为主, 并明确 HPV16 的主要流行株; 在对 HPV DNA 整合的研究中, 我们利用 E2/E6 比值的半定量测定判断 HPV DNA 在宿主细胞中的存在状态, 更进一步, 对 E2 基因的扩增我们采用了巢式 PCR, 提高了 E2 基因的检出率, 使之对 HPV DNA 整合状态的判定更加准确。这些研究信息的获得, 不仅丰富了该地区宫颈癌组织 HPV 感染的流行病学资料, 也为宫颈癌的防治和 HPV 疫苗设计策略提供理论依据和基因储备。

一、宫颈癌 (CC) 与人乳头瘤病毒 (HPV) 的关系

1. HPV 感染是宫颈癌的主要流行因素

HPV 感染与宫颈癌的病因关系最初由 Zur Hausen 在 1973 年提出, 并于 1976 年首次从宫颈癌组织中分离出 HPV16、18, 此后许多流行病学和分子生物学研究进一步证实了 HPV 感染是宫颈癌流行的主要因素。

表 1 显示的过去的一些病例-对照研究表明不论是在拉丁美洲 (Reeves V.C., 1989) 采用准确性较低的检测技术 (FISH) 进行的大规模流行病学研究, 还是采用较高灵敏度检测技术 (PCR 等) (戎寿德, 2002) 的小样本量研究, 所有的结果均显示 HPV 感染与宫颈癌有明显的相关性

(OR=3.6-61.6) (Voollo M., 2000; Mccance D.J., 1985; Coker A.L., 2001; Muñoz N., 1992), 尤其是 HPV16、18 型。Muñoz 等在哥伦比亚和西班牙 (宫颈癌发病率前者比后者高 8 倍) 进行的人群基础上的病例-对照研究中, 同时采用了三种 HPV DNA 检测技术 (ViraPap、SH 和 PCR) (Muñoz N., 1992) 不仅避免了人群和地区的选择性偏倚, 同时又考虑到检测技术间的差异, 在调整了一些混杂因素后三种检测方法都得出相同的结论: 在两个国家中 HPV16, 18, 31, 33 和 35 型与宫颈癌均呈强相关性, 提示 HPV 与宫颈癌可能具有病因关系。

表1 评价人乳头状瘤病毒与宫颈癌关系的病例-对照研究

文献年代	地区	病例		非病例		危险度比值比*
		数目	HPV 阳性率	数目	HPV 阳性率	
Eluf-Neto,1994	巴西	199	84	225	17	37.1
Fuchs,1988	德国	44	72	31	10	23.1
Lorincz,1987	北/南美洲	39	82	31	19	19.2
McCance, 1985	英格兰	13	92	17	18	52.4
Munoz,1992	西班牙	142	69	130	5	46.2
	哥伦比亚	87	72	98	13	15.6
Peng,1991	中国	101	35	146	1	32.9
Reeves,1989	拉丁美洲	759	62	1467	32	9.1
赵方辉等,2001	中国	86	84	1784	253	254

* 计算时考虑了调整因素

Bosch 和 Manos 等通过收集来自 22 个国家的 1008 份宫颈癌活检标本作 PCR 检测, 发现 99.7% 的肿瘤中都可以检测到 HPV DNA, 而且各国间无显著差异 (Bosch F.X., 1995; Smith J., 2001)。这是迄今为止所报道人类肿瘤致病因素中的最高检出百分数, 同时表明 HPV 感染与宫颈癌的相关具有普遍意义。1995 年 WHO 和 IARC 已将 HPV 正式确定为是宫颈癌的

病因。

2. HPV 感染在宫颈癌疾病自然史中的作用

HPV 感染生殖道是一个长期的过程，可潜伏在细胞内若干年，一旦被感染机体免疫力下降，潜伏的病毒可恢复活动。HPV 感染过程通常分为潜伏感染期、亚临床感染期、临床症状期和 HPV 相关的肿瘤期 (Schneider A., 1993)。宫颈癌也有一系列的前驱病变，即宫颈上皮不典型增生，在细胞学上称鳞状上皮内病变 (SIL)；在病理上称宫颈上皮内瘤变 (CIN)，通常又根据严重程度分成三级：宫颈上皮内轻度瘤变 (CIN I)、宫颈上皮内中度瘤变 (CIN II) 和宫颈上皮内高度瘤变 (CIN III)。这些前驱病变有可能发展为宫颈浸润癌 (张友会, 1993)。在临床上，1985 年 FIGO 根据癌侵入宫颈组织的范围和大小，又将宫颈癌发生进展划分为 0 期、I 期、II 期、III 期和 IV 期，0 期是原位癌。

尽管 HPV 感染是宫颈癌发病的主要因素，但并不是所有的 HPV 感染和 CIN 都会进展为癌。这主要取决于三方面因素：病毒因素、宿主因素和环境协同因素。病毒因素，最明显的是感染 HPV 的型别。在宫颈低度病变的妇女中，癌相关型 HPV (又称高危型 HPV) 感染阳性的妇女宫颈癌变的危险性大于非癌相关型 HPV (又称低危型 HPV) 感染或 HPV 阴性的妇女 (Kataja V., 1990)。除病毒的型别外，HPV 首次感染的时间也很重要，因为细胞核不典型增生的程度随病毒的持续感染加重，并且这种持续感染也增大了 HPV DNA 对宿主细胞的整合风险 (Zur Hausen H., 1994)。另外很重要的一个因素就是宿主的免疫功能，其它还有产次、激素、吸烟和营养状况等，这些因素再受到环境协同因子的影响，对乳头状瘤转化为恶性肿瘤有致突变及启动作用 (Apple R.J., 1994; Odunsi K.O., 1997; Brady C.S., 1999)。有学者也认为同时感染其它性传播病原体如 HIV、HSV 和衣原体等，能增加癌变的危险性。图 1 显示了 HPV 感染最

终致癌的机理模式:

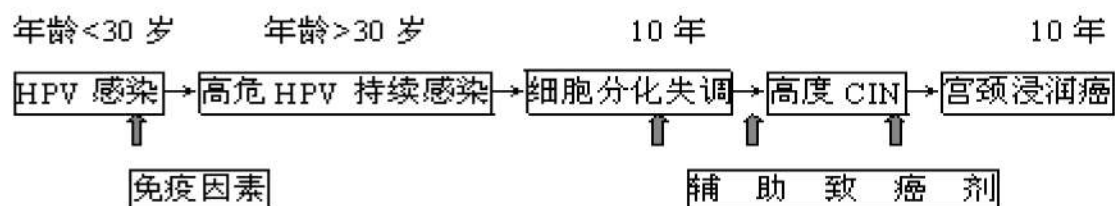


图1 HPV致癌的机理模式

二、宫颈癌流行病学综述

1. 宫颈癌的发病率

根据世界卫生组织的统计资料，每年全球大约有 50 万新发宫颈癌病例，约 20 万人死于宫颈癌，其中，80% 的死亡发生在发展中国家（Parkin D., 2001）。图 2 显示了 2000 年全球宫颈癌疾病的发生分布状况，亚洲占到发病率的 50%。我国每年宫颈癌新发病例约 13.15 万，占世界宫颈癌新发病例的 28.8%，每年约有 5 万妇女死于宫颈癌，占世界宫颈癌死亡总数的 25%（Anttila A., 1999）。

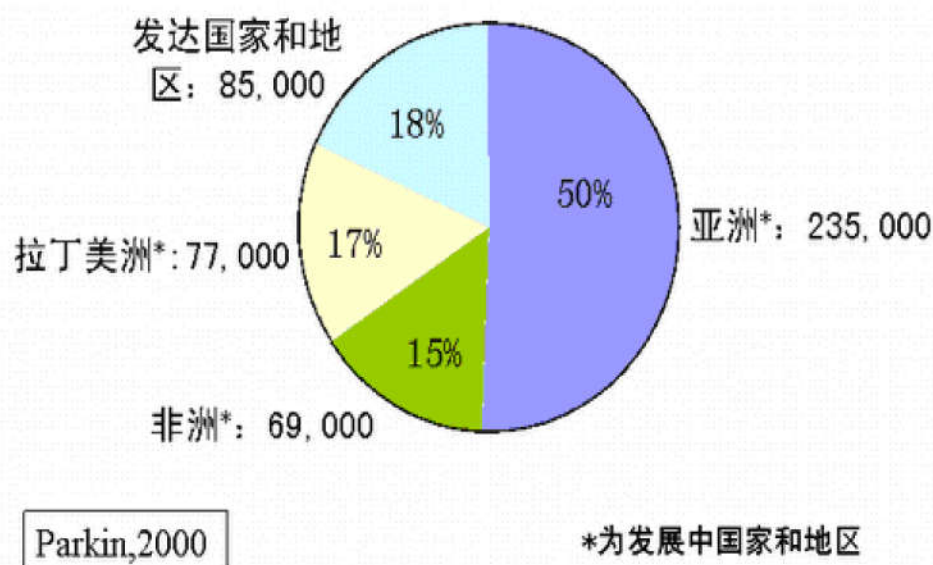


图 2 全世界2000年宫颈癌新发病例数 (N=466, 000)

有关 HPV 感染的检测，由于标本的来源、使用的 HPV 检测技术以

及检测地区人群的差异等各有不同,因此,对 HPV 感染阳性率的报道结果也存在很大差别,范围从 22%到 100% (IARC. 1995)。但在宫颈癌患者组织中检测 HPV DNA,不论检测方法和地理人群的差别,几乎 80%以上都呈阳性 (Bosch F.X., 1995)。

2. 感染途径

HPV 感染是一种性传播性疾病,主要和性行为相关 (Kataja V., 1993; Burk R.D., 1996; Franco E.L., 1995)。生殖器以外的 HPV 感染可以通过很小的皮肤破损和病变部位的直接接触或者与污染物的间接接触而传染。John Cason 等 (John Cason., 1995) 通过连续观察发现人乳头瘤病毒还可以通过母婴垂直传播。

3. 危险因素

3.1 性行为及性伴数

很多研究证实妇女的多性伴侣数,多性交频率和性伴侣患有生殖道疣等能够明显增加 HPV 感染几率 (Kataja V., 1993; Burk R.D., 1996; Franco E.L., 1995)。一些研究表明初次性交年龄与 HPV 感染存在相关性,但这种因素受性伴侣数的影响,调整性伴侣数后,其危险性没有显著意义 (Kataja V., 1993; Brisson J., 1988; Kjaer S.K., 1990)。因此,性接触是 HPV 流行最为危险的因素,而性伴数则是生殖器 HPV 感染的一个独立因素 (Schneider A, 1993)。Hildesheim A (Hildesheim A, 1993) 研究认为 HPV 感染与性伴数关系最为密切,尤其高危型别感染与之呈显著相关性。

3.2 免疫因素

宿主的免疫反应对控制 HPV 感染具有十分重要的作用。大多数免疫功能健全者,都可以自发清除感染的 HPV,而不出现任何继发病症。只有持续性 HPV 感染才与宫颈病变的进程密切相关 (Ho G.Y., 1995;

Remmink A.J., 1995)。有研究发现肾移植的免疫抑制者 HPV 的感染率是正常人群的 17 倍 (Halpert R., 1986)。HIV 感染的人群中 HPV 的感染率也相应增高 (Ho G.Y.F., 1994; CKidula N., 1998)。这说明机体免疫能力的降低, 将增加 HPV 的感染几率。

宿主的遗传背景对 HPV 的感染有着重要的影响。有研究提示 HPV16、18 阳性的宫颈癌与人类白细胞抗原(HLA)具有相关性。如 HLA-DQB1*03(DQ3)的妇女患宫颈癌或癌前病变的风险增高(Gregoire L., 1994)。HLA-B7 患者的宫颈癌更具侵袭性, 预后更差。对 HPV16 阳性的宫颈癌患者的研究发现, HLA-B7 和 HLA-DQB1*0302 与宫颈癌成正相关, 而 HLA-DRB1*1501、DQB1*0602 和 DRB1*13 则与宫颈癌成负相关(Hildesheim A., 1998)。1998 年 Storey 首次报道了 P53 第 72 位密码子多态性与宫颈癌的关系, 研究认为 P53Arg/Arg 纯合子导致宫颈癌的机会比杂合子高 7 倍左右。随后又有许多学者做了类似的研究, 得到了类似的结果。Agorastos 等(Agorastos T., 2000) 研究发现随着宫颈病变的严重程度的增加, Arg/Arg 所占的比例呈明显线性升高趋势, Pro/Pro 与杂合型在两组中无明显差异。大多数相关性研究认为, p53 多态性与宫颈鳞癌的发生有关, 而中国台北的 Yang 等 (Yang Y.C., 2001) 认为 Arg/Arg 与 HPV 相关宫颈的腺癌有关, 与鳞癌无相关性。随后又发现, 野生型 p53 蛋白存在至少 10 种不同形式的多态性, 而位于第 72 位密码子的多态性, 由于可能与肺癌、乳腺癌发生的遗传易感性相关而被广泛研究 (Agorastos T., 2000)。

此外, 一些 HPV 感染可逃避宿主的免疫监视。例如, 一些表皮疣可持续存在, 它们对宿主没有危害, 宿主的免疫系统对之处于忽略或耐受状态。而某些情况下出现的这些表皮疣的自发消失现象, 正是这种忽略或耐受状态被打破的体现。宫颈癌的发生, 除了 HPV DNA 整合、肿瘤抑

制基因的灭活外，免疫监测的逃逸也是一个重要的原因。

总之，HPV 感染及其诱发的细胞癌变和宿主的免疫因素密切相关。

3.3 不同的 HPV16 突变株

HPV16 在世界各地宫颈癌组织中是最常见的感染型别，而它的 E6、E7、E2、URR 部位经常发生突变形成不同的突变体。根据 HPV16 突变体被发现的区域将其分为五个突变株：亚美株（Asian-American, AA）、东亚株（East-Asian, As）、欧洲株（European, E）、非洲 1 株（African-1, Af1）和非洲 2 株（African-2, Af2）。又依基因同源性关系将这五个突变株分为欧洲突变株和非欧洲突变株。As 和 E 有很高的同源性属于欧洲突变株；AA、Af1 和 Af2 与欧洲原型同源性相对较远，属于非欧洲突变体。

有证据指出 HPV16 不同的突变株致癌的危险性不同。研究显示非欧洲突变株的致癌危险是欧洲突变株的 2 到 9 倍(Xi L.F., 1995; Wheeler C.M., 1997)。有人对来自墨西哥的宫颈癌与 CIN 组织中 HPV16 突变分布进行了对比研究,明确显示感染 AA 的癌变率远比 E 高(Xi L.F., 1997; Villa L.L., 2000; Hildesheim A, 2001)。Hildesheim 等对来自哥斯达黎加 10000 多名妇女 HPV16 突变感染情况的调查也显示非欧洲型 HPV16 的癌变率比欧洲型 HPV16 高(Hildesheim A, 2001)。因此，感染不同的 HPV16 突变株是宫颈癌发生的一个重要的危险因素。

HPV16 不同的突变株在世界各地的分布存在差异。Yamada 等（Yamada T, 1995）对来自 22 个国家的 HPV16 样品进行分析并绘制了各突变株在不同地区的分布图（见图 3）。结果发现，在欧洲及北美的 HPV16 主要以 E 株为主，Af1 和 Af2 在非洲宫颈癌组织中占 92%，As 主要在南亚地区，AA 在中美、南美和欧洲均有发现，但在欧洲的 AA 只在西班牙患者中发现(Yamada T, 1997)。因此，研究不同地理区域的 HPV16 突变体，对深入理解 HPV 和宫颈癌之间的相互关系和治疗策略的设计意义重大。

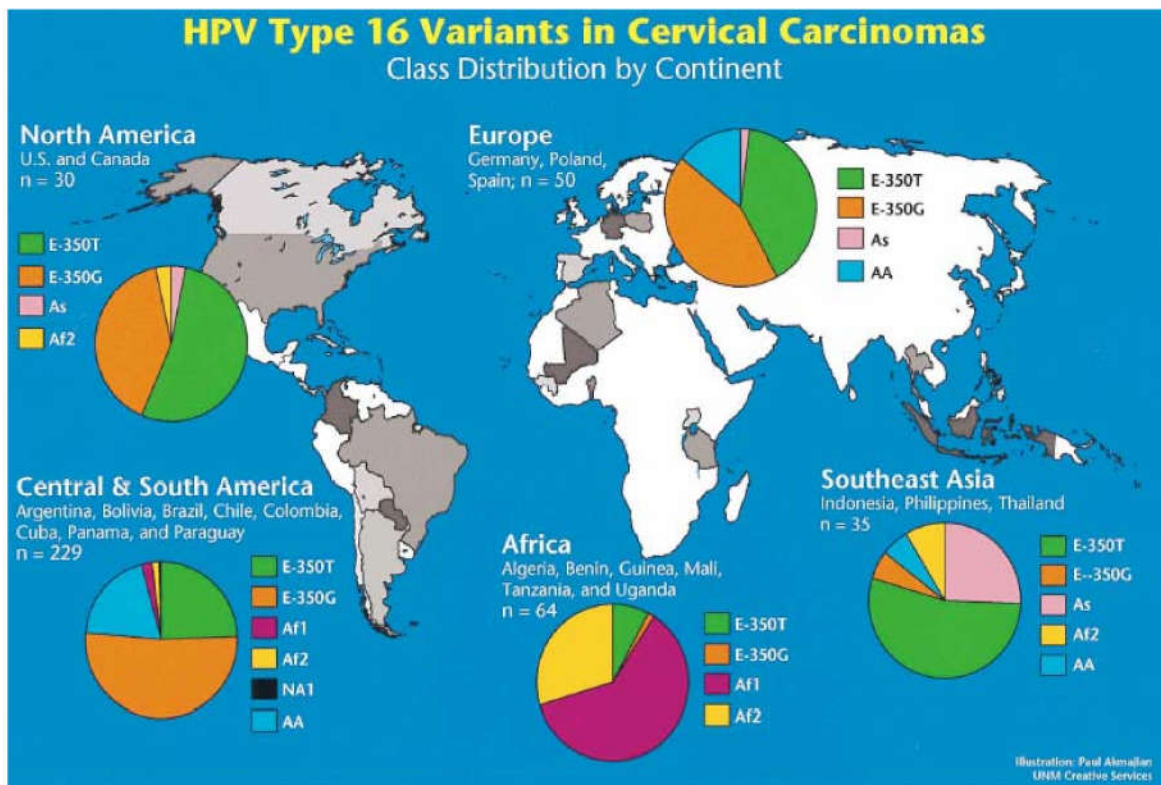


图 3. HPV16不同突变株在世界各地的分布

该图显示了HPV16 5个突变株E、As、Af-1、Af-2和AA 的分布。欧洲原型 (E) 根据E6编码区核酸350位的变化而分为不同的欧洲突变株。E-350T 和 E-350G 表示不同类的区别, 包括As突变株。阴影部分代表HPV16突变样本来自的国家。

3.4 激素

临床研究发现, 孕妇 HPV 阳性率比非孕妇高 2.2 倍, 口服避孕药者 HPV 阳性率比未用药者高 2.5 倍; 宫颈移行带是宫颈癌和 HPV 感染的好发部位, 移行带雌、孕激素受体表达明显高于宫颈其他部位, 未成熟鳞状上皮化生组织中雌、孕激素受体水平明显增高, 提示雌、孕激素在 HPV 感染及宫颈癌发生中可能具有协同作用 (Remoue F., 2003)。有研究发现 (Kedzia W., 2000), HPV 基因组中含有类固醇激素反应组件, 可以影响病毒基因的表达方式, 可能在激素水平异常时在肿瘤形成过程中起作用。

1991 年 Mansonego (Monsongego J., 1991) 在 HPV 感染组织中发现孕激素受体的表达, 且与 HPV DNA 型别有关, HPV6、11 型感染组织中以雌激素受体的表达为主, HPV16、18 则主要为孕激素受体的表达。一

般认为雌激素抑制凋亡，孕激素促进凋亡，而雌激素与雌激素受体的结合促进了孕激素受体的表达，从而使更多的孕激素和孕激素受体结合，增强了孕激素的促凋亡作用。

HPV 在激素刺激细胞生长的过程中起作用。雌二醇可以刺激 HPV 阳性宫颈癌细胞的生长，被雌激素刺激的 HPV 阳性宫颈癌细胞的生长和 HPV E6/E7 的表达增加有关，在高浓度的雌二醇和他莫西酚的条件下 HeLa 细胞的生长抑制或许是凋亡的结果。总之，外源性雌二醇或许是 HPV 介导的宫颈癌变的一个危险因素。

3.5 HPV 基因突变

HPV 感染对于宫颈病变的形成是必要的，但只有一部分病变发展为癌变。除了 HPV 型别的致癌能力不同之外，其它因素可能提高了恶变的机会。型内基因突变已被报导与病毒持续感染和许多宫颈疾病有关(Zehbe I., 2001; Xin C.Y., 2001)。因为高危型 HPV 感染与宫颈癌的密切关系，所以目前研究较多的是 HPV16、18、58 等的突变。

3.5.1 HPV16 的基因突变

HPV16 的突变主要位于 E6、E7，其次是 E2、URR 部位。目前研究认为 E6 和 E7 都与转化相关，E6 蛋白降解抑癌蛋白 p53，E7 主要是破坏 Rb 蛋白。一些研究结果表明 HPV16E6 第 350T/G 突变(L83V)单独或其它突变联合似乎不仅预示着 CIN I 向 CINIII 发展还提示 CINIII 向 ICC 的转变(Zehbe I., 1998)。氨基酸改变不仅使 E6 的生物学活性改变而且使其更容易逃脱免疫监视。HPV16E6 350T/G 突变在欧洲最常见，而在亚洲很少发生。Londesborough 等 1996 年研究发现该突变与病毒持续感染和癌前病变有关，但后一现象却存在人群差异性，在瑞典人中 350G 变异体代表宫颈癌的一种高危因子，而意大利人中却表现为低危因子，德国人中

也与高危无关,这可能与人群之间的差异有关(Nindl L., 1999; Mark Van Duin., 2000)。另外如果将癌症的病例与人白细胞抗原(HLA)单体型联系起来和早期的研究共同考虑,HPV16E6 突变在不同人群的 CIN 与 ICC 中的分布是不同的。这些资料表明宿主遗传因素,比如 HLA 多态性,可能决定了 HPV16E6 L83V 变异的潜在致癌性。因此研究 HPV16E6 突变对宫颈癌疫苗研制策略及 HPV 致癌机理的研究具有重要意义。

3.5.2 HPV18 与 58 的突变

HPV18 基因结构经常发生改变,特别是 E1 或 E2 基因的删除,可能和 HPV18 阳性宫颈癌的侵袭性有关。但明确的突变位点很少。

HPV58 是近来研究相对较多的高危型,但 E6 基因突变的研究相对较少。香港人中高危 HPV58 型的 E7 632C→T(T20I)和 760G→A(G63S)两突变与 CIN 程度正相关,伴有 HPV58 (T20I/G63S)的 CIN III 或 ICC 病人明显较其它人群年轻。提示伴有 HPV58 (T20I/G63S)的病人患宫颈癌的危险性较高(Chan P.K., 2002)。

3.6 HPV DNA 整合宿主基因组

Ho 等曾指出感染 HPV16 的宫颈癌患者,若持续感染超过 35 年最终将发展为高级别鳞状上皮内损伤,而其余患者将自行消退(Ho et al., 1998)。对转化细胞状态的诱导和维持需要 E6/E7 两种病毒癌基因的持续表达,这是保持 HPV 持续感染的必要条件(von Knebel-Doeberitz et al., 1994)。研究显示 E2 ORF 通过抑制 HPV16 启动子的活性,而间接抑制 E6/E7 癌基因的表达(Thierry, 1991)。在宫颈癌患者中, E2 基因则失去了这种抑制功能,这是由于 HPV DNA 整合宿主细胞染色体导致病毒 E2 基因断裂所致(McBride et al., 1991)。Cullen 等认为断裂的 E2 基因通常多数在癌瘤中检出,在 CIN 中则很少出现,而检出的频率和宫颈损伤进

展密切相关 (Cullen et al., 1991)。这说明病毒基因的整合有更高的宫颈癌风险。

HPV 感染引起的宫颈损伤, 最初病毒基因组都是以完全游离的形式出现 (Daniel B., 1997), 但在宫颈癌细胞中病毒 DNA 经常和细胞基因组发生整合 (Cullen A.P., 1991; Durst M., 1985), 这种阶梯式的进展过程, 可以通过病毒基因整合状态的检测来作为一种宫颈损伤的早期标志, 也可以作为一种宫颈癌风险预判指标。

3.7 其它因素

引发宫颈癌的危险因素还有吸烟、怀孕状况、营养和卫生状况等等。研究表明, 烟碱的代谢产物已在宫颈粘膜中发现, 这就意味着它直接作用于宫颈移行带的细胞。而易受 HPV 感染的细胞也存在于宫颈移行带内 (石敏, 1997)。因此吸烟与 HPV 感染存在某种内在联系。有研究表明, 妇女怀孕次数, 分娩次数, 流产次数等增加并不能增强 HPV 感染的危险性, 而畸胎个数却与 HPV 感染相关 (Franco E.L., 1995; De Roda Husman A.M., 1995)。营养和卫生条件的改善也可以降低宫颈癌的发病率。

三、HPV 病毒概述

1. 一般特征

HPV 为乳多空病毒科 (Papovaviridae) A 属成员, 属小 DNA 病毒。病毒呈球形颗粒, 直径约 50~55nm, 由外壳和中心两部分组成。病毒壳体由 72 个壳微粒排列成立体对称的 20 面体, 无脂质包膜结构; 中心是病毒 DNA, 呈环状双链结构, 与蛋白质组成核体 (Scheffner M., 1994)。完整的病毒颗粒在氯化铯中浮密度为 1.34g/ml, 在密度梯度离心时易与 DNA 的空壳 (密度 1.29g/ml) 分开。HPV 基因组是一闭环双股 DNA, 分子量 5×10^6 D, 含 7200~8000 个碱基对, G+C 含量较低。HPV 在体外细

胞培养尚未完成。它具有宿主和组织特异性，只能感染人的皮肤和粘膜，不能感染动物。

2. 基因组结构与功能

2.1 基因组结构

HPV 基因组是一个双链共价闭环 DNA,长约 7.9kb。所有开放读框(open reading frame, ORF)由一条 DNA 链编码 (Chow L.T., 1994),且几个基因的读框有部分重叠。根据 HPV 基因组的功能可分为三个部分(图 3):

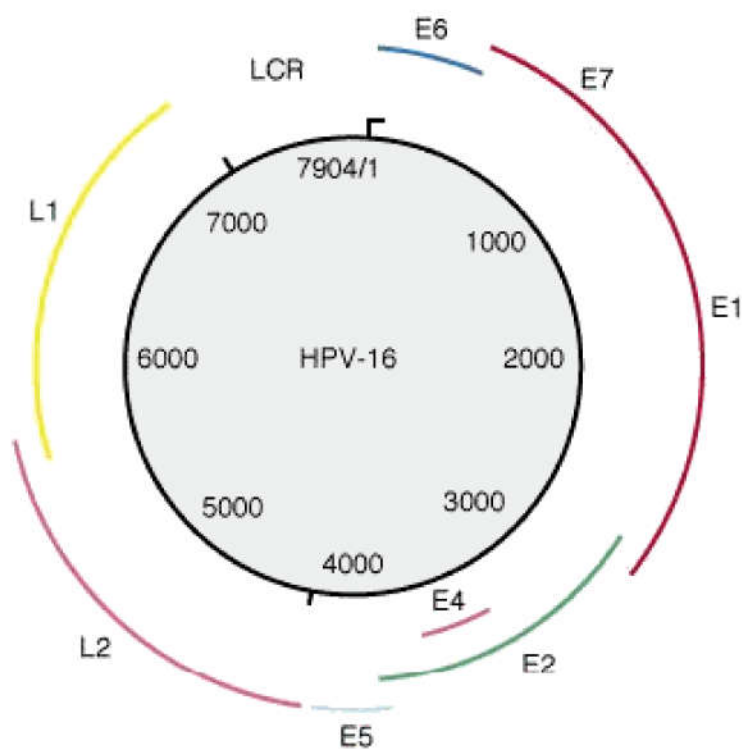


图 4 HPV DNA 基因组结构图

(1)非编码区(non-coding region, NCR), 又叫长控制区(long control region, LCR)或上游调节区(upper regulatory region, URR), 其全长约 400bp-1000bp, 含有 p97 核心启动子、增强子和静息子序列, 以及 E2 结合位点等, 通过控制 ORF 的转录来调节 DNA 的复制(Apt D., 1996)。将不同型 HPV(如 HPV1, 6b, 7, 11, 18, 16)、牛乳头瘤病毒和兔乳头瘤病毒的 URR 插入到增强子检测质粒中, 发现有增强子活性。将 HPV6b 基因组上

游 URR 540bp 的 Sau 3A-NarI 片段插入 β -干扰素(IFN)表达载体 Trp 启动子上游可使 β -IFN 表达明显增强。URR 的变异较大,甚至在密切相关的型别之间也存在差异(Kurvinen K., 2000)。(2)早期区(early region, ER)全长约 4kb, 编码 E1, E2, E4, E5, E6,E7 等 ORF, 主要在感染早期表达, 功能主要与 DNA 复制、转录调节和细胞转化相关。只是 E4 基因与转化并无直接联系,而是在病毒感染的晚期才表达。(3)晚期区也称 L(late region,LR)区, 约 3kb, 含两个主要 ORF, 称为 L1, L2。L1 编码病毒自身主要结构蛋白, L2 编码病毒次要蛋白, 在病毒感染的晚期表达, 主要参与病毒衣壳的形成。

2.2 基因组功能

2.2.1 上游调节区 (URR)

由 400-1000 个碱基对组成, 位于 E6 和 L1 之间。该区含有 HPV 基因组 DNA 的复制起点和 HPV 基因表达所必需的调控元件, 以调控病毒的转录与复制。

2.2.2 早期区 (E)

E1 和 E2 基因编码 HPV 的重要调节蛋白。E1 和 E2 编码的这两种蛋白对病毒 DNA 的复制和病毒的感染很重要。完整的 E1 蛋白(分子量 70~80kD)是磷酸化的核蛋白, 具有 DNA 依赖的 ATP 酶和 DNA 螺旋酶活性, 并含有 DNA 结合域、E2 蛋白结合域和催化结构域(Molir I.J., 1990), 可以与 ATP、DNA 复制起始点富含 AT 序列的部位结合, 并能结合完整的 E2 蛋白, 增强病毒转录, 同时 E1 与 E2 的结合还增强了 E1 与 DNA 复制起始点的亲和力(Yasugi T., 1997)。E1 蛋白可促进 E2 蛋白与 URR 的结合, 而 E2 蛋白则通过与 URR 的 E2 结合位点结合来抑制病毒转录。

E2 蛋白是一种特异性的 DNA 束缚蛋白, 是一种磷酸化蛋白, 可以

调节病毒 mRNA 的转录和 DNA 的复制, 并有减量调节 E6、E7 表达的作用; 它可以通过结合病毒启动子附近的基因序列而抑制转录起始。E2 蛋白包括 3 个功能域, 具有反式激活作用的 N 端长约 220 氨基酸, 二聚体时具有 DNA 结合功能的 C 端约含 90 个氨基酸, 二者之间为绞链区。在 URR 内存在多个回文顺序 (Ustav E., 1993), 侧翼有 E6、E7 主要启动子的 TATA 盒和剪接子。E2 蛋白与 URR 回文结构结合可阻碍转录因子 IID 或 RNA 聚合酶 II 与 TATA 盒的结合, 从而抑制 E6、E7 的转录。某些情况下, 还可启动早期 mRNA 合成向晚期 mRNA 合成转化, 导致衣壳蛋白的大量合成 (Hudson J.B., 1990)。恶变的细胞中病毒常整合入宿主细胞染色体, 导致 E1/E2 基因断裂或缺失, 使 E1/E2 蛋白表达缺失, 从而失去对 E6、E7 基因转录的抑制 (Yoshinouchi M., 1999)。

E4 蛋白主要与病毒颗粒的成熟和释放有关。E4 ORF 全部位于 E2 ORF 内, 常缺少起始密码子, 通过转录产物的拼接得以表达。E4 蛋白大量存在于细胞胞质, 因此最初是在表皮角质形成细胞胞质中发现的 E4 蛋白。HPV1 中 E4 基因是由晚期启动子启动表达的 (Doorbar J., 1996)。因此有人认为 E4 并不一个真正的“早期”基因, 而属“晚期”基因。

E5 ORF 编码一种细胞转化蛋白, 在乳头瘤病毒的 ORF 中保守性很强, 但常缺少起始密码子。它是迄今为止发现的最小的转化蛋白, 通过与表皮生长因子受体、 β 血小板生长因子受体及集落刺激因子受体 I 形成复合体而刺激细胞生长 (Hwang E.S., 1995)。E5 蛋白还能诱导多种癌基因的表达。最近发现, E5 还可阻止 DNA 损伤后细胞的凋亡。

E6 蛋白是一种多功能蛋白, 至少能够与两种细胞蛋白(即 E6 相关蛋白-E6AP 和 E6 结合蛋白-E6BP)结合。E6 蛋白分子量是 16~19kD。高危型 HPV 中, 如 HPV16, E6 和 E7 蛋白是宿主→鳞状上皮细胞→永生化所必需的 (Loignon M., 2002)。体外表达的 E6 蛋白: 含有 151 个氨基酸。

其主要结构特征是 2 个锌指结构,每个锌指结构的基础是两个 cys-x-x-cys,这种结构是所有 HPVE6 所共有,其结构根据功能不同可分为 5 个区,分别是:①C 端, 1-29 氨基酸;②锌指 1 区, 30-66 氨基酸;③中央区(连接区), 67-102 氨基酸;④锌指 2 区, 140-151 氨基酸;⑤N 端, 139 氨基酸。致癌病毒的 E6 蛋白可以持久的存在于人类乳房原始细胞中,与 E7 蛋白作用可以持久存在于人类原始角质细胞中。现已证明高危型 HPV E6 基因产物可与 P53 结合形成复合物并促使 P53 降解 (Liu Y., 2000)。

E7 蛋白是 HPV 的主要细胞转化蛋白,是一种仅有 98 个氨基酸的酸性蛋白,分子量 10~14kD,定位于核内或附着于核基质上。E7 蛋白分为:CR1 区, 1-15 氨基酸;CR2 区, 16-37 氨基酸;CR3 区, 38-98 氨基酸;锌指及 N 端区。它是一个与锌结合的核磷蛋白,能与 pRb, p107 和 p130 结合(Crishi J.F., 2000),导致这些蛋白质的灭活。

2.2.3 晚期区 (L)

晚期区 L1、L2 ORF 编码主要壳蛋白和次要壳蛋白。L1 具有属特异性, L2 具有型特异性。在真核细胞内表达的 L1、L2 或 L1 结构蛋白能够自我组装成病毒样颗粒(Virus-like particle,VLP)。VLPs 在立体结构以及抗原性方面都与乳头瘤病毒相似,并具备诱导高浓度和高亲和力中和抗体的表位。和病毒不同的是, VLPs 不包含 HPV 的致癌 DNA,可以保障它的安全性。大量动物模型表明由乳头瘤病毒结构蛋白 L1 和(或)L2 组成的预防性疫苗能够独立地保护接种动物免受病毒的感染,如 Breitburd 等 (Breitburd F., 1995) 用来自美洲棉尾兔乳头瘤病毒的 VLPs 作为疫苗接种家兔,结果使家兔免受乳头瘤病毒的皮肤感染, VLPs 同样也能有效地防止粘膜的乳头瘤病毒感染 (Suzich JA., 1995)。

3. 致病机理

高危型 HPV 的 E6、E7 蛋白是癌的主要转化蛋白。其致病的主要方式和机理见图 4。图 4 详细描述了 E6、E7 蛋白不同的作用形式，使感染的细胞永生化。

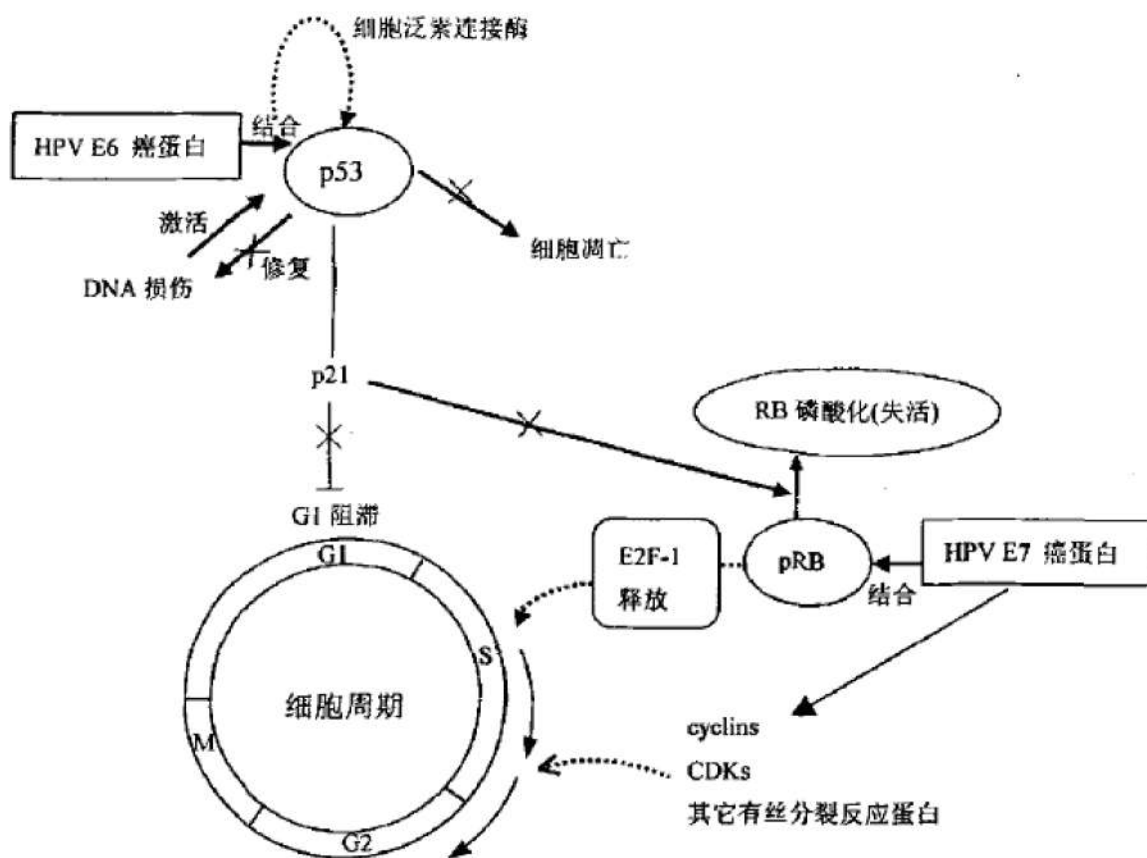


图 5 HPV E6、E7 基因致癌机理

3.1 与 P53 基因相关的致癌机理

3.1.1 P53 生物学特性

P53 基因是定位在人染色体 17P13.1 上的一种重要的抑癌基因，与细胞周期调控、DNA 修复、细胞分化、细胞凋亡等重要的生物学功能有关。p53 基因的缺失或者突变已经被证实是许多肿瘤发生的原因之一，但是在宫颈癌组织中很少发现有 p53 基因的突变。正常人的体细胞中克隆出的

p53cDNA, 发现 p53 基因第 4 外显子第 72 位密码子存在两种变异形式:CGC 和 CCC, 这使其编码的氨基酸残基分别为精氨酸(Arg)或脯氨酸(Pro), 引起表达的 p53 蛋白结构改变。由于其多态性, 使得一般人群中携带的基因型为 Arg/Arg、Pro/Pro、Pro/Arg 的三者之一, 不同种族的人群携带该位点基因型的频率不同, 而且存在地域差别。

3.1.2 致癌机理

在高危型人乳头瘤病毒 HPV 16/18 感染的宫颈癌中, HPV16/18 E6 癌基因编码合成的 E6 蛋白与 P53 蛋白结合, 可以导致 P53 蛋白失活和降解, 从而引起宫颈组织细胞增殖失控和诱发宫颈癌形成 (Einstein M., 2002)。

HPV 16E6 癌基因表达合成的 E6 蛋白能结合野生型 P53 抑癌蛋白, 并在 E6 相关蛋白(E6-AP)以及遍在蛋白化途径相关酶蛋白 E1、E2 的参与下, 诱导 P53 蛋白遍在蛋白化, 再经过细胞内的 26S 蛋白酶复合体作用, 促使 P53 降解。正常的野生型 P53 抑癌基因参与了细胞周期调控。当细胞 DNA 受到损伤时, P53 蛋白产物能够激活 P21 基因表达, 并且经过 P21 蛋白与细胞周期蛋白(cyclins)结合形成复合体, 以抑制依赖细胞周期蛋白激酶(CDKs)的活性, 从而阻止 CDKs 对 Rb 蛋白磷酸化, 使细胞周期停滞在 G1 期, 或者引起细胞程序性死亡 (Cardo-Cordon C., 1995)。但野生型 P53 蛋白半衰期短, 难以检测。而突变型 P53 蛋白则参与致癌, 研究表明, 突变型 P53 蛋白在宫颈癌组织中的阳性表达明显高于癌前病变组及宫颈炎症组, 而且随着宫颈癌分化程度的下降表达呈上升趋势。这提示突变型 P53 的过度表达是宫颈癌发生的常见现象。由于突变型 P53 蛋白较稳定且半衰期长, 容易用免疫组化法检测出来, 可以通过检测 P53 蛋白的水平来判断宫颈癌发生的演进情况。

有文献报道 HPV 16E6 蛋白能够通过抑制 p53 的联合兴奋因子

CBP/p300 来抑制 p53 的作用(Zimmermann H., 1999)。由于 p300, CBP 的一些目标基因参与细胞因子以及免疫信号的产生,如 IL-6, IL-8 等。HPV E6 对 p300/CBP 的抑制作用是 HPV 感染的免疫机制之一(Patel D., 1999)。

3.2 与 CDKs 相关的致癌机理

3.2.1 细胞周期调控

细胞主要通过两个限制点(G1/S 期限制点和 G2/M 限制点)保证细胞的准确复制。当细胞受损时,通过限制点导致细胞在 G1 或者 G2 期停滞,使得细胞有时间在 DNA 复制及有丝分裂前进行修复,当损伤超过细胞的修复能力时,则促进细胞凋亡。细胞周期的停滞或细胞凋亡对维护基因组稳定有重要意义。细胞周期调控的核心是细胞周期素依赖激酶(CDKs)、细胞周期素(Cyclins)对其进行正性调节, Cyclin D 和 Cyclin E 主要调控 G1/S 期转化, Cyclin A 主要负责 S 期的行进, Cyclin B 主要与 M 期的完成有关。细胞周期素依赖性激酶抑制剂(CKIs)对其进行负性调节。CKIs 是抑制 CDKs 活性的一组蛋白,一类为 CIP/KIP 蛋白,它包括 p21, p27, p57, 主要抑制 Cyclin E, A/CDK2, Cyclin B/CDK1 等复合物活性;另一类为 INK4 蛋白,包括 P16, P15, P18, 通过与 Cyclin D 竞争结合 CDK4/6, 抑制其对 pRb 的磷酸化作用。Cyclins, CDK, CKI 对细胞周期的作用主要通过两条途径,以 pRb 为主的网络调控途径, pRb 是遗传性视网膜母细胞瘤中发现的抑癌产物,是 G1/S 限制点的中心成分,当 Cyclin D 与相应 CDK 结合为激酶复合物时可对 pRb 磷酸化,磷酸化 pRb 可以释放其结合的核转录因子 E2F, E2F 因子控制参与细胞增生、生长、分化、凋亡基因的表达,这些基因的产物促进细胞进入 S 期。

3.2.2 HPV 病毒编码产物对细胞周期的影响

HPV E5, E6, E7 蛋白不仅在细胞转化中起重要作用,而且是干扰细胞

周期调控的重要物质。E5 主要通过提高丝裂原激活蛋白激酶(MAP)活性, 增强细胞对生长分化因子的反应, E6 和 E7 主要通过与关键的细胞周期调节物(p53, pRb)作用, 破坏细胞周期进展与分化的调控环节, 导致细胞连续增殖, 并且可以造成基因损伤积累, 最终可能恶变。

E7 蛋白是 HPV 的主要致癌蛋白, 高危型 HPV (16, 18, 31) E7 单独即能使人角质细胞(HFK)永生化。E7 通过 CR2 区的 LXCXE 结构特异地与 Rb 第 649~722 位氨基酸的口袋结构结合, 并且释放核转录因子 E2F, 使细胞进入 DNA 合成期。近来的研究表明, E7C 末端区域(CR3)能够与 pRb 的第 803 位氨基酸至 841 位氨基酸之间的区域相作用, 导致 E2F 因子游离, 游离的 E2F 因子进入核内, 与一系列具有共同特殊序列的基因启动子结合, 如 C-Myc、C-Myb、CDC-2、腺苷酸激酶、二氢叶酸还原酶和 DNA 聚合酶 α 基因, 结合后的复合物不仅能诱发 DNA 复制(S 期)所需基因的转录, 同时能诱导产生 G1 期调节因子, 包括 CyclinA 和 CyclinE, 进一步对 pRb 磷酸化, 导致 G1 期的调节失控。E7 对 CyclinE 和 CyclinA 的影响能延长宿主细胞终末分化时间, 有利于病毒的自身复制。E7 蛋白的表达导致多种细胞周期负性调控的信号失效, 包括 p53 介导的 G1 生长停滞, p16 介导的细胞周期停滞, p21 和 p27 所介导的 G1/S 期阻滞等(Giarre M., 2001)。

E6 蛋白能有效的使人乳腺上皮细胞永生化, 与 E7 协同作用使人包皮角质细胞(HFK)永生化。HPV E6 蛋白能够通过 E6-AP 蛋白泛肽作用降解调亡前蛋白 Bak, 这种与 Bak 的作用可能是不依赖 p53 的调亡抑制作用。另外有实验表明 E6 通过形成 C-myc-E6-E6-AP 复合物来阻止 C-myc 所介导的调亡, 以保证病毒感染的持续存在 (Jackson S., 2000; Gross-Mesilaty S., 1998)。E6 能够绕过多种细胞周期负性因子的调控, 如 p16 和 p27 所致的 G1 期细胞周期停滞, 使得细胞进入 DNA 合成期(S 期)

(Malanchi L., 2002)。

HPV16E5 蛋白不能永生化原始的人角质细胞 C，但是能协同 E6、E7 发挥重要的补充作用。

3.3 与端粒酶相关的致癌机理

3.3.1 端粒酶的生物学特性

端粒是真核染色体末端的 DNA 重复序列与特异性蛋白的复合体，其功能是保护染色体免遭降解、避免有害的端-端融合以及决定细胞的寿命。随着细胞分裂，端粒逐渐缩短，致使细胞衰老、死亡。而端粒酶是一种具有逆转录活性的核糖核蛋白酶，能以自身的 RNA 为模板，指导合成端粒 DNA。其主要作用是使染色体在细胞分裂过程中保持稳定、正确定位和准确复制，防止染色体互相融合、重组及一些外切酶、连接酶的作用。正常人体细胞中端粒酶的表达很低，或完全检测不到，而在恶性肿瘤细胞中，端粒酶常呈阳性表达，使端粒保持一定长度，因而细胞具有无限生长和繁殖的能力。

3.3.2 端粒酶的激活

正常细胞中，端粒能够有次序性的限制细胞的生长能力，端粒酶的激活可以维持细胞端粒的长度从而使细胞走向永生化。在细胞恶变的过程中，某种机制激活了端粒酶，染色体只能维持在一定长度，癌细胞则持续繁殖。因此端粒酶的激活、端粒长度的维持被认为是人类肿瘤发生发展的先决条件。端粒酶的激活是一个多因素参与调节的过程，涉及转录水平调控、蛋白质之间的相互作用以及蛋白质的磷酸化等。

3.3.3 端粒酶与 HPV 感染及宫颈病变的作用机制

端粒酶在人类各种恶性肿瘤中均有不同程度的表达，总表达率为 85% 左右。Sakamoto 等 (Sakamoto M., 2000) 对 118 例妇科肿瘤的研究发现，

端粒酶与妇科肿瘤的发生、发展密切相关，而且随着恶性程度增加端粒酶活性增强，端粒酶激活发生在癌前病变提示它是子宫颈癌变的早期事件。吕雯等（吕雯, 2004）的研究表明，从正常子宫颈、子宫颈炎、CIN到子宫颈癌，HPV 和端粒酶的协同表达及表达强度依次递减，但是 HPV 在癌前病变早期就有较多感染，而端粒酶则在癌前病变中晚期激活，这说明癌变发生初期，高危型 HPV 感染尚未伴随端粒酶激活，随着细胞恶性程度加重，两者逐渐趋于一致，由此推断二者在癌变过程中有时序性差异，HPV 感染是启动因子，导致端粒酶的重新激活，使得细胞具有无限增殖能力。研究发现 HPV16E6 能够激活端粒酶而使正常细胞永生化。在 HSIL 和宫颈癌中，端粒酶至少部分被高危型 HPV 激活，端粒酶的激活伴随强的主要原癌基因的表达是细胞处在高度癌变危险阶段的特征，端粒酶的活力有望成为肿瘤标记物(Riethdorf S., 2001)。

3.4 癌基因与 HPV 的相互作用

3.4.1 c-myc 癌基因

c-myc 癌基因定位于染色体 8q24，全长 6~7kb，含有 3 个外显子，编码蛋白由 49 个氨基酸残基组成，分子量达 64/67kDa。在宫颈病变组织中经常发现 c-myc 的过度表达和扩增。Ngany (Ngan H.Y., 1999) 的研究发现在发育不良的细胞中，c-myc 表达活跃，提示在 CIN 的演进中 c-myc 是一个重要的原癌基因。Aoyama (Aoyama C., 1998) 通过 PCR 检测不同病理类型宫颈组织发现在分化较差的癌组织中 c-myc 癌基因较易扩增和过度表达。c-myc 有促使细胞增殖，抑制分化和使细胞永生化作用，可以促使细胞转化。

3.4.2 c-erbB-2 癌基因

c-erbB-2 癌基因于 1985 年被发现，定位于染色体 17q21，编码一个

相对分子质量为 185000 的分子细胞表面糖蛋白, 具有酪氨酸激酶活性。近年来的研究发现 HPV 永生化可以导致 c-erbB-2 的过度表达。

HPV 与 c-myc, c-erbB-2, p21ras 的共同作用是宫颈病变发生发展的重要因素。国内外学者的研究表明, 这些癌基因在宫颈癌中均有高表达的情况, 且与宫颈癌的分化程度呈负相关 (Marangoz S., 1999; Lakshmis., 1997)。

4. 检测分型

人类是 HPV 的特异宿主, 根据 HPV DNA 序列的差异, 已鉴定出 100 多型 HPV (Burd E.M. 2003)。新 HPV 型别命名的原则是: HPV DNA 与其它任何已知 HPV 的 E6, E7, L1 ORF 基因序列的同源性小于 90% (Goodman A. 2000); 如果与某一已知 HPV 的同源性在 90%~98%, 则被命名为相应 HPV 的亚型; 若同源性大于 98%, 则称为该型的变异株 (variant)。

根据 HPV 的致病性, 可分为高危型和低危型。高危型包括 HPV16、18、31、33、34、35、39、45、51、52、56、58、59 和 66 等, 主要存在于宫颈癌、头颈癌和其它的肛门生殖癌; 低危型主要包括 HPV6、11、42、43 等, 多见于生殖器疣等良性增生病变 (Burd E.M. 2003)。

由于 HPV 无法体外培养, 血清学也只能检测病毒抗体, 无法确定病毒及其型别。对 HPV 的感染主要依赖分子生物学手段对病毒进行检测。HPV 的检测方法大致有以下五种, 但基于 PCR 再辅助其它方法, 因其具有高敏感性和特异性, 被许多实验室广泛用于 HPV 研究之中。

4.1 杂交捕获二代 (HC II)

HC II 方法是抗体捕获—液体杂交—信号放大的过程, 采用化学发光定性检测 HPV DNA。但该方法不能区分同组中具体的 HPV 型别, 并且

由于两组探针之间及与宫颈标本中可能存在的细菌质粒存在一定的交叉反应,可导致假阳性结果。其假阴性率在 1.1%~7.5%,病毒含量低、取样不当或标本中存在干扰因素时易出现假阴性(Chow L.T., 1994)。

4.2 型特异性 PCR

型特异性 PCR 方法的基础是各型 HPV 在 E6, E7 基因序列中的差异。由于需要在每一份标本中将 HPV 常见基因型逐个筛选才能最后确定感染 HPV 的型别,须进行较多的 PCR 反应,因此主要用于研究领域。

4.3 通用引物 PCR

多数通用引物是针对 L1 基因内保守性序列设计的,至今应用最多的三套系统是 MY09/11, GP5+/6+和 SPF1/2。其中引物 GP5+/6+的目的片段位于 MY09/11 目的片段之内,三种通用引物系统的目的片段的长度及其在 HPV L1 基因内的位置如图 5 所示。

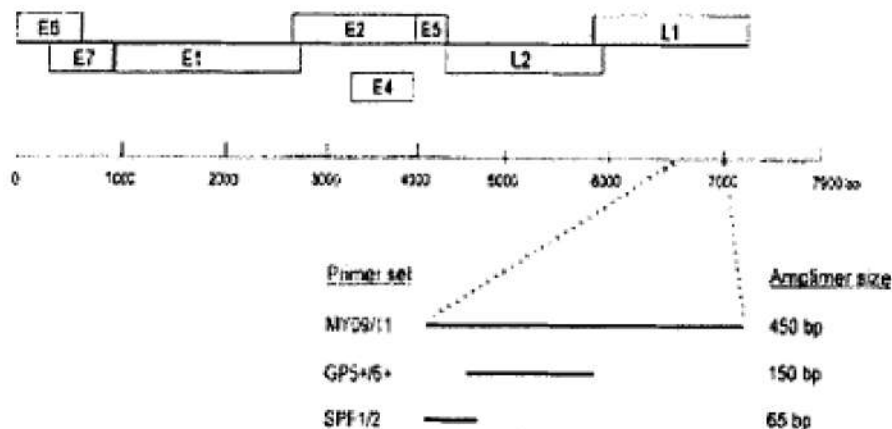


图 6 MY09/11、GP5+/6+和 SPF1/2 通用引物 PCR 目的片段在 HPV L1 基因内的位置及长度

采用MY09/11, GP+5/+6等普式引物进行PCR扩增或结合MY09/11和GP+5/+6巢式PCR来提高灵敏度。进一步用直接测序法(DSC)对所获得的HPV进行分型,该分型方法目前被认为是HPV分型的金标准(Feoli-Fonseca J.C., 2001; Gharizadeh B., 2003)。该方法能同时筛查多种HPV型别,但不能确定多重感染的情况。由于病毒基因组整合时可能丢失L1区,

而导致假阴性的结果。

4.4 原位杂交

原位杂交(in situ hybridization)是用 DNA 或 RNA 探针来检测另一条互补链在细菌或其它真核细胞中的位置。该方法分辨率强、灵敏度及特异性高,能直接观察细胞中或染色体上的 DNA 序列的有无或相互位置关系。其检测最低限度为每个细胞病毒基因 20-25 个拷贝。由于该方法试验程序复杂,缺乏正常对照,因此,不适于流行病学研究。

4.5 生物芯片技术

近年来生物芯片技术的发展为检测 HPV 提供了技术支持,TS Hwang 等用可以检测 15 种高危型 HPV(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 和 69)和 7 种低危型 HPV(HPV 6、11、34、40、42、43 和 44)的寡核苷酸芯片与可以检测 7 种高危型 HPV(HPV 16、18、31、33、35、52 和 58)的 PCR-RFLP 方法比较,发现二者具有良好的可比性,这无疑为 HPV DNA 的检测提供了新的策略(Hwang T.S., 2003)。

四、宫颈癌的预防和治疗

目前控制宫颈癌疾病除定期筛查和外科手术外,还没有更有效的方法。随着生物技术的发展,与宫颈癌相关的 HPV 疫苗有望成为预防和治疗宫颈癌的首选。

HPV 疫苗的研制现状: HPV 疫苗包括用于预防 HPV 感染的预防性疫苗和用于抑制 HPV 引起的相关肿瘤的治疗性疫苗(郭天棋, 2001)。大多数预防性疫苗为 L1 结构蛋白的病毒样颗粒 (VLP),通过诱导机体产生高水平中和抗体来预防人乳头瘤病毒的感染。治疗性疫苗有 E6、E7 疫苗,包括多肽、融合蛋白、带衣壳的质粒 DNA 等疫苗。通过刺激机体产生特异性细胞免疫反应来治疗已有的人乳头瘤病毒感染。现阶段正在对两种

预防性疫苗进行三期临床试验。一种由美国默克公司研制的四价（HPV16、18、6、11）VLP 疫苗，已经结束；另一种由葛兰素史克公司研制的二价（HPV16、18）VLP 疫苗，2004 年开始试验。默克公司在 2002 年发表的 HPV16 型二期临床结果和葛兰素史克公司在 2004 年发表的双价二期临床结果都表明其疫苗能产生抗体，具有超过 90% 的保护性。由于 HPV 至今不能经组织培养，且含有潜在的致癌性 DNA，故疫苗不能采用 HPV 减毒活疫苗或死疫苗，因此疫苗发展集中于由晚期蛋白 L1 及 L2 组成的基因工程亚单位疫苗(魏兰兰. 2001)。

HPV 疫苗的研究开发已 10 多年，并取得了明显的进展。尽管目前还没有一种理想的疫苗问世，相信在不久的将来用于 HPV 感染的预防性疫苗及 HPV 引起的相关肿瘤的治疗性疫苗一定会应用于临床。

五、本论文的设计思想

1. 收集四川地区宫颈癌患者组织，提取组织 DNA，利用 PCR 和测序的方法，横断面调查该地区 9 种高危 HPV 亚型。以此了解该地区 HPV 主要的高危流行亚型分布，为研制宫颈癌疫苗提供亚型参考。

2. 通过对 HPVE6 基因的测序比对，调查该地区 HPV 不同亚型 E6 基因的变异特性，指明特殊的突变位点，为进一步研究其基因变化和函数的关系及相关疫苗设计打下基础。同时，根据 HPV16 E6 的突变特征确定该地区 HPV16 主要的流行株。

3. HPV DNA 在宿主细胞中的存在状态和宫颈癌的进展密切相关。在宫颈高级别损伤和癌瘤中，经常发生病毒基因的整合，这导致 E2 基因的断裂；在低级别损伤中，病毒基因组常以游离状态出现，没有病毒基因的断裂或却失。宫颈癌这种阶梯式的进展过程，理论上，可以通过病毒基因整合状态的检测来作为一种宫颈损伤的早期标志，也可以作为一种宫颈癌风险预判指标。

由于 E6 基因相对保守, 在疾病进展过程只有 E2 基因的改变。因此, 当扩增 E2 基因时, 阴性表示该病毒基因组和宿主基因组发生整合; 阳性时, 检测 E2/E6 的比值, 如果大于或等于 1 表示病毒基因组呈游离状态; 小于 1 则呈伴随状态。通过检测 HPV DNA 在宿主细胞中的物理状态, 获取 HPV DNA 整合信息和在临床各期中的分布, 能够了解该检测方法在临床应用中的价值, 并从实际中考察整合信息能否作为宫颈癌进展的一种指示性标志。

第二章 材 料 与 方 法

第一部分 高危 **HPV** 亚型在四川地区宫颈癌组织中的分布

一、实验材料

1. 收集样品

从 2003 年 10 月收集, 到 2004 年 6 月截止, 在四川省肿瘤医院共获取 158 例宫颈癌组织样品。

2. PCR 扩增实验

2.1 引物合成

所有引物均由上海 Sangon 生物工程公司合成。

2.1.1 基因组提取质量验证引物

β -globin 球蛋白引物由 Amanda et al(2002)设计, 其上下游引物分别是: 5'-CAACTTCATCCACGTTTACC

/ 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC- 3'。能扩增大约 268bp 片段。

2.1.2 普式筛选的 **GP5+/GP6+**引物

由 Jacobs (DE Roda Husman AM., 1997; Jacobs M V., 1995)设计, 其上下游引物分别是: GP5+(5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3')

/GP6+(5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3')。

能扩增大约 150bp 片段。

2.1.3 9 种高危亚型 **HPV E6** 型特异性引物

根据 Gene bank 提供的 HPV16、18、31、33、35、45、52、58、59 的全基因组序列, 要求各引物既能扩增出 E6 基因序列, 又能确保型间的

特异性，而 LF16E6、LR16E6 和 1601、1602 两对引物是用于 HPV16E6 的巢式 PCR，见表 3。由本实验室设计。

表 3 高危型 HPV E6 基因扩增所用引物

型别	核酸序列(5' to 3')	位点	退火温度(℃)	产物长度(bp)
HPV-16*	... ACCGGTTAGTATAAAAG	56~72	56	584
	... GCTCATAACAGTAGAG	640~625		
HPV-18	... GCGCGCTTTGAGGATCCAACACGG	108~131	58	471
	... TACTTGTGTTTCTCTGCGTCG	578~558		
HPV-31	... GTTCAAAAATCCTGCAG	110~126	48	445
	... CACTTGGGTTTCAGTACG	554~537		
HPV-33	... CTATGTTTCAAGACACTG	107~124	45	450
	... TTTACACGTCACAGTGCA	556~549		
HPV-35	... GGACAGACATTGTAAGGTGC	87~106	52	499
	... CAATGTAGTTATTTCTCCATGC	585~563		
HPV-45	... GGCGCGCTTTGACGATCCAAAG	104~125	60	469
	... TTGTGTTTCCCTACGTCTGC	572~553		
HPV-52	... GAGGATCCAGCAACACGA	108~125	56	438
	... CACTTGGGTCACAGGTCG	545~528		
HPV-58	... GTTCCAGGACGCAGAGGAG	112~130	58	445
	... CACTTGTGTTTGTCTACG	556~539		
HPV-59	... CACGCTTTGAGGATCCTAC	59~77	55	476
	... CACCAGTGTTTCACTACGC	534~516		
LF16E6	... AAAACTAAGGGCGTAACCG	20~38	56	649
LR16E6	... TCCTCCTCCTCTGAGCTGTC	668~649		
1601	... CACCAAAAGAGAACTGCAATG	86~106	56	471
1602	... CAGCTGGGTTTCTCTACGTG	556~637		

Note: “*”由Wheeler *et al.* (1997) 设计。

2.1.4 普式引物 MY09/MY11

由 Manos *et al.*(1989)(Manos M.M., 1989)设计，其引物分别是：

上游： 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'

下游： 5'- CGTCCMARRGGAWACTGATC- 3',

M=A+C, R=A+G, W=A+T, Y=C+T。

能扩增大约 450bp 片段。

2.2 主要试剂

高保真 TAQ 酶及相关试剂均购自 Invitrogen 公司 (Platinum Taq DNA Polymerase, dNTP), 分子量 marker 购自 TAKARA 公司。

2.3 主要设备

PCR 仪: 德国产 T-Gradient Thermoblock Biomertra®。

高速离心机: 德国产 eppendorf 5415D。

电泳仪: Bio-rad 公司产品。

凝胶扫描成像系统: UVP, Ultra-Violet, U.S.A。

二、实验方法

1. 临床样品和资料信息的获取

158 例宫颈癌患者组织均通过外科手术切除后, 放 -70°C 保存。临床病理资料由该院病案记录、病理报告获得。

2. 组织 DNA 提取

购买 QIAGEN 公司的 DNA 提取试剂盒 (DNeasy Tissue Kit), 提取的基因组经过 β -globin 球蛋白引物 PCR 扩增验证所提取 DNA 质量。操作按说明书进行, 具体步骤如下:

- ① 25mg 样品组织剪成微小碎块, 放入 1.5ml EP 管中, 加 180ul ATL 溶液。
- ② 加入 20ul 蛋白酶 K 溶液充分混合, 置 55°C 孵育并间隔震荡混匀使组织完全溶解。
- ③ 充分溶解后, 涡旋震荡 15s, 加入 200ul AL 溶液, 混合均匀置 70°C , 孵育 10min。
- ④ 加入 200ul 96~100% 的乙醇溶液, 涡旋混合。

- ⑤吸取 EP 管中混合液体置 DNeasy Mini Spin Column 中,6000g 离心 1min,弃离心液。
- ⑥将 DNeasy Mini Spin Column 置新 2ml 收集管,加 500ulAW1 溶液,6000g 离心 1min,弃离心液。
- ⑦将 DNeasy Mini Spin Column 置新 2ml 收集管,加 500ulAW2 溶液,20000g 离心 3min,弃离心液。
- ⑧将 DNeasy Mini Spin Column 置新 2ml 收集管,加入 200ulAE 溶液,室温放置 1min,6000g 离心 1min,收集洗脱液。
- ⑨重复步骤⑧。

3.检测 HPV 的 PCR

所有样品首先用 HPV L1 基因普式引物 GP5+/6+进行 PCR 扩增,获得 HPV 总体感染情况;其次,为确定主要高危型 HPV 感染的详细情况及防止因 HPV L1 基因在整合、断裂或丢失引起的假阴性,分别用常见高危型(HPV16、18、31、33、35、45、52、58、59) E6 特异性引物进行 PCR 扩增,获得各型感染率及多重感染信息;最后用 MY09/11, GP5+/6+巢式 PCR 法对以上阴性样品进行补充筛查,并对扩增产物测序、定型。为获得 HPV16 感染的准确信息,用以上方法检测的 HPV16 阴性样品,进行 HPV16E6 的巢式 PCR,以减少样品的假阴性。

3.1 GP5+/6+普式引物 PCR

GP5+/6+普式引物法是基于各型 HPV L1 基因同源性设计的一对普式引物,可扩增至少 19 个型别的 HPV L1 基因片断,从而鉴定是否有 HPV 感染。具体试验方法:50 μ L 反应体系,包含 1 $\times$ PCR 缓冲液、3.5mM MgCl₂、200 μ M dNTPs、1 μ L 模板 DNA、引物各 0.5 μ M 和 2.5U Taq DNA 聚合酶。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟后进入循环,94 $^{\circ}$ C 变性 45 秒,45 $^{\circ}$ C

退火 45 秒, 72℃ 延伸 45 秒, 共循环 30 次, 最后 72℃ 延伸 5 分钟。取 3μL PCR 反应产物, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色检测。

3.2 9 种高危型别 HPV E6 基因特异性引物 PCR

型特异性 E6 引物法是针对各型 HPV E6 基因分别设计引物, 特异地扩增筛查每个型别的感染情况。采用 50μL 反应体系, 包含 1×PCR 缓冲液、3.5mM MgCl₂、200 μM dNTPs、1μL 模板 DNA、引物各 0.5μM 和 2.5U Taq DNA 聚合酶。反应条件为 94℃ 加热 3 分钟后进入循环, 94℃ 变性 60 秒, 退火 (HPV16 57℃、HPV18 58℃、HPV31 54℃、HPV33 50℃、HPV35 55℃、HPV45 58℃、HPV52 56℃、HPV58 54℃、HPV59 54℃) 60 秒, 72℃ 延伸 60 秒, 共循环 30 次, 最后 72℃ 延伸 5 分钟。取 3μL PCR 反应产物, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色检测。

3.3 L1 巢式 PCR

L1 巢式 PCR 法是结合被广泛应用的 HPV L1 基因普式引物 MY09/11 引物组和包含于其扩增区域内的 GP5+/6+ 引物进行巢式 PCR, 更灵敏地检测多个型别 HPV。操作方法: 首先用 MY09/11 引物进行 PCR, 在 50μL 反应体系中包含 1×PCR 缓冲液、6.5mM MgCl₂、200 μM dNTPs、1μL 模板 DNA、引物各 0.5μM 和 2.5U Taq DNA 聚合酶。反应条件为 94℃ 加热 3 分钟后进入循环, 94℃ 变性 60 秒, 55℃ 退火 60 秒, 72℃ 延伸 60 秒, 共循环 30 次, 最后 72℃ 延伸 5 分钟。取 MY09/11 引物 PCR 产物作为模版进行第二轮 PCR, 50μL 反应体系, 包含 1×PCR 缓冲液、3.5mM MgCl₂、200 μM dNTPs、1μL 模板、引物 GP5+, GP6+ 各 0.5μM 和 2.5U Taq DNA 聚合酶。反应条件为 94℃ 加热 3 分钟后进入循环, 94℃ 变性 45 秒, 45℃ 退火 45 秒, 72℃ 延伸 45 秒, 共循环 30 次, 最后 72℃ 延伸 5 分钟。取 3μL PCR 反应产物, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色检测。

3.4 HPV16 E6 巢式 PCR

HPV16E6 特异性巢式 PCR 法是特别为检测 16 型 HPV 感染而设计的两对引物。利用这两对引物——LF16E6/LR16E6 和 1601/1602 进行巢式 PCR, 可以更敏感地检测样品中 HPV16 的感染情况。先用引物 LF16E6 和 LR16E6 进行 PCR, 在 50 μ L 反应体系中包含 1 $\times$ PCR 缓冲液、2mM MgCl₂、200 μ M dNTPs、1 μ L 模板 DNA、引物各 0.5 μ M 和 2.5U Taq DNA 聚合酶。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟后进入循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 60 秒, 58 $^{\circ}$ C 退火 60 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒, 共循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟。取该反应产物作为模版进行第二轮 PCR, 50 μ L 反应体系, 包含 1 $\times$ PCR 缓冲液、2mM MgCl₂、200 μ M dNTPs、1 μ L 模板、引物 1601 1602 各 0.5 μ M 和 2.5U Taq DNA 聚合酶。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟后进入循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 60 秒, 57 $^{\circ}$ C 退火 60 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒, 共循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟。取 3 μ L PCR 反应产物, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色检测。

4. PCR 产物的回收纯化

购买日本 TaKaRa 公司的 PCR 产物纯化系统(TaKaRa Spin Columns), 具体步骤按说明书操作执行。

5. HPV 感染率测定与分型

所有样本先用 HPV L1 基因普式引物 GP5+/GP6+PCR 扩增 (145bp), 得到一个相应的 HPV 感染比率。再对整体样本分别用常见 HPV 高危型 E6 特异性引物 (HPV16、18、31、33、35、45、52、58、59) 扩增以确定型别, 并补充 GP 筛选结果。对扩增出的相应 E6 基因片段进行双向测序分析。

6. 核酸序列测定

将目的 PCR 产物进行双向测序，以获得可靠的序列信息。凡发现突变的样品经过 PCR 重新扩增，并再次测序以排除 PCR 过程中碱基错配而可能产生的误差。为保证检测的准确性，每个样品至少测两次以上。测序由上海 Sangon 生物工程公司完成。序列分析用 NCBI Blast 软件。

第二部分 **HPV E6** 基因碱基突变分析

一、实验材料

利用 PCR 扩增的 HPV（16、18、33、45、52、58、59）E6 开放读码框架（ORF）产物，进行序列测定。

二、实验方法

核酸序列测定同第一部分方法 6。遗传进化树采用 MEGA3.0 软件分析。

第三部分 HPV16 DNA 在宿主中存在状态的分析

一、实验材料

1. 含 HPVE1、E2、E6 基因片段的阳性质粒

pT-16E₁₊₂₊₃ 质粒由本实验室构建。

2. PCR 实验所用引物

2.1 HPV16 E1-E2 引物

由本室设计能扩增 E1、E2 ORF 片段的一对引物，并带有 Sac I 酶切位点。引物序列如下：

上游：E1-E2-01gagctcTTTGGAAAGACCTGTTAATGG

下游：E1-E2-02gagctcAAAGCAAAGCAAAAAGCAC

2.2 HPV16E2 引物

由本室设计一对能扩增 E2 ORF 的引物，并在该片段内设计一对能扩增 332bp 的小片段，用以进行巢式 PCR。具体引物序列如下：

E2 ORF 引物：

上游：E2p1 5'-ACCAGATTAAGTTTGCACG-3'

下游：E2p2 5'-AAAAGCACGCCAGTAATG-3'

E2 巢式引物：

上游：e2p1 5'-TGCACCAACAGGATGTATAA-3'(3067-3086)

下游：e2p2 5'-AGTGCTGCCTAATAGTTTCA-3'(3378-3398)

3. 质粒和菌株

菌株 JM109 由本室保存。

pGEM-T easy 载体购自 Invitrogen 公司。

4. 限制性内切酶及其它试剂

内切酶 EcoRI、KpnI、SacI、XmnI 和 T4DNA 连接酶均购自 Invitrogen 公司；Taq DNA 聚合酶、胰蛋白胨、酵母提取物和相关分子生物学试剂购自北京鼎国生物技术公司；RNase、氨苄青霉素购自华美生物公司；其它试剂均为国产分析纯试剂。

二、实验方法

1. pT-16E₁₊₂₊₆ 质粒构建

该质粒构建设计如图 7:

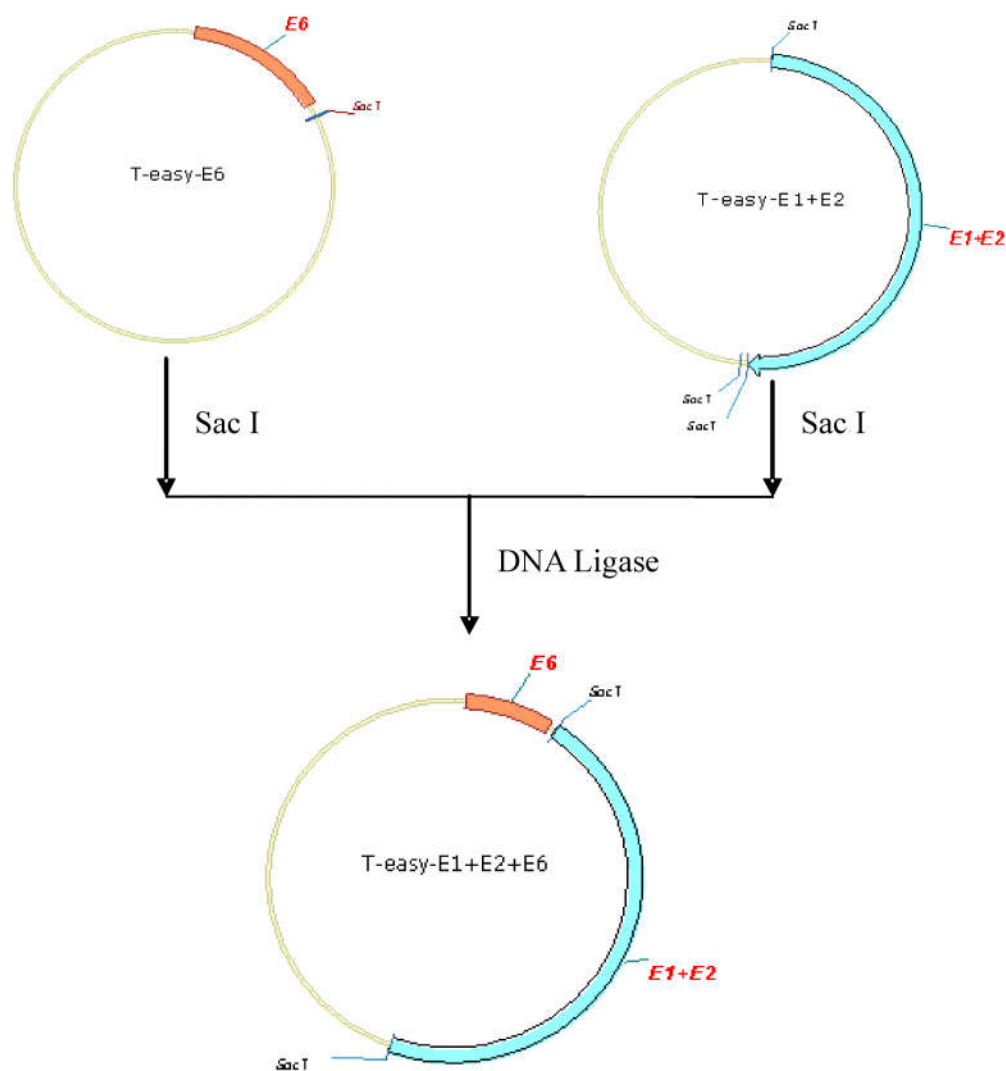


图 7 pT-16E₁₊₂₊₆ 质粒构建示意图

1.1 目的基因的 PCR 扩增

1.1.1 E1-E2 基因片段的获取

用 E1-E2 引物对, HPV16 DNA 为模板扩增 E1-E2 片段。PCR 产物 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, QIAGEN KIT 回收。具体步骤如下:

- ①紫外灯下仔细切下含待回收 DNA 的凝胶, 置 1.5ml 离心管中, 称重。
- ②加入 Buffer QG (每 100mg 凝胶加 Buffer QG 300 μ l), 置 50℃水浴 10min。若回收片段小于 500bp 或大于 4kb, 则需加入异丙醇 (每 100mg 凝胶加异丙醇 100 μ l), 混匀。
- ③将小柱放在 2ml 收集管上, 将上述溶液加于柱上。
- ④4℃离心 13000g $\times$ 1min, 弃去收集管中液体。
- ⑤加入 500 μ l Buffer QG 于柱上, 4℃离心 13000g $\times$ 1min, 弃去收集管中液体。
- ⑥加入 750 μ l Buffer PE 于柱上, 4℃离心 13000g $\times$ 1min, 弃去收集管中液体。
- ⑦4℃离心 13000g $\times$ 1min。弃去收集管。
- ⑧将柱放于一新 1.5ml 离心管上, 加 50 μ l EB 于柱上。放置 1min, 4℃离心 13000g 1min。
- ⑨取 5 μ l 回收 DNA 电泳检测, 定量。

1.1.2 E6 基因片段的获取

用 E6 ORF 引物扩增 E6 基因片段。回收 PCR 产物同上。

1.2 基因克隆

1.2.1 PCR 产物的 PGEM-T easy 载体连接

PCR(50 μ g/ μ l)	3 μ l
T-easy(50ng/ μ l)	1 μ l
2 $\times$ buffer	5 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
Total	10 μ l

将 HPV16 E6 ORF 和 E1-E2 的 PCR 电泳胶回收产物分别和 PGEM-T easy 载体连接, 连接反应在 0.5mlEP 管中进行。总体积 10 μ l 的混合物混匀后, 于 16 $^{\circ}$ C 水浴连接过夜。

1.2.2 感受态细胞的制备

- ①挑单克隆菌接种灭菌试管, 5ml, 37 $^{\circ}$ C, 培养过夜;
- ②将灭菌 CaCl₂/甘油、50ml 离心筒、1.5ml EP 管及枪头放入-20 $^{\circ}$ C 冰箱预冷;
- ③接 4ml 菌于 400ml LB 培养基 (即 1:100), 37 $^{\circ}$ C 250 转培养约 2-3h, 其间随时监测 OD 值。当 OD₅₉₀=0.375 时, 取出;
- ④菌液分装入 4 个 50ml 离心筒, ice 5-10 min, 1600g 4 $^{\circ}$ C 离心 7 min, 弃菌液;
- ⑤每离心筒加 10ml CaCl₂/甘油重悬, 1100g 4 $^{\circ}$ C 离心 5min, 弃上清;
- ⑥再加 10ml CaCl₂/甘油重悬, ice 30min, 1100g 4 $^{\circ}$ C 离心 5min, 弃上清;
- ⑦2ml CaCl₂/甘油重悬后, 分装入 EP 管, 每管 200 μ l, -70 $^{\circ}$ C 速冻。

1.2.3 连接产物转化感受态细胞

- ①在连接产物中加入 100 μ l JM109 感受态菌, 冰浴 30 min.
- ②42 $^{\circ}$ C 热休克 90 s
- ③冰浴 2 min, 加入 1ml LB 液体培养基

④37℃摇床 120 rpm, 培养 1 h

⑤取 200 μ l 均匀涂布于 LB/氨苄青霉素(Amp) (50 μ g/ml) 平板

⑥37℃倒置培养过夜

⑦从转化平板中挑取白色重组菌落, LB(含 Amp)扩大培养。

1.2.4 碱裂解法小量提取质粒

①用 1.5ml 离心管离心菌液, 12000g 1min, 弃去液体;

②100 μ l 溶液 I (ice), 剧振, 200 μ l 溶液 II, 快速颠倒 5 次; (管壁管帽均要沾到液体), 150 μ l 溶液 III(ice), 温和振荡 10sec, ice 3-5min; 12000g 5min, 取上清至干净 EP 管;

③450 μ l 酚:氯仿 (1:1), 振匀; 12000g 5min, 小心取上清至干净 EP 管, 注意不要把有机层及蛋白吸入;

④900 μ l 无水乙醇, 振匀, 室温 2min, 12000g 5min, 弃上清, 吸尽管壁液滴;

⑤1ml 70%乙醇洗, 12000g 2min, 弃上清, 开盖至于空气中干燥 10min;

⑥50 μ l 水/RNase 水重溶。可在-20℃长期保存。

1.2.5 酶切鉴定

E6 和 E1+E2 PCR 产物分别连接 T-easy, 由于 PCR 产物 3'端多出 A 碱基, 而 T-easy 载体 5'端多出 T, 在连接酶的作用下, 可以将 PCR 产物连接至载体中。

酶切试验方法采用常规实验方法。分别取 E6-T 和 E1+E2-T 质粒, 每份 1 μ g DNA, 在 50 μ l 反应体系分别用 EcoR I, Sac I 和 XmnI 进行酶切反应, 酶切反应 37℃, 1 小时后, 取 5 μ l 进行琼脂糖 (浓度为 1%) 电泳分析。而 pT-16E₁₊₂₊₆ 质粒鉴定, 分别用 EcoR I, KpnI 和 Sac I 酶切, 酶切产物琼脂糖电泳分析。

2. pT-16E₁₊₂₊₆ 质粒 E2/E6 比值的测定

以 pT-16E₁₊₂₊₆ 质粒为模板, 用 E2、E6 ORF 引物, 在同一反应 EP 管中做 PCR, 扩增 HPV16E2、E6 ORF 基因。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 通过美国产的紫外凝胶成像仪(UVP, Ultra-Violet, U.S.A)扫描, 并利用其质量分析软件 LabWorksTM software version 4.5(UVP, Inc.)计算 E2/E6 比值。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min。94°C 变性 30S, 65°C 退火 1 min, 74°C 延伸 1 min。循环 30 次, 最后 74°C 延伸 10 min。

3. HPV16E2 巢式 PCR 的扩增

将 HPV16 E2 ORF 阴性的样品, 重新进行 PCR 扩增, 并用巢式 E2 引物继续扩增。巢式 PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min。94°C 变性 40S, 58°C 退火 40S, 72°C 延伸 40S。循环 35 次, 最后 72°C 延伸 5 min。

4. HPV16E2 ORF 阳性样品 E2/E6 比值的测定

同 pT-16E₁₊₂₊₆ 质粒 E2/E6 比值的测定。

5. HPV DNA 在宿主基因组中存在状态的判定

判定标准: 1) E2 基因片段经 ORF PCR 扩增, 样品呈阴性, 而经巢式 PCR 扩增亦呈阴性, 则认为 E2 基因完全断裂, 病毒基因组处于整合状态; 2) E2 基因片段经 ORF PCR 扩增, 样品呈阴性, 而经巢式 PCR 扩增则呈阳性, 则认为 E2 基因片段部分断裂, 病毒基因组处于伴随状态; 3) E2 基因片段经 ORF PCR 扩增, 阳性样品经 E2/E6 比值测定, 若该比值大于或等于对照的 E2/E6 比值, 则认为该样品病毒基因组处于完全游离状态; 4) E2 基因片段经 ORF PCR 扩增, 阳性样品经 E2/E6 比值测定, 若该比值小于对照的 E2/E6 比值, 则认为该样品病毒基因组处于伴随状态。

第三章 结 果 与 讨 论

第一部分 高危 HPV 亚型在四川地区宫颈癌组织中的分布

一、结果

1. 临床样本信息

来自四川地区的 158 例宫颈癌组织样品, 经查询病案记录和病理报告确定 146 例为鳞状细胞癌(squamous-cell carcinoma, SCC); 11 例是腺细胞癌(adenocarcinoma, AC); 1 例是腺鳞细胞混合型癌。FIGO 临床分期资料显示 I 期有 11 例, II 期 67 例, III 期 78 例和 IV 期 2 例。从细胞分化角度观察高分化有 6 例, 中度分化 45 例, 低分化 76 例, 还有 31 例没有查到相应资料。详见表 4-6。

表 4 临床样品组织分类信息和 HPV 亚型感染状况

组织学分类	例数	HPV16 例数	其它型例数	阴性例数
鳞状细胞癌	146	110	30	6
腺细胞癌	11	3	4	4
鳞腺混合癌	1	1	0	0
总 数	158	114	34	10

表 5 临床样品 FIGO 分级和 HPV 亚型感染状况

FIGO 级别	例数	HPV16 例数	其它型例数	阴性例数
I	11	9	2	0
II	67	51	15	1
III	78	53	17	8
IV	2	1	0	1
总 数	158	114	34	10

表 6 临床样品细胞分化信息和 HPV 亚型感染状况

细胞分化程度	例数	HPV 16 例数	其它型例数	阴性例数
高分化	6	4	2	0
中分化	45	34	6	5
低分化	76	50	21	5
未定	31	26	5	0
总 数	158	114	34	10

2. 样品基因组提取

提取 158 例宫颈癌组织基因组 DNA, 并以 β -globin 球蛋白引物 PCR 进行验证, 其中有 5 例 β -globin 呈阴性, 有效提取出 153 例病例组织 DNA 供进一步分析。

3. HPV 总体感染率和亚型分布

3.1 PCR 扩增结果

3.1.1 普式引物 GP5+/GP6+ PCR 结果

选取部分样品示意, 见电泳图 8。10 道为 Marker DL2000, 16 道是阴性对照。在 1~7、9 和 13~15 道, 可见大约 150bp 的清晰条带; 8、11、12 和 17 道呈阴性。阴性对照成立。通过对 153 例样品的 GP5+/GP6+ PCR 筛选, 发现 88 例阳性样品, 占总体样本量的 57.5%。

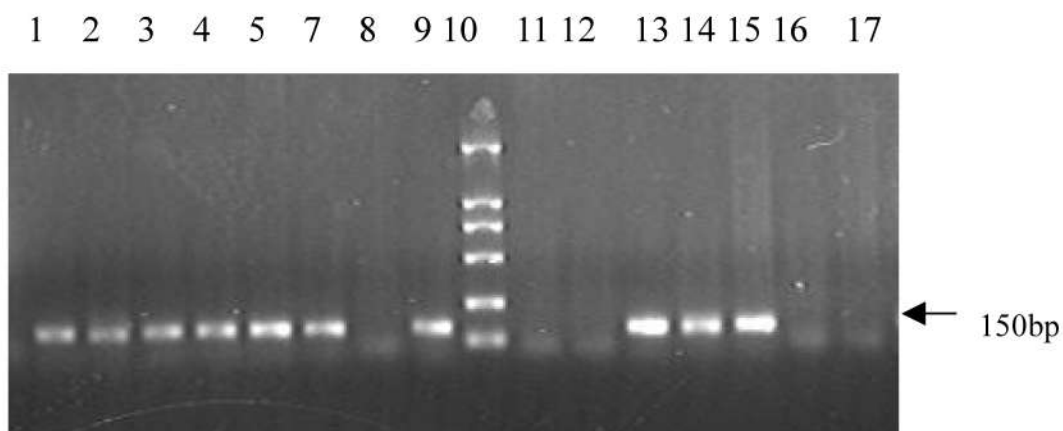


图 8 利用普式引物 GP5+/GP6+ 做 PCR, 筛选 HPV DNA 阳性样品。1~9, 11~15 和 17 道为筛选样品; 10 道是电泳标准品 DL2000; 16 道是未加模板 DNA 的阴性对照。

3.1.2 E6 型特异性引物 PCR 结果

153 例样品分别经 HPV16、18、31、33、35、45、52、58、59 E6 基因特异性引物 PCR 筛查，PCR 扩增电泳结果（各取一例示意）见图 9。

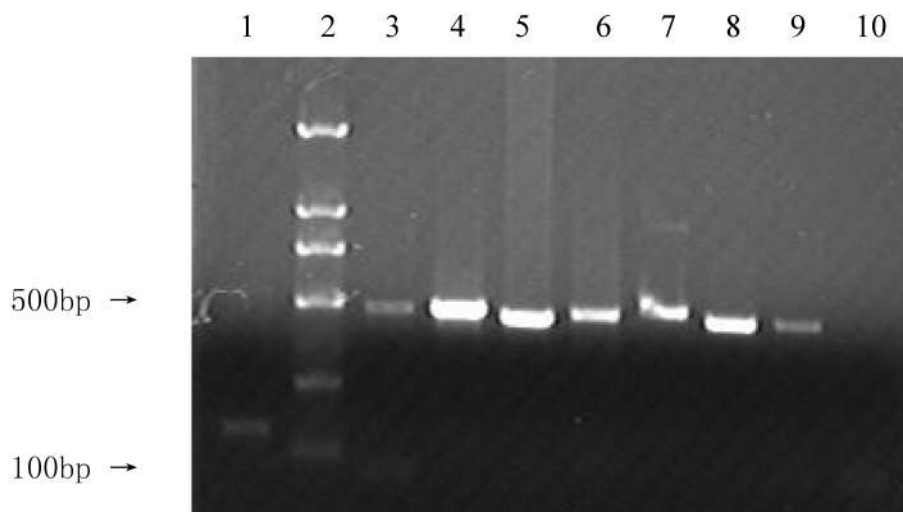


图 9. 宫颈癌组织 HPV16、18、31、33、45、52 和 58 E6 基因 和 L1 基因片断 PCR 扩增检测电泳图。利用 E6 型特异性引物做 PCR，筛选 HPV DNA 阳性样品。

1. HPV L1 GP PCR 产物,150bp; 2. 分子量 Marker (DL2000); 3. HPV16 E6 PCR 产物,471bp; 4. HPV18 E6 PCR 产物,471bp; 5. HPV31 E6 PCR 产物,448bp; 6. HPV33 E6 PCR 产物,452 bp; 7. HPV45 E6 PCR 产物, 469bp; 8. HPV52 E6 PCR 产物, 438bp; 9. HPV58 E6 PCR 产物, 445bp; 10. 阴性对照。

筛查结果显示，有 118 例呈阳性，占总样本量的 77.1%。而 HPV16 型有 85 例呈阳性，占筛查总数的 55.6%。

3.1.3 HPV16 E6 巢式 PCR 结果

HPV16 E6 阴性样品用 LF16E6/LR16E6、1601/1602 引物进行巢式 PCR 筛查，以提高 HPV16 的检出率。68 例样品中 29 例呈阳性，占检测样本数的 42.6%。图 10 是 HPV16 E6 的巢式 PCR 电泳照片，这里仅取部分样品示意。道 2~9 是检测样品，其中 2~8 道为巢式阳性，9 道为双轮阴性。1 道是 DNA Marker，10 道为阴性对照。

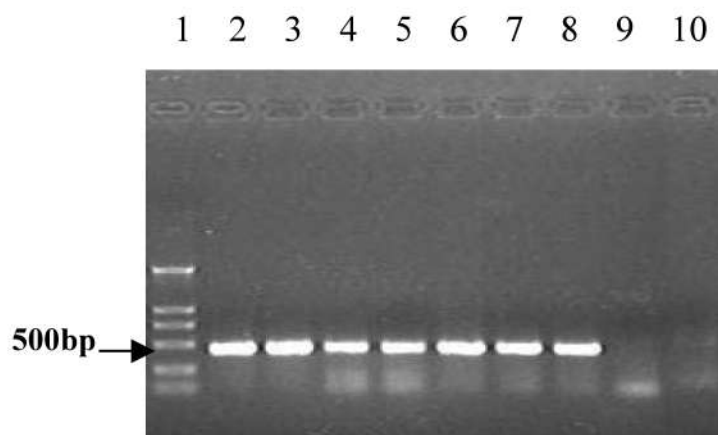


图 10. HPV16 E6 巢式 PCR 电泳图。Lane1 是 DL2000 marker, Lane2~8 是巢式阳性, Lane9 是双轮阴性, Lane10 是阴性对照。

3.1.4 普式引物 MY09/11 和巢式 GP5+/GP6+ PCR 结果

对以上三轮筛查都呈阴性的样品, 进行巢式筛查。选取部分样品示意, 见电泳图 11。在 450bp 处和 150bp 处 7、9、10、18 和 19 道都呈阳性; MY09/11 阴性样品中, 150bp 处有清晰条带的样品是 1、2、4、11、13、15、17 和 20; 5 和 6 道分别为两轮 PCR 的阴性对照。全部阴性样品是 3、14 和 16。总数 30 例样品中有 24 例呈阳性, 占筛查样品的 80%。

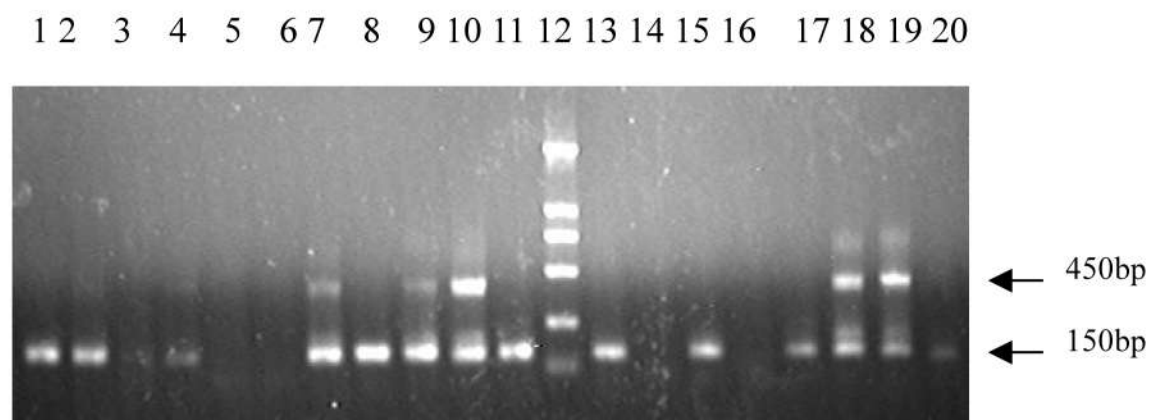


图 11 GP5+/GP6+和 E6 阴性样品, 做 MY09/11 加巢式 GP5+/GP6+PCR, 筛选阳性 HPV DNA 样品。5、6 是阴性对照; 12 是 DL2000Marker; 其余各道为检测样品。

3.2 HPV 总体感染率的测定

对 158 例宫颈癌组织样品提取基因组 DNA, 经 人 β -globin 球蛋白引

物扩增验证,有 5 例样品显示阴性,说明这 5 例样品可能在提取过程中,由于操作原因或者该组织外科切除量少,没有提取到相应组织 DNA。其余 153 例样品,进行 HPV 感染亚型的鉴定。其中 8 例样品,经过 3 次以上 PCR 和相应基因片段测序,5 例样品呈 PCR 阴性,另 3 例不能准确判断其感染亚型。因此,进入本研究的总体样本数是 153 例,HPV 亚型分布研究总样本数是 145 例。从四川地区得到的该组宫颈癌组织样本中,HPV DNA 总体感染率是 96.7%(148/153)。

3.3 HPV DNA 感染亚型分布

在 145 例病例样本中,经检测 113 例被单一 HPV 亚型感染,占 77.9%; 32 例样本存在 HPV 亚型的混合感染,占 22.1%。对 9 种常见 HPV 高危亚型的检测结果见表 7。从表 7 可见,HPV33 亚型的感染只存在于混合感染中,而在本研究病例组中没有发现 HPV35 型的感染。

表 7 145 例宫颈癌组织样品中 HPV 亚型的感染状况

亚 型	单 一 感 染		混 合 亚 型	混 合 感 染	
	例数	感染率(%)		例数	感染率(%)
16	82	56.6	16\18	6	4.1
18	6	4.1	16\31	3	2.1
31	1	0.7	16\33	2	1.4
33	0	0	16\45	1	0.7
35	0	0	16\52	3	2.1
45	4	2.8	16\58	13	9.0
52	3	2.1	16\59	3	2.1
58	16	11.0	16\31\45	1	0.7
59	1	0.7			
Total	113	77.9		32	22.1

在检测的 9 种高危 HPV 亚型中,HPV16 是感染最多的亚型,占 78.6%,

HPV58 是该组病例中位于第二位的流行亚型, 占 20.0%, 其次是 HPV18 占 8.3%, 随后的 HPV 亚型感染率由高到低依次是 HPV31 (3.4%)、HPV45 (4.1%)、HPV52 (4.1%)、HPV59 (2.8%)、HPV33 (1.4%) 和 HPV35 (0%)。见图 12。

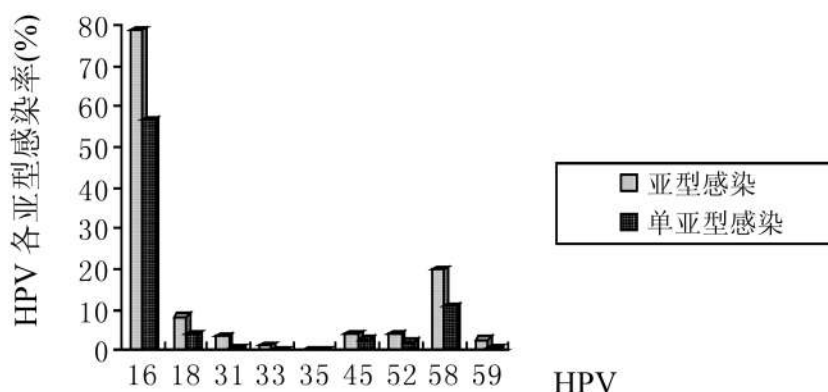


图 12. 145 例感染 HPV DNA 的样品在 9 种不同亚型中的分布

4. HPV 感染在各年龄组和 FIGO 级别中的分布

我们分析了 153 例感染 HPV DNA 的宫颈癌样本在 FIGO 级别和各年龄组中的分布情况。该研究组宫颈癌病人的平均年龄是 48 岁, 最小的 17 岁, 最大的 85 岁; 按 7 年间隔, 将其分为 10 组。从表中可以发现 HPV 感染的宫颈癌发病率集中在 32~、39~、48~、56~和 62~年龄组, 占总发病率的 90%以上; 而 69 岁以上的妇女发病率仅 2%, 但 32 岁以下的妇女发病率却高达 22%。

HPV 感染的宫颈癌患者, 在 FIGO 分期中, 主要集中在 II、III 期, 但 I 期患者也接近 7%的比例。详见表 8。

表 8 不同年龄段中 FIGO 各级别的感染率

		各年龄段中感染 HPV 的例数									
FIGO	感染例数	17~	25~	32~	39~	48~	56~	62~	69~	76~	83~89
I	10	0	1	4	4	1	0	0	0	0	0
II	65	1	0	16	13	22	7	4	1	0	1
III	76	0	2	8	20	26	10	9	1	0	0
IV	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
总数	153	1	3	29	37	49	18	13	2	0	1
感染率(%)		0.7	2	19	21.2	32.0	11.8	8.5	1.3	0	0.6

二、讨 论

宫颈癌和 HPV 的感染有着密切的关系,而高危 HPV 亚型因其能够与宿主基因组整合,使之引发宫颈癌的危险性更加显著 (Ferenczy A., 2001)。世界各地对 HPV 感染的研究由于检测方法、地理环境和人群特征的不同, HPV 感染率从 22%到 100%显示出很大的差异性 (IARC 1995)。为更准确的检测四川地区宫颈癌患者中 HPV 感染率和感染亚型的分布状况,本研究采用了 L1 的 GP5+/6+普式引物、HPV 型特异性 E6 引物、L1 巢式 PCR 法及 16 型 E6 特异性巢式 PCR 法等不同方法对样品进行了检测。这些方法优势各异,可以作为方法学上的互相补充,使得到的结果更加接近实际。

GP5+/6+普式引物法是基于各型 HPV L1 基因同源性设计出一对普式引物,可扩增至少 19 个型别的 HPV L1 基因片断,从而鉴定是否有 HPV 感染 (De Roda Husman A.M., 1997)。该方法操作简便,筛查容量大,经一轮 PCR 就可鉴定多种型别 HPV 的感染,但该方法不能对 HPV 分型,进行型别鉴定须辅助其他方法,如核苷酸测序、核酸杂交等。测序法分型的缺点在于无法鉴定多重型别感染的感染样品,且成本较高;而杂交法分型灵

敏度不如测序法且操作方法复杂。此外由于引物位于L1基因内部，其位置正处于HPV病毒整合入染色体时可能断裂丢失的区域（Gallo G, 2003; Schwarz E., 1985），这一方法目标基因区域的拷贝数受HPV病毒在细胞中的物理状态的影响，从而影响该方法的灵敏度。

特异性E6引物法是针对各型HPV E6基因分别设计引物，特异地扩增筛查每个型别的感染情况。本研究主要通过此方法对感染HPV的样品进行型别鉴定。该方法针对性强，灵敏度高，并且可以检测HPV亚型多重感染的情况。同时因E6基因稳定存在与转化细胞中，特异性E6引物法不受病毒存在状态的干扰。该方法的不足之处是要对每个HPV型分别都要设计特异性引物，从样品筛查角度有很大的工作量，且很难包含所有型别。因此，本研究仅针对9种常见高危HPV亚型进行检测。

L1巢式PCR法是结合被广泛应用的HPV L1普式引物MY09/11引物组和包含于其扩增区域内的GP5+/6+引物进行巢式PCR，更灵敏地检测多个型别HPV。但这种方法操作烦琐，易发生污染，同时也不能鉴定多重感染样品。本研究运用此方法对以上两个方法进行补充，不同的检测方法互相验证和弥补，很大程度上提高了检测的灵敏度和准确度。

16型E6特异性巢式PCR法是本研究特别为检测16型HPV感染而独特设计的。根据HPV16基因组序列设计两套引物LF16E6/LR16E6和1601/1602进行巢式PCR，以更敏感地检测样品中HPV16的感染情况。本研究通过此法将HPV16的检出率从55.6%提高到74.5%（按总数153例计算）。这一方法针对性强、灵敏性好，但操作烦琐。

我们首次采用该检测系统，在四川地区153例宫颈癌患者组织中发现有96.7%(148/153)的患者感染HPV病毒。这个结果和Walboomers对宫颈癌患者HPV调查的96%基本一致(Walboomers et al.,1999)；略高于韩国报道的94%（Taesook Hwang. 1999）及日本妇女宫颈癌中93%的HPV感染率

(Toshiyuki Sasagawa., 2001;); 高于上海地区的87.5%(Huang S., 1997), 台湾的86.2%(Lai HC., 1998), 以及Liu等2004年发表的在中国南部调查的83.7%(Liu J., 2004), 提示该地区高危型HPV在宫颈癌组织中有较高的感染率。

在亚型分布上, HPV16 是主要流行亚型占 78.6%, 进似于 YuPing Wu 的报道(79%)(Yuping Wu., 2005)。位居第二的是 HPV58, 占 20%, 远高于 Lo 等 58 型 3.8% 的报道(Lo K., 2002)。Liaw 等(Liaw K.L., 1997)认为在宫颈癌组织中中国以 HPV58 和 HPV52 为主要亚型。李洁、刘宝印等(李洁, 1996)曾对我国 14 省区 HPV 感染调查认为 HPV16、58 为主要流行亚型, HPV18 相对少见。但在香港和我国北方地区有调查表明 HPV18 为第二大流行亚型。在欧美地区 HPV18 也是仅次于 HPV16 的流行亚型(Bosch F.X., 1995)。而在我们的病例组中, HPV18 感染率相对较低仅 8.3%。我们的结果进一步证实 HPV 亚型分布在不同国家或同一国家不同地区之间都存在着地理环境上的差异。在四川地区我们还发现了在亚洲相对少见的 HPV39 (1.4%) 亚型(结果没有显示), 在我国仅 YuPing Wu(Yuping Wu., 2005)2005 年报道, 从来自广东和江西的 152 例宫颈癌组织中发现 2 例 HPV39 的感染。IARC(1995)曾对 22 个国家 HPV 感染调查后认为, HPV33、39 和 59 更多的出现在拉丁美洲国家。这预示高危型 HPV 感染在该地区的流行亚型较为特殊, 除世界范围内普遍流行的 HPV16、18 外, HPV58 和亚洲相对少见的 HPV39, 在该地区都有流行, 但本病例组中没有检测到高危型 HPV35, 这对研制中国 HPV 疫苗的设计策略将提供非常重要的流行病学资料。

Zur Hausen 等认为宫颈癌发生多见于 55~65 岁之间, 而低级别损伤则一般发生在 25~35 岁左右, 这种损伤如果进展为宫颈癌大概需要 20~30 年时间(zur Hausen, 1994)。但近几年, 我国的于冬雁、沈伟宏等人研

究认为宫颈癌的发生有年轻化的趋势（于冬雁. 2003；沈宏伟. 2003）。我们的结果也显示，32 岁以下的妇女宫颈癌发病率达到 22%，有较高的发病率。

三、小 结

1. 四川地区宫颈癌妇女患者中 HPV DNA 的总体感染率是 96.7%。
2. 四川地区宫颈癌患者组织中感染 HPV DNA 的亚型以 HPV16 为主，占 78.6%；居于第二位的是 HPV58，占 20.0%；其次是 HPV18 占 8.3%。随后的 HPV 亚型感染率由高到低依次是 HPV45（4.1%）、HPV52（4.1%）、HPV31（3.4%）、HPV59（2.8%）、HPV33（1.4%）和 HPV35（0%）。
3. 该地区宫颈癌的发病率有年轻化趋势。

第二部分 HPV E6 基因碱基突变分析

一、结果

1. HPV18 型 E6 基因碱基突变分析

在本实验组中，HPV18 感染率占 8.3%，是第三大流行亚型。我们从 12 例 HPV18 阳性样品中随机选取了 7 例（样品号 SC18-1~7），扩增其 E6 ORF，PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后，目的基因经纯化后进行测序分析。测序结果与 Genbank 提供的标准全序列 HPV18（AY262282）进行比对。结果显示，7 例 HPV18 型样品中有 4 例（SC18-1、3、5、6）为野生型，另 3 例（SC18-2、4、7）发生两处同样的点突变，分别为 HPV 总基因组第 485 位 T→C、549 位 C→A，两处皆为同义突变（见表 10）。

2. HPV33 型 E6 基因碱基突变分析

HPV33 型感染率仅占 1.4%，我们将其中 1 例 HPV33 E6 基因经 PCR 扩增并测序比对，发现在该 E6 基因 ORF 内有 6 处点突变，其中 5 处在 nt164 位 T→C、nt273 位 A→G、nt364 位 A→C、nt387 位 A→C 和 nt446 位 A→G 发生的碱基置换能导致相应氨基酸的变化。另一处为同义突变，在 nt213 位 A→C。详见表 9。

表 9 HPV33 型 E6 碱基突变和氨基酸变化

	E6 碱基序列位点						E6 氨基酸序列位点				
突变位点	1	2	2	3	3	4	1	3	1	9	1
	6	1	7	6	8	4	9	5	0	3	1
	4	3	3	4	7	6			6		3
参考原型	t	a	a	a	a	a	L	K	N	K	Q
突 变	C ^a	c	G	C	C	G	S	N	H	N	R

a. 大写字母表示涉及氨基酸的变化。

3. HPV45 型 E6 基因碱基突变分析

HPV45 型感染在研究病例组中占 4.1%，共有 6 例。我们选取 2 例，经 PCR 扩增其 E6 基因，测序和碱基序列比对（Genbank X74479）后，在 2 例样品中共发现 8 处碱基置换。

样品号为 SC45-2 的病例，检测到 HPV45 E6 基因在 482 位碱基发生 T→C 的变化，另一处 nt549 位 C→A。这两处突变都没有相应氨基酸的改变，为同义突变。而样品 SC45-1 E6 基因有 6 处碱基突变，分别为 134 位 C→T、157 位 C→T 、259 位 G→T 、341 位 T→C 、482 位 T→C、497 位 A→G。其中 157 位的突变在氨基酸水平由苏氨酸变为异亮氨酸（T19I）、259 位的突变在氨基酸水平由半胱氨酸变为苯丙氨酸（C53F），其余均为同义突变(表 10)。

表 10 在 HPV 18 和 45 E6 基因中的碱基突变.

HPV-18			HPV-45								
突 变 位 点	4	5	突 变 位 点	1	1	1	1	2	3	4	4
	8	4		2	3	5	5	5	4	8	9
	5	9		4	4	0	7	9	1	2	7
参考原型	T	C	参考原型	A	C	T	C	G	T	T	A
SC18-1	-	-	SC45-1	-	T	-	T	T	C	C	G
SC18-2	C	A	SC45-2	-	-	-	-	-	-	C	G
SC18-3	-	-	HPV-45 Y13218	C	-	C	-	T	-	C	-
SC18-4	C	A						*	*		
SC18-5	-	-									
SC18-6	-	-									
SC18-7	C	A									
HPV-18 U89349	C	A									

HPV-18 和 HPV-45 是原型序列, HPV18(U89349) 和 HPV45(Y13218)是基因库中变异参考序列, 在“*”位置有氨基酸的变化。

4. HPV52 型 E6 基因碱基突变分析

和 HPV45 型感染率一致，HPV52 型感染在本实验组中检测到 6 例，

我们选取 4 例样本做 E6 基因核苷酸序列的分析。其中 2 例在 HPV52 E6 基因序列 350 处发生 G→T 同义突变, 在 379 处有 A→G 突变, 并导致该处氨基酸由赖氨酸变为精氨酸 (K93R)。另 1 例 除有以上突变外, 还存在 A356G 同义突变。最后 1 例样品同时具有 G350T、A378C、A379G、C467A 4 处突变, 其中 A378C 和 A379G 导致该处氨基酸残基由赖氨酸变为精氨酸 (K→R), 而 nt467 位 C→A 的突变则导致氨基酸残基由天冬酰胺变为赖氨酸 (N122K)。详见表 11。

表 11 HPV52 型 E6 基因碱基突变分布

	E6 碱基序列位点					E6 氨基酸序列位点		突变例数
突变位点	3	3	3	3	4	9	1	
	5	5	7	7	6	3	2	
	0	6	8	9	7		2	
参考原型	g	a	a	a	c	K	N	
突 变	t	-	-	G ^a	-	R	-	2
	t	g	-	G	-	R	-	1
	t	-	C	G	A	R	K	1

a.大写字母表示涉及氨基酸变化。

5. HPV58 型 E6 基因碱基突变分析

HPV58 型在本研究病例组中是第二大流行亚型, 仅次于 HPV16, 占 20%。观察 4 例测序的 HPV58 E6 基因变化, 发现 1 例在 E6 基因组 259 位有 A→G 同义突变, 而另外 3 例都是 388 位 A→C 单点突变, 并导致该处氨基酸由赖氨酸变成天冬酰胺 (K93N), 见表 12。

表 12 HPV58 型 E6 基因碱基突变分布

	E6 碱基序列位点		E6 氨基酸序列位点	突变例数
突变位点	2	3	9	
	5	8	3	
	9	8		
参考原型	a	a	K	
突 变	g	-	-	1
	-	C ^a	N	3

a.大写字母表示涉及氨基酸变化。

6. HPV59 型 E6 基因碱基突变分析

共有 4 例感染 HPV59 亚型，占 2.8%。将 3 例阳性样品的 PCR 产物进行测序分析，结果表明 SC59-1 和 SC59-2 样品 E6 基因核苷酸序列同标准株（Genbank X77858）一致，未有突变。SC59-3 样品 E6 基因相对 Genbank 收录的来自日本和韩国的 HPV-59 标准株有 4 处碱基突变，分别为 nt102 位 T→C、nt306 位 C→T、nt363 位 A→C 和 nt402 位 T→C。这 4 处碱基突变都不涉及氨基酸的变化，皆为同义突变。

7. HPV16 型 E6 基因碱基突变分析

HPV16 亚型在世界范围内都是主要的流行亚型，中国也不例外。在 153 例宫颈癌病例 HPV 亚型研究中，我们检测到 114 例 HPV16 阳性样品，全部样品经 E6 ORF PCR 扩增，测定核酸序列，与 Genbank（AF534061）标准株比对，除 1 例样品未能确定 E6 基因序列外，其余 113 例都获得了相关的序列变异信息（见表 13）。

7.1 E6 基因的碱基突变

表 13 中的结果显示，HPV16 感染的样品里，针对 E6 ORF 基因的序列突变，我们发现了 21 种型内变异体，这些变异体在不同的核苷酸位点

发生碱基替换，大多数碱基的变化都导致了氨基酸的改变。

表 13 E6 基因不同于原型(350T)的突变分布

变异体	碱基序列位点														氨基酸变化	例数	百 分 率 (%)
	94	168	173	176	178	188	203	240	276	335	350	442	464	511			
	(参考原型)																
1	G	C	C	G	T	G	A	C	A	C	T	A	A	T		26	23
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	L83V*	4	3.5
3	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D25E	34	30.1
4	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H24Y	1	0.9
5	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	N58S	4	3.5
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	H78Y	2	1.8
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	K121E	1	0.9
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	E113D	3	2.7
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	NO	1	0.9
10	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D25N	1	0.9
11	-	G	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T22S+D25E	1	0.9
12	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	D25N+L83V	1	0.9
13	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	L83V	5	4.4
14	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	G	-	-	-	K34E+L83V	1	0.9
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	C	-	-	H78Y+E113D	3	2.7
16	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	T22S+L83V	7	6.2
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	-	-	-	H78Y+L83V	8	7.1
18	-	G	-	-	-	C	-	-	-	-	G	-	-	-	T22S+E29Q+L83V	7	6.2
19	-	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	C	-	-	D25N+H78Y+E113D	1	0.9
20	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	D25N+L83V	1	0.9
21	-	G	-	-	-	C	-	G	-	-	G	-	-	-	T22S+E29Q+A46G+L83V	1	0.9

注：*L83V 表示在 83 位，氨基酸由亮氨酸转变为缬氨酸。其余类似。

在 113 例宫颈癌组织样本中，变异体 1 和原型（欧洲株）E6 序列完全一致，共发现 26 例，占总病例数的 23%；而变异体 3 仅在 nt178 位发生 T→G 突变，其 25 位氨基酸由天冬氨酸变为谷氨酸。该型和东亚株 E6 完全同源，共有 34 例，占总病例数的 30.1%。此外，我们发现包含 nt350T→G 点突变的病例亦占有 30.1%的比例，该突变导致 83 位氨基酸

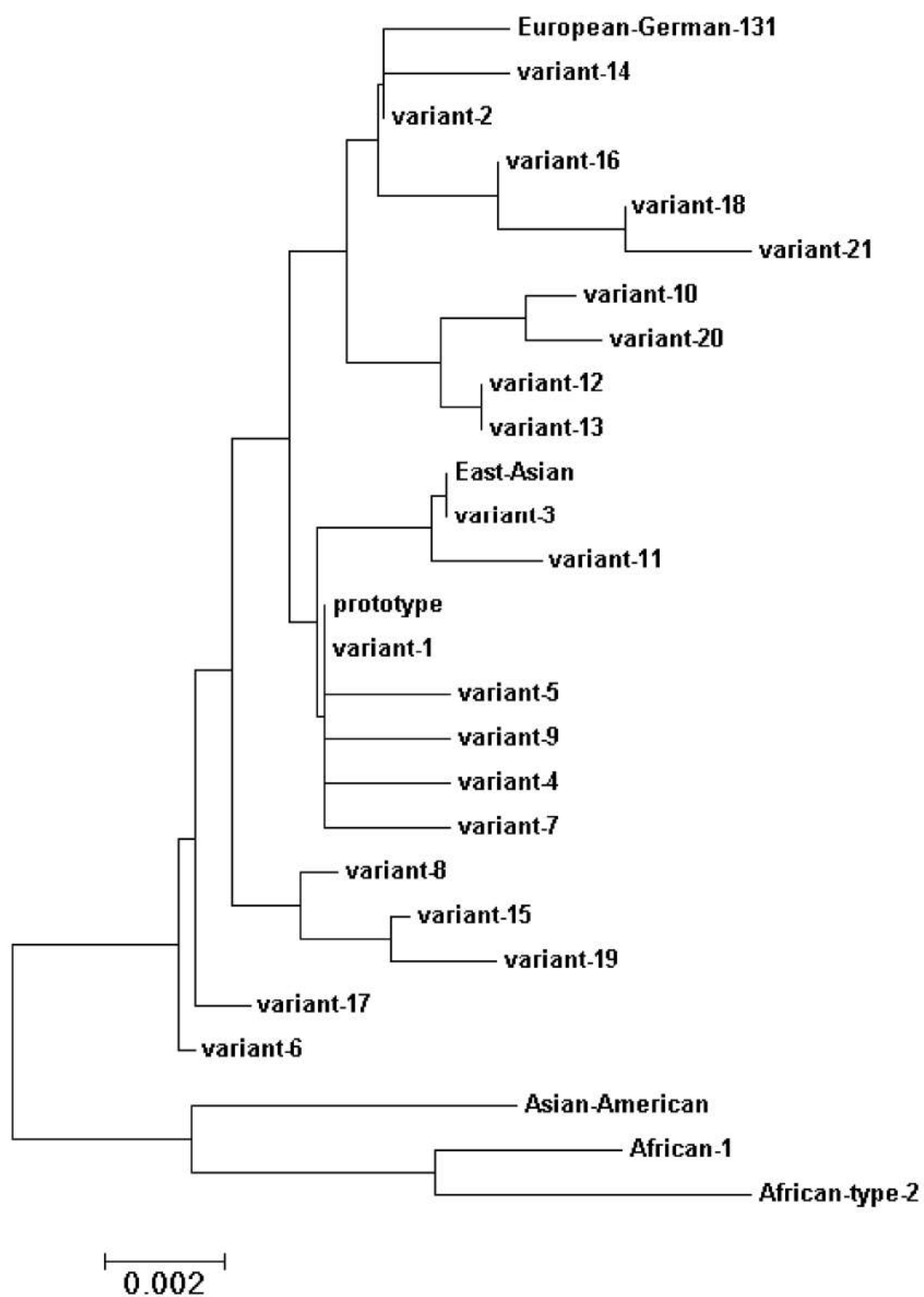
由亮氨酸变化为缬氨酸。从基因库中搜寻，在我们发现的 14 处点突变中，G94A、C173T、A203G、C240G、A464G 和 T511C 以前没有报道，其中 G94A 和 T511C 的变化没有引发氨基酸的改变，另外 4 个突变则有相应位置氨基酸的转化。

7.2 E6 变异体亲缘关系分析

对所发现的 21 个突变体与 5 大流行株 (AA、As、E、Af1 和 Af2) E6 基因进行系统进化分析 (见图 13)，发现突变体 3、4、5、7、9、11 与欧洲原型同源性非常近，位于同一分化枝内，而突变体 2、14、16、18、21 与 E131 同源性很近，位于同一分化枝内。E131 欧洲原型及亚洲型同源性很高，通常将 E131 欧洲原型及亚洲型共同称为欧洲型突变株。非 1、非 2 和亚美型亲缘性很高，共同被称为非欧洲突变株。通过软件分析的进化树可以发现突变体 6、8、15、17、19 与以上两个分支有一定差异，位于欧洲型和亚美型之间。

因此，从遗传进化树上，我们可以得到如下结论：变异体 1 和欧洲株 (E) 完全同源，而变异体 2、3、4、5、7、9、10、11、12、13、14、16、18、20 和 21 都和 E 株有相近的同源性，可以看作是 E 株的突变体。在该研究组中，欧洲株和欧洲变异株占 85%，是该地区的主要流行株。

图 13 HPV16 E6 基因遗传进化树



7.3 E6 变异体在 FIGO 分期中的分布

表 14 显示了 E6 变异体在不同 FIGO 分期中的分布, 只有变异体 1 和变异体 3 在 FIGO 各期中都有存在, 其余各变异体在 FIGO I 期中没有发现; 21 种变异体中仅变异体 7、12 和 14 在 FIGOIII-IV 期中没有出现。所有 58 例 FIGOIII-IV 期宫颈癌组织样品, 变异体 1 和变异体 3 各占 25.9% 和 27.6%, 分布状态均匀; 而在 I 和 II 期的 8 例和 47 例样品中, 变异体 3 所占比例要略大于变异体 1 的比例。

表 14 E6 变异体在不同 FIGO 分期中的分布

变 异 体	E6 突变位点	I n=8	II n=47	III – IV n=58	总 数 113
1	350T	2 [25]	9 [18.7]	15 [25.9]	26
2	350G	0 [0]	2 [4.2]	2 [3.4]	4
3	178G	6 [75]	12 [25]	16 [27.6]	34
4	173T	0 [0]	0 [0]	1 [1.7]	1
5	276G	0 [0]	3 [6.3]	1 [1.7]	4
6	335T	0 [0]	1 [2.1]	1 [1.7]	2
7	464G	0 [0]	1 [2.1]	0 [0]	1
8	442C	0 [0]	1 [2.1]	2 [3.4]	3
9	511C	0 [0]	0 [0]	1 [1.7]	1
10	94A+176A	0 [0]	0 [0]	1 [1.7]	1
11	168G+178G	0 [0]	0 [0]	1 [1.7]	1
12	176A+350G	0 [0]	1 [2.1]	0 [0]	1
13	94A+350G	0 [0]	3 [6.3]	2 [3.4]	5
14	203G+350G	0 [0]	1 [2.1]	0 [0]	1
15	335T+442C	0 [0]	2 [4.2]	1 [1.7]	3
16	168G+350G	0 [0]	3 [6.3]	4 [6.9]	7
17	335T+350G	0 [0]	6 [12.5]	2 [3.4]	8
18	168G+188C+350G	0 [0]	2 [4.2]	5 [8.6]	7
19	176A+335T+442C	0 [0]	0 [0]	1 [1.7]	1
20	94A+176A+350G	0 [0]	0 [0]	1 [1.7]	1
21	168G+188C+240G+350G	0 [0]	0 [0]	1 [1.7]	1

注: 方括号内数值表示在各分期中所占的百分数。

二、讨论

自 19 世纪 70 年代, HPV 感染与宫颈癌的病因学关系提出到 1995 年 WHO 和 IARC 将 HPV 正式确定为是宫颈癌的病因。人们将研究热点从两者的病因学关系集中到 HPV 基因的变化和宫颈癌之间的作用影响上。先前的研究认为 HPV 型内基因的突变在持续感染宿主细胞中扮演重要的角色(Zehbe I., 2001; Xin C.Y., 2001)。但这种变异对宫颈癌的进展以及预后是否具有意义, 一直存在争论。目前研究最多的是 HPV16、HPV18 和 HPV58 型基因的变化。而研究的目的基因, 根据各基因的主要功能多集中在 URR、E6 和 E7 片段。高危型 HPV16E6、E7 在感染的宿主细胞内能产生遗传的不稳定性 (Duensing S., 2002), 而基因序列的突变可能导致该序列编码蛋白生物学功能的改变, 进而影响感染的自然史。HPV E6 蛋白能够结合 P53 并使之降解, 也能通过形成 C-myc-E6-E6-AP 复合物来阻止 C-myc 所介导的调亡, 以保证病毒感染的持续存在。因此, 确定 E6 基因的变异对合理设计宫颈癌疾病的诊断、治疗、预防和疫苗研发策略显得尤为重要; 而 E6 比 E7 基因有更高的变异率 (Ingo Nindl., 1999), 所以, E6 是重要的研究对象。

本研究以 HPV16 E6 为重点, 获得了 7 个高危亚型 E6 的突变信息。尽管有 6 个 HPV 亚型研究的样本数略显微薄, 但从中我们还是可以了解其突变的特点。例如, 我们检测的 3 例 HPV59 型 E6 变异, 只有 1 例和原型比对有 4 处突变, 但都没有引发相应氨基酸的变化, 属于同义突变。这可能提示我们, HPV59 型的 E6 基因在宫颈癌组织中相对保守; 而我们首次发现的这 4 处突变可能和地域人群相关。与其相反的是 HPV18 型 E6 基因的突变, 在分析的 7 例样品中, 有 3 例共发生 2 处突变, 并且也没有相应氨基酸的改变, 但同样的变化在国外文献上有过报道(Cole S.T., 1987), 提示这两点的变化可能在世界各地较为普遍。

我们获得的 1 例 HPV33E6 基因在多个位置上发生碱基点突变, 和日本 Cui 等报道的 HPV33E6 突变株比较, 值得注意的是他们中有 6 例 HPV33 分别具有除了我们发现的 T164C 以外的其它点突变, 其中 1 例同时具有 A273G、A364C、A387C、A446G 的多点突变(Cui Y.X., 2001)。在 Cui 等检验的 46 例 HPV52 E6 基因样本中, 有 43 例 E6 基因具有 G350T 和 A379G 两处点突变, 有 1 例具有 G350T、A378C、A379G 三处点突变(Cui Y.X., 2001)。而我们发现的 A356G 和 C467A 点突变未见报道, 并且 4 例 HPV52 E6 基因和 Cui 等人发现的 HPV52E6 基因样本, 没有一例与 Genbank 提供的标准株完全相同。从 1 例 HPV33 和 4 例 HPV52E6 基因突变位点结果看, 和日本报道的结果大部分吻合。而我们获得的 4 例 HPV58 E6 基因点突变, 则与我国台湾地区报道的结果相近。Can 等人曾对台湾地区 HPV58 E6/E7 基因突变株进行调查, 有 28 例 E6 基因都单独含有或包含有 A388G 点突变(Chan P.K.S., 2002), 而我们的 4 例 HPV58 型患者中有 3 例是 A388G 单点突变。

从 HPV33、52、58 型 E6 突变和日本、台湾地区的类似研究结果看, 这三种 HPV 亚型在东亚地区人群中有着进似的变化; 而我们的研究没有发现一例与 Genbank 提供的 HPV33、52、58 标准株完全相同的 E6 基因序列, 这提示有可能存在着不同于 Genbank 标准株的东亚 HPV33、52、58 流行株。而 1 例 HPV33 E6 基因在核苷酸 164 位发生的 T→C 替换, 1 例 HPV52 E6 基因在核苷酸 356 位发生的 A→G 替换, 另一例在 467 位发生的 C→A 替换和 1 例 HPV58 E6 基因在 259 位的 A→G 替换, 这些突变以前未见报道。由于我们调查的病例数相对较少, 因而不能推测这些首次报道的突变和四川内陆地区感染 HPV33、52 和 58 型宫颈癌病人之间是否存在特异的相关性, 但是这些不同于其它地区的变异, 可以提示这些突变可能和地区以及人种之间存在差异。

检测的 2 例 HPV45 型 E6 基因共有 8 处发生基因的点突变, 其中 1 例在 157 位 C→T 的突变导致 19 位的氨基酸由苏氨酸变为异亮氨酸 (T19I)。值得关注的是 19 位的氨基酸位于 E6 蛋白保守区域。有资料指出 HPV 病毒 E6 蛋白 19 位氨基酸位于 B 细胞抗原决定簇和 T 细胞抗原决定簇区域 (Scheffner M., 1994; Bartholomew J.S., 1994; Muller M., 1992), 提示该位点氨基酸的改变 (T19I) 很可能对病毒 E6 蛋白的免疫原性产生影响。另一处涉及氨基酸变化的突变: 碱基水平上由 45 型变为 18 型的 259 位突变在氨基酸水平 (C53F) 上也转变为 18 型。该突变反映了 HPV45 和 HPV18 型在系统进化上距离很近, 有着很高的同源性 (乌恩奇, 2006)。

已有的四川地区 HPV 感染的流行病学资料都没有明确 HPV 主要流行亚型 HPV16 是属于哪一流行株。而 Yamada 等对来自 22 个国家的样品 HPV16 进行突变分析并归纳不同突变体所属的流行株, 绘制了各流行株在不同地区的分布图, 但对中国流行的 HPV16 还没有任何分类的报道。先前的研究认为 HPV 病毒的进化是通过碱基点突变累积的结果, 而不是通过基因重排或基因重整 (rearrangement or recombination) 来实现的, 因此可以通过某一区段基因的突变情况判定病毒所属的世系。目前通常将 HPV16 突变株分为五个类型: Asian-American、East-Asian、European、African-1 和 African-2。有证据指出非欧洲型突变株的致癌危险是欧洲型突变的 2 到 9 倍 (Xi L.F., 1997; Villa L.L., 2000; Matsumoto K., 2000; Berumen J., 2001; Hildesheim A., 2001)。对来自墨西哥宫颈癌与 CIN 中 HPV16 突变分布的对比研究明确显示了感染亚美型 HPV16 的癌变率远比欧洲型 HPV16 高 (Berumen J., 2001)。Hildesheim 等对来自哥斯达黎加 10000 多名妇女 HPV16 突变感染情况的调查也证实非欧洲型 HPV16 的癌变率比欧洲型 HPV16 高 (Hildesheim A., 2001)。

在我们检测的 113 例宫颈癌样本中, 依据 E6 基因区, 有 26 例和欧

洲株完全相同，占到总体的 23%；和欧洲株比较，只在核苷酸 178 位发生 T→G 突变的样品有 34 例，占总体的 30.1%，与 Genbank 收录的亚洲株完全同源。从变异体的亲缘看，突变体 3、4、5、7、9、11、2、14、16、18、21 有很高的同源性，都视为欧洲原型的突变体。因此，四川地区流行的 HPV16 型主要是欧洲株 (E-350T) 及其变异体，占总体的 85%。就 E6 基因，欧洲原型与亚美型间有 7 个碱基的差别，突变株 17 相对欧洲原型有 2 处碱基处差异，相对亚美型有 5 处差别，该突变体可视为是欧洲型和亚美型的中间型。该组 HPV16 E6 的变异研究发现，21 个变异体没有亚美型和非洲型出现，进一步提示，在四川地区宫颈癌患者组织中感染的 HPV16 型来源于欧洲株或欧洲株的变体。

对欧洲株 E-350T 有许多报道显示经常发生 E-350G 的变化，在我们的研究中，核苷酸 350T→G 变异体只有 3.5%，但伴随其它突变的 350T→G 变异体却达到 28.1%。Zebhe et al (Zehbe I., 1998) 认为 T350G 的突变可以导致 E6 表达的第 83 位氨基酸由亮氨酸转变为缬氨酸 (L→V)，而这种变化能促进宫颈癌的进展。随后，有研究表明这种变化和宫颈癌的发展没有相关性 (Ingo Nindl., 1999; H.U.X., 1999)。而我们的结果显示，L83V 的变化在 FIGO II~IV 中都有分布和 Yamada et al., (Yamada T., 1997; Ingo Nindl., 1999) Ingo NINDL 的结果相似，并且比例达到了 31.6%。但很有意思的现象是，占总数 53.1% 的 350T 和 T178G 变异体中都没有 350G 的变化，这暗示 T350G 的变化和宫颈癌进展之间不存在明显的相关性。这些矛盾的结果，可能和不同的实验设计，调查的不同的地理区域人群以及样本量大小相关。

在 HPV E6 核苷酸 168 位和 188 位之间有 5 处碱基发生替换，引发 E6 编码蛋白 N 端氨基酸的改变。Kast et al (Kast et al., 1994) 在一个体外实验中证实，该区域氨基酸作为抗原物质能在体内产生强烈的 T 细胞免疫应答。而我们在该区域发现的突变暗示这种氨基酸的变化可能有生物学功能的改

变。本研究又一个新的发现是变异体 14 和 21，尽管各自只有 1 例，但这两种变异体都有核苷酸 203 位 A→G 和 240 位 C→G 的变化，并分别导致相应氨基酸在 34 位 K→E 和 46 位 A→G 的改变。尤其是 240 位的碱基替换，正好位于抑癌基因 P53 的降解区，预示该点突变可能有更强的潜在致癌性。而 Lechner et al (Lechner M.S., 1992) 曾报告 HPV16E6 蛋白 46 位的 Y、47 位的 Y 和 49 位的 H 能够抑制由 P53 介导的对癌细胞生长的转录抑制，这种抑制作用使 E6 能够充分的结合 P53。当然，要证实我们的预测还需要更深意义的研究。但无论如何，这些变异体的生物多样性，尤其它们的致癌能力只有通过流行病学的研究加以阐述，而这些研究则包括病毒变异体和疾病进展的关系以及病毒变异体在体外的瞬时表达。图 14 显示了 HPV16E6 区所有突变的位点。

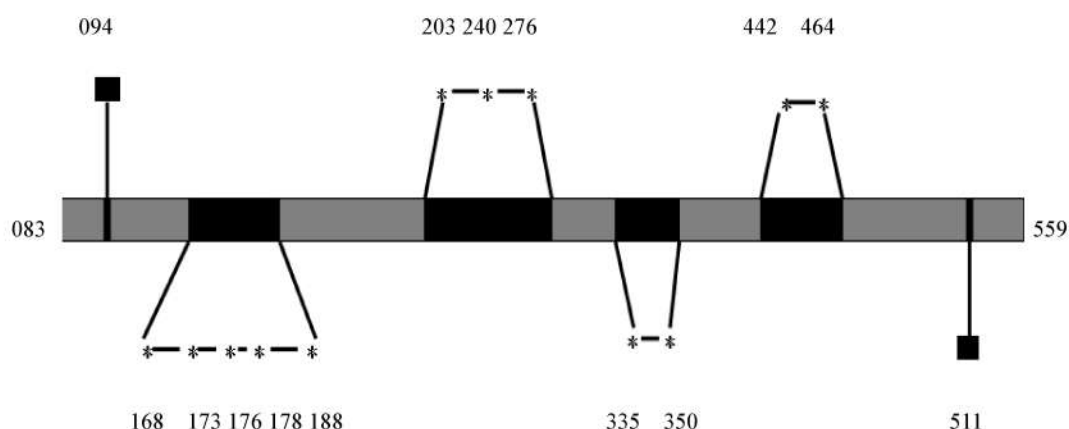


图 14 HPV16 E6 区突变位点示意图。黑方块表示突变为同义突变，星号表示突变发生氨基酸的变化。

通过对 HPV16E6 的突变研究，我们发现变异体 1 和变异体 3 不仅出现在 FIGO I 期，而且在 FIGOIII-IV 期均匀分布。这提示欧洲株和 178 位的欧洲 T→G 突变株可能有着相似的致癌性。

三、小 结

1. HPV E6 区新发现的突变位点: **HPV16**: G94A、C173T、A203G、C240G、A464G 和 T511C; **HPV33**: T164C; **HPV45**: C134T、C157T、G259T、T341C; **HPV52**: A356G, C467A; **HPV58**: A259G; **HPV59**: T102C、C306T、A363C 和 T402C。

突变意义: 1) 为丰富 E6 区突变信息资料, 掌握不同地区 E6 突变规律, 进而了解各地区突变和宫颈癌之间的关系。

2) 某些突变位点如 HPV16 E6 的 C240G、HPV45 E6 的 G259T 等不仅发生氨基酸的改变, 而且这些突变位点正处于 P53 或 T 细胞抗原决定簇结合区, 这种突变是否增加宫颈癌的危险性, 这将提供进一步研究的理论信息。

2. 四川地区宫颈癌患者组织中感染 HPV16 亚型以欧洲株和欧洲突变株为主要流行株。

3. 该研究不支持 T350G 突变更具危险性的结论。

4. 欧洲原型 (变异体 1) 和欧洲 T178G 突变体 (变异体 3) 可能有相似的致癌性。

第三部分 HPV16 DNA 在宿主中存在状态的分析

一、结果

1. pT-E₁₊₂₊₆ 质粒的构建

1.1 pT-E6 质粒的构建

按“材料和方法”叙述构建, 根据 T-easy 载体特点, 用 EcoR I 酶切。理论上, E6 片段在 584bp, 而载体质粒大约 3170bp; E6 片段两端有 EcoR I 酶切位点, 酶切后应该在 500bp 和 3000bp 处出现 DNA 条带。见图 15。

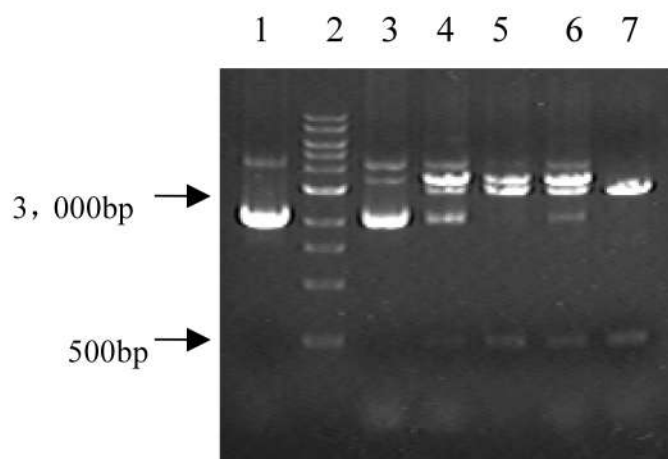


图 15 pT-E6 质粒酶切图谱。T 载体 (3170bp) 上, 连接 E6 基因片段 (584bp) 两端有 EcoR I 酶切位点, 可以将连接上的 E6 片段切下。Lane1、3 是构建的原始质粒, Lane2 是 1Kb DNA Marker, Lane4、5、6、7 是 EcoR I 酶切。

从图 15, 我们可以清晰的看见 Lane5、6、7 在 500bp 处有目的酶切片段。进而证实 E6 片段已经成功连接 T 载体。

1.2 pT-E₁₊₂ 质粒的构建

用 SacI 酶切 pT-E₁₊₂ 质粒, 理论上, 在 3000bp 左右将出现 DNA 条带; 如果酶切不完全, 在 6000bp 左右将出现 DNA 条带。从电泳图 16, 可见酶切 Lane3 在 3000bp 和 6000bp 左右出现了 DNA 条带。我们为进一

步证实质粒构建状况，又用内切酶 *Sac*I 和 *Kpn*I 进行质粒双酶切，*Kpn*I 只在 E1+2 片段内有酶切位点，可以将 E1+2 切割为两个片段，因此，理论上若切割完全将出现三条 DNA 带。电泳图 17 良好的显示了酶切质粒条带。以上酶切图谱说明，该质粒构建成功。

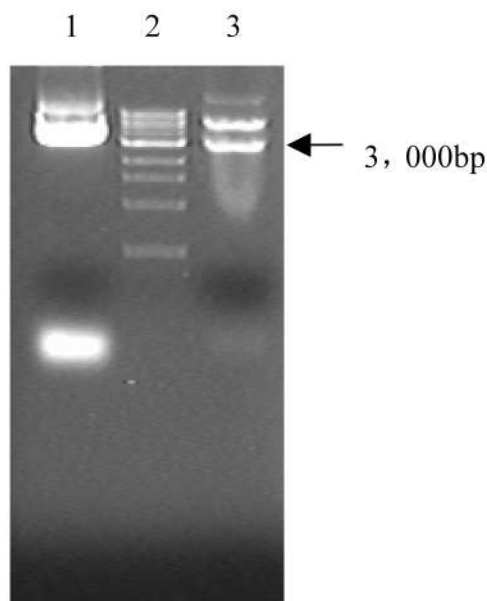


图 16 pT-E1+2 质粒 *Sac*I 酶切图谱
Lane1 是质粒，Lane2 是 Marker，Lane3 是 *Sac*I 酶切。

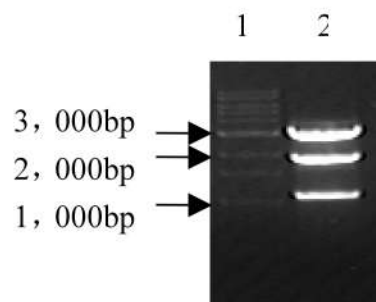


图 17 pT-E1+2 质粒 *Sac*I 和 *Kpn*I 双酶切图谱。Lane1 是 DNA Marker, Lane2 是双酶切。

1.3 pT-E1+2+6 质粒的构建

质粒 pT-E₁₊₂₊₆ 用 *Sac*I 酶切，理论上，将产生两条 DNA 片段，大小分别为 3100bp 和 3600bp 左右。该酶切电泳见图 18。质粒 pT-E₁₊₂₊₆ 再用 *Eco*R I 酶切，也产生两条 DNA 片段，大小分别为 500bp 和 6000bp 左右。见电泳图 19。从酶切图谱可见实际酶切的片段大小和理论预期相一致，说明 E6 和 E1+2 基因片段已成功连接 T 载体。

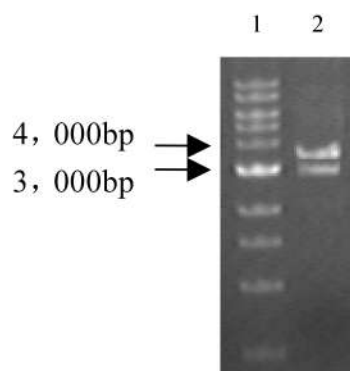


图 18 质粒 pT-E₁₊₂₊₆ SacI 酶切图谱。
Lane1 为 1Kb Maker, Lane2
为 SacI 酶切。

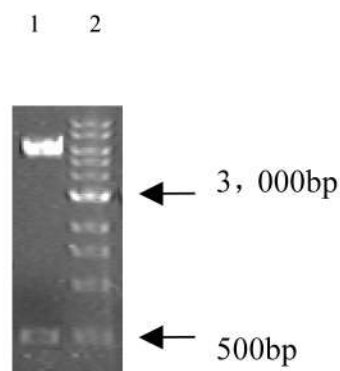


图 19 质粒 pT-E₁₊₂₊₆ EcoR I 酶切图谱。
Lane1 为 EcoR I 酶切, Lane2 为
1Kb Maker。

2. pT-E₁₊₂₊₆ 质粒 E2/E6 比值的测定

纯化的 pT-E₁₊₂₊₆ 质粒按 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍比稀释后进行 PCR，而 PCR 循环数则由 20、25、30、35、40 分别进行扩增。PCR 产物经质量分析软件计算后，无论 DNA 含量变化和 PCR 循环数的不同，E2/E6 比值都稳定在 1.08~2.46 之间。

3. HPV16 E2 ORF PCR 扩增结果

利用 HPV16 E2 ORF 引物对 114 例感染 HPV16 的宫颈癌组织 DNA 进行 PCR 扩增。结果见电泳图 20。其中有 56 例 HPV16 E2 ORF 呈阴性，另 58 例样品获得了相应的基因片段。

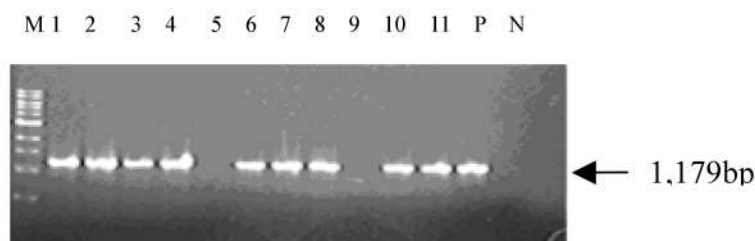


图 20. HPV16 E2 ORF PCR 扩增示意图。M: 1kb ladder; 1-11: 样品; P: 阳性对照;
N: 阴性对照。

4. HPV16 E2 巢式 PCR 扩增结果

将 56 例 HPV16 E2 ORF 阴性样品分别用扩增 E2 ORF 和其中的小片段

引物，做巢式 PCR，结果仅 8 例样品呈阴性，其余 48 例都为阳性。

5. HPV16 DNA 在宿主中状态的分析

对 58 例 HPV16 E2 ORF 阳性样品用 E2 和 E6 ORF 引物，在同一反应管中，做 PCR 扩增。结果见图 21。通过质量分析软件计算，有 15 例样品 E2/E6 比值小于 0.9，低于阳性 pT-E₁₊₂₊₆ 质粒 E2/E6 的比值结果。



图 21. 对 HPV16 DNA E2、E6 基因做多重 PCR。M: 1kb ladder; S1、2、3、4、5、6、7、8、9 是样品号；其中 5、6、8、9 E2/E6 比值较低；P, N: 分别是阳性和阴性对照。

根据 E2 基因的 PCR 和巢式 PCR 结果，以及对 E2/E6 比值的结果，我们判定感染 HPV16 的 114 例宫颈癌患者，其 HPV16 DNA 在宿主细胞中存在的状态如表 15。表 15 显示在 114 例宫颈癌患者中有 63 例呈伴随状态（巢式阳性和 E2/E6 低于对照的病例总和），43 例呈完全游离状态，还有 8 例是完全整合状态。从临床分级看（见图 22），完全整合的 8 例中没有一例在 I 期，有 2 例在 II 期，占总数的 25%，其余 6 例都在 III 期，占总数的 75%。I 期的 9 个病例中，有 6 例是伴随状态，占 67%；3 例是完全游离状态，占 33%。49 例 II 期样品，22 例是完全游离状态，占 45%；25 例是伴随状态，占 51%；2 例是完全整合状态，占 4%。56 例 III 期样品，18 例是完全游离状态，占 32%；32 例是伴随状态，占 57%；6 例是完全整合状态，占 11%。

表 15 HPV DNA 在不同临床级别中的物理状态

FIGO	E2/E6 比值状况		E2 巢式阳性	E2 巢式阴性
	$\geq$ 对照 (游离态)	$<$ 对照(伴随态)	(伴随态)	(整合态)
	例数	例数	例数	例数
I	3	1	5	0
II	22	10	15	2
III	18	4	28	6
IV	0	0	0	0
总 数	43	15	48	8

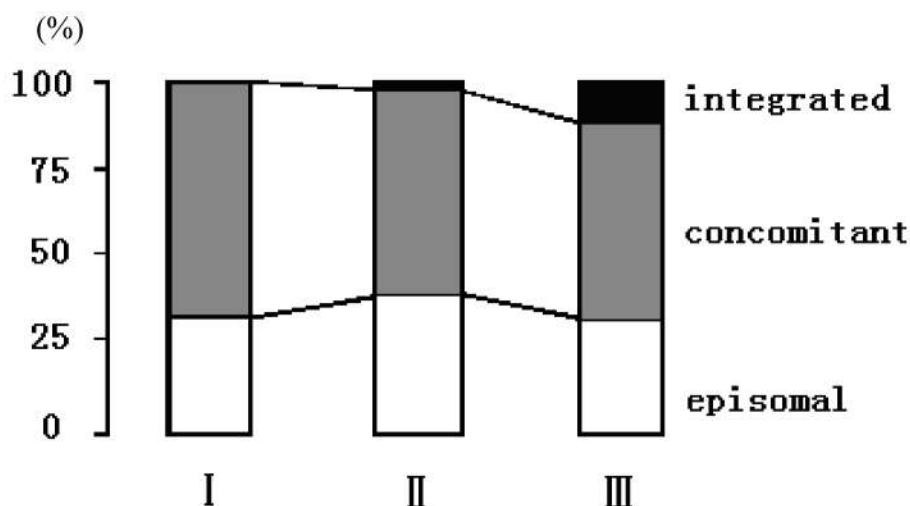


图 22 在宫颈癌组织中 HPV16 DNA 物理状态的分布。

白色表示纯游离的形式，灰色表示伴随状态，黑色代表完全整合的形式。

二、讨 论

HPV16 DNA 整合宿主基因组和宫颈癌的进展具有相关性 (Klaes R., 1999)。HPV 感染引起的宫颈损伤，最初病毒基因组都是以完全游离的形式出现(Daniel B., 1997)，但在宫颈癌细胞中病毒 DNA 经常和细胞发生整合(Cullen A.P., 1991; Durst M., 1985)。这种整合现象被认为是肿瘤进展的潜在的重要机制(Cullen A.P., 1991; Daniel B., 1995; Pirami L., 1997)。因此，精确测定 HPV DNA 物理状态对了解宫颈癌的机理、发展及癌瘤转移显得

非常重要。

大多数组织 DNA 都由石蜡包块提取或由外科手术切取的组织块提取。由于石蜡包埋组织对 DNA 有一定的损伤，而外科切取组织量也相对较少，加之提取过程中的损失，因此不可能得到大量的病毒 DNA。检测病毒 DNA 的物理状态，多采用较灵敏的多重 PCR 方法(Yoshinouchi M., 1999)。这种方法可以不需要大量的病毒 DNA，而且操作简单；不象杂交检测，不仅烦琐、价格昂贵，而且要求大量的病毒 DNA。

研究表明病毒 DNA 整合宿主基因组时，经常在 E2 区产生断裂(Durst M., 1985 ; Jeon S., 1995)，引起 E2 基因片段的缺失。因此，E2 基因的缺失可以作为病毒基因组整合状态的标志。我们首先 PCR 扩增 E2 的开放读码序列，筛选 E2 阳性样品。对其阴性样品，基于 HPV DNA 量的多寡和可能存在大部分的断裂现象，再用 E2 内的一小片段引物，进行巢式 PCR，不仅提高检测 E2 的灵敏度，同时也增加检测的准确性。从结果看，有 51.9% (58/114) 的样品呈 E2 ORF 首轮 PCR 阳性，提示有 48.1% 的样品中可能存在 E2 ORF 的断裂，也就是说有 48.1% 的样品中病毒基因组可能是整合状态。48.1% 的阴性样品经巢式 PCR 后，E2 完全阴性的只有 8 例，占总例数的 7%。这显示在 114 例宫颈癌患者中，有 58 例病毒 DNA 可能存在完全游离或游离和部分整合的伴随状态；而巢式 48 例阳性样品则呈伴随状态；E2 完全阴性的仅 8 例，病毒 DNA 呈完全整合的状态。在宫颈癌细胞中，这个病毒 DNA 完全整合的比率较以前的报道相对偏低 (Tonon S.A., 2001; Yoshinouchi M., 1999)。我们推测这种差异的产生可能因研究人群的不同或者研究方法敏感性的不同而发生，对 E2 基因巢式 PCR 筛查具有更高的敏感性。

通常情况下，病毒 DNA 完全游离的状态时，其 E2 和 E6 基因的拷贝数是一致的。当 E2 基因发生断裂，E2 基因的拷贝数将下降，低于 E6 基

因的拷贝数；而伴随状态时，理论上，E2 基因的拷贝数小于 E6 基因。据此，通过测定 E2/E6 的比值，我们能够区分这两种病毒 DNA 的状态。利用构建的 pT-16E₁₊₂₊₆ 质粒，我们发现 E2/E6 的比值不随 DNA 量的多少和 PCR 循环次数而改变，其范围始终保持在 1.08 到 2.46 之间。用优化的 PCR 反应条件检测 E2 ORF 阳性样品，有 15 例样品的 E2/E6 比值低于 0.9，预示这 15 例样品中的病毒 DNA 呈伴随状态。

在本研究中，我们分析了病毒 DNA 三种状态在不同 FIGO 级别中的分布（见图 22）。发现在不同的级别中都有游离和伴随状态的存在，而且数量没有明显的差异，但完全整合状态在 FIGO I 期中没有发现，而 49 例 II 期样品中有 4%，56 例 III 期样品中有 11%，这种现象提示 HPV DNA 完全整合宿主基因组主要发生在高级别损伤中。Krzysztof Lukaszuk 等曾用多重 PCR 方法分析 HPV16 在宫颈癌细胞中的状态，认为 E2/E6 低比值经常出现在高级别临床分期中（Krzysztof Lukaszuk, 2003）。而我们的结果则显示伴随形式可以在各个损伤过程中出现。这种差异也许和不同的地区环境以及人群相关。该检测病毒 DNA 物理状态的技术若能应用于临床，将有助于人们了解宫颈癌的进展过程，并设计理想的治疗方案。

三、小 结

1. 病毒 DNA 7% 的整合状态比例低于以前的研究结果。
2. 整合状态通常发生在高级别临床分期中。
3. 游离和伴随状态在各级别临床分期中都有发生。
4. 整合状态的检测可以作为宫颈癌发展的一个参考标志。

参 考 文 献

1. 于冬雁、薛新春. 人乳头瘤病毒与宫颈癌的关系. 口岸卫生控制. 2003; 8: 40-45.
2. 沈宏伟、柯佩琪、杨国奋. 人乳头瘤病毒 16 、18 型检测在宫颈癌早期诊断应用. 中国现代医学杂志, 2003, 13: 104-106.
3. 戎寿德、陈汶、吴令英等. 山西省襄垣县宫颈癌危险因素分析. 中华预防医学杂志. 2002; 36: 41-43.
4. 张友会主编. 现代肿瘤学. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社. 1993.
5. 石敏, 贺又娥. HPV 感染与子宫颈病变的关系及其诊治现状. 国外医学*妇产科学分册. 1997; 24: 284.
6. 吕雯等. 子宫颈病变 HPV 感染与端粒酶活性相关性研究. 实用肿瘤杂志. 2004; 19: 43-45.
7. 李洁, 刘宝印, **Zur Hausen** 等. 中国妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒感染及地理分布的调查. 中国实验和临床病毒学. 1996; 10: 50-55.
8. 郭天棋、李诚信. 人乳头瘤病毒感染与宫颈癌. 中国实用妇科与产科杂志. 2001; 17: 641.
9. 魏兰兰. 16 型人乳头瘤病毒疫苗研究进展. 国外医学预防、诊断、治疗用生物制品分册. 2001; 24: 52-56.
10. 乌恩奇, 邱爱东等. 四川地区宫颈癌组织 HPV18 和 HPV45E6 基因突变分析. 高等学校化学学报. 2006; 27: 1-4.
11. **Agorastos T., Lambropoulos A.F., Constantinidis T.C., et al.** P53 condon 72 polymorphism and risk of intra-epithelial and invasive cervical neoplasia in Greek women. Eur J Cancer Prev. 2000; 9:113-118.
12. **Amanda L.S; Carol H.T; Martin H.T.** Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of hpv 16 cervical cancer isolates from central china Int. J. Cancer: 2000; 86: 695-701.
13. **Anttila A., Pukkala E., Soderman B., et al.** Effect of organized screening on cervical cancer incidence and mortality in finland, 1963-1995: recent in cervical cancer incidence. Int J Cancer. 1999; 83:59-65.
14. **Aoyama C., Peters J., Senadheera S., et al.** Links uterine cervical dysplasia and cancer; identification of c-mycstatus by quantiatative pdymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol. 1998; 7: 324-330.
15. **Apple R.J., Erlich H.A., Klitz W.** HLA DR-DQ associations with cervical carcinomas show papillomavirus-type specificity. Nat Genet. 1994; 6:157- 62.

16. **Apt D., Watts R.M., Suske G., Bernard H.U.** High SP11SP3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virol.* 1996; 224: 281-291.
17. **Bartholomew J.S., Stacey S.N., Coles B., et al.** Identification of a naturally processed HLA A0201-restricted viral peptide from cells expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 3175-9.
18. **Berumen J., Ordonez R.M., Lazcano E., Salmeron J., Galvan S.C., et al.** Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 1325-1330.
19. **Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., et al.** Prevalence of papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 796-802.
20. **Brady C.S., Duggan-Keen M.F., Davidson J.A.** Human Papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol.* 1999; 80: 3233-40.
21. **Breitbart F., Kimbauer R., Hubbert N.L., et al.** Immunization with virus-like particles from cottontail papillomavirus can protect against experimental CRPV infection. *J Virol.* 1995; 69: 3959-3963.
22. **Brisson J., Roy M., Fortier M., et al.** Condyloma and intraepithelial neoplasia of the uterine cervix: a case-control study. *Am J Epidemiol.* 1988; 128: 337-342.
23. **Burd E.M.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003, 16: 1-17.
24. **Burk R.D., Ho G.Y., Beardsley L., et al.** Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis.* 1996; 174: 679-89.
25. **Cardo-Cordon C.** Mutation of cell cycle regulators. *Am J Pathol.* 1995; 147: 545-560.
26. **Chan P.K., Lam C.W., Cheung T.H., Li W.W., Lo K.W., Chan M.Y., Cheung J.L., Cheng A.F.** Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 1249-53.
27. **Chow L.T., Broker T.R.** Papillomavirus DNA replication. *Intervirology.* 1994; 37: 150-158.
28. **CKidula N., Tyndall M., et al.** The Supermarket for women's reproductive health: the burden of genital infections in a family planning clinic in Nairobi, Kenya. *Sex Transm Infect.* 1998; 74: 202-4.

29. **Clifford G.M., Smith J.S., Plummer M., Munoz N., Franceschi S.** Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: ameta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; 88: 63-73.
30. **Coker A.L., Gerasimova T., King M.R., et al.** High-Risk HPVs and risk of cervical neoplasia: a nested case-control study. *Exp Mol Pathol*. 2001; 70: 90-5.
31. **Cole S. T., Danos O. J. Mol.** Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol*. 1987; 193: 599-608.
32. **Crishi J.F., Bone F., Balasubramanian S., et al.** Suprabasal expression of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell regulatory proteins. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 1031-1037.
33. **Cui Y.X., Matsumoto K., Yoshikawa H., et al.** Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Letters*. 2001; 170:19-24.
34. **Cullen A.P., Reid R., Champion M., Lorincz A.T.** Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*. 1991; 65: 606-612.
35. **Daniel B., Mukherjee G., Seshadri L., Vallikad E., Krishna S.** Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *J Gen Virol*. 1995; 76: 2589-2593.
36. **Daniel B., Rangarajan A., Mukherjee G., Vallikad E., Krishna S.** The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol*. 1997; 78: 1095-1101.
37. **DE Roda Husman A.M., Walboomers J.M., Hopman E., et al.** HPV prevalence in cytologically normal cervical scrapes of pregnant women as determined by PCR: the age-related pattern. *J Med Virol*. 1995; 46: 97-102.
38. **DE Roda Husman A.M., Walboomers J.M.M., et al.** The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1997; 76: 1057-1062.

39. **Doorbar J., Medcalf E., Napthine S.** Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo. *Virol.* 1996; 218: 114-126.
40. **Duensing S., Munger K.** The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res.* 2002; 62: 7075-7082.
41. **Durst M., Kleinheinz A., Hotz M., Gissmann L.** The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J Gen Virol.* 1985; 66: 1515-1522.
42. **Einstein M., H Goldberg G.L.** Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest.* 2002; 20: 1080-1085.
43. **Feoli-Fonseca JC, Oligny LL, Brochu P, Simard P, Falconi S, Yotov WV.** Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR-direct sequencing approach. *J Med Virol.* 2001; 63: 284-92.
44. **Ferenczy A., Franco E.** Cervical-cancer screening beyond the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001; 2: 27-32.
45. **Franco E.L., Villa L.I., Ruiz A., et al.** Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. *J Infect Dis.* 1995; 172: 756-63.
46. **Gallo G., Bibbo M, Bagella L., et al.** Study of viral integration of hpv-16 in young patients with lsil. *J Clinic Pathol.* 2003; 56: 532-536.
47. **Gharizadeh B, Ghaderi M, Donnelly D, Amini B, Wallin K.L., Nyren P.** Multiple-primer DNA sequencing method. *Electrophoresis.* 2003; 24:1145-51.
48. **Giarre M., Caldeira S., Malanchi I., et al.** Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4A-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol.* 2001; 75: 4705- 4712.
49. **Goodman A.** Role of routine human papillomavirus subtyping in cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2000; 12: 11-14.
50. **Gregoire L., Lawrence W.D., Kukuruga D., et al.** Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in african-american women. *Int J Cancer.* 1994; 57: 504-507.
51. **Gross-Mesilaty S., Reinstein E., Bercovich B., et al.** Basal and human papilloma- virus E6 oncoprotein-induced degradation of myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 8058-8063.
52. **Halpert R., Fruchter R.G., Saedilis A., et al.** Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol.* 1986; 68: 251-258.

53. **Hildesheim A., Schiffman M., Bromley C., Wacholder S., Herrero R., et al.** Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001; 93: 315-318.
54. **Hildesheim A., Schiffman M., Scott D.R., et al.** Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the united states. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7: 1035-1041.
55. **Ho G.Y., Burk R.D., Klein S., et al.** Persistent genital human papillomavirus infection as a risk for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 1365-71.
56. **Ho G.Y.F., Burk R.D., Fleming I., et al.** Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus- induced immunosuppression. *Int J Cancer.* 1994; 56: 788-792.
57. **Ho Y., Gloria F., Bierman R., Beardsley J., Leah C.** Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New Engl J Med* 1998; 338: 423-5.
58. **HU X., Guo Z., Tianyun P., Ponten F., Wilander E., Andersson S., Ponten J.** HPV typing and hpv16 E6-sequence variations in synchronous lesions of cervical squamous-cell carcinoma from swedish patients. *Int J Cancer.* 1999; 83: 34-37.
59. **Huang S., Afonina I., Miller B.A., Beckman A.M.** Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from chinese women. *Int J Cancer.* 1997; 70: 408-11.
60. **Hudson J.B., Bedell M.A., Mccance D.J., Laiminis L.A.** Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol.* 1990; 64: 519-526.
61. **Hwang E.S., Nottoli T., Dimaio D.** The HPV 16 E5 protein expression, detection and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virol.* 1995; 211: 227-233.
62. **Hwang T.S., Jeong J.K., Park M., et al.** Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol oncol.* 2003; 90: 51-56.
63. **IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, vol. 64, human papillomaviruses, pp. 47±52.** Lyon: international agency for research on cancer, world health organization. IARC (1995).

64. **Ingo Nindl., Knuth Rindfleisch., Beatrix Lotz. Achim Schneider., Matthias Durst.** Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer*. 1999; Jul 19; 82: 203–207.
65. **Jackson S., Harwood C Thomas M., et al.** Role of bak in uv-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*. 2000; 14: 3065- 3073.
66. **Jacobs M.V., Husman A.R., Brule A.J., 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.
67. **Jeon S., Lambert P.F.** Integration of HPV-16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6/E7 mrnas: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:1654–1658.
68. **John Cason., Jeremy N., Kaye., et al.** Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol*. 1995; 47: 209-218.
69. **Kast W.M., Brandt R.M., Sidney J., Drijfhout J.W., Kubo R.T., Grey H.M., Melief C.J., Sette A.** Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J Immunol*. 1994; 152: 3904-12.
70. **Kataja V., Syrjanen K., Syrjanen S., et al.** Prospective follow-up of genital hpv infections: survival analysis of the HPV typing data. *Eur J Epidemiol*. 1990; 6: 9-14.
71. **Kataja V., Syrjanen S., Yliskoski M., et al.** Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. *Am J Epidemiol*. 1993; 138: 735-745.
72. **Kedzia W., Gozdicka Jozefiak A., Kwasniewska A., et al.** Relationship between HPV infection of the cervix and blood serum levels of steroid hormones among pre-and postmenopausal women. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2000; 21:177-179.
73. **Kjaer S.K., Engholm G., Teisen C., et al.** Risk factors for cervical human papillomavirus and herpes simplex virus infections in greenland and denmark: a population-based study. *Am J Epidemiol*. 1990; 131: 669-682.

74. **Klaes R., Woerner S.M., Ridder R., Wentzensen N., Duerst M., Schneider A., et al.** Detection of high- risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; 59: 6132–6136.
75. **Krzysztof Lukaszuk, Joanna Liss, Izabela Wozniak, Janusz Emerich, Czesław Wojcikowski.** Human Papillomavirus Type 16 Status in Cervical Carcinoma Cell DNA Assayed by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003; 41: 608-612.
76. **Kurvinen K., Yliskoski M., Saarikoski S., Syrjanen K., Syrjanen S.** Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer.* 2000; 36: 1402-1410.
77. **Lai H.C., Sun C.A., Yu M.H., Chen H.J., Liu H.S., Chu T.Y.** Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papillomavirus type 58 and related type. *Int J Cancer .*1998; 4: 553–7.
78. **Lakshmi., Nair M.B., Jayaprakash P.Q., et al.** C-erbB-2 oncoprotein an epidermal growth factor receptor in cervical lesions. *Pathobiology.*1997; 65: 163- 168.
79. **Lechner M.S., Mack D.H., Finicle A.B., Crook T., Vousden K.H., Laimins L.A.** Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J.* 1992; 11: 3045-3052.
80. **Liaw K.L., Hsing A.W., Schiffman M.H., You S.L., Zhang T., Burk R., et al.** Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancer from chinese women. *Int J Cancer .*1997; 73:775–6.
81. **Liu J., Rose B., Huang X., Liao G., Carter J., Wu X., et al.** Comparative analysis of characteristics of women with cervical cancer in highversus low-incidence regions. *Gynecol Oncol .*2004; 94: 803–10.
82. **Liu Y., Mckalip A., Herman B.** Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. *J Cell Biochem.* 2000; 78: 334-349.
83. **Lo K., Wong T.F, Chan M.K, Li J.C, Poon J.S, Wang V.W, et al.** Prevalence Of Human Papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in china. *Int J Cancer.* 2002; 100: 327–31.
84. **Loignon M., Drobetsky E.A.** The initiation of UV-induced gl arrest in human cells is independent of the P53/P21/PRB pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 35-45.

85. **Malanchi L., Caldeira S., Krutzfeldt M., et al.** Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in deregulating the G1/S transition. *Oncogene*. 2002; 21: 5665-5672.
86. **Manos M.M., Ting Y., Wright D.K., Lewis A.J., et al.** Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cellss*. 1989; 7: 209-214.
87. **Marangoz S., Gullu I.H.** Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *O Cancer*. 1999; 85: 2668-266.
88. **Mark Van Duin., Peter J.F Snijders., Mireille T.M Vossen., Erik Klaassen.** Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal of General Virology*. 2000; 81: 317-325.
89. **Matsumoto K., Yoshikawa H., Nakagawa S., Tang X., Yasugi T., Kawana K., Sekiya S., Hirai, Y., Kukimoto, I., Kanda, T., Taketani, Y.** Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett*. 2000; 156:159-165.
90. **McBride A., Romanczuk H., Howley P.** The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 1991; 266: 18411-4.
91. **Mccance D.J., Campion M.J., Clarkson P.K, et al.** Prevalence of Human Papillomavirus type16 dna sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br J Obstet Gynaecol*. 1985; 92: 1101-1105.
92. **Molir 1.J., Clark R., Sun S.** Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 trans-activator. *Science*. 1990; 250: 1694-1699.
93. **Monsongego J., Magdelenant H., Catalan F., et al.** Estragen and progesterone receptors incervical human papillom avirus related lesions. *Lnt J Cance*. 1991; 48: 533.
94. **Muller M., Viscidi R.P., Sun Y., et al.** Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology*. 1992; 187: 508-14.
95. **Muñoz N., Bosch F.X., Sanjose D.S., 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; 52:743-749.
96. **Ngan H.Y.** Proto-oncogenes and p53 protein expression in normal cervical stratified squamous epithelium and cervical intra-epithelial neoplasia. *Eur J Cancer*. 1999; 35: 1546-1550.

97. **Nindl L ., Rindfleisch K., Lotz B, Schneider A., Durst M.** Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer*. 1999; Jul 19; 82: 203-7.
98. **Odunsi K.O., Ganesan T.S.** The roles of the human histocompatibility complex and human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1997; 9: 4-13.
99. **Parkin D., Bray F., Ferlay J., et al.** Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001; 94:153-156.
100. **Patel D., Huang S.M., Baglia L.A., et al.** The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and P3000. *EMBO J*. 1999; 18: 5061-5072.
101. **Pirami L., Giache V., Becciolini A.** Analysis of HPV 16, 18, 31 and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol*. 1997; 50: 600-6004.
102. **Reeves V.C., Brinton L.A., Garcl A., et al.** Human Papillomavirus(HPV) infection and cervical cancer in latin america. *N Engl J Med*. 1989; 320: 1436- 1441.
103. **Remmink A.J., Walboomers J.M., Helmerhorst T.J., et al.** The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Lm J Cancer*. 1995; 1: 306-11.
104. **Remoue F., Jacobs N., Miot V., et al.** High intraepithelial expression of estrogen and progesterone receptors in the transformation zone of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 189: 1660-1665.
105. **Riethdorf S., Riethdorf L.** Relationship between telomerase activation and HPV16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol*. 2001; 20:177-185.
106. **Sakamoto M., Toyozumi T., Kikuchi Y., et al.** Telomerase activity in gynecological tumors. *Oncol Rep*. 2000; 7:1003-1009.
107. **Scheffner M., Romanczuk H., Munger K., Huibregtse JM., Mietz JA.** Howley pmfunctions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994; 186: 83-9.
108. **Schneider A.** Pathogenesis of genital HPV infection. *Genitourin Med*. 1993; 69: 165-73.

109. **Schwarz E., Freese U.K., Gissmann L., et al.** Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985; 314: 111-114.
110. **S Farjadian, E asadi, M Doroudchi, A Samsami Dehaghani, SZ Tabei, VP Kumar, A Ghaderi.** High Risk HPV Types in Southern Iranian Patients with Cervical Cancer. *Pathology Oncology Research*. 2003; 9: 121-125.
111. **Smith J., Herrero R, Erles K., et al.** Adeno-associated virus seropositivity and hpv-induced cervical cancer in spain and colombia. *Int J Cancer*. 2001; 94: 520-6.
112. **Song Y.S., Kee S.H., Kim J.W., Park N.H., Kang S.B., Chang W.H., Lee H.P.** Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of korean women. *Gynecol Oncol*. 1997; 66: 275-81.
113. **Suzich J.A., Ghim S.J., Palmer-Hill F., et al.** Systemic immunization with papillomavirus 11 protein completely prevents the development of viral mucosal papilomas. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92:11553-11557.
114. **Taesook Hwang.** Detection and typing of human papillomavirus dna by pcr using consensus primers in various cervical lesions of korean women. *J Korean Med Sci*. 1999; 14: 593-9.
115. **Thierry F., Howley P.M.** Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biol* 1991; 3: 90-100.
116. **Tonon S.A., Picconi M.A., Bos P.D., Zinovich J.B., Galuppo J., Alonio L.V., Teyssie A.R.** Physical status of the E2 human papillomavirus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol*. 2001; 21: 129-134.
117. **Toshiyuki Sasagawa., Walid Basha.** Hiroshi yamazaki and masaki inoue. high-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in japanese women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preven- tion*. 2001; 10: 45-52.
118. **Ustav E., Ustav M., Szymanski P., Stenlund A.** The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator. *Proc Nall Acad Sci, USA*. 1993; 90: 898-902.
119. **Villa L.L., Sichero L., Rahal P., Caballero O., Ferenczy A., Rohan T., Franco E.L.** Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000; 81: 2959-2968.

- 120.von Knebel-Doeberitz M., Ritmuller C., Aengeneyndt F., Jansen P., Spitkovsky D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells, consequences for the phenotype and E6-p53 and F7-pRB interactions. *J Virol* 1994; 68: 2811–21.
- 121.Voollo M., Pukkala E., Nieminen P., et al. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol.* 2000; 39: 71-5.
- 122.Wheeler C.M., Yamada T., Hildesheim A., Janison S.A. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage specific hybridization. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 11–9.
- 123.Xin C.Y., Matsumoto K., Yoshikawa H., Yasugi T., Onda T., Nakagawa S., Yamada M., Nozawa S., Sekiya S., Hirai Y., Shiromizu K., Fujii T., Taketani Y. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett.* 2001; 170:19-24.
- 124.Xi L.F., Demers G.W., Koutsky L.A., Kiviat N.B., Kuypers J., Watts D.H., Holmes K.K., Galloway D.A. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. *J Infect Dis.* 1995; 172: 747-55.
- 125.Xi L.F., Koutsky L.A., Galloway D.A., Kuypers J., Hughes J.P., Wheeler C.M., Holmes K.K., Kiviat N.B. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89, 796-802.
- 126.Yamada T., Manos M., Peto J., Greer C.E., Munoz N., Bosch F.X., Wheeler C.M. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997; 71: 2463–2472 .
- 127.Yamada T., Wheeler C.M., Halpern A.L., Stewart A.C., Hildesheim A., Jenison S.A. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 1995; 69: 7743-53.
- 128.Yang Y.C., Chang C.L., Chen M.L. Effect of p53 polymorphism on the susceptibility of cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 2001; 51: 197-20.
- 129.Yasugi T., Benson J.D., Sakai H., Vidal M., Howley P.M. Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins. *J Virol.* 1997; 71: 891-899.
- 130.Yoshinouchi M., Hongo A., Nakamura K. Kodama J., Itoh S., Sakai H., Kudo T. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3514–

- 3517.
131. **Youk E.G., Ku J.L., Park J.G.** Detection and typing of human papilloma-virus in anal epidermoid carcinomas: sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *Dis Colon Rectum*. 2001; 44: 236-42.
 132. **Yuping Wu., Yulong Chen., Longyu Li., Guifang Yu., Yanling Zhang., Ying He.** Associations of high-risk hpv types and viral load with cervical cancer in china. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 944.
 133. **Zehbe I., Tachezy R., Mytilineos J., Voglino G., Mikyskova I., Delius H., Marongiu A., Gissmann L., Wilander E., Tommasino M.** Human Papilloma virus16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class ii haplotypes. *Int J Cancer*. 2001; 94: 711-6.
 134. **Zehbe I., Wilander E., Delius H., Tommasino M.** Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*. 1998; 58: 829-833.
 135. **Zimmermann H., Degenkolbe R., Bernard H.U., et al.** The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/P3000. *J Virol*. 1999; 73: 6209-6219.
 136. **Zur Hausen H.** Human papillomaviruses. *Ann Rev Microbiol*. 1994; 48: 427-47.

致 谢

感谢孔维教授三年来在工作和学习各个方面给予我的谆谆教诲和悉心关怀。孔老师宽厚待人、不计名利的学者风范是我学习的榜样。

衷心地感谢查晓教授。本论文工作的完成是在查老师的悉心指导下完成的。查老师敏锐的洞察力、广博的知识、和蔼可亲的待人态度给我留下了深刻印象；也让我在这三年里学到了超越论文本身的知识；这些将使我受益终生。

感谢金英花老师、姜春来老师在实验过程和论文写作中给予的指点和帮助，在此向两位老师表示衷心的感谢。

特别感谢吉林大学疫苗研究中心实验室的乌恩奇硕士，还有滕红刚、李皓、陈宇、张煜、等博士及石玉华、于湘丽等在论文完成工作中给予的无私的帮助，本篇论文的完成是大家共同努力的结果。再次感谢他们。

特别感谢我的家人这些年来给予的关爱、理解和支持。

向吉林大学疫苗研究中心的全体师生以及所有给予过帮助和支持的人表示衷心的感谢。

感谢免费提供文献的出版公司。

中 文 摘 要

论文题目：四川地区宫颈癌患者组织中高危型人乳头瘤病毒的
分子流行病学研究

作 者：邱 爱 东

指导教师：孔维教授

专 业：生物化学和分子生物学

关 键 词：人乳头瘤病毒 (**human papillomavirus**)；宫颈癌 (**cervical cancer**)；流行率 (**prevalence**)；E6 基因变异 (**E6 gene variation**)；物理状态 (**physical state**)

在世界范围内，宫颈癌在妇女恶性肿瘤发生中居第二位，仅次于乳腺癌。而越来越多的研究表明，宫颈癌的发生和高危型人乳头瘤病毒 (HPV) 的感染有着十分密切的关系。近年来，宫颈癌的发病率和死亡率处于稳定水平且有增长趋势，尤其令人忧虑的是宫颈癌患者有明显的年轻化趋势。

人乳头瘤病毒 (HPV) 是一种与人体相关的小型 DNA 病毒，由基因组 DNA 和外壳组成，无包膜。它的主要传播方式是直接性接触。依据 HPV 与癌发生的危险性高低，分为低危险型 HPV 如 HPV6, 11 等，高危险型 HPV 如 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 等。

目前宫颈癌的防治还没有有效的方法，首选的策略是 HPV 疫苗。为研发针对宫颈癌的预防和治疗性疫苗，人们对 HPV 的感染进行了多层次的流行病学研究。研究发现 HPV 的感染，尤其对宫颈癌起关键作用的高危亚型，在不同的地区、不同的地理环境、不同的经济状况和不同的种族之间存在很大的差异。Bosch 和 Manos 等通过收集来自 22 个国家的 1008 份宫颈癌活检标本作 PCR 检测，认为 HPV16 和 18 型是主要的流行

亚型, 在各国间没有明显差异。但在伊朗, S FARJADIAN (S FARJADIAN et al; 2003) 等研究指出在该组人群中, HPV16 感染率仅 26.7%, 而 HPV18 没有发现。在中国, 有限的流行病学调查显示, 除 HPV16 外, 南方北方感染高危 HPV 亚型种类、感染率也存在很大不同。因此, 充分了解各地区感染高危 HPV 亚型的分布情况, 对 HPV 疫苗的设计具有极大的参考价值。

在临床上, HPV 感染生殖道是一个长期的过程, 可潜伏在细胞内若干年; 所有的 HPV 感染并不都进展为癌, 它取决于病毒因素、宿主因素和环境协同三大因素。Zebhe (Zebhe et al; 1998) 等人对病例—对照组分析, 认为 HPV DNA 在 E6 基因的碱基 (T350G) 突变, 能够增强 HPV 的致癌性; 而另外的研究并不支持这一观点。但 HPV DNA 的突变是病毒持续感染的重要因素, 这已成为人们的共识。更进一步的研究发现, 在大多数宫颈癌组织中, 都有 HPV DNA 和宿主细胞基因组的整合发生, 而这种整合和疾病进展及危险度之间是否具有相关性, 目前还没有明确的定论。因此, 深刻理解 HPV DNA 的突变及在宿主中的状态对掌握 HPV 的致病机理、疫苗设计和诊断治疗至关重要。

针对中国相关 HPV 流行病学资料的匮乏, 以及对感染 HPV 宫颈癌患者组织中 HPV DNA 感染特征研究的欠缺, 我们选取四川地区宫颈癌患者作为分子流行病学的研究对象。这一地区宫颈癌发病率 22/100 000 人, 处于中游水平。

我们从 2003 年到 2004 年收集了 158 例宫颈癌组织样本, 调查了该地区宫颈癌患者 HPV 的总体感染率; 详细分析了 9 种常见的 HPV 高危亚型分布; 对其中的 7 种亚型进行了 HPV DNA E6 基因的突变分析, 包括主要的 HPV16 全部阳性样品; 并进一步分析了 HPV16 DNA 在宿主细胞中存在的物理状态。为使结果准确可靠, 我们采用了 L1 普式 GP5+/GP6+

引物 PCR 筛选法、E6 型特异性引物 PCR 法和 L1 普式 MY09/11 引物、GP5+/GP6+引物巢式 PCR 法，三种方法互相补充；对 HPV16 亚型，我们特别使用了 E6 型特异性引物巢式 PCR 法。这种基于测序的 PCR 的方法检测灵敏、特异、操作简单快速。而研究 HPV DNA 物理状态时，我们则利用 HPV 整合时会发生 E2 基因片段断裂，但 E6 相对保守的现实，采用在一个反应管中同时扩增 E2、E6 两个基因片段，通过扫描 PCR 产物不同的量，计算 E2/E6 的比值并和阳性对照比较。理论上，游离态时，E2/E6 比值等于或大于 1；伴随状态时，E2/E6 比值小于 1；完全整合时，E2 呈阴性。这种半定量的方法操作简单、快速，并不要求 E2、E6 很准确的含量测定，因此，减低了对仪器精度的要求。

四川地区宫颈癌患者组织 HPV DNA 的总体感染率。在 158 例样本中，有 5 例没有成功提取基因组；153 例样品有 148 例检测到 HPV DNA 的感染，5 例样品呈阴性。由此，获得该地区 HPV DNA 总体感染率是 96.7%(148/153)。

HPV DNA 感染的亚型分布。148 例样品中，有 3 例不能确定其具体感染亚型；其余 145 例样本，单一感染占 77.9%(113/145)，混合感染占 22.1%(32/145)。检测的 9 种常见高危亚型，HPV35 没有在该研究组中发现；HPV16 有 114 例，是感染最多的亚型，占 78.6%；20.0% (29/145) 的患者感染了 HPV58 型，是第二位的流行亚型；HPV18 在该组病例中只有 8.3%(12/145)；随后的 HPV 亚型感染率由高到低依次是 HPV45(4.1%)、HPV52 (4.1%)、HPV31 (3.4%)、HPV59 (2.8%)、HPV33 (1.4%)。这种 HPV 亚型的流行分布和中国一些地区如山西、新疆等存在差异。

宫颈癌患者 HPV 感染的年龄分布。该病例组的平均年龄是 48 岁，以 7 岁为分组间隔，共分 10 个年龄组。HPV 感染的宫颈癌发病率集中在 32~、39~、48~、56~和 62~年龄组，占总发病率的 90%以上；而 69

岁以上的妇女发病率仅 2%，但 32 岁以下的妇女发病率却高达 22%。

7 种 HPV 亚型的突变信息。HPV16 型在 E6 基因开放读码框上，共发生了 14 处突变，分别是核苷酸序列位点的 94 (G→A)、168 (C→G)、173 (C→T)、176 (G→A)、178 (T→G)、188 (G→C)、203 (A→G)、240 (C→G)、276 (A→G)、335 (C→T)、350 (T→G)、442 (A→C)、464 (A→G)、511 (T→C)，其中 94 和 511 位点的突变没有发生相应氨基酸的改变，而其它碱基的变异都导致了翻译氨基酸的转变。G94A、C173T、A203G、C240G、A464G 和 T511C 的突变信息以前未有报道。值得关注的是 C240G 突变正好位于 P53 降解区。HPV18 型在 E6 区发现 2 处突变，分别在基因组第 485 位 T→C、549 位 C→A，这两处突变不改变相应的氨基酸。HPV33 型有 6 处碱基突变，分别位于核苷酸 164 位 T→C、273 位 A→G、364 位 A→C、387 位 A→C、446 位 A→G 和 213 位 A→C。除 A213C 为同义突变外，另 5 处突变都导致相应氨基酸的改变。其中核苷酸 164 位 T→C 的变化，以前没有报道。HPV45 型 E6 序列，经分析发现 8 处碱基置换：其中 482 位碱基发生 T→C 的变化，549 位 C→A，这两处突变都没有相应氨基酸的改变；而另外 6 处碱基突变，分别为 134 位 C→T、157 位 C→T、259 位 G→T、341 位 T→C、482 位 T→C、497 位 A→G，其中 157 位和 259 位的突变在氨基酸水平都发生了改变，其余均为同义突变。而 134 位 C→T、157 位 C→T、259 位 G→T、341 位 T→C 的变化，以前未见报道。HPV52 型共发现了 5 处突变，分别为 350G→T、356A→G、378A→C、379A→G 和 467C→A，其中 350G→T 和 356A→G 的突变为同义突变，其余均导致氨基酸的变化，而 A356G 和 C467A 的突变以前没有报道。HPV58 型共检测 4 例，发现 2 处突变，一处为 259A→G，另一处为 388A→C。388A→C 能导致氨基酸的改变，而 259A→G 突变未见报道。HPV59 型有 4 处碱基突变，分别为 T102C、

C306T、A363C 和 T402C，这些突变都不产生氨基酸的变化，并且都为同义突变。

HPV16 DNA 的物理状态分析。在 114 例 HPV16 阳性样品中，有 63 例呈伴随状态，43 例呈完全游离状态，还有 8 例是完全整合状态。从临床分级看，完全整合的 8 例中没有一例在 FIGO I 期，有 2 例在 FIGO II 期，其余 6 例都在 FIGO III 期。

总之，通过对 158 例宫颈癌患者组织 HPV DNA 的检测，结果显示四川地区宫颈癌组织中 HPV 的总体感染是 96.7%，和以前其它很多地区报道的感染率相近，但该地区 HPV58 是第二大流行亚型，有别于欧美和中国的山西、新疆等地区。研究中，发现了一些没有报道过的突变位点，其中有些位点位于 P53 降解区或 T 细胞抗原决定簇的结合区。通过这些突变信息，我们能掌握不同地区 E6 突变的规律，进而深入了解宫颈癌的发生发展；对特殊的突变是否更具致癌性，提供深入研究的理论基础。HPV16 变异体的分析，明确了该地区主要流行株是欧洲株和欧洲变异株；更具探讨价值的是，在宫颈癌组织中，HPV16 DNA 的完全整合比例仅有 7%，远低于前人研究的结果（45.5%）。整合状态通常发生在高级别临床分期中，可以作为宫颈癌发展的一个参考标志。

ABSTRACT

Title: Molecular epidemiologic studies on high risk Human papillomavirus in cervical cancer isolated from Sichuan

Author: Ai-Dong Qiu

Adivisor: Professor Wei Kong (Jilin University)

Subject: Biochemistry and Molecular Biology

Key Word: human papillomavirus; cervical cancer; prevalence; E6 gene variation; physical state

Cervical cancer is the second most common cancer in women malignant tumor worldwide and only inferior in breast cancer. But more and more many research indicated, the association of cervical cancer and high-risk human papillomavirus (HPV) is extremely close, in other words, the infection with HPV is the primary factor which cervical cancer occurs. In recent years, the incidence rate and the mortality rate of cervical cancer were in the stable level also had the growth tendency, what is especially anxious is cervical cancer patients have the obvious youth oriented tendency.

Human papillomavirus (HPV) is one kind with the race correlation small DNA virus which is composed by genome DNA and the capsid, no have an envelope. The most transmission is the direct sex contact. The carcinogenesis according to HPV, divided into low-risk HPV like HPV6, 11 and so on, high-risk HPV like HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 and so on, with cervical cancer correlation, in particular HPV16 and 18.

At present, the failures of effective method are performed to control cervical cancer. HPV vaccine is the first choice for the prevent and therapy cervical cancer. In order to design prevention and therapy vaccine, researchers

have conducted the multi-level epidemiology studies to the infection with HPV. The studies indicated HPV plays an important role, especially to cervical cancer with high-risk subtypes and between various area, geographical environment, economical condition and population were different. Bosch and Manos collected 1,008 cervical cancers biopsies specimens from 22 countries to perform the PCR and found HPV16 and 18 is the most epidemic subtypes, which is not significant different in various countries. But in Iran, S Farjadian (S Farjadian et al; 2003) points out the rate of infection with HPV16 was only 26.7% and HPV18 was not found in the study groups. In China, the limited epidemiology investigation demonstrated that, except HPV16, the high-risk HPV subtypes and the rate of the infection was very different between south and north. Therefore, to understand sufficiently the distributions of high-risk HPV genotypes in various areas has an important reference value to HPV vaccine design.

Clinically, genital tract infection with HPV is a long-term process and HPV can exist for many years in cell. Not all of the HPV infection progress develop to the cancer. The incidence of cervical cancer is due to interaction among the viral factor, the host factor and the environment factor. Zebhe (Zebhe et al; 1998) suggested that the substitution of T350G in the HPV DNA E6 regions, can strengthen the carcinogenicity of HPV. But it is not supported by the other researchers. It is a recognition that HPV DNA variation is the important attribute which the virus infect procession continues to. The further research found, at all of the majority cervical cancer tissues, the integration of HPV DNA and the host cell occurred. At present, people do not have the explicit conclusion whether there has a relevance between this kind of

integration and carcinogenicity. But, the thorough understand of the variation and the physical status of HPV DNA in host cells is very importance to explain the pathogenesis mechanism, design the vaccine, diagnose and therapy the disease.

In China, the HPV material on epidemiology and the studies of HPV infection characteristic are absent. We investigated 158 cervical cancer patients from Sichuan area, in which the morbidity of invasive cervical cancer was moderately high (approximately 22 per 100 000 women). Sichuan province has a large population, but actually the epidemiology material on HPV is few.

We collected 158 samples cervical cancer tissues, from 2003 to 2004, and investigated HPV infection rate in cervical cancer and analyzed the distribution of 9 high-risk HPV subtypes, of which 7 detected the mutations of HPVE6 region, including the total of specimens with HPV16 DNA. Furthermore, we analyzed the physical state of HPV16 DNA which exists in the host cell. In order to detect accurately HPV DNA, 158 specimens were subjected to PCR amplication with a pair of primers GP5+/GP6+, E6 type-specific primers and MY09/11 primers with the nested PCR. Three methods supplemented mutually. For the HPV16, we have used E6 type-specific primers to perform PCR and next nested PCR. The method of PCR-based on sequencing is accurate, simple and specific. The genome integration of HPV usually disrupts the open reading frame (ORF) of E2 gene and results in the lack of E2 gene which leads to the overexpression of E6 and E7 genes. In this process, E6 gene is relatively conservative. E2 and E6 genes fragments were amplified in the same tube by multiplex PCR and the PCR products was detected

different quantity through scans, next, calculated E2/E6 ratio. Theoretically, E2/ E6 ratio was equal or exceeded 1 in DNA episomal states and E2/E6 ratio is smaller than 1 in DNA concomitant, E2 fragment is negative in DNA integrated states. The method for half quota is operated simple and quickly, but not requesting E2 or E6 accurate content. Therefore, the exact instrument is not requiremented.

The infection rate of HPV DNA in Sichuan area. In 158 samples, 5 did not had a successful to amplified DNA. 148 specimens were positive for HPV DNA in 153. 5 samples were negative. So, the overall infection rate is 96.7% (1.48/153).

The distribution of HPV subtypes. In 148 specimens, of 3 could not determine HPV subtype. Others 145, the single infection accounts for 77.9% (1.13/145), the mix infection accounts for 22.1% (32/145). The prevalence of 9 high risk human papillomavirus (HPV) subtypes (16,18,31,33,35,45,52,58 and 59) were studied in 145 isolates with definite subtypes, of which HPV16, 58 and 18 were prominent, accounting for 78.6%, 20.0% and 8.3% respectively, followed by 45 (4.1%), 52 (4.1%), HPV31 (3.4%), 59 (2.8%) and 33 (1.4%). However, no HPV35 was observed in the 145 isolates. This distribution is different with the other area in china, likes Shanxi, Xinjiang and so on.

Age and HPV. This group's average age is 48 years old. The incidence rate concentrates in 32~、39~、48~、56~ and 62~ the age group, accounts for above 90%. Above 69 years, the incidence rate is only 2%, but it is as high as actually 22% below 32 years old.

The mutations of 7 HPV subtypes. In HPV16 E6 ORF region, there

were 14 base substitutions, in the nucleotide position, 94 (G→A)、168 (C→G)、173 (C→T)、176 (G→A)、178 (T→G)、188 (G→C)、203 (A→G)、240 (C→G)、276 (A→G)、335 (C→T)、350 (T→G)、442 (A→C)、464 (A→G) and 511 (T→C), respectively. The mutations of 94 and 511 did not result amino acid changes, but other base variations had all caused amino acid transformation. The base substitutions of 94A, 173T, 203G, 240G, 464G and 511C have not been reported previously. What is worth paying attention is the C240G located just right in the P53 degeneration regions. HPV18 E6 were found 2 substitutions(485T→C、549C→A) which did not change the corresponding amino acid. HPV33 had 6 base substitutions and was 164T→C、273A→G、364A→C、387A→C、446A→G and 213A→C, respectively. Except A213C, the other mutations had result amino acid changes. The substitution of 164C has not been reported previously. The base substitutions of 482T→C、549C→A、134C→T、157C→T、259G→T、341T→C、482T→C and 497A→G had been found in HPV45E6 region. Of 482T→C and 549C→A did not result amino acid changes, but 157C→T and 259G→T have all had the change in the amino acid level, other are the silent mutation. The mutations of 134C→T、157C→T、259G→T and 341T→C have not been reported previously. HPV52 had altogether found 5 substitutions which was 350G→T、356A→G、378A→C、379A→G and 467C→A, respectively. The mutations of G35T and A356G were both silent mutation. Others caused amino acid changes. The mutations of A356G and C467A have not been reported previously. To detect 4 specimens with HPV58 and find 2 base substitutions, of which one is 259A→G, another is 388A→C, resulting amino acid change. The A259G has not been reported previously. We

have found 4 base substitutions that is T102C, C306T, A363C and T402C, respectively, in HPV59 E6 regions. These variants had not all resulted amino acid change.

The physical state of HPV16 DNA. 63 of 114 HPV16 positive specimens were concomitant state, 43 cases were episomal and only 8 specimens were integrated into the host cells. In clinical stages, the integration appeared mostly in FIGO III (6/8), 2 specimens in II and no I.

In brief, through analyzing 158 patients with cervical cancer, the results showed the infection rate of HPV was 96.7% in Sichuan area and similar to most other regions. But HPV58 occupied a second high prevalence and was different with other areas worldwide. In this study, we had novel found some variants which have not been reported previously, but there substitutions located in the P53 degeneration region or T antigen binding points. By the information of mutations, we would find the rules of variant in HPV E6 genes and then understand the process of cervical cancer. Furthermore, we will be requested to study these special mutations which are high risk to CC. Analysis of HPV16 variants indicated the E and E derivative strains were main in this areas. The integrated proportion of HPV16 DNA was only 7% in cervical cancer tissues and low far previous results (45.5%). It is value that further investigated. The integration of HPV DNA was usually taken place in high clinical stages and as a process sign of cervical cancer.

作 者 简 历

姓名：邱 爱 东

性别：男

出生年月：1969 年 1 月

教育背景：

1986.9~1991.7： 白求恩医科大学环境医学系获医学学士学位

1993.9~1996.7： 长春生物制品研究所获医学免疫学硕士学位

2003.9~现在： 吉林大学生命科学学院生物化学与分子生物学专业攻读博士学位

攻读博士学位期间发表和待发表论文：

1. **Qiu Ai-dong** et al. Physical Status of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Carcinoma. Chemical Research In Chinese Universities. accepted.
2. **Qiu Ai-dong** et al. HPV Prevalence, E6 Sequence Variation and Physical State of HPV16 isolated from Patients with Cervical Cancer in Sichuan, China. Gynecologic Oncology. submitted.
3. 邱爱东等，四川地区宫颈癌患者组织中部分高危 HPV 亚型感染及 E6 基因分析。中国生物制品学杂志，May 2006, Vol.19. No.3.
4. 邱爱东等，四川广元地区宫颈癌组织中高危型人乳头瘤病毒的检测与分型。中国实验诊断学杂志，Jul 2006, Vol.10. No.7.
5. 乌恩奇，邱爱东等，四川地区宫颈癌组织 HPV18 和 HPV45 E6 基因突变分析。高等化学学报，Feb 2006, Vol.27. No.2.
6. 乌恩奇，邱爱东等，四川地区宫颈癌 HPV59 型感染及其 E6 基因突变。中国病毒学，Dec 2005, Vol.20. No.6.