

分类号:
学 号: 2008109006

密 级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



维吾尔族子宫颈癌与哈萨克族食管癌中 HPV16 变异的初步研究

学 位 申 请 人	王 刚 刚
指 导 教 师	李 锋 教 授
申请学位门类级别	医 学 硕 士
学 科 、 专 业 名 称	病理学与病理生理学
研 究 方 向	肿瘤病理学
所 在 学 院	医 学 院

中国·新疆·石河子
2011 年 6 月

分类号:
学 号: 2008109006

密 级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



维吾尔族子宫颈癌与哈萨克族食管癌中 HPV16 变异的初步研究

学 位 申 请 人	王 刚 刚
指 导 教 师	李 锋 教 授
申请学位门类级别	医 学 硕 士
学 科 、 专 业 名 称	病理学与病理生理学
研 究 方 向	肿瘤病理学
所 在 学 院	医 学 院

中国·新疆·石河子
2011 年 6 月

**Investigation of HPV16 Variants in Uighur's Cervical Cancer
and Hazakh's Esophageal Cancer**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Wang Gang-gang

(Pathology and pathophysiology)

Dissertation Supervisor: Prof. Li Feng

June, 2011

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

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

研究生签名：王刚刚

时间：2011年6月13日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：王刚刚

时间：2011年6月13日

导师签名：

李强

时间：2011年6月13日

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
英文缩略语表.....	III
前言.....	1
材料与方法.....	4
1. 材料.....	4
2. 方法.....	9
2.1 临床病理学研究内容.....	9
2.2 HPV16 质粒的抽提及基因组 DNA 的制备.....	9
2.3 目的片段的扩增.....	13
2.4 PCR 产物测序.....	16
2.5 系统生成树的构建.....	17
2.6 实验室质量控制.....	17
3. 统计学分析.....	18
结果.....	19
1. 临床病理特征分析.....	19
2. 基因组 DNA 质量检测及 HPV16 E6、E7 PCR 扩增产物检测结果.....	21
3. HPV16 变异位点分布.....	22
4. 系统进化树构建分析.....	24
5. HPV16 变异体与宫颈癌、食管癌关系.....	26
讨论.....	28
1. 乳头瘤病毒的分类进展.....	29
2. HPV16 E6、E7 变异位点与维族宫颈癌及哈族食管癌关系探讨.....	29
3. HPV16 变异检测方法的选择.....	33
4. 问题与展望.....	35
结论.....	37
参考文献.....	38
文献综述.....	42
致谢.....	49
作者简介.....	50
导师评语.....	51

摘 要

目的: 检测新疆维族宫颈癌与哈族食管癌中 HPV16 变异情况, 通过构建演化树对 HPV16 变异进行归类, 并以其为参照比较新疆维族宫颈癌与哈族食管癌感染的 HPV16 变异是否具有相似性。

方法: 选取 HPV16 感染阳性维族宫颈癌 40 例、哈族食管癌 51 例; 用德国 HPV16 标准株做阳性对照, 通过 PCR 扩增 HPV16 E6、E7 后测序; 应用 Lasergene、DNASTar、Clustal 1.83、Mega 4.1 软件对 HPV16 E6、E7 序列进行比对分析, 并最终生成系统生成树; 所有结果统计学分析通过 SPSS 17.0 软件完成。

结果: (1) 在 37 例维族宫颈癌中发现 HPV16 变异位点 4 个: 350nt(T→G), 310nt(T→G), 295nt(T→G), 135nt(A→C); 其中 135 位点为新发现位点 (3.57%, 1/28), 变异率最高位点为 350nt, (71.5%, 20/28); 相应氨基酸变化为 L→V, F→L, D→E, K→T。(2) 通过系统生成树发现, 本组样本中 71.5% (20/28) 为欧洲变异体, 28.5% (8/28) 为 HPV16 欧洲标准体。(3) HPV16E6 350 位点变异与分化程度及年龄分组作比较, *P* 值大于 0.05, 两者之间无统计学意义; 宫颈癌中 HPV16 E7 未见突变位点。(4) 在 30 例 PCR 扩增成功的食管癌中, 5 例 HPV16E6 F1R1 片段测序成功, 未见突变位点。

结论: (1) 维族宫颈癌中存在 350、310、295、135 四个 HPV16 变异位点, 其中 135 为新发现变异位点。根据变异序列我们发现维吾尔族宫颈癌存在 HPV16 欧洲变异体感染。(2) 哈族食管癌中存在 HPV16 感染, 但是未检测到 HPV16 变异, 可能与检测技术及样本选择有关。

关键词: 宫颈鳞癌, 食管鳞癌, HPV16, 变异

论文类型: A(基础研究)

本课题由国家科技支撑计划项目 (2009BAI82B03, 2009BAI82B02); 国际科技合作与交流专项 (2010DFB34100) 资助。

Abstract

Objective: To detect and classify the variants of HPV16 E6、E7 gene of Uighur's cervical squamous cell carcinoma and Hazakh's esophageal squamous cell carcinoma in XinJiang Province by structured HPV 16 variant's phylogenetic tree, and to explore whether HPV16 E6、E7 variant have resemblance in these squamous cell carcinomas.

Methods: Selecting 40 cases of Uighur's cervical squamous cell carcinoma(CSCC) and 51 cases of Hazakh's esophageal squamous cell carcinoma(ESCC), which had been detected HPV16 infection; HPV16 standard strain has been used as positive control. PCR amplification segments of the HPV16 E6、E7 genes were sequenced which were blasted and analyzed by Lasergene、DNASTAR. Finally, phylogenetic tree of HPV16 was drawn by using clustal 1.83、Mega4.1 program. All the statistical analysis have been used by SPSS17.0 software package.

Results: (1) 4 variant sites of HPV16 were found in 37 cases of Uighur's cervical squamous cell carcinoma(CSCC): 350nt(T→G),310nt(T→G),295nt(T→G), 135nt (A→C). 135nt was the latest found variant site, the most frequently variant site was 350nt (71%, 20/28).The variation of corresponding amino acids were L→V, F→L, D→E, K→T. (2) When the phylogenetic tree was structured, we found 71.5% (20/28) of HPV16 in CSCC cases was E variant, 28.5% (8/28) cases was E standard branch. (3) There were no statistical significance by Compared HPV 350 site's variant rate with age and differentiation degree($P>0.05$). No variant sites were found in HPV16 E7 of CSCC. (4) 5/30 cases were successful sequenced, but no variant sites was found.

Conclusions: (1) There are four HPV16 variant sites(350、310、295、135 sites) in Uighur's CSCC, 135nt was the latest found variant site. HPV 16 E variant infection was found in Uighur's CSCC according to these variant sequences. (2) HPV 16 infection exists in ESCC, but no HPV16 variant was found, perhaps owing to the use of detected technology and selecting of samples.

Key words: Cervical Squamous Cell Carcinoma; Esophageal Squamous Cell Carcinomas; HPV; Variant

Type of Thesis: A (Basic Research)

This research was financed by The National Key Technology R&D Program (2009BAI82B03, 2009BAI82B02) and International S&T Cooperation Program of China (2010DFB34100)

英文缩略语表

英文缩写	英文全名	中文译名
ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinomas	食管鳞状细胞癌
CSCC	Cervical Squamous Cell Carcinoma	宫颈鳞状细胞癌
PV	Papillomavirus	乳头瘤病毒
HPV	Human Papillomavirus	人乳头瘤状病毒
URR	Upstream Regulatory Region	上游调控区
ER	Early Region	早期蛋白编码区
LR	Late Region	晚期蛋白编码区
E	Eropean variant	欧洲变异体
As	Asia variant	亚洲变异体
AA	Asia-American variant	亚-美洲变异体
Af	Africa variant	非洲变异体
NA-1	North American 1	北美 1 变异体
dNTP	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	三磷酸脱氧核苷酸
Tris	Tris(hybromymethyl) aminomethane	三（羟甲基）氨基甲烷
EDTA	Ethylene diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
TaqDNApoly	Taq DNA Polymerase	Taq DNA 聚合酶
LB	Luria-Bertani broth	溶菌培养基
ICTV	International Committee on the Taxonomy of Viruses	国际病毒分类学委员会
CR	Conserved Region	保守区

前言

(Introduction)

人乳头瘤病毒(Human Papillomaviruses, HPV)为直径 52-55nm 的二十面体病毒,属于乳头瘤多空病毒科乳头瘤病毒属,人类是其唯一的宿主,可以感染皮肤及粘膜组织。HPV 基因组按照功能可以分为三个区:上游调控区(Upstream Regulatory Region, URR),早期蛋白编码区(Early Region, ER)及晚期蛋白编码区(Late Region, LR)。E 区负责编码 HPV 复制蛋白, L 区负责组装 HPV 衣壳蛋白,而 URR 区负责调控病毒基因的复制机转录,三者缺一不可。根据未知 HPV 型 L1 序列与已知 HPV 型 L1 序列同源性,可对未知 HPV 进行定义,如果 L1 序列同源性小于 90%,则定义为新的型(Type);如果 L1 序列同源性在 90~98%,则定义为已知 HPV 型的亚型(Subtype);如果 L1 序列同源性大于 98%,则定义为已知 HPV 型的变异体(Variant)。

HPV 致癌机制研究多集中于与疾病风险相关性高的 HPV16、18 型。根据 HPV16 E6 序列及 L1 中 MY09/11 序列差异可将 HPV16 变异体分为如下几种分支(Branch):欧洲变异体(European variant, E)、亚洲变异体(Asia variant, As)、亚-美洲变异体(Asia-American variant, AA)、非洲 1 变异体(Africa-1 variant, Af-1)、非洲 2 变异体(Africa-2 variant, Af-2)、北美 1 变异体(North American 1, NA-1)^[1]。研究发现 HPV16 变异体分支与人群的地理分布有关。E 体在除非洲外的几个大陆均有分布且多见于欧洲和北美洲;Af 1 和 Af 2 体多见于非洲;As 体多见于东南亚;AA 体多见于中南美洲和欧洲。另外, E-350G 变异常见于欧洲和整个美洲,而东南亚和非洲的 E 变异以 E-350T 变异为主。除此外,有研究发现 HPV16 E 变异体的感染分布和持续性时间而言,美国白种人比非洲籍美国人要高,而 HPV16 Af 变异体在感染分布和持续性上则相反,这就说明了 HPV16 变异体分布存在人种上的差异^[2]。

HPV16 变异体除了有以上这些特点外,变异体中的某些碱基的改变可增强机体对癌症的易感性。E6、E7 变异引起功能上或抗原决定簇区域的改变,可以导致 E6、E7 区编码蛋白的生物、免疫性质改变。E6 读码框内第 350 位碱基由 T 变为 G,密码子编码的第 83 位氨基酸由 L 变为 V(L83V), T350G 突变可以导致重要的编码蛋白改变,而此改变在宫颈癌细胞株中可以增强 MAPK 通路信号及协同 Notch 信号通路和抑制 Ras 介导的转化导致宫颈癌发生^[3]。研究发现 HLA 多态性与发生宫颈癌的相关性也受 HPV16 变异的影响。

目前 HPV 变异体致癌机制研究正在成为一个热点,在多种肿瘤中有相关研究,然而各地 HPV 变异体感染有各自的特点,明确地区 HPV 变异体的特点可对预防和治疗提供参考。HPV 变异与宫颈癌发生、分化程度、类型的关联性各不相同。Koen D.Quint 等^[4]研究发现在宫颈侵袭性腺癌、HPV16 阳性的原位腺癌、CIN3 和鳞癌中 AA 检出率分别为 41.7%、17.4%、4.1%、2.4%。与宫颈鳞癌相比,HPV16、HPV18、HPV45 AA 变异与宫颈腺癌更有相关性。ML Tornesello^[5]等选定侵袭性宫颈腺癌及宫颈鳞癌扩增 E6

特异性片段并直接测序,结果提示 HPV16 在这两种癌组织中都有较高感染率,且 HPV16 AA 体相比于 HPV16 E 体致癌性更高。

感染特定HPV型或特定HPV位点变异的女性感染更易发展为宫颈癌。HPV16、18已经明确为高危致宫颈癌病毒。许多研究认为HPV16 E-350G变异(L83V)与宫颈持续感染有关,此位点变异也与增加宫颈疾病进展的风险有关。Martha Grodzki等^[6]报道有HPV持续感染(OR=2.4, 95% CI=1.3~4.3)和高级别损伤(OR=4.2, 95% CI=2.1~8.1)的女性更易感染HPV16型;其中有HPV16 E-350G变异感染的女性中呈持续感染者(OR=3.0, 95% CI=1.4~6.7)和进展损伤者(OR=6.2, 95% CI=2.7~14.3)的OR值明显提高。阴茎癌的发生与宫颈癌的发生原理极相似。Mina Kalantari等^[7]报道在巴西阴茎癌病例中发现9/17病例为HPV16 AA变异,7/17病例为HPV16E变异。作者将巴西阴茎癌和宫颈癌中的HPV16变异体做了比较,认为相比于无症状女性,HPV16 AA变异体在巴西宫颈癌病例中较高的发生率更加支持了宫颈癌和阴茎癌有相似的病因学的理论。

某些HPV变异体与阴茎癌的发生更有相关性。Maria Lina Tornesello等^[8]发现阴茎癌病例有HPV16(94.7%)及HPV18感染,并对HPV16 E6、E7、LCR测序分析发现欧洲体变异(E-350 G)和非欧洲体(AA和Af-1)分别占44.4%和55.6%,其中阴茎癌中HPV16 AA感染率(44.4%)要高于宫颈癌病例中的感染率(19.4%)。这提示阴茎癌中HPV16 AA相比于HPV16 E更具有致癌性。

潘音桦等^[9]通过透射电镜及DNA分子原位杂交发现广西乳腺癌中存在HPV16、18感染,且证实乳腺癌中HPV16、18感染情况可作为临床判断有无淋巴结转移的一个参考指标。C-Y Kan等^[10]对澳大利亚乳腺癌患者进行了HPV筛查、测序,发现总HPV感染率为48% (24/50),其中HPV18 E6有5处变异。序列变异位于Sp1结合位点, E2蛋白结合位点2, E2蛋白结合位点1和2之间,第一个起始密码子上游12bp区。然而这些区域变异不能更改SPI和E2蛋白结合基序,碱基对的改变不能更改E6氨基酸序列。

同为与外界相通的管道,消化道和生殖道肿瘤中都可检出有HPV的感染。Yuri Agrawal等^[11]发现相比于头颈部鳞癌HPV16感染阴性者,口腔高危HPV感染更易发生于头颈部鳞癌HPV16感染阳性者。在口腔灌洗肿物中感染的HPV16小部分为As变异体(2/19),大多数为E变异体(12/19),其中最常见的是E-350T(6/19),其次是E-350G(4/19)和E-131G(2/19)。作者认为用检测口腔HPV来预测局部肿瘤复发的研究设计评估要综合考虑HPV型及其变异体感染的情况。Paolo Boscolo-Rizzo等^[12]发现HPV16是口咽喉鳞癌形成的危险因素,并提出其中有HPV16 L83V变异的患者需要更加关注。另有研究表明,新疆哈萨克族较汉族食管癌明显高发^[13],且新疆哈族食管癌中HPV16感染率为38.7%^[14]。郭伟鹏等^[15]报道新疆哈族食管癌患者HPV16 E6基因大小与德国标准体一致,且5例样本E6的第28位碱基都由A突变为G,编码的氨基酸由精氨酸(AGA)变为甘氨酸(GGA),导致E6蛋白降解及P53免疫原性及功能改变,此研究为明确哈族食管癌HPV E6基因改变,进一步完善食管癌的病因学提供了帮助,但此研究中病例较少,尚需加大样本量。食管癌与宫颈癌的组织结构相似,解剖位置都与外界相通,病程进展也较为相似,

两者共同感染的HPV16是否是共同的病因尚未可知，但刘红彦^[16]通过PCR技术及快速导流杂交基因芯片技术研究河南同地区宫颈鳞癌及食管鳞癌患者的HPV感染型别状况，发现同地区两种鳞癌HPV感染型别都为HPV16型，提示HPV16可能是两者的共同致病因素。

由于宫颈癌和食管癌在组织类型及发病进展及解剖位置比较相似（都与外界相通），所以本课题比较新疆地区哈萨克族食管癌及维吾尔族宫颈癌中感染的 HPV16 型中是否存在变异，以及这种变异在两种肿瘤是否具有—致性，以期能从这方面对本地 HPV16 所致肿瘤病因学做进一步的研究。HPV 变异体分布有地方特色，因此对地理位置特殊且发病率较高的维族宫颈癌、哈族食管癌进行 HPV16 变异体感染的研究有一定价值。探明本地维族宫颈癌及哈族食管癌的发生机制及病因，以期可以早发现、早诊断、早治疗维族宫颈癌及哈族食管癌，提高患者的生活水平，减低患者的经济负担。

材 料 与 方 法

(Materials & Methods)

1. 材 料

1.1 样本收集

收集宫颈癌样本选取新疆喀什地区陆军第 12 医院和喀什地区人民医院病理科以及石河子大学医学院第一附属医院病理科 2001~2009 年间维族宫颈鳞癌经手术切除、福尔马林固定、石蜡包埋组织，蜡块保留时间从 3~10 年不等。以 40 例维族宫颈癌中 HPV16 检测阳性病例 40 例为研究对象。

收集 192 例石河子大学医学院第一附属医院、伊犁州友谊医院、伊犁州新华医院、伊犁州奎屯医院及农四师医院病理科哈萨克族食管癌手术切除、福尔马林固定且经石蜡包埋组织标本，蜡块保留时间从 1~22 年不等。同时收集病例组样本临床病理资料，见附录。选取以上哈族食管癌中 HPV16 检测阳性病例 51 例为研究对象。

1.2 主要试剂

1.2.1 主要溶液配制

(1)蛋白酶 K(Proteinase K, 20mg/ml):

蛋白酶 K	100.0mg
双蒸水	5.0ml

(2)Tris 母液:

Tris-base(三羟甲基氨基甲烷)	60.55g
双蒸水(需高压)	400.0ml

(3)Tris-Hcl(1mol/L, pH=8.0):

Tris 母液	160ml
分析纯浓 HCL 调节 pH 至 8.0, 双蒸水定容至 200.0ml, 需高压	

(4)NaOH(10mol/L):

NaOH (固体)	60.0g
双蒸水 125.0 ml 定容至 150.0 ml	

(5)EDTA(0.5mol/L, pH=8.0):

EDTA-Na ₂ (乙二胺四乙酸二钠)	46.53g
双蒸水(需高压)	180.0ml
用 10 mol /L NaOH 液调节 pH 至 8.0, 双蒸水定容至 250.0ml, 需高压。	

(6)TE buffer(pH=8.0):

Tris-Hcl(1mol/L, pH=8.0)	5.0ml
EDTA(0.5mol/L, pH=8.0)	1.0ml
双蒸水(需高压)	494.0ml

表 1 40 例维吾尔族子宫颈癌与 51 例哈萨克族食管癌 HPV16 阳性病例临床病理资料一览表

序号	编号	病理号	性别	年龄	分化	诊断类型	序号	编号	病理号	性别	年龄	分化	诊断类型
1	121	08-0074	F	47	低	鳞癌	39	244	03-38323	F	53	中	鳞癌
2	125	42485	F	62	高	鳞癌	40	246	01-3638	F	54	低	鳞癌
3	129	05-61564	F	45	中	鳞癌	41	20	y04-2040	M	40	中	鳞癌
4	130	05-61610	F	38	低	鳞癌	42	24	y04-0482	M	40	中	鳞癌
5	132	05-61952	F	53	中	鳞癌	43	25	y04-0247	M	50	高	鳞癌
6	134	05-62178	F	50	低	鳞癌	44	26	y03-3477	M	52	中	鳞癌
7	135	06-0532	F	45	中	鳞癌	45	28	y03-3084	F	58	高	鳞癌
8	138	06-2032	F	25	低	鳞癌	46	36	y02-3744	F	66	中	鳞癌
9	139	06-2148	F	40		鳞癌	47	42	y02-0830	M	56	中	鳞癌
10	140	06-2177	F	31	中	鳞癌	48	47	y01-3622	F	55	中	鳞癌
11	142	06-2942	F	44	中	鳞癌	49	48	y01-2755	M	54	中	鳞癌
12	143	06-2974	F	33	中	鳞癌	50	54	y201641	F	55	低	鳞癌
13	144	06-3533	F	32	低	鳞癌	51	56	y200391	F	60	高	鳞癌
14	145	06-3654	F	42	低	鳞癌	52	61	y982135	M	37	中	鳞癌
15	148	06-5169	F	53	低	鳞癌	53	63	y981222	F	58	中	鳞癌
16	149	06-6430	F	55	高	鳞癌	54	64	y980927	F	64	中	鳞癌
17	150	06-6585	F	42	高	鳞癌	55	66	y970797	F	52	中	鳞癌
18	151	06-6888	F		高	鳞癌	56	70	y962054	M	74	中	鳞癌
19	152	06-7381	F	40	低	鳞癌	57	73	y951670	F	48	中	鳞癌
20	153	07-1647	F	27	中	鳞癌	58	78	y951127	F	57	低	鳞癌
21	154	07-1844	F	35	中	鳞癌	59	372	y51847	F	65	中	鳞癌
22	155	07-1883	F	50	高	鳞癌	60	373	y51489	M	47	中	鳞癌
23	158	07-2650	F	52	低	鳞癌	61	382	y54738	M	41	中	鳞癌
24	159	07-3339	F	52	中	鳞癌	62	384	y61136	F	63	中	鳞癌
25	161	07-3951	F	41	低	鳞癌	63	404	y71268	M	66	高	鳞癌
26	164	07-5000	F	50	低	鳞癌	64	405	y70940	F	66	中	鳞癌
27	166	07-5921	F	52	低	鳞癌	65	407	y70524	M	49	高	鳞癌
28	167	07-5937	F	65	低	鳞癌	66	414	y73117	M	45	高	鳞癌
29	169	07-6107	F	62	低	鳞癌	67	420	y73322	F	50		鳞癌
30	170	07-6358	F	48	低	鳞癌	68	423	y74690	F	43	低	鳞癌
31	174	07-8210	F	30	低	鳞癌	69	440	x05-0737	M	36	高	鳞癌
32	175	08-0191	F		高	鳞癌	70	441	x05-0621	M	62	高	鳞癌
33	177	08-0515	F	49	低	鳞癌	71	443	x05-0810	F	53	高	鳞癌
34	178	08-0570	F	35	低	鳞癌	72	468	y83011	M	40	低	鳞癌
35	179	08-0630	F	65	中	鳞癌	73	470	y83183	F	57	低	鳞癌
36	182	06-1858	F	36	低	鳞癌	74	474	y80825	M	59	低	鳞癌
37	183	07-7467	F		中	鳞癌	75	475	y84851	F	49	中	鳞癌
38	239	02-33052	F	36	低	鳞癌	76	480	y83884	F	58	中	鳞癌
77	498	y086460	M	58	高	鳞癌	85	527	y101508	M		低	鳞癌

78	509	y093779	F	49	高	鳞癌	86	529	y106485	M	48	中	鳞癌
79	520	y106597	M	68	低	鳞癌	87	532	y097246	F	49	高	鳞癌
80	521	y107474	M	58	高	鳞癌	88	533	y096088	M	62	中	鳞癌
81	522	y106392	M	57	中	鳞癌	89	534	y097457	M	47	低	鳞癌
82	523	y107503	M	51	中	鳞癌	90	535	y096904	M	51	低	鳞癌
83	525	y104843	M	56	高	鳞癌	91	537	y092481	F	50	中	鳞癌
84	526	y100754	M	51	中	鳞癌							

注：F 代表女性，M 代表男性；1-40 号为宫颈癌，41-91 号为食管癌。

(7)TBE(5×储存液 1L):

Tris 碱	54.0g
硼酸	27.5g
EDTA(0.5mol/L, pH=8.0)	20.0ml
加蒸馏水至	1000.0ml

(8)细胞裂解液(Lysis Buffer):

Tris-Hcl(1mol/L, pH8.0)	2.0ml
EDTA(0.5mol/L, pH8.0)	4.0ml
SDS(十二烷基硫酸钠)	2.0g
双蒸水(需高压)	100.0 ml

(9)2%琼脂糖凝胶:

琼脂糖	2.0g
5×TBE 工作液	10.0ml
双蒸水	90.0ml
goldview 工作液	50.0μl

(10)100μg/ml 氨苄青霉素:

氨苄青霉素	1.0g
双蒸水	10.0ml

(11)LB 液态培养基:

胰蛋白胨	1.0g
酵母提取物	0.5g
氯化钠	0.5g
双蒸水	100.0ml

(12)LB 固态培养基:

胰蛋白胨	1.0g
酵母提取物	0.5g
氯化钠	0.5g
琼脂糖	1.5g
双蒸水	100.0ml

(13)1%琼脂糖凝胶:

琼脂糖	0.2g
5×TBE 工作液	4.0ml
双蒸水	16.0ml
Goldview 工作液	50.0μl

1.2.2 DNA 提取相关试剂

- (1) 二甲苯、无水乙醇(上海生物工程有限公司)
- (2) Tris 饱和酚(Phenol Saturate, pH=8.0) (上海生工生物工程有限公司)
- (3) 酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混合液(上海生工生物工程有限公司)
- (4) 氯仿-异戊醇(Chloroform:Isoamyl Alcohol=24:1)混合液(自己配置)
- (5) 蛋白酶 K(德国 Merke 公司)
- (6) 细胞裂解液(自己配置)
- (7) TE buffer(上海生工生物工程技术服务有限公司)
- (8) Qiagen 石蜡组织提取试剂盒(凯杰生物技术上海有限公司)

1.2.3 质粒抽提相关试剂

高纯质粒小量制备试剂盒(离心柱型)(北京百泰克生物技术有限公司)

1.2.4 PCR 及琼脂糖凝胶电泳检测相关试剂

- (1) dNTP(10mM)(北京 TIAGEN 生物技术有限公司)
- (2) TaqDNA 聚合酶(北京 TIAGEN 生物技术有限公司)
- (3) 10×Taqbuffer(北京 TIAGEN 生物技术有限公司)
- (4) 5×TBE(上海生工生物工程技术服务有限公司)
- (5) 琼脂糖(北京博奥生物技术有限公司)
- (6) Goldview(北京百泰克生物技术有限公司)
- (7) 6×loading buffer(北京 TAKARA 生物技术有限公司)
- (8) Trans DNA Marker I(北京 TIAGEN 生物技术有限公司)

1.3 PCR 引物合成

选定 HPV16 E6 (灰色部分)、E7 (下划线部分) 标准序列:

```

1   actacaataa ttcattgtata aaactaaggg cgtaaccgaa atcggttgaa ccgaaaccgg
61  ttagtataaa agcagacatt ttatgcacca aaagagaact gcaatgttc aggaccaca
121 ggagcgaccc agaaagtac cacagttatg cacagagctg caaacaacta tacatgatat
181 aatattagaa tgtgtgtact gcaagcaaca gttactgcga cgtgaggtat atgactttgc
241 ttttcgggat ttatgcatag tatatagaga tgggaatcca tatgctgtat gtgataaatg
301 ttaaagttt tattctaaaa ttagtgagta tagacattat tggtatagtt tgtatggaac
361 aacattagaa cagcaataca acaaacggtt gtgtgatttg ttaattaggt gtattaactg
421 tcaaaagcca ctgtgtcctg aagaaaagca aagacatctg gacaaaaagc aaagattcca
    
```

481 taatataagg ggtcgggtgga ccggtcgatg tatgtcttgt tgcagatcat caagaacacg
 541 tagagaaacc cagctgtaat catgcatgga gatacaccta cattgcatga atatatgta
 601 gatttgcaac cagagacaac tgatctctac tgtatgagc aattaaatga cagctcagag
 661 gaggaggatg aaatagatgg tccagctgga caagcagaac cggacagagc ccattacaat
 721 attgtaacct ttgttgcaa gtgtgactct acgcttcggt tgtgcgtaca aagcacacac
 781 gtagacattc gtactttgga agacctgtta atgggcacac taggaattgt gtgccccatc
 841 tgttctcaga aaccataatc taccatggct gatcctgcag gtaccaatgg ggaagagggt
 901 acgggatgta atggatggtt ttatgtagag gctgtagtgg aaaaaaac aggggatgct
 961 atatcagatg acgagaacga aaatgacagt gatacaggtg aagatttggg agattttata

PCR 引物包括 β -globin 引物、HPV16 E6、E7 引物, 以上引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列等详见表 2。

表 2 PCR 引物序列

基因	引物序列	扩增片段大小
β -globin	For:5'-CAGACACCATGGTGCACCTGAC-3' Rev:5'-CCAATAGGCAGAGAGAGTCAGTG-3'	210bp
HPV16 E6	F1:5'-AAACTAAGGGCGTAACCGAAA-3' R1:5'-GTCATATACCTCACGTCGCAGT-3'	214bp
HPV16 E6	F2:5'-ACTGCGACGTGAGGTATATGA-3' P2:5'-CAGCTGGGTTTCTCTACGTGTT-3'	343bp
HPV16 E7	正:5'-CCATAATATAAGGGGTCGGTGGA-3' 反:5'-TTTTTCCACTACAGCCTCTACAT-3'	468bp

1.4 主要仪器设备

- (1) CHK Olympus 显微镜(Olympus optical 公司)
- (2) Leitz 1512 切片机(德国莱卡公司)
- (3) THZ-82 型恒温水浴摇床(常州国华电子有限公司)
- (4) PCR 仪(BioRad 公司)
- (5) -20℃冰箱(上海海尔公司)
- (6) DYY-6B 型中压电泳仪(北京市六一仪器厂)
- (7) GEL-DOC2000 凝胶图像成像仪(BIO-RAD 公司)
- (8) AB204-E 电子天平(MonoBloc 公司)
- (9) SSY-H 水浴箱(上海三申医疗器械有限公司)
- (10) 德国 Z-36HK 台式高速冷冻离心机(乌市华力科析仪器有限公司)
- (11) 60℃烤箱和 37~45℃恒温孵育箱(北京光明仪器厂)
- (12) NanoDrop ND1000 分光光度计(NanoDrop Technologies, Inc.Wilmington, DE, USA)
- (13) SUKUN SKY-2102C 恒温摇床(苏净集团安泰公司)
- (14) AIRtech 单人单面超净台(苏净集团安泰公司)
- (15) 梯度 PCR 仪(美国 Eppendorf 公司)
- (16) SPSS17.0 软件包

2. 方法

2.1 临床病理学研究内容

宫颈癌由于资料所限,分析年龄、组织学分级指标。经 2 名病理学专家确诊,光镜观察所有病例均为子宫颈癌,高分化鳞癌 4 例,中、低分化鳞癌 12、23 例。

食管癌的临床病理学研究从以下几个指标进行分析:性别、年龄、肿瘤发生部位、病理大体类型、组织学观察、组织学分级、淋巴结转移及临床 TNM 分期等指标。

所有食管癌组织均做常规 HE 染色,由 2 名病理学专家进行组织学观察复诊。食管癌病理诊断标准参照《WHO Classification Tumours of the Digestive System》,经光镜观察所有病例均为食管鳞状上皮细胞癌(以下简称食管鳞癌),高分化鳞癌 14 例,中、低分化鳞癌 26、10 例(1 例资料缺失);TNM 分期参照 2009 年第 7 版 UICC TNM 分期标准。选取其中 HPV16 感染阳性的标本。

2.2 HPV16 质粒的抽提及基因组 DNA 的制备

2.2.1 HPV16 质粒的抽提

2.2.1.1 感受态细胞的培养、转染:CaCl₂法

- (1) 挑取 DH5 α 大肠杆菌原种,在 LB 琼脂板上划线,37℃培养过夜(12~16 小时);
- (2) 挑取单菌落接种到 100 ml LB 液体培养基中,37℃摇菌培养 12 小时左右,OD₆₀₀ 达 0.4~0.5;
- (3) 将菌液转移至预冷的 100 ml 离心管中,冰浴 10~15 min;
- (4) 4000 rpm,4℃离心 10 min,回收细菌沉淀;
- (5) 加入 200 ml 冰预冷的 0.1 M CaCl₂ 悬浮细菌沉淀,然后冰浴 10~15 分钟,4000 rpm,4℃离心 10 分钟,回收细菌沉淀;
- (6) 加入 4 ml 0.1 M CaCl₂ 重悬细菌沉淀,这时的细胞可直接用于转化实验。加甘油至终浓度为 15%~20%,混匀,分装成 200 μ l/份,-70℃冻存。
- (7) 从-70℃取出冻存的感受态细胞,冰上解冻;
- (8) 200 μ l 感受态细胞中加入 5 μ l 连接产物,冰浴 30 分钟;
- (9) 42℃水浴热激 90 秒,立即冰浴 8 分钟;加 500~800 μ l 液体 LB,37℃复活 50 分钟;取 200 μ l 铺于含 100 μ g/ml Amp、X-gal 和 IPTG LB 平板;37℃恒温培养箱培养 12~16h 后观察。

2.2.1.2 摇菌及封存甘油菌制备和冻存

无菌条件下取少量培养的重组质粒的菌液 1ml 加入 1.5mlEp 管中,再加入 40%甘油 0.5ml,混匀后用塑料薄膜封口,-80℃保存;

2.2.1.3 质粒抽提

根据质粒小量提取试剂盒说明书提取质粒,操作过程如下:

*第一次使用前请现在 15ml 漂洗液 WB 中加入 45ml 无水乙醇。

*将 RNase A 全部加入溶液 P1 中,混匀,每次使用后置于 2-8℃保存。

- (1) 从恒温摇床中取出培养成云雾状浑浊的细菌，取 1.5ml 至离心管中，9000rpm，离心 30s，弃上清，收集菌体，尽可能倒尽上清；处理超过 1.5 毫升菌液可以离心弃上清后，在同一个 1.5 毫升管内加入更多菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。
- (2) 用 250ul 溶液 P1 重悬菌体沉淀，漩涡振荡至彻底悬浮；
如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取的量及纯度偏低。
- (3) 加入 250ul 溶液 P2，上下温和翻转 6-10 次，使菌体充分裂解，直至溶液变得清亮；温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变的清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步。
- (4) 加入 400ul 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6-10 次，室温放置 5min，室温离心 13000rpm，10min，小心取上清；
- (5) 将吸附柱安置于收集管上，将上一步所得上清液加入吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中，溶液太多可分两次加入)，25℃离心 13000rpm，1min，弃滤液。
- (6) 加入 500ul 去蛋白 PE，13000rpm 离心 30-60 秒，弃滤液。
此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株位 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所有菌株为 XL-1 Blue 和 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。
- (7) 加入 500ul 漂洗液 WB(之前加入无水乙醇)，离心 13000rpm，30 秒，弃滤液。
- (8) 重复步骤 7 一次，13000rpm 离心 60 秒，弃滤液。空柱 13000rpm，离心 2 分钟，室温放置 3-5 分钟，除去残留乙醇；
- (9) 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中央部位加入 60-100ul 洗脱缓冲液双蒸水，室温放置 1 分钟，离心 13000rpm，1 分钟，洗脱 DNA，即为提取的质粒 DNA 溶液，-20℃保存；洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要质粒浓度较高，可以适量减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50ul，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。
- (10) 取 1ul 在 1%琼脂糖凝胶上电泳检测其纯度。

2.2.1.4 质粒提取质量检测

将新提取的 HPV16 质粒与德国 HPV16 质粒一起在 1%琼脂糖凝胶上跑电泳，看条带位置是否相同，并用 HPV16 特异性引物扩增 E6 后测序验证为 HPV16 基因，见图 1、图 2。



图 1 HPV16 新旧质粒对比电泳图

M marker; 1 新质粒; 2 旧质粒

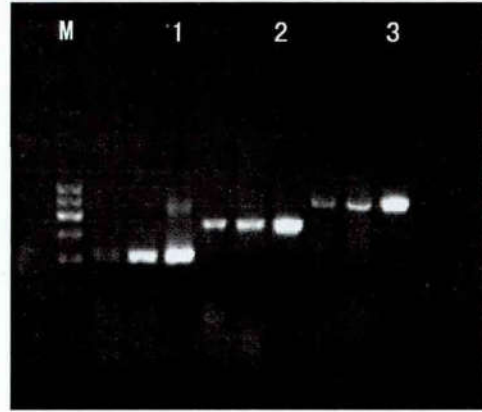


图 2 HPV16 扩增片段电泳图

M marker; 1 E6F1R1; 2 E6F2P2; 3 E7 正反

2.2.2 基因组 DNA 的制备

2.2.2.1 酚-氯仿法提取石蜡包埋组织中 DNA:

- (1) 10 张 5 μ m 厚石蜡包埋组织切片装入 2.0ml 消毒 Eppendorf 管(待用);
- (2) 加入 1.5ml 二甲苯上下颠倒混匀 5min, 55 $^{\circ}$ C 水浴 15min, 13000rpm、25 $^{\circ}$ C 离心 5min;
- (3) 重复上一步(如果脱蜡不干净可以再重复一次);
- (4) 弃上清, 加入 1.5ml 无水乙醇, 上下颠倒混匀 15min, 13000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10min;
- (5) 重复上一步 2 次;
- (6) 弃上清, 25 $^{\circ}$ C 干燥(需要晾干);
- (7) 加 Lysis buffer (细胞裂解液)300ul 轻混, 加蛋白酶 K(20mg/ml)80 μ l 轻混, 封口膜封口, 55 $^{\circ}$ C 水浴过夜;
- (8) 95 $^{\circ}$ C 水浴 5min 灭活蛋白酶 K, 12000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10min;
- (9) 取上清至新 Eppendorf 管中(1.5ml), 记录液体体积, 加入等体积饱和酚(pH=8.0), 25 $^{\circ}$ C 上下颠倒混匀 10min, 13000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10min;
- (10)取上清至新 Eppendorf 管中(1.5ml), 记录液体体积, 加入等体积酚-氯仿-异戊醇(25:24:1), 25 $^{\circ}$ C 上下颠倒混匀 10min, 13000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10min;
- (11)取上清至新 Eppendorf 管中(1.5ml), 记录液体体积, 加入等体氯仿-异戊醇(24:1), 常温上下颠倒混匀 10min, 13000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10min;
- (12)取上清至新 Eppendorf 管中(2.0ml), 记录液体体积, 加入 1.5ml 预冷无水乙醇, 常温上下颠倒混匀 10min, 放入-20 $^{\circ}$ C 冰箱沉淀 30min, 13000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10min;
- (13)弃上清, 加 1.5ml 预冷 75%乙醇洗沉淀, 上下颠倒混匀 5min, 13000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10min;
- (14)弃上清, 25 $^{\circ}$ C 干燥(挥发乙醇)10-30min(需要晾干);
- (15)加入已高压双蒸水缓冲液 30ul, 4 $^{\circ}$ C 冰箱溶解 DNA12-24h;
- (16)DNA 置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2.2.2 Qiagen 试剂盒法提取石蜡包埋组织 DNA:

准备工作: 所有试剂至 25 $^{\circ}$ C; 水浴锅调至 56 $^{\circ}$ C; AL、ATL 若有沉淀加热至 70 $^{\circ}$ C

溶解; AW1、AW2 使用前要轻微混匀。注意: 所有离心步骤均在 25℃ 下进行(15-25 ℃) 具体步骤:

- (1) 组织切片(5μm)10 张, 装入 2.0 ml 的灭菌 Ep 管中;
- (2) 加入 1.5ml 二甲苯上下颠倒混匀 5min, 55℃水浴 15min, 13000rpm、25℃离心 5min;
- (3) 重复上一步(如果脱蜡不干净可以再重复一次);
- (4) 弃上清, 加入 1.5ml 无水乙醇, 上下颠倒混匀 15min, 13000rpm、4℃离心 10min;
- (5) 重复上一步 2 次;
- (6) 弃上清, 25℃干燥(需要晾干);
- (7) 加 Lysis buffer (细胞裂解液)300ul 轻混, 加蛋白酶 K(20mg/ml)80μl 轻混, 封口膜封口, 55℃水浴过夜;
- (8) 95℃水浴 5min 灭活蛋白酶 K, 12000rpm、4℃离心 10min;
- (9) 短暂离心以使 1.5 mlEp 管盖上的水珠下沉;
- (10) 迅速加入 200 μl Buffer AL, 以涡旋震荡器充分混匀, 再加入 200μl 无水乙醇, 涡旋震荡器充分混匀; (注意: 样本、Buffer AL、无水乙醇要迅速混匀; 若样本量大可先将 Buffer AL、无水乙醇混匀后一并加入样本)
- (11) 短暂离心以使 1.5 mlEp 管盖上的水珠下沉; 小心转移全部裂解液至 QIAamp 层析柱(放在 2 ml 收集管) 中, 盖上盖子, 离心 8 000 r / min 1 min。
- (12) 将柱子放入 1 个干净的 2 ml 收集管中, 弃去原先的滤液收集管, 小心打开柱子, 加入 500 μl Buffer AW1(用前轻混), 盖上盖子, 离心 8 000 r / min 1 min;
- (13) 将柱子放入 1 个干净的 2 ml 收集管中, 弃去原先的滤液收集管, 小心打开柱子, 加入 500 μl Buffer AW2, 盖上盖子, 离心 8 000 r / min 1 min;
- (14) 将柱子放入 1 个干净的 2 ml 收集管中, 弃去原先的滤液收集管, 全速离心 14 000 r / min 3 min, 使膜完全干燥;
- (15) 将柱子放入 1 个 1.5 ml 干净的 Ep 管中(试剂盒未提供), 弃去原先的滤液收集管, 小心打开柱子, 加入 40 μl Buffer ATE, 室温下盖上盖子孵育 5 min, 4 ℃全速离心 14 000r/min 1 min, 离心所得产物-20 ℃冻存储备用。

2.2.2.3 DNA 纯度及浓度鉴定:

NanoDrop 分光光度计定量检测 DNA 浓度及纯度, 确保其纯度(OD260/OD280 比值) 在 1.8-2.0 之间、浓度>50ng/μl, 所提 DNA 置-20℃冰箱保存备用。

2.2.2.4 DNA 质量鉴定:

所选新疆维族宫颈癌样本 40 例, 哈萨克族食管癌样本 53 例, 均为病毒拷贝数大于 10⁴/μl, 且 DNA 均进行常规 β-globin PCR 扩增检测, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳在 210bp 处出现目的片段, 则说明样本 DNA 未完全断裂, 可用于 HPV16E6、E7 的检测。

每次 β-globin PCR 扩增检测均设阳性对照和阴性对照, 阳性对照以含 HPV16 标准序列全长质粒(德国海德堡大学 HAUSEN 教授馈赠)为模板, 阴性对照以双蒸水(ddH₂O) 为模板。

(1) β -globin 反应体系:

dd H ₂ O	18.7 μ l
10 $\times$ PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2.5 μ l
dNTP(10mmol/L)	0.5 μ l
β -globin For primer(25 μ mol/L)	0.5 μ l
β -globin Rev primer(25 μ mol/L)	0.5 μ l
Taq DNA polymerase(5U/ μ l)	0.3 μ l
Template DNA	2.0 μ l
Total Volume	25.0 μ l

(2) β -globin 反应条件:

PCR 起始:	94 $^{\circ}$ C	4 分钟	1 个循环
PCR 循环:	94 $^{\circ}$ C	45 秒	} 35 个循环
	56 $^{\circ}$ C	45 秒	
	72 $^{\circ}$ C	45 秒	
	72 $^{\circ}$ C	10 分钟	1 个循环
	4 $^{\circ}$ C	储存	

(3) β -globin 电泳鉴定:

加样器取 5 μ l PCR 产物与 1 μ l 6 $\times$ loading buffer 混匀后, 上样于 2%琼脂糖凝胶、150V, 45mA 电泳(0.5 $\times$ TBE), 27 分钟后在紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照。择 β -globin(+)样本用于后续 HPV16E6、E7 检测, β -globin(-)样本重新扩增一遍, 如果还是没有产物则重新抽提基因组 DNA。

2.3 目的片段的扩增

2.3.1 宫颈癌 HPV16 E6F1R1 及 F2P2 检测

(1)E6F1R1 反应体系:

Nuclease free water	16.5 μ l
dNTP(10mM)	2.5 μ l
10 $\times$ PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2.5 μ l
E6F1(25 μ mol/L)	0.5 μ l
E6R1(25 μ mol/L)	0.5 μ l
Taq DNA polymerase(5U/ μ l)	0.5 μ l
Template DNA	2.0 μ l
Total Volume	25 μ l

(2)反应条件:

PCR 起始:	94℃	4 分钟	1 个循环
PCR 循环:	94℃	45 秒	} 35 个循环
	54℃	45 秒	
	72℃	45 秒	
	72℃	10 分钟	1 个循环
	4℃	储存	

(3)电泳鉴定:

取 5μl PCR 产物与 1μl 6×loading buffer 混匀后,上样于 2%琼脂糖凝胶、150V,45mA 电泳(0.5×TBE), 27 分钟后在紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照。

(4)E6 F2P2 反应体系:

Nuclease free water	16.5μl
dNTP(10mM)	2.5μl
10×PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2.5μl
E6 F2(25μmol/L)	0.5μl
E6 P2(25μmol/L)	0.5μl
Taq DNA polymerase(5U/μl)	0.5μl
Template DNA	2.0μl
Total Volume	25μl

(5)反应条件:

PCR 起始:	94℃	3 分钟	1 个循环
PCR 循环:	94℃	45 秒	} 35 个循环
	56℃	45 秒	
	72℃	45 秒	
	72℃	10 分钟	1 个循环
	4℃	储存	

(6)电泳鉴定:

取 5μl PCR 产物与 1μl 6×loading buffer 混匀后,上样于 2%琼脂糖凝胶、150V,45mA 电泳(0.5×TBE), 27 分钟后在紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照。

2.3.2 宫颈癌 HPV16E7 检测

(1)E7 正反反应体系

Nuclease free water	14.6μl
dNTP(10mM)	0.5μl
10×PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2.5μl
E7 正(25μmol/L)	0.8μl
E7 反(25μmol/L)	0.8μl
Taq DNA polymerase(5U/μl)	0.8μl

Template DNA	3.0μl
Total Volume	25μl

(2)反应条件:

PCR 起始:	94℃	3 分钟	1 个循环
PCR 循环:	94℃	45 秒	} 35 个循环
	52℃	45 秒	
	72℃	45 秒	
	72℃	10 分钟	1 个循环
	4℃	储存	

(3)电泳鉴定:

取 5μl PCR 产物与 1μl 6×loading buffer 混匀后,上样于 2%琼脂糖凝胶、150V,45mA 电泳(0.5×TBE), 27 分钟后在紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照。

2.3.3 食管癌 HPV16E6F1R1 及 F2P2 检测

(1)E6F1R1 反应体系:

Nuclease free water	15.5μl
dNTP(10mM)	2.5μl
10×PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2.5μl
E6F1(25μmol/L)	0.5μl
E6R1(25μmol/L)	0.5μl
Taq DNA polymerase(5U/μl)	0.5μl
Template DNA	3.0μl
Total Volume	25μl

(2)反应条件:

PCR 起始:	94℃	3 分钟	1 个循环
PCR 循环:	94℃	45 秒	} 35 个循环
	52℃	45 秒	
	72℃	45 秒	
	72℃	10 分钟	1 个循环
	4℃	储存	

(3)电泳鉴定:

取 5μl PCR 产物与 1μl 6×loading buffer 混匀后,上样于 2%琼脂糖凝胶、150V,45mA 电泳(0.5×TBE), 27 分钟后在紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照。

(4)F2P2 反应体系:

Nuclease free water	15.5μl
dNTP(10mM)	2.5μl
10×PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2.5μl
E6F2(25μmol/L)	0.6μl

E6 P2(25 μ mol/L)	0.6 μ l
Taq DNA polymerase(5U/ μ l)	0.8 μ l
Template DNA	3.0 μ l
Total Volume	25 μ l

(5)反应条件:

PCR 起始:	94 $^{\circ}$ C	3 分钟	1 个循环
PCR 循环:	94 $^{\circ}$ C	45 秒	} 35 个循环
	56 $^{\circ}$ C	45 秒	
	72 $^{\circ}$ C	45 秒	
	72 $^{\circ}$ C	10 分钟	1 个循环
	4 $^{\circ}$ C	储存	

(6)电泳鉴定:

取 5 μ l PCR 产物与 1 μ l 6 $\times$ loading buffer 混匀后,上样于 2%琼脂糖凝胶、150V,45mA 电泳(0.5 $\times$ TBE), 27 分钟后在紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照。

2.3.4 食管癌 HPV16E7 检测

(1)E7 正反反应体系

Nuclease free water	14.6 μ l
dNTP(10mM)	2.5 μ l
10 $\times$ PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2.5 μ l
E7 正(25 μ mol/L)	0.8 μ l
E7 反(25 μ mol/L)	0.8 μ l
Taq DNA polymerase(5U/ μ l)	0.8 μ l
Template DNA	3.0 μ l
Total Volume	25 μ l

(2)反应条件:

PCR 起始:	94 $^{\circ}$ C	3 分钟	1 个循环
PCR 循环:	94 $^{\circ}$ C	45 秒	} 35 个循环
	52 $^{\circ}$ C	45 秒	
	72 $^{\circ}$ C	45 秒	
	72 $^{\circ}$ C	10 分钟	1 个循环
	4 $^{\circ}$ C	储存	

(3)电泳鉴定:

取 5 μ l PCR 产物与 1 μ l 6 $\times$ loading buffer 混匀后,上样于 2%琼脂糖凝胶、150V,45mA 电泳(0.5 $\times$ TBE), 27 分钟后在紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照。

2.4 PCR 产物测序

样本 DNA 经 PCR 扩增出目的片段后,将 PCR 产物 40 μ l 放于-80 $^{\circ}$ C冰箱冻 12 小时,

冰袋包裹，泡沫盒封装送交北京 Invotragen 公司测序。

2.5 系统生成树的构建

2.5.1 HPV16 变异体参照序列的选定

本研究中参考对照的 HPV16 变异体核苷酸序列 GenBank 编码如下：

SihaHPV16E6(AF003019.1);SihaHPV16E7(AF003021.1);CaskiHPV16E6(AF003018.1);CaskiHPV16E7(AF003020.1);HPV16EP(K02718.1);HPV16E131G(AF536179.1);HPV16As(AJ388066.1);HPV16AA(AF402678.1);HPV16Af1(AF536180.1);HPV16Af2(AF486324.1);HPV16NA-1(AF486325.1);Xinjiang HPV16E6(AF327851.1)。

2.5.2 测序结果分析、系统生成树构建

将测序波峰图用 Chromas 软件导出，用 DNASTar 软件中 Seqman 程序分析、拼接序列，后用其 EditSeq 程序将拼接好的核苷酸序列与标准序列翻译为氨基酸序列并加以比对分析，发现氨基酸的改变，之后应用 Clustal 1.80 核苷酸序列文件的格式由 “*.seq” 格式转变 “*.aln” 格式，然后可用 MEGA4.1 软件分析并构建 HPV16 演化树。

系统发生树 (Phylogenetic tree)，别名演化树 (Evolutionary tree)，是标识被认为有共同祖先的物种间演化关系的树。这也是一种亲缘分支分类方法 (cladogram)。在演化树中，每个节点对应为其各分支的最近共同祖先，而节点间的线段长度代表演化距离。系统演化树分两种方式进行描述：一种是有根 (rooted) 树，一种是无根 (unrooted) 树。有根树反映了树上物种或基因的时间顺序，分支越早，相关性越差，而无根树只反映分类单元之间的距离而不涉及谁是谁的祖先问题。分枝节点上的数值代表解靴带值 (Bootstrap)，表示软件程序随机绘制 100 个演化树时相应的病毒株序列分枝在该处出现的频率，即表示 100 个树中一个特定分支节点上的发生数，“0.001” 为演化树中相邻分枝节点之间的长度标尺，两节点之间距离对应了病毒变异体间的演化距离及亲缘关系。

2.6 实验室质量控制

- (1) 在切取蜡膜过程中，每例标本在切片之前用 75% 酒精擦拭刀片，并以空白石蜡连续切数片，消除刀片上前一例标本可能残存下的碎屑，以避免交叉污染。将上述空白石蜡切片与其他受检蜡膜标本同时进行 DNA 提取及 HPV PCR 检测，结果均为阴性，排除了切片过程对实验结果的影响。
- (2) 蜡膜 DNA 提取、PCR 工作液配制、DNA 样品加样、PCR 扩增反应、PCR 产物电泳分别在实验室指定的所属空间操作；不同的操作过程，加样枪和常规用品 (如 EP 管、EP 管架、枪头等) 均分开使用，严格遵守无菌操作，避免污染。
- (3) 所有试剂均分装，按照指定温度保存，EP 管在每次开盖前均离心；
- (4) PCR 实验室操作分区：标本处理区、PCR 扩增体系制备及 PCR 扩增区、PCR 产物检测区分开；
- (5) 每日的工作程序为：配制 PCR 工作液 → 样品 DNA 加样 → PCR 产物电泳检测，防止了 PCR 产物污染；及时更换乳胶手套；

- (6) DNA 加样的顺序为：先加样品 DNA，后加阴性对照，再加阳性对照，尽量避免阳性对照对样品 DNA 造成污染；
- (7) 每次 PCR 均设空白对照、阴性对照和阳性对照。
- (8) 75%乙醇定期擦洗 EP 管架、加样枪、桌面，紫外线照射过夜；
- (9) 重复操作验证。
- (10) 石蜡组织提取 DNA 过程中前三步一定要将石蜡脱干净，第 7 步中加蛋白酶 K 消化好的状态是 EP 管中液体呈透亮状，如果仍有组织悬浮，可补加蛋白酶 K，直至组织消化完全，水浴过夜时 EP 管要用封口膜封口，以防液体渗入。之后，95℃灭活蛋白酶 K 时，可将 EP 管的盖子漏个小缝，以防管中压力过大以致盖子崩开，水蒸汽大量进入管中。
- (11) Nanodrop 分光光度计使用过程开始时，要用双蒸水调零(blank)，后面加样时一定要吸取足够量的 DNA(0.1μl)。每测 5 例，需对样本进行再调零(re-blank)；样本加样时要将 DNA 打入样孔里面，去除样本时要用卫生纸擦拭干净。
- (12) 做 PCR 扩增时，吸取 DNA 模板时要足量，可先吸取相应双蒸水量为标准。

3. 统计学分析

样本HPV16变异与临床病例资料分析，采用秩和检验分析两两之间的相关性。计数资料用率或构成比表示，计数资料组间的比较使用秩和检验及确切概率法统计， $P < 0.05$ 视差异性有统计学意义。应用SPSS17.0软件包对所有数据处理。

结 果

(Results)

1. 临床病理学特征

1.1 维吾尔族宫颈癌

新疆维族宫颈鳞癌 40 例：年龄 25-65 岁，中位年龄 45.00 岁，平均年龄 45.11 ± 10.48 岁，具体如表 3。

表 3 40 例新疆维吾尔族宫颈鳞癌临床病理学特征

特征	—	例数	百分比(%)
年龄 (37 例)	≤30	3	8.2
	31~40	10	27.0
	41~50	12	32.4
	51~60	8	21.6
	≥61	4	10.8
分化程度 (39 例)	高分化	4	10.2
	中分化	12	30.8
	低分化	23	59.0

注：宫颈癌年龄（3 例）、分化程度（1 例）资料缺失。

新疆维族宫颈鳞癌 40 例，不同分化程度高分化 4 例，中分化 12 例，低分化 23 例(详见表 3)，镜下组织病理学特征如图 3、图 4 所示；

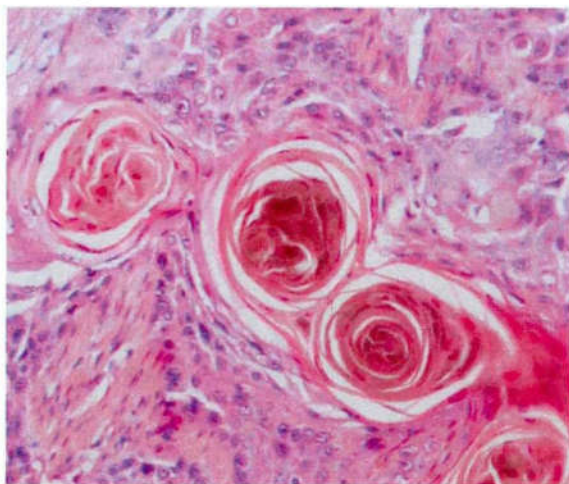


图 3 高分化鳞癌 (HE×200)

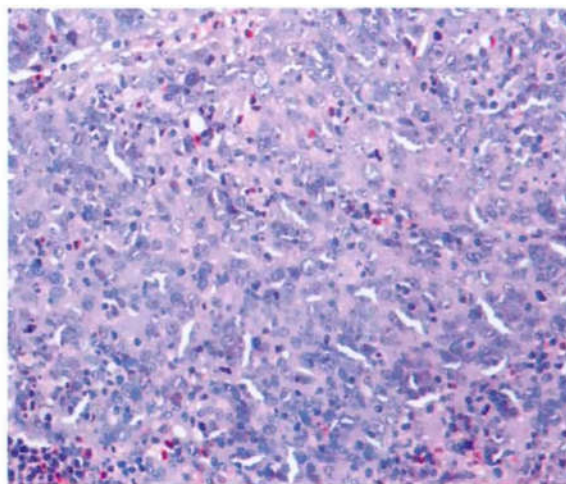


图 4 低分化鳞癌 (HE×200)

1.2 哈萨克族食管癌

新疆哈族食管鳞癌 51 例：男/女比例为 29/22；年龄 36-74 岁，中位年龄 53.50 岁，

平均年龄 53.60 ± 8.52 岁；哈族食管鳞癌 51 例，不同分化程度高分化 14 例，中分化 26 例，低分化 10 例(详见表 4)镜下组织病理学特征如图 5、图 6 所示。

表 4 51 例新疆哈萨克族食管鳞癌临床病理学特征

特征	——	例数	百分比(%)
性别 (51 例)	男性	29	56.9
	女性	22	43.1
年龄 (50 例)	≤44	7	14.0
	44~54	19	38.0
	54~64	18	36.0
	≥65	6	12.0
肿瘤部位 (20 例)	食管上段	0	0
	食管中段	11	55.0
	食管下段	9	45.0
大体类型 (15 例)	溃疡型	14	93.3
	髓质型	0	0
	缩窄型	0	0
	蕈伞型	1	6.7
分化程度 (50 例)	高分化	14	28.0
	中分化	26	52.0
	低分化	10	20.0
淋巴结转移 (47 例)	无转移	22	46.8
	有转移	25	53.2
TNM 分期 (51 例)	I 期	6	11.8
	II 期	20	39.2
	III 期	23	45.1
	IV 期	2	3.9

注：临床病理学特征部分资料有缺失，详见各特征下例数。

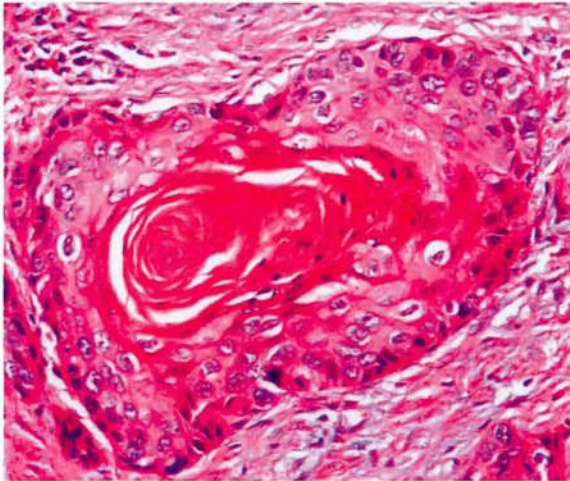


图 5 高分化鳞癌 (HE×200)

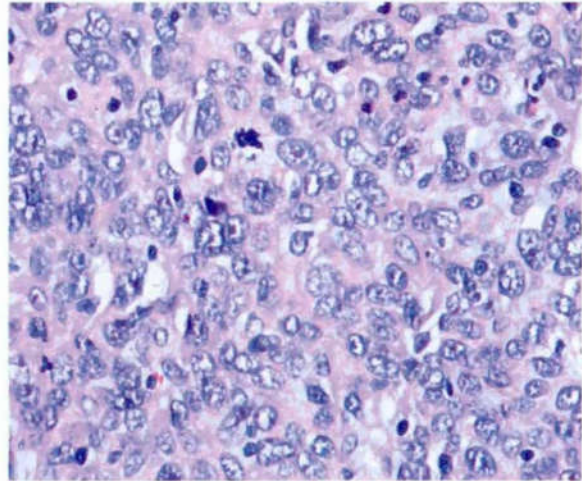


图 6 低分化鳞癌 (HE×400)

2. 基因组 DNA 质量检测及 HPV16 E6 、 E7 PCR 扩增产物检测结果

2.1 维吾尔族宫颈癌

所选新疆维族宫颈癌 40 例, 经 β -globin PCR 扩增检测成功 37 例。PCR 扩增产物做 2% 琼脂糖凝胶电泳, 210bp 处出现目的片段(图 7), 说明样本 DNA 均可用于 HPV16 变异检测。

维族宫颈癌中 β -globin PCR 扩增检测阳性 37 例样本, 全用于 HPV16 E6 、 E7 PCR 扩增。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 214bp(35/37 例)、343bp(31/37 例)、468bp(10/37 例)处出现目的片段(图 8), 说明实验样本可用于后续的测序。

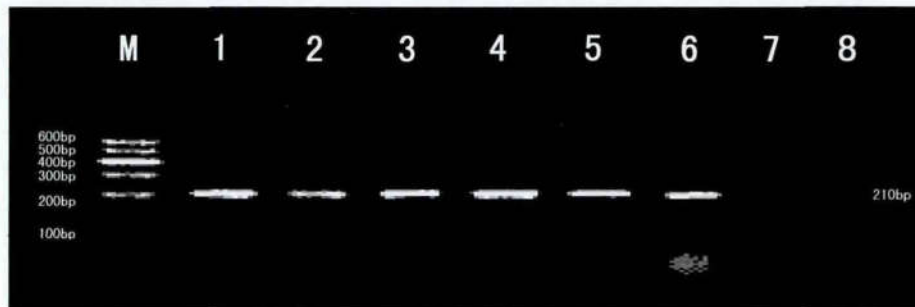


图 7 宫颈癌 β -globin 扩增电泳图

M marker; 1-5 样本; 6 阳性对照; 7 阴性对照 8 空白对照

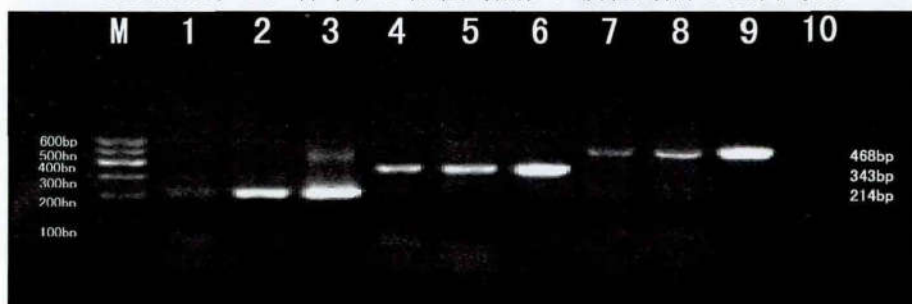


图 8 宫颈癌 HPV16E6、E7 扩增电泳图

M marker; 1-2 E6 F1R1; 4-5 E6 F2P2; 7-8 E7 正反; 3,6,9 阳性对照; 10 阴性对照

2.2 哈萨克族食管癌

所选新疆哈族食管癌 51 例, 经 β -globin PCR 扩增检测成功 51 例。PCR 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳, 210bp 处出现目的片段(图 9), 说明样本 DNA 合格, 均可用于 HPV16 变异检测。DNA 合格样本全用于 HPV16 E6、E7 PCR 扩增。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, E6 F1R1 (214bp, 30/51 例)、E6 F2P2(343bp, 6/51 例)、E7 正反 (468bp, 6/51 例)处出现目的片段(图 10-12), 有杂带, 经公司切胶纯化后测序。

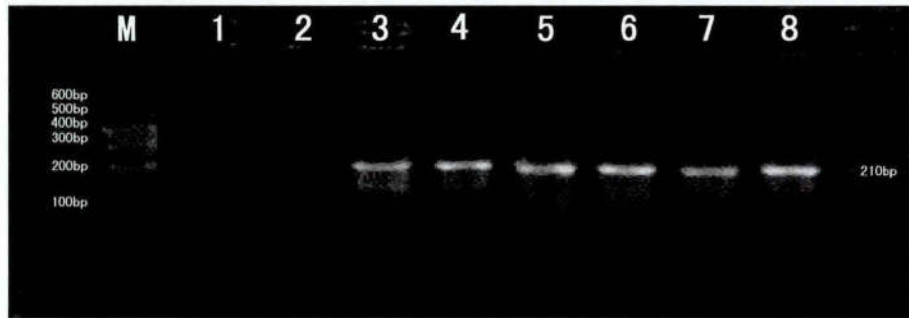


图 9 食管癌 β -globin 扩增电泳图

M marker; 1 空白对照; 2 阴性对照; 3 阳性对照; 6-8 样本



图 10 HPV16E6F1R1 扩增电泳图

M marker; 1 阳性对照;
2-9 E6F1R1; 10 阴性对照

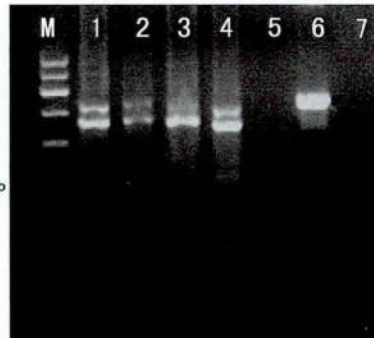


图 11 HPV16E6F2P2 扩增电泳图

M marker; 1-5 E6 F2P2;
6 阳性对照; 7 阴性对照;

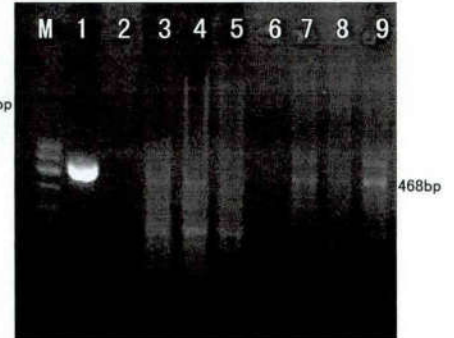


图 12 HPV16E7 正反扩增电泳图

M marker; 1 阳性对照;
2 阴性对照; 3-9 E7 正反;

3. HPV16 变异位点分布

3.1 维吾尔族宫颈癌 E6 变异检测

扩增目的片段 E6 测序波峰图 (图 13), 波峰图用 Chromas 及 DNASTar 软件查看并分析序列。维族宫颈癌 37 例, 28 例测序成功, E6 变异率 71.5% (20/28), 其中 T350G 变异率 71.5% (20/28), 178 位点未见变异, 发生 T310G 变异 1 例 (152 号), T295G 变异 1 例 (167 号), A135C 变异 1 例 (167 号)。见图 14, 表 5。

表 5 28 例维吾尔族宫颈癌中 HPV16 E6 变异情况

例数	E6 变异位点				氨基酸突变
	350	310	295	135	
8	T	T	T	A	未变异
18	G				L→V
1	G		G	C	K→T/D→E/L→V
1	G	G			F→L/L→V

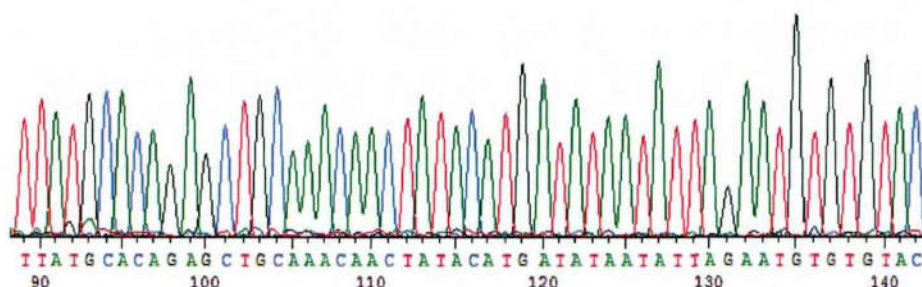


图 13 宫颈癌 HPV16E6 测序波峰图

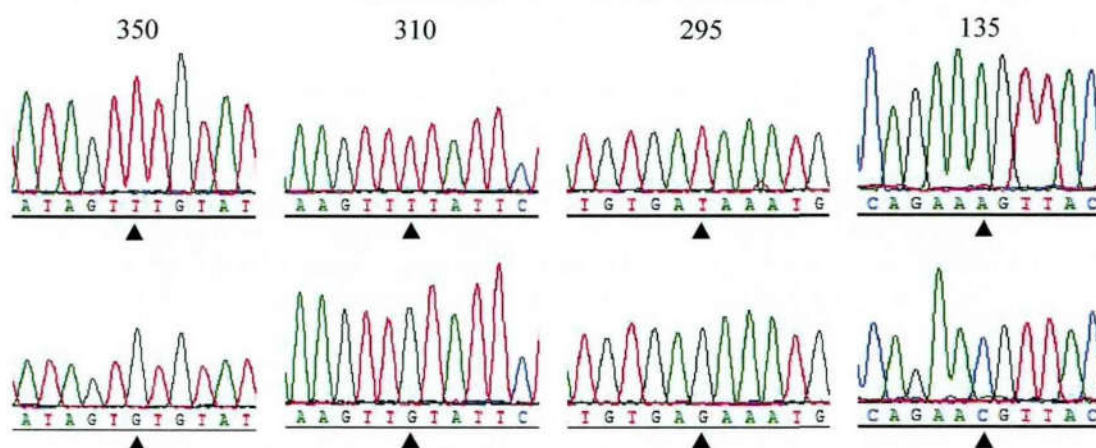


图 14 宫颈癌 HPV16E6 变异位点波峰图

上层为正常波峰图，下层为变异位点的波峰图。▲分别指向相应变异位点。

3.2 维吾尔族宫颈癌 HPV E7 变异检测

扩增目的片段 E7 测序波峰图（图 15、16），波峰图用 Chromas 及 DNASTAR 软件查看及分析序列。比对标准序列，发现突变位点，质粒扩增片段序列为标准序列。宫颈癌 HPV16 E7 测序成功 7 例，未见突变位点。

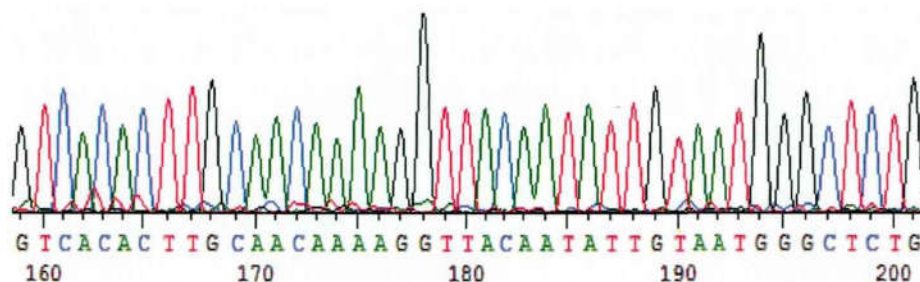


图 15 质粒 HPV16E7 测序部分波峰图

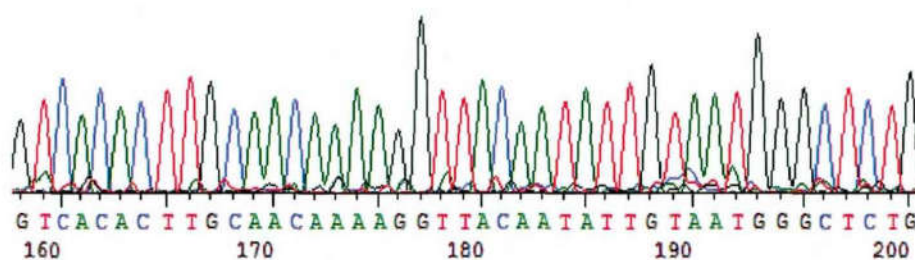


图 16 子宫颈癌 HPV16E7 测序部分波峰图

3.3 哈萨克族食管癌 E6 变异检测

扩增目的片段 E6F1R1 测序波峰图，波峰单一，波形较好（图 17、18），波峰图用 Chromas 及 DNASTar 软件查看及分析序列。哈族食管癌 37 例，5 例 HPV16E6F1R1 测序成功，未见突变位点。HPV16 E6F2P2 测序未成功。

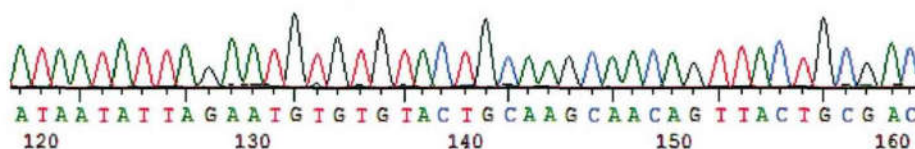


图 17 HPV16 质粒 E6 F1R1 测序部分波峰图

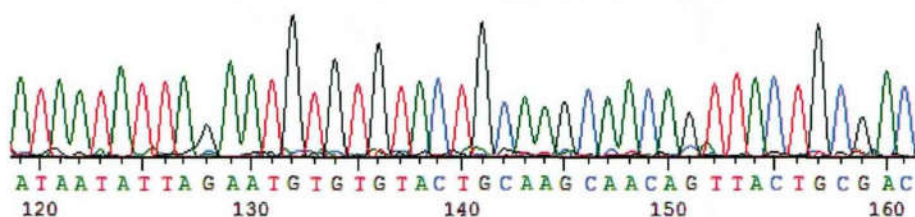


图 18 食管癌 HPV16E6 F1R1 测序部分波峰图

3.4 哈萨克族食管癌 E7 变异检测

所选新疆哈族食管癌51例，经 β -globin PCR扩增检测成功51例。经HPV16 E6、E7 PCR扩增，E6 F1R1 (214bp, 30/51例)、E6 F2P2(343bp, 6/51例)、E7正反 (468bp, 6/51例)经公司切胶纯化后测序E6F1R1成功5例，E7正反扩增未能测序成功。

4. 系统演化树构建分析

4.1 维族宫颈癌

根据 HPV16E6 序列构建演化树，从图 19、20 可看出，NA-1、AA、Af1 与 Af2 变异体分支较晚，进化较慢，一直比较稳定，而欧洲变异体及 As 变异体则早早的就分支，相对不稳定，所选维族宫颈癌样本欧洲变异体为主。19 例样本 121、132、134、138、140、142、143、149、150、152、155、164、166、167、170、175、178、183、246 归为欧洲变异体，其中 9 例样本 125、130、145、148、151、169、179、239、244 归为欧洲标准体。

根据 HPV16 E7 序列构建演化树，从图 21、22 中可见，Afl、AA、Siha、As 变异体相对较欧洲变异体要稳定。所扩增七例样本（134、142、155、166、169、239、244）皆为欧洲变异体。在 HPV16 EP、EG131、Caski 的 E7 序列相同，所以分在一个大支里面。

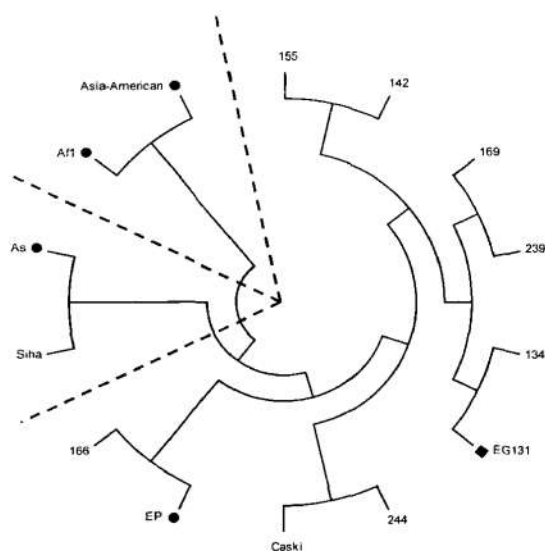


图 21 宫颈癌 E7 无根树

● 代表五大支变异体 ■ 代表欧洲变异体。
样本大致分支被虚线分开。

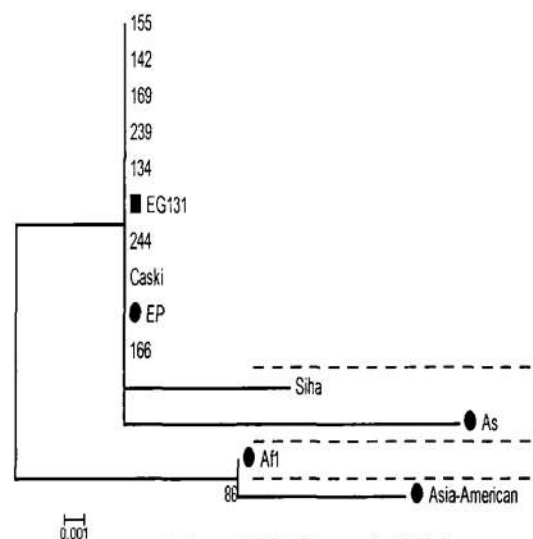


图 22 宫颈癌 E7 有根树

● 代表五大支变异体 ■ 代表欧洲变异体。
样本大致分支被虚线分开。“0.001”为进化尺度节点前方数字为“bootstrap 值”。

4.2 哈族食管癌

所选新疆哈族食管癌51例，经 β -globin PCR扩增、HPV16 E6 F1R1 (214bp, 30/51例)、E6 F2P2(343bp, 6/51例)、E7正反 (468bp, 6/51例) PCR扩增，公司切胶纯化后测序扩增 E6F1R1成功5例， E7正反信号弱测序未成功，由于序列为部分E6片段，所以未能构建演化树。

5. HPV16 变异体与宫颈癌、食管癌的关系

5.1 维族宫颈癌

本实验中在维族宫颈癌有 HPV16 欧洲标准体 (Ep)，HPV16 欧洲变异体 (E131G) 两种感染，感染率分别为 32.14% (9/28)，67.86% (19/28)，以 HPV16 欧洲变异体为主。HPV16 变异体分型与组织学分化程度通过秩和检验，两者没有相关性 ($P=0.699$) 表 6。

表 6 宫颈癌中 HPV16 变异类型与组织分化程度相关性比较

变异类型	高分化	中分化	低分化	合计
Ep	6(21.43%)	2(7.14%)	1(3.57%)	9
E131G	11(39.29%)	5(17.86%)	3(10.71%)	19
合计	17	7	4	28

$P>0.05$

另外，对 HPV16E6 350 位点变异与组织分化程度应用秩和检验，结果两者之间不存在相关性（ $P=0.699$ ）表 7。

表 7 宫颈癌中 HPV16 E6 350 位点变异与组织分化程度相关性比较

变异类型	高分化	中分化	低分化	合计
T	6(21.43%)	2(7.14%)	1(3.57%)	9
G	11(39.29%)	5(17.86%)	3(10.71%)	19
合计	17	7	4	28

$P>0.05$

对 HPV16E6 350 位点变异与年龄分组做确切概率法分析，结果两者之间不存在相关性（ $P=0.856$ ）表 8。

表 8 宫颈癌中 HPV16 E6 350 位点变异与年龄分组间相关性比较

年龄分组（岁）	350G	350T	合计
≤30	1(4.17%)	0(0%)	1
31-40	4(16.67%)	2(8.31%)	6
41-50	7(29.17%)	1(4.17%)	8
51-60	4(16.67%)	1(4.17%)	5
≥61	1(4.17%)	3(12.50%)	4
合计	17	7	24

$P>0.05$

5.2 哈族食管癌

此次实验扩增 E6，检测成功 5 例，未发现变异，未能构建哈族食管癌演化树，无法进一步做统计学分析。

讨 论

(Discussions)

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一,发病率在女性癌症中仅次于乳腺癌。在我国新疆地区维吾尔族宫颈癌呈现民族集聚高发现象,其汉族发病率明显低于维族^[17]。南疆维吾尔族妇女宫颈癌的患病率由 527/10 万(2004 年)上升到 622/10 万(2008 年)^[18],近年其发病年龄趋于年轻化^[19]其发病率及死亡率在我国新疆少数民族中最高。目前宫颈癌的主要病因有已经公认的高危型人乳头瘤状病毒(High risk-human papilloma virus HR-HPV)感染,另外与环境卫生状况差、多个性伴侣、多孕多产等环境因素和生活行为相关^[20]。

食管癌(Esophageal Carcinoma, EC)是目前世界人类常见的消化道恶性肿瘤之一,分为鳞癌和腺癌两种常见类型。国外食管癌以亚非拉部分地区的黑人、中国人、印度人及日本人等地的居民发病率较高,而欧洲、北美洲及大洋洲地区发病率较低。我国食管癌发病地区以河南林县、河北磁县等太行山区为主,从民族发病率来看,新疆哈萨克族较同地区汉族食管癌明显高发^[21]。食管癌因其早期症状隐匿,发现时多为症状明显的中晚期,而食管拉网筛查、食管镜活检等方法为食管癌的诊断提供了有力的帮助,治疗方法多采用外科治疗、放射治疗、化学治疗及综合治疗。然而,目前研究发现食管癌的发生受到年龄、性别、职业、种族、地理、生活环境、饮食生活习惯、遗传易感性等诸多方面影响,其具体致病机制仍然不明确。

研究者已从哈族食管癌中 HPV16、18、31、45 感染情况、MTHFR Codon 677C/T 基因型和 TAP1 Codon637A/G 基因型、叶酸缺乏等环境方面及 PTEN、RASSF1A、HLA-DRB1、HLA-DQB1、mir-203 及 mir-34 基因甲基化等表观遗传学方面的改变对食管癌的发生机制进行了相关探索。其中,肿瘤中病毒的作用逐渐引起重视,关于病毒致癌学说逐渐成为研究热点,本实验室通过膜芯片杂交检测,发现新疆哈族食管癌有 HPV 感染,感染率达 55/194,以 HPV 16 型别为主,其感染率为 26.29%。目前,有报道某些 HPV16 变异体及特殊位点突变能增加患宫颈癌的危险性。而且食管与宫颈组织来源相似,都是处于组织交接的地方,而且都与外界相通,且发展过程也比较相似,刘红彦^[16]通过研究河南豫北地区食管癌及宫颈癌组织中 HPV16 感染状况,发现 HPV16 可能是食管癌及宫颈癌的共同致病因素,所以本文就新疆地区哈族食管癌及维族宫颈癌中感染的 HPV16 变异情况进行检测,研究两种肿瘤中感染的 HPV16 在变异方面是否也具有一致性。本项研究既可为新疆哈族食管癌及维族宫颈癌中 HPV16 进化情况提供一个基本实验数据,且探明 HPV16 致癌机制对新疆哈萨克族食管癌早期诊断、治疗、预后以及预防具有重要的意义,对维族宫颈癌来说,可针对民族自身感染的 HPV16 变异特点设计更加符合本民族的预防疫苗。

病毒致癌有两方面主要原因:一方面与病毒造成的持续感染有关;另一方面与机体自身 HLA 多态性有关。人是 HPV 的唯一宿主,HPV 要存活就要侵袭人体,而机体则

通过免疫应答清理 HPV。HPV 感染要导致肿瘤,需要长期持续感染,而非一过性的感染所能形成。病毒要能长期感染而不被机体免疫应答所清除,提示致癌乳头瘤病毒必然要发生免疫逃逸。正如达尔文生物进化论所描述,在这种抗衡的环境中,乳头瘤病毒如同常见的流感病毒一样,也会以变异等方式逃避机体的免疫应答。乳头瘤病毒发生免疫逃逸主要通过下列几种方式^[22]: 1.病毒抗原的隐匿; 2.病毒诱使干扰素能力低下; 3.病毒对 T 细胞亚群极化选择的影响; 4.免疫选择; 5.病毒感染与宿主遗传因素间的相互影响。乳头瘤病毒在发生进化的同时,随着我们对它认识的不断深入,对其命名分类标准也在不断完善。

1. 乳头瘤病毒的分类进展

乳头瘤病毒(papillomavirus, PV)的命名表示是根据自然宿主的前两个字母而来(人乳头瘤病毒和牛乳头瘤病毒两者除外)。完整的命名只能在病毒完整分离并获取完整序列,然后经德国海德堡乳头状瘤病毒证明中心证实后才能进行,表示为 HPV+数字。对扩增部分片段的新型,命名只能用个人或实验室的名字加上实验室编号进行命名。2000 年,人们对传统克隆获得的和 PCR 扩增获得的乳头状瘤进行了区分,后者用 cand HPV+数字表示。最新的标准是在 2004 年划分的,根据 ICTV(International Committee on the Taxonomy of Viruses)对乳头瘤病毒分型的新标准对 118 型乳头瘤病毒进行了种系分类,并将属和种这些生物学概念引入种系分类。属成了超组和主要分支的统一体,不同属 L1 序列同源性小于 60%,整体序列核酸同源性在 23~43%。种则成了组、亚组、微小分支的统一体,不同种 L1 序列同源性在 60~70%,种内传统的 PV 型别之间 L1 区核酸序列同源性在 71~89%。按照最新的标准,目前的 118 型乳头瘤病毒分为了 16 个属,由希腊字母表示,属内常有数个种,种内型别之间有着通用的生物及病理学特征。其中 16 属中有 5 个属是由人和类人猿的乳头瘤病毒组成,他们分别是: Alpha、Beta、Gamma、Mu、Nu-PV 属,其他属则是山其他哺乳动物及鸟类的病毒组成。对于人类来说,最重要的是 Alpha-PV 属,因为这个属包含了生殖道及黏膜疾患相关的所有型^[23]。

迄今已有 118 型乳头瘤病毒已有了全序列描述。人们根据未知与已知 HPV 基因组 L1 序列的同源性百分比对前者进行命名:如两者同源性小于 90%,则为不同型(Type);同型内两者同源性在 90-98%,则为不同亚型(Subtype);同亚型内两者同源性大于 98%,则为变异(Variant)。

目前,根据 HPV16 的地区及人种差异,HPV16 存在六种变异体: E(European, 欧洲变异体)、As(Asian, 亚洲变异体)、AA(Asian-American, 亚洲-美洲变异体)、Af 1(African 1, 非洲变异体 1)、Af 2(African 2, 非洲变异体 2)及 NA 1(North American 1, 北美变异体 1)。

2. HPV16E6、E7 变异位点与维族宫颈癌及哈族食管癌关系探讨

2.1 HPV16 常见变异位点

新疆所处位置是欧亚大陆结合地,而且古代的政治婚姻以及战略人口迁徙迁移、欧

亚经商比较频繁,新疆地区民族就有 47 个,其中以维吾尔族和哈萨克族为主,这就为 HPV 形成多种变异提供了基础,Keris KrennHrubec^[24]研究突尼斯南、北、中三个地区的 HPV 变异感染情况,发现宫颈癌中感染率较高的 HPV E 变异体极可能是历史上欧洲向突尼斯移民的结果。朱开春等^[25]发现新疆维族宫颈癌感染 HPV 常见变异位点为 L83V (53.8%, 49/91), D25E (4.39%, 4/91), D64E/L83V (2.2%, 2/91), 与标准序列相同的占 39.6% (36/91)。根据实验结果,我们发现维族宫颈癌中发生变异最多位点是: 350 位点, 350 位点变异所占样本比例分别为 70.3% (19/27), 其次是 310、295、135 位点的变异。其中 135 位点是新发现变异位点。

表 9 新疆维族子宫颈癌 HPV16 变异研究进展

研究者	时间	方法	研究结果
海米提·阿不都力木	2009	PCR, 测序	E6: 与原型相同, 汉族 T350G(L83V)
李清阳	2009	PCR, 测序	E6: G132A, A139T, G176A, T178G, T295G, T350G, E7: C561T, A647G, G666T, G676A, T760C, C790T, A803C, T809A, G814A, G823A, A825G, C840G, T847C, G849C
朱开春	2008	PCR, 测序	E6: T350G(L83V), T178G(D25E), T295G(D64E) E6: 与原型相同, T350G, T295G L1: C6240G, A6433G, 6901 与 6902 间插入 CAT, 6949-6951 间插入 GAT
马正海	2004	PCR, 测序	L2: A4363T, A5224T, G4936A, G4564T, G5015A, T5039C, G5043A, T5291C, C5292T, C5367T, C5485T, A5491G, A5516C, A7058T
张茂祥	2003	PCR, 测序	E7: T70G, T172G, T271G

表 10 国内汉族子宫颈癌 HPV16 变异研究进展

研究者	时间	方法	研究结果
熊光武	2010	PCR, 测序	北京 E6: T178G, T350G E7: A647G, G658A LCR: G7521A, A7729C, G7839A
H.B.Cai	2010	PCR, 测序	湖北 E6: 原型相同, D25E, L83V/E113D
郝敏	2009	PCR, 测序	北京 E5: A4075T
王安荣	2008	PCR, 测序	广元 E6: C168G, G176A, A203G, C240G, C335T, A442C
丁晓华	2008	PCR, 测序	湖北 E6: T178G, A442G
Qiu AD	2007	PCR, 测序	四川 E6: T178G, T350G, C335T, C168G
刘国炳	2005	PCR, 测序	广东 E6: T131G, A178C, G173A, A385C

表 11 哈族食管癌 HPV16 感染、变异进展

研究者	时间	方法	研究结果
柯 杨	2009	特异性 PCR 测序	HPV (8 型) 检出率 (42/78) 53.8% HPV16 检出率 (19/45) 42.2%
卢晓梅	2008	SPF10-Lipa 法	HPV (37 型) 检出率 (20/67) 30% HPV16 检出率 (8/20) 40%
陈 玲	2008	特异性 PCR 测序	HPV16 检出率 (58/150) 38.7% 对照组检出率 (4/40) 10%
郭伟鹏	2005	PCR 分子克隆测序	HPV16 检出率 (8/18) 44.4% HPV16 E6 A131G 变异 5 例

2.2 HPV16 常见变异位点致癌性

2.2.1 HPV16 E6、E7 致病机制

HPV16 E6 是病毒的早期表达基因, 此基因表达的 E6 蛋白由 158 个氨基酸组成, 分子量大小为 16 至 18Kd。其中第 37-73 位氨基酸残基和第 110-146 位氨基酸残基构成锌指结构域 cys-x-x-cys, 此结构域可结合致癌机制中起重要作用的 P53 蛋白, 并通过与 E6-AP 蛋白共同作用激活泛素蛋白酶体途径来降解 P53 蛋白^[26 27]。E6 蛋白起的功能十分关键和重要的作用, 其功能主要包括: 细胞永生、结合 E6 相关蛋白以促使 P53 降解、抗凋亡、染色体不稳定、活化端粒酶等。基因的改变会造成 E6 蛋白的表达差异及其功能异常。

HPV16E6 基因的表达与 microRNA 的表达相互影响。Xiaohong Wang 等^[28]发现有 HPV 感染的人类原始鳞状细胞中 miR-34a 的表达下调与 HPV 早期 E6 蛋白的表达增高有关, 这是因为 E6 使得 p53 这个 miR-34a 反式作用因子不稳定化。通过 siRNA 敲除了 E6 的 HPV16⁺ 和 HPV18⁺ 宫颈鳞癌细胞株表达时, 导致了 p53 和 miR-34a 的表达递增和 miR-34a 在 G₀/G₁ 期的积累。

HPV16 E7 蛋白含有氨基酸约 100 个, 有三个较为保守区(conserved region, CR)。这三个保守区分别为 CR1(位于 N 端), CR2(含有 LXCXE 结构域), CR3(含有两个锌指样结构域)。E7 通过 CR 其中之一与 Rb 蛋白家族结合后在通过泛素-26S 蛋白酶体途径降解 PRb 家族蛋白^[29]。Marta Melar-New 等^[30]发现 HPV E7 阻断上皮分化过程中 MAPK/PKC 通路依赖性 miR-203 表达的活化。miR-203 的下游靶点有 p63, CARM-1, p21, Bax, 这些因子在 HPV E7 表达的细胞中有明显增加, 与 miR-203 表达呈负相关。当 HPV 阳性鳞状细胞引入高水平 miR-203 表达时可发现有修复基因扩增。作者得出以下结论: 高水平表达的 miR-203 能抑制 HPV 扩增, 而 HPV 蛋白也可反过来抑制扩增复制的分化细胞中 microRNA 的表达。

哈族食管癌组织中 mir-203 呈现高甲基化、低表达^[31], 其抑制 HPV 感染细胞扩增的能力下降, 则 E7 表达增加, 这与 E7 突变后呈现的免疫逃逸可能共同导致食管癌。E6 的突变所致的免疫逃逸使 E6 表达增加, 而抑制 P53, 而下游 mir-34a 则呈表达增加。

2.2.2 HPV16 常见变异位点的致癌性

HPV16 变异体中的某些特定位点的改变能增加肿瘤的易患性。大量文献报道某些位点变异后能增加疾病的易患风险。Rubén López-Revilla 等^[32]在墨西哥圣路易斯发现 1 个 AA 变异 AA-a (5.3%)及 3 个 E 变异: E-P(71.1%), E-T350G(18.4%), E-C188G(5.3%), 未发现非洲变异体。除了 E 变异外, 还发现了 24 处新的核苷酸改变, 其中最常见的是 A334G 变异, A334G 变异在高级别上皮内瘤变和侵袭性宫颈癌内所占比例要高于 E-P 相关的其他变异。作者认为 E-P A334G 变异相比于 E-P 原型更具有致癌性。

许多研究认为 HPV E6 T350G 变异与增加宫颈疾病进展的风险有关。

E6 读码框内第 350 位碱基由 T 变为 G, 密码子编码的第 83 位氨基酸由 L 变为 V(L83V), T350G 突变可以导致重要的编码蛋白改变, 而这些改变的编码蛋白能增强下游信号途径的表达, 如 HPV16 E6 T350G 变异在宫颈癌细胞株中可以增强 MAPK 通路信号, 并且协同 Notch 信号通路和抑制 Ras 介导的转化而导致宫颈癌发生^[3]。HPV18 E6 变异可激活细胞存活和扩增中起重要作用的 Akt/PKB 及 MAPKs 信号通路^[33]。虽然 HPV16 E7 序列变异有限, 但 Song YS 等^[34]发现其中常见的 A647G(N29S)变异与大多数侵袭性宫颈癌有关。本实验发现维族宫颈癌中 HPV16 E6 T350G 变异率最高, 其次的位点为 310、295、135。350 位点的变异可能与维族宫颈癌的发生有关, 而另外这些位点的变异是一过性的自身改变还是有潜在致癌性, 尚需进一步的研究下去。

根据 HPV16 位点的变异情况, 我们可将它们划分为具体的 HPV16 变异体。伴特定 HPV 变异体感染的女性发生宫颈损伤时, 更容易发展为高级别上皮内瘤变(high-grade lesion)。如 XI LF 等报道^[35]HPV16 非欧洲变异体相比于欧洲变异体与疾病进展更有相关性。在巴西宫颈高级别上皮内瘤变中 HPV16E 变异和 AA/Af 变异发病率相似, 而在无症状感染者中 HPV16E 变异数目要高于 HPV16AA 和 Af 变异^[36]。墨西哥的一项研究^[37]显示在宫颈癌患者及伴有更强侵袭力肿瘤的年轻女性中 HPV16 AA 变异相比于 E 变异的感染率更高, 而在对照中 AA 变异则以低频率出现, 这提示我们 HPV16 AA 变异 (AA-a 和 AA-c)可能比 E 变异更有致癌性。

某些 HPV 变异体与癌症组织学类型及发生有关。Lizano 等^[38]调查墨西哥宫颈癌人群发现了与宫颈鳞癌密切相关的 4 种 HPV18A 变异和与宫颈腺癌相关的 6 种 HPV18AA 变异。De Boer 等^[39]研究了印尼、苏里南、荷兰三地区 HPV16、HPV18 感染阳性的宫颈癌病例, 发现 HPV18A 变异特异性地发现于宫颈鳞癌, HPV18AA 变异在宫颈腺癌中占 56%, 在宫颈鳞癌中占 15%($P < 0.006$), 然而在 HPV16 阳性肿瘤中没有发现整合变异和组织病理分型有特异相关性。Koen D.Quint 等^[40]对纽约女性宫颈腺癌和鳞癌研究, 发现在宫颈侵袭性腺癌、HPV16 阳性的原位腺癌、CIN3 和鳞癌中 AA 检出率分别为 41.7%、17.4%、4.1%、2.4%。相比于宫颈鳞癌, HPV16、HPV18、HPV45 AA 变异与宫颈腺癌更有相关性。这说明 HPV16 变异体在宫颈鳞癌形成过程中也起到了重要作用, 只是作用没有在宫颈腺癌中明显, 而且 HPV16 变异体间也表现出了功能差异性。

各个地区有其长期变异中稳定下来的 HPV 变异体, 根据 HPV16 E6 的变异序列, 本地维族宫颈癌中 HPV16 变异体主体属于欧洲变异体, 其中 HPV16 欧洲标准体,

HPV16 欧洲变异体 (EG131) 感染率分别为 28.5% (8/28), 71.5% (20/28)。HPV16 欧洲变异体可能是人口迁移及经商等交流过程中传到此地, 而其变异可能是促成宫颈癌的重要因素之一, 根据朱开春和郭伟鹏研究结果, 我们发现: 维族宫颈癌和哈族食管癌中都有 HPV16 变异, 对 HPV16 变异进行变异体归类后都以 HPV16 欧洲变异体为主。

HPV 病毒感染与宫颈癌的发生已经公认有相关性。许多研究者认为宫颈癌的发生除了与 HPV 基因改变造成的持续感染有关外, 还与机体自身的免疫状态及 HLA 多态性相关。目前发现 HPV 变异与 HLA 多态性之间也能相互影响。

Martha Grodzki 等^[6]报道在法国有 HPV 持续感染(OR, 2.4%; 95%CI, 1.3-4.3)和进展为高级别损伤(OR=4.2%; 95%CI=2.1-8.1)的女性患者相比于其他高危 HPV 感染型更易受到 HPV16 的感染。值得关注的是, 在隐匿有 HPV16 T350G 变异感染的女性中, 感染呈持续进程者(OR=3.0; 95% CI=1.4-6.7)和进展进程者(OR=6.2; 95% CI=2.7-14.3)OR 值明显提高, Koji Matsumoto 等^[41]发现日本女性中 HLA DRB1*1502 与 HPV16 E 变异 D25E 感染呈正相关, 而 HLA II 等位基因与 L83V 变异未发现相关性。这提示 HPV 之所以能够持续感染除了与各民族清除病毒能力差异有关外, 还与民族易感 HPV 变异体类型及 HPV 病毒自身变异导致表达差异, 而发生的免疫逃逸机制相关。Zehbe 等^[42]研究发现女性 DR04-DQ03 单体型与 HPV16 E6 L83V 变异呈正相关, 而瑞典女性比意大利和捷克女性 DR04-DQ03 单体型出现的频率高 3 倍。两年后, Zehbe 等^[43]研究又发现伴 HPV16 E6 变异 L83V 感染的 HLA-B*44、HLA-B*51 或 HLA-B*57 型女性患宫颈癌的风险要比正常女性高 4~5 倍(OR= 3.5, 95% CI =1.1~11.1, OR= 4.2, 95% CI=1.19~14.69 或 OR= 4.67, 95% CI= 1.2~18.6); HLA-B*15 在 HPV16 阳性的宫颈癌组中有缺失, 提示它可能起保护作用, 并认为特异性 HLA I 结合一定的 HPV16 E6 变异在宫颈癌致癌机制中免疫监视方面可能起着关键作用。De Araujo Souza 等^[44]发现宫颈癌中 DRB1*15 与 HPV16 E 变异体、HPV16 AA 变异体感染呈正相关。DRB1*04 同 HPV16 350T 变异感染呈负相关。证实了机体 HLA 多态性与发生宫颈癌的相关性受 HPV16 变异的影响。Corina Helle^[20]通过对 HPV16 E7 变异所做的功能丧失和功能获取研究发现, E7 中第 78, 80, 88 位突变对介导 MHC I 功能抑制起重要作用。

3. HPV16 变异检测方法的选择

对于 HPV 变异的检测方法选择有两种情况: 其一, 对已知目的位点进行检测(杂交法); 其二, 对未知目的位点进行检测(测序法)。前者是要针对某特异位点设计引物, 而后扩增出来, 以明确该位点有没有变异; 后者是设计引物扩增出目的基因全部序列后测序获知该序列中存在哪些位点变异。

3.1 杂交法

3.1.1 反向杂交法(Reverse Hybridization Assay, RHA):

本方法是一种基于等位基因特异性寡核苷酸法之上, 用于检测基因突变或单核苷酸多态性的方法。在原理和方法上可视为杂交法和 PCR、ELISA 的结合, 具有高灵敏度的优点。尤其在基因分型、基因突变检测、病原体的检测等方面有其独特的优势。Koen

D.Quint 等^[45]从纽约搜集宫颈原位腺癌、侵袭性腺癌、宫颈上皮内瘤变III级及鳞状细胞癌组织蜡块,提取 DNA 后用 SPF10-LiPA25 系统进行 HPV 分型,对 HPV16 阳性组织应用 PCR 检测 E6 后经逆向杂交法评估 131, 132, 143 等 11 个位点的突变。此方法可以区分欧洲体和亚洲体、350G、350T、131G 突变等。

3.1.2 TDI-FP 法:

此技术是种在聚合酶链反应基础上具备液相探针杂交及碱基掺入三重特异反应的一种检测新方法,用于基因点突变的检测有突出的优点,引物扩增、探针杂交及荧光素标记碱基掺入三关保证具有极高的特异性与敏感性,另外检测快速且通量高,引物不需特殊修饰,操作简便,成本低廉。樊江波等^[46]用此法检测宫颈癌患者 HPV16 E7 基因 647 位点突变情况,发现此位点可能是 HPV 致癌的高危因素之一,且经测序验证此方法准确性,两者符合率为 100%。

3.1.3 变异特异性杂交(Variant Specific Hybridization, VSH):

以 PCR 为基础的 VSH 可以检测点突变,此方法相比于 PCR-SSCP 在检测靶点变异方面有更高的敏感性。REBECCA T. EMENY 等^[47]报道 VSH 打靶 HPV16 E6 编码区域可以区分已知核苷酸位点变异如 109、131、132 等 11 个位点,且这些位点可以区分 E 体和非 E 体。

3.2 测序法:

3.2.1 PCR-SSCP 筛选后测序:

1989 年日本研究工作者 Orita 等建立了 SSCP 技术。原理:相同长度的单链 DNA 因碱基序列不同或单个碱基不同,所形成的构象就有差异。DNA 单链在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶电泳时,其迁移率除了与自身长度有关外,更取决于 DNA 单链所形成的构象。2008 年, Pablo Moreno-Acosta 等^[48]从宫颈癌活检组织中提取 DNA 后 PCR 扩增出 HPV16E6 基因,后用非放射性 SSCP 技术筛选出 HPV16 变异阳性标本,对其进行提纯后直接测序,发现此方法可用以区分 HPV16E 体和 AA 体。此方法对 PCR 扩增片段长度要求较高,且受多方面因素的影响。在扩增片段小于 400bp 时,通过凝胶电泳分离单链效果较好。扩增 200bp 左右片段时,此方法可检测 90%以上单个碱基的替换,扩增 400bp 左右片段时,此方法可检测 80%左右单个碱基的替换。

3.2.2 PCR 扩增后克隆、测序或直接测序:

DNA 测序是确定变异的金标准。但此方法直接简单,但是费用较高,常应用于样本少及经费足的研究。马正海等^[49]从宫颈癌活体组织提取 DNA 后扩增 HPV16 L1 基因片段,后用从琼脂糖凝胶中回收 PCR 产物并对其测序,另外还构建了 pMD18-T/HPV16 L1 重组质粒,对目的片段进行分子克隆后测序。作者还证实了 PCR 产物直接测序结果与克隆后测序结果一致。但是值得注意的是 PCR 扩增产物扩增出来的是 PCR 片段众多分子混合物的结果,如果有少量的错配发生可反映不出来,即 PCR 直接测序反映了 PCR 所用 DNA 模板的原始状态。克隆后测序所用的是单克隆菌,它会完整的复制所转化进入的序列,但是我们无法保证这个序列在 PCR 过程中不存在错配。

总之,测序法适于发现未知突变,杂交法能更特异地发现已知突变。所以根据以上各种方法的优缺点并结合我们实验的目的,选择了 PCR 纯化后直接双向测序,纯化可去除一些二聚体及杂带的影响,而双向测序最大可能的保证了序列的真实性。

L1 在病毒整合到机体 DNA 中时常发生丢失,而 E6、E7 常能完整的保留下来,所以我们选择 HPV16E6、E7 扩增。在扩增 HPV16 目的片段过程中,发现在宫颈癌全为 HPV16 强阳性标本,其中 HPV16 E6F1R1(214bp)、E6F2P2(343bp)及 E7 正反片段(468bp)扩增出的条带较好,而在食管癌中用同样的实验条件,同为 HPV16 强阳性标本中,2010 年的样本扩增条带亮度可以,年份较前的样本亮度明显变暗,考虑食管癌样本中 DNA 降解或者病毒拷贝数较新年份的低,总体 HPV 负荷量在食管癌不如宫颈癌中高所致。HPV E6、E7 表达与 HPV 病毒 DNA 负荷呈线性相关($P<0.001$)也支持 E6、E7 表达除了与 E2 等基因状态有关外,与病毒基因的拷贝数更相关^[50]。

另外,HPV 常在高分化上皮细胞中有分化,在中到低分化的细胞中常处于潜伏状态,所以不同的组织取材,所得的拷贝数相差较大,且对 PCR 扩增结果也有一定的影响。

样本 DNA 的浓度值可间接反映 HPV 感染的负荷量多少,目前要获知 HPV 负荷量的检测有两种方法:其一,第二代杂交捕获技术(Hybridization capture II, HC-II),其二,实时定量 PCR(Real Time PCR, RT-PCR)。HC-II 采用的是 96 孔平板法,可检测 13 种高危型 HPV,此方法适用于普查且不需特殊条件的实验室,并可对 HPV 进行半定量测定。然而此技术只适于细胞学标本检测,不适于组织学标本检测,不能对 HPV 进行明确分型,且检测费用比较高。两种方法相比较实时定量 PCR 检测技术为佳。HPV 负荷量已成为临床医生确定干预治疗时间的一个指标。大量文献报道 HPV 负荷量与宫颈癌进展程度有关^[51]。本实验挑选的病例皆为亚能公司检出 HPV16 样本,膜芯片技术保证了 HPV16 病毒拷贝数在 10^4 copy/ μ l 以上,而检出强阳性、阳性、弱阳性、极弱阳性,只是拷贝数多少不一。

4. 问题与展望

目前,病毒致癌学说越来越引起大家的重视,HPV16 属于高危致癌病毒,已被公认为是诱发宫颈癌的危险因素之一,且在美国已有 HPV 四价疫苗在临床应用,四价疫苗是针对特异片段设计,而各地区 HPV 变异后是否使片段失去这种特异性,而致疫苗效力下降?值得每个关心此领域的人重视。有文献报道^[16]河南豫北地区 HPV16 感染可能是食管癌和宫颈癌的共同致病因素。而且 HPV16 致癌可能与其免疫逃逸有关,但是变异致癌的机制需要进一步明确,所以本研究对维族宫颈癌及哈族食管癌感染的 HPV16 变异情况做一调查,并比较两种肿瘤中 HPV16 变异情况是不是具有一致性,为后续机制研究做一基础。HPV16 某些高危位点的变异对机体有很大的成瘤危险性。而本实验中这些位点是否变异在食管鳞状上皮中表达会出现何种差异,此种差异是否与哈萨克族食管癌的发生有相关性?这还需要研究者在病毒致癌领域做进一步的研究。宫颈癌中 HPV 致癌机制已经相对完善,通过研究 HPV 在宫颈与食管鳞癌中致病机制进一步明了后,必定可为新疆地区维族宫颈癌、哈萨克族食管癌的预防及治疗提供有力的指导,对其他有 HPV16 感染相

关肿瘤在病因学上也有重要提示意义。

结 论

(Conclusions)

1. 新疆维吾尔族宫颈癌中存在 350、310、295、135 四个 HPV16 变异位点，其中 135 为新发现变异位点。根据变异序列我们发现维吾尔族宫颈癌存在 HPV16 欧洲变异体感染。
2. 哈萨克族食管癌中存在 HPV16 感染，但是未检测到 HPV16 变异，可能与检测技术及样本选择有关。

参考文献

- [1] Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective [J]. *Virology*, 1997, 71(3):2463-2472.
- [2] Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(15):1045-1052.
- [3] Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, et al. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic ras [J]. *J Virol*, 2004, 78(11):5934-5945.
- [4] Quint KD, de Koning Maurits NC, van Doorn L-J, et al. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 117(2):297-301.
- [5] Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, et al. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix [J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 121(1): 32-42.
- [6] Grodzki M, Besson G, Clavel C, et al. Increased Risk for Cervical Disease Progression of French Women Infected with the Human Papillomavirus Type 16E6 -350G Variant [J]. *Cancer Epidem Biomar*, 2006, 15(4):820-822.
- [7] Kalantari M, Villa LL, Calleja-Macias IE, et al. Human Papillomavirus-16 and 18 in Penile Carcinomas: DNA Methylation, Chromosomal Recombination, and Genomic Variation [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(8):1832-1840.
- [8] Tornesello ML, Duraturo ML, Losito S, et al. Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(1):132-137.
- [9] 潘音桦, 陆云飞. 乳腺癌组织中 HPV 病毒超微结构及 DNA 检测的研究 [J]. *国际病毒学杂志*, 2008, 15 (6) : 178-181.
- [10] Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, et al. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer [J]. *Brit J Cancer*, 2005, 93(8):946-948.
- [11] Agrawal Y, Koch WM, Xiao WH, et al. Oral HPV infection before and after treatment for HPV16-positive and negative head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21):7143-7150.
- [12] Boscolo-Rizzo P, Da Mosto MC, Fuson R, et al. HPV-16 E6 L83V variant in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(4): 559- 566.
- [13] 陈明星, 龚惠芸, 陈敏. 新疆伊犁哈萨克自治州五种名族食管癌 10 年间的临床分析 [J]. *中国内镜杂志*, 2002, 8(11):80-81.
- [14] 陈玲, 杨兰, 孙振柱, 等. 人乳头状瘤病毒 16 型与新疆哈萨克族食管鳞癌的相关性

- 研究[J].农垦医学,2008,30(1):1-4.
- [15] 郭伟鹏,卢小梅,赵学信,等.新疆哈萨克族食管癌患者 HPV16 E6 基因的克隆及序列分析[J].新疆医科大学学报,2005,28(4):318-320.
- [16] 刘红彦,袁翎,乔玉环,等.子宫颈、食管鳞状细胞癌人乳头状瘤病毒感染的比较研究[J].临床与实验病理学杂志,2009,25(2):119-126.
- [17] 姜淑清,王涛,土松爱,等.新疆策勒县宫颈癌的流行病学调查研究[J].中国实用妇科与产科杂志,2006,20(5):379-381.
- [18] 陶林.TCT、DNA 定量分析和 HPV 检测对新疆维族宫颈癌的普查研究.[D].石河子大学,2009 年.
- [19] 郝敏,王静芳.宫颈癌流行病学研究与调查[J].国外医学妇幼保健分册,2005,16(6):405-407.
- [20] Munoz N, Franceschi S, Bosetti, et al. Role of parity and human papilloma- virus in cervical cancer: The IARC multicentric case-control study [J]. Lancet, 2002,359(9312):1093-1101.
- [21] 陈明星,龚惠芸,陈敏等.新疆伊犁哈萨克自治州五种民族食管癌 10 年间的临床分析[J].中国内镜杂志,2002,8(11):80-81.
- [22] 耿建祥,王旭波.人乳头状瘤病毒检测及其临床应用.人民卫生出版社 2009,148-152.
- [23] Ethel-Michele de Villiers, Claude Fauquet, Thomas R. Broker et al. Classification of papillomaviruses[J].Virology,2004,324:17-27.
- [24] Keris KrennHrubec, Karima Mrad, Badreddine Sriha, et al. HPV types and variants among cervical cancer tumors in three regions of Tunisia[J]. J Med Virol,2011,83(4):651-657.
- [25] 朱开春,玛依努尔·尼亚孜,刘芳,等.新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 型 E6 基因变异分析[J].临床肿瘤学杂志,2008,13(3):209-212.
- [26] 庞天云,胡新荣,戴世忠.人乳头状瘤病毒引起宫颈肿瘤的病理过程及其机制[J].广东医学院学报,2007,25(1):66-70.
- [27] Burkhardt A, Willingham M, Gay C, et al. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes[J]. Virology 1989,170:334-339.
- [28] Xiaohong Wang, Hsu-Kun Wang, J. Philip McCoy. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein [J].RNA,2009,15:637-647.
- [29] Berezutskaya E B, YU B, MOROZOV P, et al. Differentiation regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein[J]. Cell Growth Differ,1997,8:1277-1286.
- [30] Marta Melar-New and Laimonis A. Laimins, Human Papillomaviruses Modulate Expression of MicroRNA 203 upon Epithelial Differentiation to Control Levels of p63

- Proteins[J]. J Virol, 2010,84: 5212-5221.
- [31] 王巍伟, 刘东, 刘春霞, 等.新疆哈萨克族食管癌 miR-203-15 甲基化与 HPV16 感染关系探讨[J].农垦医学, 2010,32(2):97-102.
- [32] Lopez-Revilla R, Pineda MA, Ortiz-Valdez J, et al.Human papillomavirus type 16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosi City, Mexico [J]. Infectious Agents and Cancer ,2009,4:1-9.
- [33] Contreras-Paredes A, De la Cruz-Herna'ndez E, Mart'inez-Ram'irez I, et al. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway[J].Virology ,2009, 383 (1):78-85.
- [34] Song YS, Kee SH, Kim JW, et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women[J]. Gynecol Oncol,1997,66(2):275-281.
- [35] Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18[J].Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007,16:4-10.
- [36] Sichero L, Ferreira S, Trottier H,et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPV 16 and 18[J].Int J Cancer, 2007,120:1763-1768.
- [37] Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer[J].J Natl Can Inst,2001,93:1325-1330.
- [38] Lizano M, Berumen J, Guido MC, et al.Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1997,89(16): 1227-1231.
- [39] De Boer MA , Peters LA , Aziz MF , et al.Human papillomavirus type 18 variants : Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries[J]. Int J Cancer, 2005, 114(3):422-425.
- [40] Quint KD, de Koning Maurits NC, van Doorn L-J, et al.HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix[J]. Gynecol Oncol,2010,117(2):297-301.
- [41] Koji Matsumoto,Toshiharu Yasugi,Shunsuke Nakagawa, et al.Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer[J].Int J Cancer,2003,106(6):919-922.
- [42] Zehbe I, Mytilineos J, Wikstrom I, et al.Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women[J].Hum Immunol ,2003, 64 (5) :538-542.
- [43] De Araujo Souza PS, Maciag PC, Ribeiro KB, et al.Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer[J].BMC Cancer ,2008,8: 246-255.
- [44] Heller, C., T. Weisser, et al. Identification of key amino acid residues that determine the

- ability of high-risk HPV16-E7 to dysregulate MHC class I expression[J].J Biol Chem. 2011; 1-21.
- [45] Quint KD, de Koning Maurits NC, van Doorn L-J, et al. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix . [J]. Gynecol Oncol, 2010, 117(2):297-301.
- [46] 樊江波, 曲群, 吴静, 等. TDI-FP 法检测宫颈癌组织中 HPV16 E7 基因 647 位点突变 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 7(17):1584-1587.
- [47] Emeny RT, Herron JR, Xi LF, et al. Comparison of Variant-Specific Hybridization and Single-Strand Conformational Polymorphism Methods for Detection of Mixed Human Papillomavirus Type 16 Variant Infections [J]. J Clin Microbio, 1999, 37(11):3627-3633.
- [48] Moreno-Acosta P, Molano M, Huertas A, et al. A non-radioactive PCR-SSCP analysis allows to distinguish between HPV 16 European and Asian-American variants in squamous cell carcinomas of the uterine cervix in Colombia[J]. Virus Genes, 2008, 37(1):22-30.
- [49] 马正海, 张富春, 梅新娣, 等. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒 16 型 L1 基因突变谱分析[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(12):987-991.
- [50] Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, et al. Human papillomavirus type - 16 variants in Quechua aboriginals from Argentina[J]. J Med Virol, 2003, 69 (4):546-552.
- [51] 耿建祥, 王旭波. 乳头状瘤病毒检测及其临床应用. 人民卫生出版社:2009, 165-166.

文 献 综 述

(Review)

人乳头状瘤病毒 16、18 型变异及相关肿瘤

肿瘤的形成可由多种病毒引起^[1],其一就是人类乳头状瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)。HPV 是 1949 年从普通疣体浸出液中首次被观察到,1995 年有研究证实 HPV 感染为宫颈癌的致病病原体。研究显示: HPV16、18 能促使人类鳞状上皮的增生。目前 HPV16、18 变异体的致瘤性受到各国学者的广泛关注。

1 HPV 结构与其分类

人乳头状瘤病毒是直径为 52-55nm 的二十面体病毒,无包膜,由含 72 个衣壳蛋白颗粒的衣壳包绕 DNA 双链构成。HPV 基因包含上游调控区(Long control region, LCR) 及以下开放读码框(Open reading frame, ORF): E 区(E1、E2、E4、E5、E6、E7,负责编码 HPV 复制蛋白); L 区(L1、L2,负责组装 HPV 衣壳蛋白); LCR 区(负责调控病毒基因的复制及转录)。

人们根据未知与已知 HPV 基因组 L1 序列的同源性百分比对前者进行命名: 如两者同源性小于 90%,则为不同型(Type); 两者同源性在 90-98%,则为不同亚型(Subtype); 两者同源性大于 98%,则为变异(Variant)^[2]。

目前已经发现的 HPV 有 200 种,其中 100 种已有描述。根据 HPV 致病性分为高危型和低危型。高危型包括与癌发生相关的 HPV16、18、31、34 型等,低危型包括与良性病变发生相关的 HPV6、11、42、13 型等。据 HPV 感染细胞类型,又可分为表皮型和粘膜型。表皮型感染手足等皮肤的基底细胞层,粘膜型感染肛门生殖器及口咽、呼吸道等部位的粘膜上皮。

目前发现的 HPV 亚型很少,起初被命名为 HPV46 型、HPV55 型和 HPV64 型的型别,由于命名规则的改变,现在认为它们分别是 HPV20,HPV44,HPV34 的真正亚型。另外,关于 HPV68a 和 HPV68b 这一对亚型亦有报道。

对于 HPV 变异的研究主要集中于同宫颈癌有明确利害关系的 HPV16、18 型。目前尚无统一的变异体分支原则,大部分人是根据 E6、L1 序列中 MY09/11 区同源性将 HPV16 分为以下几种变异体(branch): E(European,欧洲体)、As(Asian,亚洲体)、

AA(Asian-American,亚洲-美洲体)、Af 1(African 1,非洲体 1)、Af 2(African 2,非洲体 2) 及 NA 1(North American 1,北美体 1)。

根据 LCR 及 E6、E7 开放读码框序列差异,HPV18 分为以下 3 种变异体分支: E(European,欧洲体)、A(African,非洲体)、AA(Asian-Amerindian,亚洲-美洲印第安体)。根据 LCR 序列差异,HPV6 和 HPV11 分为 HPV6-a、HPV6-b 与 HPV11、HPV11SN1、HPV11G30。

根据碱基位点的改变我们可以将变异体进一步分为变异。根据在 350 位核苷酸碱基为 T

或 G,我们又可以将 HPV16 E 体分为 E-P(European prototype,欧洲原型)变异、E-350T 变异、E-350G 变异。根据 E2 的多态性,可以将 HPV16Ep 进一步分为 Ep-a、Ep-b、Ep-c。

2 HPV 变异致癌机制

2.1 HPV 读码框变异与转录

E2 调控 E6、E7 转录。当 HPV16 E 体基因整合到宿主细胞 DNA 上时,部分病例 HPV16 E2 基因断裂,导致 E6、E7 开始转录,而部分病例表现为 HPV16 E2 表达阳性。这说明 E 体感染致癌途径中 E2 起一定作用。HPV16 E6、E7 表达与 HPV 病毒 DNA 负荷呈线性相关($P < 0.001$)表明 E6、E7 表达除了与 E2 等基因状态有关外,也依赖病毒基因的数目^[3]。E6、E7 变异引起功能上或抗原决定簇区域的改变,可以导致 E6、E7 区编码蛋白的生物、免疫性质改变,这可能与病毒的免疫逃逸机制有关;此外,E6 读码框内第 350 位碱基由 T 变为 G,密码子编码的第 83 位氨基酸由 L 变为 V,改变的编码蛋白能增强下游信号途径的表达,如 HPV16 E6 T350G 在宫颈癌细胞株中可以增强 MAPK 通路信号,并且协同 Notch 信号通路和抑制 Ras 介导的转化导致宫颈癌发生^[4]。HPV18 E6 变异可激活细胞存活和扩增中起重要作用的 Akt/PKB 及 MAPKs 信号通路^[5]。HPV16E6 基因的表达与 microRNA 的表达也有相互影响。2009 年, XiaoHong Wang 等^[6]发现有 HPV 感染的人类原始鳞状细胞中 miR-34a 的表达下调与 HPV 早期 E6 蛋白的表达增高有关,这是因为 E6 使得 p53 这个 miR-34a 反式作用因子不稳定化。通过 siRNA 敲除了 E6 的 HPV16+ 和 HPV18+ 宫颈鳞癌细胞株表达时,导致了 p53 和 miR-34a 的表达递增和 miR-34a 在 G0/G1 期的积累。

虽然 HPV16 E7 序列变异有限,但 Song YS 等^[7]发现其中常见的 A647G (N29S) 变异与大多数侵袭性宫颈癌有关。Marta Melar-New 和 Laimonis A.Laimins^[8]发现 HPV E7 阻断上皮分化过程中 MAPK/PKC 通路依赖性 miR-203 表达的活化。miR-203 的下游靶点有 p63、CARM-1、p21 和 Bax,这些因子在 HPV E7 表达的细胞中有明显增加,与 miR-203 表达呈负相关。当 HPV 阳性鳞状细胞引入高水平 miR-203 表达时可发现有修复基因扩增。高水平表达的 miR-203 能抑制 HPV 扩增,而 HPV 蛋白也可反过来抑制扩增复制的分化细胞中 microRNA 的表达。

HPV 进入细胞需硫酸乙酰肝素糖蛋白介导的病毒体结合到细胞表面,初始的连接只依赖于 L1 而不需要 L2^[9]。L1 主要编码外壳蛋白的表达,此蛋白在免疫识别和疫苗发展方面起着重要作用。L1 基因改变导致氨基酸改变,而影响到 HPV16 L1 蛋白自我加工成类病毒粒子的过程^[10,11]且此变异可以导致用于中和病毒的抗原决定簇内构象的改变^[12],从而逃避机体的免疫反应并造成持续感染,为病毒致瘤提供了基础。

核苷酸变异数目最多的是 LCR,其次是 L1、E6、E7 基因^[13]。LCR 是各种细胞或病毒转录因子结合的位点,这些因子激活或抑制 p97 启动子活化,p97 调控 HPV16 各种基因,尤其是 E6 和 E7 致癌基因的转录。目前 HPV16 变异体的启动子区活性的相互比较已有相关报道^[14]。HPV16 AA、NA、E、Af 体 LCR 变异相互间比较发现,NA1 和 AAc 体相比 E

体可使 p97 启动子活性呈 3 倍增加。在 YY1 结合位点的突变促进 p97 启动子活化的同时消除了 AP1 的活性,因此抑制了 HPV16 转录^[15]。由于在非癌性损伤和无症状携带者没有 YY1 结合位点的突变,因此认为在癌症病例此突变位点的角色还是很重要的^[16]。

2.2 HPV 变异与 HLA 的关系

HPV 病毒感染与宫颈癌的发生已经公认有相关性。许多研究者认为宫颈癌的发生除了与 HPV 基因改变造成的持续感染有关外,还与机体自身的免疫状态及 HLA 多态性相关。目前发现 HPV 变异与 HLA 多态性之间也能相互影响。Zehbe 等^[17]研究发现女性 DR04-DQ03 单体型与 HPV16 E6 L83V 变异呈正相关,而瑞典女性比意大利和捷克女性 DR04-DQ03 单体型出现的频率高 3 倍。两年后,Zehbe 等^[18]研究又发现伴 HPV16 E6 变异 L83V 感染的 HLA-B*44、HLA-B*51 或 HLA-B*57 型女性患宫颈癌的风险要比正常女性高 4~5 倍(OR=3.5, 95% CI=1.1~11.1, OR=4.2, 95% CI=1.19~14.69 或 OR=4.67, 95% CI=1.2~18.6); HLA-B*15 在 HPV16 阳性的宫颈癌组中有缺失,提示它可能起保护作用,并认为特异性 HLA I 结合一定的 HPV16 E6 变异在宫颈癌致癌机制中免疫监视方面可能起着关键作用。De Araujo Souza 等^[19]发现宫颈癌中 DRB1*15 与 HPV16 E 变异体、HPV16 AA 变异体感染呈正相关。DRB1*04 同 HPV16 350T 变异感染呈负相关。证实了机体 HLA 多态性与发生宫颈癌的相关性受 HPV16 变异的影响。Corina Helle^[20]通过对 HPV16 E7 变异所做的功能丧失和功能获取研究发现, E7 中第 78, 80, 88 位突变对介导 MHC I 功能抑制起重要作用。

3 HPV 变异与其相关肿瘤

3.1 HPV 变异与宫颈癌

HPV 变异与宫颈癌的发生及其分化程度、类型关联性各不相同。Koen D.Quint 等^[21]研究发现在宫颈侵袭性腺癌、HPV16 阳性的原位腺癌、CIN3 和鳞癌中 AA 检出率分别为 41.7%、17.4%、4.1%、2.4%。相比于宫颈鳞癌,HPV16、HPV18、HPV45 AA 变异与宫颈腺癌更有相关性。ML Tornesello^[22]等选定侵袭性宫颈腺癌及宫颈鳞癌扩增 E6 特异性片段并直接测序,结果提示 HPV16 在这两种癌组织中都有较高感染率,且 HPV16 AA 体相比于 HPV16 E 体致癌性更高。

感染特定 HPV 型或特定 HPV 位点变异的女性感染更易发展为宫颈癌。HPV16、18 已经明确为高危致宫颈癌病毒。许多研究认为 HPV16 E-350G 变异(L83V)与宫颈持续感染有关,此位点变异也与增加宫颈疾病进展的风险有关。Martha Grodzki 等^[23]报道有 HPV 持续感染(OR=2.4, 95% CI=1.3~4.3)和高级别损伤(OR=4.2, 95% CI=2.1~8.1)的女性更易感染 HPV16 型;其中有 HPV16 E-350G 变异感染的女性中呈持续感染者(OR=3.0, 95% CI=1.4~6.7)和进展损伤者(OR=6.2, 95% CI=2.7~14.3)的 OR 值明显提高。Koji Matsumoto 等^[24]发现日本女性中 HLA DRB1*1502 与 HPV16 E 变异 D25E 感染呈正相关,而 HLA II 等位基因与 L83V 变异未发现相关性。这提示我们,要将 HPV 特定位点变异与家族血统、民族相联系和比较,以决定此变异的危险性程度。

3.2 HPV 变异与其它肿瘤

3.2.1 HPV 变异与阴茎癌

阴茎癌的发生与宫颈癌的发生原理极相似。Mina Kalantari 等^[25]报道在巴西阴茎癌病例中发现 9/17 病例为 HPV16 AA 变异,7/17 病例为 HPV16E 变异。作者将巴西阴茎癌和宫颈癌中的 HPV16 变异体做了比较,认为相比于无症状女性,HPV16 AA 变异体在巴西宫颈癌病例中较高的发生率更加支持了宫颈癌和阴茎癌有相似的病因学的理论。

某些 HPV 变异体与阴茎癌的发生更有相关性。Maria Lina Tornesello 等^[26]发现阴茎癌病例有 HPV16(94.7%)及 HPV18 感染,并对 HPV16 E6、E7、LCR 测序分析发现欧洲体变异 (E-350 G) 和非欧洲体 (AA 和 Af-1) 分别占 44.4%和 55.6%,其中阴茎癌中 HPV16 AA 感染率(44.4%)要高于宫颈癌病例中的感染率(19.4%)。这提示阴茎癌中 HPV16 AA 相比于 HPV16 E 更具有致癌性。

3.2.2 HPV 变异与乳腺癌

潘音桦等^[27]通过透射电镜及 DNA 分子原位杂交发现广西乳腺癌中存在 HPV16、18 感染,且证实乳腺癌中 HPV16、18 感染情况可作为临床判断有无淋巴结转移的一个参考指标。C-Y Kan 等^[28]对澳大利亚乳腺癌患者进行了 HPV 筛查、测序,发现总 HPV 感染率为 48% (24/50),其中 HPV18 E6 有 5 处变异。序列变异位于 Sp1 结合位点,E2 蛋白结合位点 2,E2 蛋白结合位点 1 和 2 之间,第一个起始密码子上游 12bp 区。然而这些区域变异不能更改 SP1 和 E2 蛋白结合基序,碱基对的改变不能更改 E6 氨基酸序列。

3.2.3 HPV 变异与上消化道肿瘤

同为与外界相通的管道,消化道和生殖道都可检出有 HPV 的感染。Yuri Agrawal 等^[29]发现相比于头颈部鳞癌 HPV16 感染阴性者,口腔高危 HPV 感染更易发生于头颈部鳞癌 HPV16 感染阳性者。在口腔灌洗肿物中感染的 HPV16 小部分为 As 变异体(2/19),大多数为 E 变异体 (12/19),其中最常见的是 E-350T(6/19),其次是 E-350G(4/19)和 E-131G(2/19)。作者认为用检测口腔 HPV 来预测局部肿瘤复发的研究设计评估要综合考虑 HPV 型及其变异体感染的情况。Paolo Boscolo-Rizzo 等^[30]发现 HPV16 是口咽喉鳞癌形成的危险因素,并提出其中有 HPV16 L83V 变异的患者需要更加关注。另有研究表明,新疆哈萨克族较汉族食管癌明显高发^[31],且新疆哈族食管癌中 HPV16 感染率为 38.7%^[32]。郭伟鹏等^[33]报道新疆哈族食管癌患者 HPV16 E6 基因大小与德国标准体一致,且 5 例样本 E6 的第 28 位碱基都由 A 突变为 G,编码的氨基酸由精氨酸(AGA)变为甘氨酸(GGA),导致 E6 蛋白降解及 P53 免疫原性及功能改变,但此研究中病例较少,需加大样本量,以明确哈族食管癌 HPV E6 基因改变,进一步完善以明确食管癌的病因学改变。食管癌与宫颈癌的组织结构相似,解剖位置都与外界相通,病程进展也较为相似,两者共同感染的 HPV16 是否是共同的病因尚未可知,但刘红彦^[34]通过 PCR 技术及快速导流杂交基因芯片技术研究河南同地区宫颈鳞癌及食管鳞癌患者的 HPV 感染型别状况,发现同地区两种鳞癌 HPV 感染型别为 HPV16 型,提示 HPV16 可能是两者的共同致病因素。

4 总结

HPV 可导致多种肿瘤,而在各地区相关肿瘤中 HPV 检出率差异较大,明确一个地区 HPV 变异与肿瘤发病的关系,对 HPV 感染相关肿瘤高发区有重要意义。在 HPV 感染率高的肿瘤中明确 HPV 的基因改变及序列变化,在宫颈癌可因地制宜地为当地疫苗的应用提供数据,同时也为当地其他 HPV 相关肿瘤病因学研究提供科研数据。

参考文献

- [1] 孙家郡.病毒感染与肺癌相关性研究.国际病毒学杂志, 2010, 17 (5):149-151.
- [2] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al.Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004,324: 17-27.
- [3] Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, et al.Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aborigines from Argentina. *J Med Virol* ,2003,69 (4):546-562.
- [4] Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, et al.Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic ras. *J Virol* ,2004,78(11):5934-5945.
- [5] Contreras-Paredes A, De la Cruz-Hernandez E, Martinez-Ramirez I, et al.E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* ,2009,383(1):78-85.
- [6] Xiaohong Wang, Hsu-Kun Wang, J. Philip McCoy, Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein.*RNA*,2009, 15:637-647.
- [7] Song YS, Kee SH, Kim JW, et al.Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women.*Gynecol Oncol* ,1997,66(2):275-281.
- [8] Marta Melar-New,Laimonis A. Laimins. Human Papillomaviruses Modulate Expression of MicroRNA 203 upon Epithelial Differentiation to Control Levels of p63 Proteins. *J Virol*, 2010,84: 5212-5221.
- [9] Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, et al.Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview.*Virol J* ,2010,7:11.
- [10]Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, et al.Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles.*J Virol* ,1993, 67(12):6929-6936.
- [11]Touze A, El Mehdaoui S, Sizaret PY, et al.The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system.*J Clin Microbiol* ,1998, 36(7):2046-2051.
- [12]Sichero L, Ferreira S, Trottier H, et al.High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18.*Int J Cancer* ,2007, 120(8):1763-1768.
- [13]Pande S, Jain N, Prusty BK, et al.Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer

- Patients in North India. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(3):1060-1066 .
- [14] Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, et al. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* , 2000, 81(8):1975-1981.
- [15] O'Connor M, Bernard HU. Oct-1 activates the epithelial specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NF1 at a conserved composite regulatory element. *Virology*, 1995, 207: 77-88.
- [16] Seedorf K, Krammer G, Durst M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 1985, 145 (1):181-185.
- [17] Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, et al. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer* , 2001, 94(5):711-716.
- [18] Zehbe I, Mytilineos J, Wikstrom I, et al. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. *Hum Immunol* , 2003, 64 (5) :538-542.
- [19] De Araujo Souza PS, Maciag PC, Ribeiro KB, et al. Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer. *BMC Cancer* , 2008, 8: 246.
- [20] Heller, C., T. Weisser, et al. Identification of key amino acid residues that determine the ability of high-risk HPV16-E7 to dysregulate MHC class I expression. *J Biol Chem*. 2011: 1-21.
- [21] Quint KD, de Koning Maurits NC, van Doorn L-J, et al. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 2010, 117(2):297-301.
- [22] ML Tornesello, S Losito, G Benincasa , F Fulciniti, et al . Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*, 2011, 121(1): 32-42.
- [23] Grodzki M, Besson G, Clavel C, et al. Increased Risk for Cervical Disease Progression of French Women Infected with the Human Papillomavirus Type 16E6 -350G Variant. *Cancer Epidem Biomar* , 2006, 15(4):820-822.
- [24] Koji Matsumoto, Toshiharu Yasugi, Shunsuke Nakagawa, et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer. *Int J Cancer*, 2003, 106(6):919-922.
- [25] Kalantari M, Villa LL, Calleja-Macias IE, et al. Human Papillomavirus-16 and 18 in Penile Carcinomas: DNA Methylation, Chromosomal Recombination, and Genomic Variation. *Int J Cancer* , 2008, 123(8):1832-1840.
- [26] Tornesello ML, Duraturo ML, Losito S, et al. Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer* , 2008, 122(1):132-137.
- [27] 潘音桦, 陆云飞. 乳腺癌组织中 HPV 病毒超微结构及 DNA 检测的研究. *国际病毒学*

- 杂志, 2008,15 (6) : 178-181.
- [28] Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, et al. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Brit J Cancer* ,2005,93(8):946-948.
- [29] Agrawal Y, Koch WM, Xiao WH, et al. Oral HPV infection before and after treatment for HPV16-positive and negative head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008,14(21):7143-7150.
- [30] Boscolo-Rizzo P, Da Mosto MC, Fuson R, et al. HPV-16 E6 L83V variant in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *J Cancer Res Clin Oncol* ,2009,135(4): 559- 566.
- [31] 陈明星, 龚惠芸, 陈敏. 新疆伊犁哈萨克自治州五种名族食管癌 10 年间的临床分析. *中国内镜杂志*,2002, 8(11):80-81 .
- [32] 陈玲, 杨兰, 孙振柱, 等. 人乳头状瘤病毒 16 型与新疆哈萨克族食管鳞癌的相关性研究. *农垦医学*,2008,30(1):1-4.
- [33] 郭伟鹏, 卢小梅, 赵学信, 等. 新疆哈萨克族食管癌患者 HPV16 E6 基因的克隆及序列分析. *新疆医科大学学报*,2005,28(4):318-320.
- [34] 刘红彦, 袁翎, 乔玉环, 等. 子宫颈、食管鳞状细胞癌人乳头状瘤病毒感染的比较研究. *临床与实验病理学杂志*, 2009,25(2):119-126.

致 谢

(Acknowledgements)

三年研究生科研生活转眼即逝，学业业已完成，蓦然回首，思绪万千，完成此研究的不是我自己，而是我们这个实验室的团队。

在此衷心感谢我的导师李锋教授，对我学业上面的谆谆教导，对我生活上的体贴入微，对我科研上的严谨求实。在科研方面，我们现在仍然是一个个懵懂的孩子，李老师为我们这群孩子笑过、恼过，但是更多的时候是耐心地教我们什么才是做科研，面临问题的时候该如何解决，李老师为我们在科研的海洋远行过程中点亮了一盏归岸的灯塔。李老师指点我们大方向，放手让我们想办法去完成目标，激发我们的主观能动性，这既锻炼了我们自己科研的能力，也促进了我们与实验相关人员的人际关系和谐，锻炼了我们为人处事的能力。

感谢常彬、庞丽娟副教授在课题的设计及具体的实施过程中及论文开题、实验及论文写作过程给予的精心指导和热情帮助，感谢尊敬的胡文浩教授、潘晓琳教授、赵谨教授、曹玉文副教授在临床病理诊断学习中给予的指导和鼓励。

感谢李洪安老师、郭长军老师、蒋金芳老师、梁伟华老师在材料准备、资料收集、组织切片以及整个实验过程中给予的大力支持和帮助。感谢附属医院医院病理科郑玉琴老师、李丽老师、沈西华老师、王毅训老师在标本收集和处理过程中给予的大力支持。

感谢师姐杨兰、齐妍、贾薇，师兄胡建明、王巍伟、刘东、纵佩志，同学钟晨在实验及生活中给予的指点和帮助。

感谢尤伟艳、李永康、刘琳、赵春霞、李栋梁、赵娟芳在实验和生活中给予的帮助，感谢 2008 级所有病理研究生实验过程中给予的支持。

感谢常爱敏、崔晓宾、马进、郭涛、赵燕涛、王翠翠、郝晓玲、马志萍在实验过程中给予的支持与帮助。

感激我的第一位老师——父母，是他们将我带到这个世界上，含辛茹苦的抚养大，坎坷上学路中默默的支持，对我人生观潜移默化的影响，使我坚持到现在。

在论文完成之际，向所有指导、关心和帮助我的各位老师、我的家人、朋友和同仁表示最诚挚的感谢！

研究生：王刚刚

2011 年 3 月 28 日

作者简介

王刚刚，男，生于 1982 年 2 月，籍贯山东东营。2007 年毕业于山东大学，2008 年就读于新疆石河子大学医学院病理学与病理生理学专业，研究方向为肿瘤病理学。

在学期间主要参与的研究项目

1. 国家科技支撑计划项目《新疆维吾尔族子宫颈癌早诊早治现场干预研究与应用》(NO. 2009BAI82B02)
2. 国家科技支撑计划项目《新疆哈萨克族食管癌早期防治适宜技术研究与应用》(NO. 2009BAI82B03)
3. 国际科技合作与交流专项(2010DFB34100)(新疆民族高发性 HPV 相关肿瘤的病因学防治应用基础合作研究)
4. 新疆兵团食管癌/贲门癌早诊早治与石河子肿瘤登记项目(2010-2011)(卫生部中央财政转移支付项目)部分工作。

学习期间发表的文章

1. 王刚刚，刘琳，常彬，等. HPV16、18 变异及其相关肿瘤[J].国际病毒学杂志.2011(已录用)
2. 王刚刚，刘琳，尤伟艳，等. 新疆维族宫颈癌中 HPV16E6 进化情况检测[J].石河子大学学报.2011.(已录用)

获奖情况

无

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	王刚刚	学制	三年
专业	病理学与病理生理学	研究方向	肿瘤病理学

学术评语:

人乳头瘤病毒(Human Papillomaviruses, HPV)可以感染皮肤及粘膜组织, 人类是其唯一的宿主, 目前, 已有 118 型 HPV 有所研究, 研究发现 HPV16 变异体分支与人群的地理分布有关。目前 HPV 变异体致癌机制研究正在成为一个热点, 在多种肿瘤中有相关研究, 然而各地 HPV 变异体感染有各自的特点, 明确地区 HPV 变异体的特点可对预防和治疗提供参考。

选取 HPV16 感染阳性维族宫颈癌 40 例、哈族食管癌 51 例; 用德国 HPV16 标准株做阳性对照, 通过 PCR 扩增 HPV16 E6、E7 后测序; 应用 Lasergene、DNASTar、clustal 1.83、Mega 4.1 软件对 HPV16 E6、E7 序列进行比对分析, 并最终生成系统生成树; 检测新疆维族宫颈癌与哈族食管癌中 HPV16 变异情况, 通过构建演化树对 HPV16 变异进行归类, 并以其为参照比较新疆维族宫颈癌与哈族食管癌感染的 HPV16 变异是否具有相似性。(1)维吾尔族宫颈癌中存在 350、310、295、135 四个 HPV16 变异位点, 其中 135 为新发现变异位点。根据变异序列我们发现维吾尔族宫颈癌存在 HPV16 欧洲变异体感染。(2)哈萨克族食管癌中存在 HPV16 感染, 但是未检测到 HPV16 变异, 可能与检测技术及样本选择有关。本研究初步检测了新疆维族宫颈癌和哈族食管癌中 HPV16 变异情况, 并建立了 HPV16 系统生成树, 为新疆维吾尔族宫颈癌和哈萨克族食管癌病因学研究的进一步阐明提供了理论依据。

课题设计合理, 论文撰写条理清楚, 观点明确, 格式规整, 达到硕士研究生毕业论文的要求。

指导教师签字: 

2011 年 6 月 13 日