

新疆大学

硕士学位论文

新疆维吾尔妇女宫颈癌组织中HPV16上游调控区突变及其与宫颈癌发生关系的研究

姓名：余勐

申请学位级别：硕士

专业：动物学

指导教师：张富春

20060530

新疆维吾尔妇女宫颈癌组织中HPV16上游调控区突变及其 与宫颈癌发生关系的研究

宫颈癌是一类严重威胁妇女生命健康的疾病，宫颈癌的发病率和死亡率都很高，并有逐年上升的趋势。高危型人乳头状瘤病毒(human papilloma-virus,HPV)与宫颈癌发病关系密切，在80-90%的宫颈癌组织中可检测到HPV16和/或HPV18的存在，HPV16和HPV18被认为是妇女宫颈癌的主要病原。

流行病学资料表明， HPV感染率很高；高危型HPV 存在变异株，其致癌性有改变。新疆南部维吾尔妇女是宫颈癌的高发区，患病率达459~590/10万。其发病与HPV16感染密切相关，宫颈癌组织中HPV16的检出率达77.6-82.6%。

目前普遍认为病毒癌蛋白E6、E7在病毒诱导癌症形成过程中起着至关重要的作用，而HPV早期基因的表达受HPV URR (upstream regulatory region,URR) 调控，许多转录因子可通过与URR结合调控E6、E7基因的表达，URR突变可改变URR的调控功能，影响病毒癌蛋白E6、E7的表达。

为了探讨新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒16型上游调控区的变异及其与新疆维吾尔族妇女宫颈癌高发之间的关系，从新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织DNA中PCR扩增HPV16 URR DNA片段，PCR产物直接测序或克隆后测序，分析维吾尔族妇女宫颈癌组织HPV16 URR DNA多态性；然后将URR亚克隆至PGL3-Basic中，转染SiHa和HeLa细胞，48小时后检测荧光素酶活性以评估URR突变造成的转录活性的变化情况。测序结果表明：新疆株URR与原型HPV16 URR比较，新疆株HPV16 URR核苷酸多处发生变异。随后的荧光素酶活性分析证明，突变的新疆株URR转录活性均比德国标准株URR的高，其中新疆株xju-7URR区位于YY1结合位点的7792(C→T)突变和xju-4URR区位于YY1和E2结合区之间7449(T→C)突变，可显著提高启动子的转录活性。成组t检验表明，xju-7启动荧光素酶基因表达活性较德国标准株URR有显著差异(P<0.05)。中国

新疆南部HPV16URR发生了变异, HPV16 URR的突变与HPV16的系统发生存在一定关系; 新疆株HPV16 URR区的部分点突变会造成启动子转录活性的提高, 提示新疆维吾尔妇女宫颈癌的高发与HPV16 URR区的突变有关。

POU 家族成员之一 *Skn-1a* 是上皮细胞特异性转录因子, 具有分化依赖性表达和该基因的表达与上皮细胞分化状态相关等特点。研究 *Skn-1a* 有助于探讨具有上皮特异性的 HPV 病毒诱导癌症形成的过程。

利用细胞转染技术探讨 *Skn-1a* 对 HPV16 及 HPV18 癌基因表达调控的规律。首先, 将 pcDNA3-Skn-1a 质粒通过脂质体转染 Hela 和 SiHa 细胞, 48 小时提取细胞总 RNA, 反转录 cDNA, 然后, 以 β -actin 为内标, 半定量 HPV18 E6、HPV16 E6、HPV16 E7 的表达情况。结果显示 *Skn-1a* 能够显著激活 HPV18 E6、HPV16 E6、HPV16 E7 基因的表达。提示 HPV16 和 HPV18 的阳性细胞中病毒致癌基因处于活化状态, *Skn-1a* 对 p97 启动子具有上调作用, 为进一步研究 *Skn-1* 与宫颈癌发生的关系提供了条件。

同时, 检测 HPV16E7 基因在新疆南部维吾尔妇女宫颈癌组织中的突变情况。从新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织 DNA 中 PCR 扩增 HPV16 E7 全长基因, PCR 产物直接测序或克隆后测序。结果表明, 27 个 E7 分离片段中仅 1 个分离株 E7 基因核苷酸发生 2 处突变, 既 647 位 (在 HPV16 基因组中的位置) 的 A→G, 氨基酸由 Asn 变异为 Ser (N29S); 845 位的 T→C, 氨基酸不变。E7 中 N29S 的变异在韩国妇女中会提高 E7 的致癌性, 但在新疆南部维吾尔妇女中仅占 3.7% (1/27), 故认为 E7 的突变与新疆南部维吾尔妇女宫颈癌高发关系甚微。

综上所述, 新疆南部维吾尔妇女宫颈癌的高发与 HPV16 URR 区的突变以及可与 URR 结合并调控 HPV16 早期基因表达的转录因子有关, 而与 E7 的突变关系甚微。

关键词: HPV16 URR; 宫颈癌; 基因突变; *Skn-1a*; E7

Studies on the relationship between the mutation of HPV16

URR from Cervical Carcinoma Biopsies and the occurrence of cervical cancer in Xinjiang Uygur Women

Abstract Cervical cancer is the disease threatened women's life and health seriously, with the increase of its high suffering and death rate annually. High-risk HPVs (human papillomavirus, HPV) is closely linked to the development of cervical carcinomas. HPV16 and HPV18 are considered to be the major pathogenies, as the HPV16 and/or HPV18 found in tested cervical carcinomatous tissues is 80-90%.

The data of cervical cancer epidemiology indicated that the incidence of HPV infection was high, there were variant strains of high-risk HPVs with altered cancer-causing potency. The incidence of cervical cancer was high among Uygur women living in southern Xinjiang and morbidity was 459~590/10,000. The suffering of cervical carcinoma was intimately associated with the infection of HPV16, as HPV16 finding rate in cervical carcinomatous tissues was 77.6- 82.6%.

It is generally considered that the virulent oncoproteins E6/E7 plays critical roles in the formation course of HPV-induced cancer. The expression of HPV early gene was regulated by HPV URR, and the expression of HPV E6/E7 genes were regulated by many transcriptional factors via binding to URR. And mutations in HPV URR can alter its regulation function, thus impacting the expression of E6/E7 oncoproteins.

In order to investigate the relationship between the mutations in HPV16 type upstream regulatory region(URR) of cervical cancerous biopsies from Uygur women and high incidence of cervical carcinoma among Uygur women in southern Xinjiang, total DNA was extracted from cervical cancerous biopsies. Using these DNA as

templates, the DNA fragments of HPV16 URR were amplified by PCR. Then the PCR productions were sequenced either directly or post-clonally, the DNA polymorphism of the HPV16 URR was analysed. To evaluate the variation of transcription activity caused by mutations in URR, the URR was subcloned into plasmid PGL3-Basic, and the activity of luciferase was tested 48 hours after SiHa and HeLa cells had been transfected with the constructed plasmid. Sequencing of the amplified DNA fragments of HPV16 URR indicated that there were dozens of nucleotide mutations in Xinjiang strain's HPV16 URR compared with the HPV16 prototype, which resulted in elevated transcription activity. And more noticeably, two single site mutations-xju-7 URR's 7792(C→T) mutation in the YY1 binding site and xju-4URR's 7449(T→C) mutation between YY1 and E2 binding sites can drastically boost transcription activity of the promoter. And t-test for pooled data revealed that the luciferase activity of xju-7 was significantly different from that of German prototype. These results suggest close the relationship between HPV16 URR mutations and the high infection rate of cervical cancer among Uygur women in southern Xinjiang.

The epithelia cell specific transcription factor *Skn-1a* was one member of the POU transcription factor family, characterized by the differentiation dependent expression and its expression level tightly associated with the epithelia cell differentiation state. Researches on *Skn-1a* will help probe into the epithelia specific HPV-induced cancer formation.

To explore the pattern of HPV16 and HPV18 oncogenes expression regulated by *Skn-1a*, HeLa and SiHa cells were transfected with the constructed plasmid pcDNA3-*Skn-1a* by liposome-mediated approach. The total RNA was extracted in 48 hours, and RNA was reversely transcribed into cDNA. Using the *Skn-1a*

transfected cell-derived cDNA as templates, the expression of HPV18E6、HPV16E6 and HPV16E7 were analysed by semiquantitative PCR with β -actin as an inner standard. The experiment revealed that *Skn-1a* activated the expression of HPV18E6、HPV16E6 and HPV16E7 gene considerably. Indicating the virulent genes were active in the HPV16 and HPV18 positive cells and *Skn-1a* could upregulate p97. These results facilitate further studies on the relationship between *Skn-1a* and the cause of cervical cancer.

At the same time, any mutations in the HPV16E7 gene of cervical cancerous biopsies from Uygur women in southern Xinjiang were detected. HPV16E7 genes were amplified by PCR from the cervical cancerous biopsies DNA. Nucleotide sequences of the HPV16 E7 genes were determined either by direct or sub-cloning sequencing methods to analyze the mutations of HPV16 type E7 gene. The result of PCR showed that there was only one fragment with two mutations among the 27 cases, one was nt647(A→G), resulting in amino acid Ser(N29S) substituted for Asn; The other was nt845(T→C), without variation of amino acids. The E7 N29S substitution associated with a higher oncogenic risk in Korean women. However, there was only 3.7%(1/27) in Uygur Women from southern Xinjiang. So there was little relationship between E7 base changes and high occurrence of cervical cancer in Xinjiang Uygur women.

In general, high occurrence of cervical cancer in Xinjiang Uygur women demonstrated *in vitro* was closely associated with mutations in HPV16 URR and transcriptional factors via binding to HPV16 URR to regulate the expression of HPV16 early gene, and E7 base changes might not contribute to oncogenesis.

Key words: HPV URR; Cervical Cancer; mutation ; *Skn-1a*; E7

英文缩写

AP-1:activator protein 1	激活蛋白 1
AP-2: activator protein 2	激活蛋白 2
C/EBP:CCAAT enhancer binding protein	CCAAT 增强子结合蛋白
CT: Chlamydia trachomatis	沙眼衣原体
DNA:deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EB: Epstein-Barr virus	疱疹病毒
GRE:glucocorticoid receptor element	糖皮质激素反应因子
HCMV:human cytomegalovirus	人巨细胞病毒
HPV:human papillomavirus	人乳头瘤病毒
HSV-II: herpes simplex virus II	疱疹 II 型病毒
KDE: keratinocyte dependent enhancer	角质化依赖增强子
KRF-1: keratinocyte specific transcriptional activator 1	角质化细胞特异转录激活因子 1
PCR :polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PRE:progesterone receptor element	孕激素反应因子
pRB:retinoblastoma tumor suppressor gene product	视网膜母细胞抑制基因产物
RT-PCR:reverse transcription-polymerase chain reaction	反转录 PCR
Sp1:specificity protein 1	特异蛋白 1
Sp3:specificity protein 3	特异蛋白 3
URR:upstream regulatory region	上游调控区

文献综述

人乳头瘤病毒上游调控区调控病毒致癌基因表达的研究进展

HPV 感染与人类的各种良性或恶性病变密切相关,如普通疣、生殖器疣、宫颈癌、口腔乳头瘤、食管癌、非黑色素皮肤癌等^[1]。宫颈癌是死亡率居第二位的妇科肿瘤,全球每年约有 45 万新增病例,20 万例患者死亡^[2],研究显示 90 % 以上的宫颈癌与人乳头瘤病毒的感染有关^[3],其中约 50 % 是人乳头瘤病毒 16 型(HPV16) 感染引起的。HPV 病毒由壳粒排列成立体对称的 20 面体,无脂质包膜结构中心,病毒 DNA 呈环状双链结构,约 8000bp,具有严格的嗜上皮组织特异性和宿主范围。至少有 120 个 HPV 亚种被公认,其中高危型 HPV16 传播最广泛,此外还有 HPV 18,31,33,39,45,52 和 69^[4]。

1 HPV 病毒简介

人类乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)属乳多空病毒科乳头瘤病毒属,是最小的 DNA 病毒。颗粒直径为 50-55nm,由 72 个壳微粒组成的立体对称的 20 面体,在分化状态的细胞中复制;其病毒 DNA 分子为双链环状,并高度螺旋化。可将该病毒大致分成 3 组:生殖道组、疣状表皮发育不良组和粘膜皮肤组,其中约 22 种与人生殖道感染相关。根据其与肿瘤发生的关系又可分为 3 组:①低或无癌风险组,包括 HPV6、11、39、41、42、43、44;②中度癌风险组,包括 HPV31、33、35、51、52;③高度癌风险组,包括 HPV16、18、45、56。

病毒基因组含有 8 000 左右碱基(bp),依其功能不同分三区:早期区(ER)、晚期区(LR)和上游调控区(URR)。HPV 的 ER 区编码六种蛋白,分别为 E1、E2、E4、E5、E6、E7。ER 区 4 kb, E1 参与病毒复制,其编码蛋白具 ATP 依赖性解旋酶活性;E2 参与转录调节,是主要的病毒转录因子;E4 编码晚期胞质蛋白,与病毒成熟有关;E5 具较弱的转化活性;E6, E7 主要与细胞转化及致癌性有关。LR 区编码 L1 和 L2 蛋白,3 kb 左右,存在于病毒复制引起后即增

殖性感染的细胞中,其主要功能组装和稳定病毒颗粒。URR 区 1kb,该区变异程度最大,与病毒基因起始表达和复制有关,也与潜伏感染有关。

2 高危型 HPV 的致癌机理

HPV 是人类肿瘤病毒病因中最为重要的一类病毒。虽然无直接的证据证明 HPV 是人类肛门、生殖器肿瘤的病因,但是,已有足够的证据说明 HPV 与癌变密切相关,例如,在子宫癌、阴茎癌、外阴和肛门周围癌组织中可以有规律地检出 HPV DNA 序列,在发现 HPV DNA 的宫颈癌组织中主要是 HPV16 或 HPV18,在慢性宫颈炎患者的宫颈组织和洗液中,HPV16 的检出率高达 20%~50%;不仅是宫颈癌组织,而且来自宫颈癌的细胞株如 HeLa、SiHa 和 CaSki 均含有 HPV16/18 或其它型别的 HPV DNA。这些易致癌的 HPV 被认为是高危型 HPV。高危型 HPV 的致癌机理可能有以下几方面:

2.1 病毒 DNA 的整合。

已发现 HPV16 DNA 在良性肿瘤内以游离形式存在,而在恶性肿瘤内仅偶见游离形式的 DNA,大都为整合状态,呈串联重复状或单倍整合。整合可发生在 HPV DNA 的不同部位。有报道整合发生在 ORF2 和 L2 之间,缺失 813 bp,而 E6、E7 表达不受影响。有报道整合发生在 E1 和 E2ORF 处, E4 和 E5 完全缺失, L1 和 L2 内部缺失 376 个 bp。有报道在宫颈癌细胞系 SiHa 中整合有 95% 的 HPV16 基因组,整合发生在 E2 和 E4ORF 内,缺失 251 个 bp,并发现病毒整合在第 13 号染色体上。用原位染色体杂交方法检测到 HeLa 细胞上有 HPV18 相关序列的整合,整合发生在异常的 5 号染色体 8q23~q24、9q31~q34、P11~13 处,及 22 号染色体的 q11~q13 处,其中三个位点相当于原癌基因 myc、abl 和 sis 的定位,并且正位于或非常邻近于脆性位点。可见 HPV (16/18) 的整合发生在不同的 ORF 处,造成大小不一的病毒基因序列缺失。同样其整合在染色体上的部位也多种多样^[6]。

2.2 HPV 致癌转化蛋白

2.2.1 E6 ,E7 蛋白的结构

E6 定位于感染细胞的核基质及非核膜片段上,体外表达的E6 蛋白含151个氨基酸,分子量为 18×10^3 ,其主要结构特征是由4个cys-x-x-cys构成的2个锌指结构。其结构功能区分为: I:N端,1~29氨基酸; II:锌指I区,30~66氨基酸; III:中央区(连接区),67~102氨基酸; IV: 锌指II区,103~139氨基酸; V:C端,140~151氨基酸。E7 蛋白定位于核内或附着于核基质上,含98个氨基酸,有 18×10^3 和 16×10^3 两种形式。其功能区分为: I:1~15氨基酸; II:16~37氨基酸; III:38~98氨基酸,锌指及C端区。II区有一结合RB1的关键位点LXCXE(22~26)。

2.2.2 E7 对细胞周期调控的影响

E7与RB1反应是E7转化活性的关键,高危型HPV E7与RB1亲和力很强,结合后使E2F/RB1复合体解离,E2F功能恢复,G1/S期转换所需的基因得以转录。E7还能直接作用于细胞周期重要调节蛋白(CyclinA,CyclinE,cdk2,p21,p27)^[6,7],使细胞周期紊乱。许多研究发现HPV在肿瘤中经E7蛋白采取多种方式(灭活pRB,p107,p130,CKIs;上调PCNA,Cyclins等)来通过G1/S转换关卡,导致细胞无限增殖。放线菌素D经p53介导使细胞周期阻滞在G1期,但在表达HPV16E7的RB(-)胚胎成纤维细胞和角化细胞中,这种阻滞作用被消除^[8],提示E7在某些情况下能消除p53的功能,可能通过E7与p21在p53下游的相互作用介导而实现^[4,7]。

2.2.3 E6 的转化机制

E6结合并降解p53是细胞转化的关键,E6蛋白的N端及锌指I区是作用的关键区,能与细胞内100kD的E6-AP(associated protein)形成具有Ubiquitin蛋白连接酶活性的复合物,进而特异性地结合并降解p53^[9]。但研究发现E6还能通过p53非依赖性途径促使细胞增殖^[10]。E6-BP(binding protein)属细胞内质网的钙结合蛋白,对HPV16 E6复合物的形成是必需的^[11]。

ERC-55 与细胞骨架蛋白paxillin 相似,E6 蛋白与之相互作用能破坏细胞骨架^[12]。E6 尚可通过激活端粒酶和灭活G2关卡使正常细胞永生化或使癌前病变发展为癌^[13,14]。

2.3 其它病原因子对细胞癌变的协同作用

人类乳头状瘤病毒(HPV)、生殖道疱疹Ⅱ型病毒(HSV-Ⅱ)、沙眼衣原体(CT)、人巨细胞病毒(HCMV)、EB 等病原微生物,突变精子的异常 DNA 进入宫颈等上皮细胞均可协同诱发肿瘤形成。人群的生活习惯、性行为、早婚、早育、多产、性生活紊乱、性激素失调,以及尼古丁、其他激素、体质、免疫学因素(HLA 型)等也有利于癌的发生。另外在 HPV16/18/11 型上有孕激素反应因子(PRE)和糖皮质激素反应因子(GRE)。PRE/GRE 是 HPV 基因调节的重要组成部分,在病毒基因复制时起作用,在排卵周期中孕激素和糖皮质激素可以加速受感染细胞癌变。此外,口服避孕药也能增加 HPV 病毒感染的能力^[15]。

3. HPVURR的结构和功能

HPV 病毒 E6, E7 癌基因的表达受 URR 多顺反子转录的调节,它是由 p97 启动子启动。高危型 HPV URRs 已成为众多研究的焦点。这些研究已经表明许多转录因子有与 HPV URRs 结合的作用元件, HPV 早期基因表达受到许多结合到 URR 的细胞因子和病毒因子的调控。HPV URR 在组成上包含一段复杂的、动态的和富集早期基因表达的调控蛋白区域。在 HPV16 URR 大约 800bp 的区域内约有 40 个已知转录因子结合位点,这些位点至少含有 11 种不同的细胞转录因子和病毒因子的结合位点^[16]。

3.1 URR 的结构

URR 由 5' 区,中央区(角质化依赖性增强子区)和 3' 区组成。5' 区包含有晚期转录产物的转录终止位点和多聚腺苷酸化位点^[17],作用于晚期 mRNA 稳定性水平的负调控元件^[18]和一个调控转录的 E2 结合位点^[19]。3' 区含有一个 E1 结合位点,证明是复制起点和转录起点;两个 E2 结合位点;一个 Sp1 位点

与 YY1 位点重叠; 还有 TATA 盒子, 负责前起始复合体的建立和结合。400bp 的中央区的两侧是 E2 的结合位点, 已经证明是上皮特异转录增强子区。然而, HPV 早期基因表达的上皮特异性不是一个或少数几个转录因子的作用结果, 因为已报道的几个重要位点的组合并不足以构成强启动子活性^[20]。

3.2 URR 与转录因子

HPV 角质化依赖性增强子区包含大部分的转录因子结合位点, 这些结合位点以细胞类型特异性方式正向或负向调控 URR 的活性。角质化依赖性增强子区除了能作为上皮特异性增强子以外, 还能通过转录因子与其不同的同源位点结合调控病毒基因的表达, 从而对角质化细胞的不同生理和分化状态做出反应^[16]。在生殖器 HPV 中这些作用元件的序列 (长约 15-31bp) 是高度保守的, 这些作用元件与 Tef-1^[21], Tef-2^[22] 和 Oct-1-NF-1^[23] 复合物的结合调控 URR 的活性。其它反式作用元件如 AP-1 家族成员^[24], CCAAT 置换因子^[25], KRF-1^[26], C/EBP^[27], NF-IL6^[28], Oct-1^[23], YY1^[29], NF1^[30, 23], c-Myb^[31] 和类固醇类受体^[16] 负责调控 HPV E6/E7 基因, NF-1, AP-1, Oct-1, Tef-1, Tef-2 和孕激素/糖皮质激素通过结合到 HPV URR 协同促进病毒转录。相反地, 现已证明 YY1, Oct-1, CCAAT 置换因子 (CDF), NF-IL6, p53 和 C/EBP β 对病毒转录具有下调作用。应用活体印记技术, 在 HPV18URR 中发现了新的可能具有调控 E6 和 E7 转录的增强子和启动子序列, 提示以前还未报道的新因子也能促进 HPV 早期基因的表达^[32]。

细胞间因子, 例如细胞分裂素能够通过调控转录因子和/或相关因子的结合而调节 HPV16 E6/E7 癌基因达表达的信号传导途径调节 HPV URR 的活性。视黄酸 (RA) 能抑制 HPV16 早期基因的表达^[33], 用视黄酸处理 HPV-永生细胞和癌细胞能抑制两者的 HPV 转录, 但是对癌细胞的抑制程度较轻^[34]。γ-干扰素抑制 HPV-永生细胞中 HPV16 早期基因表达^[35]; 而 α-干扰素也能抑制 HPV16 E7 的表达^[36]。

3.3 URR 的变异

HPVURR 较其他基因更易发生变异, 是 HPV16 是基因组的易变区, 自不同病变中分离的 HPV16URR 变异可达到 5%, 而在编码区不超过 2%^[37]。不同地区、不同种族人群中 URR 的变异不同。转录因子与该区段结合可调节转化基因的转录, 其功能的失常在 HPV 相关性肿瘤中的发生中有重要作用。

研究表明: 在 HPV16 和 HPV18 中, URR 角质化依赖性增强子区发生的点突变, 将使其转录活性平均提高 2 倍^[38]。亚裔美洲型 (AA) URR 转录活性的提高主要由于 3' URR 末端 7660-7890 区间碱基的突变所致^[39]; 此后, Kammer C^[40] 等分离的 AA 型和 NA 型 URR 的转录活性分别是德国标准株的 3.3 和 2.7 倍, 并认为主要由于 URR 7619-124 位碱基的突变所致, 而 nt7729 (A→C) 的突变起了主要作用; Tornosello M L^[41] 发现在 Af 型中 URR 出现重排现象, 它的转录活性是德国标准株的 4.23 倍。

HPV16URR 有 31 个 YY1 潜在结合位点, 其中 24 个位点可与纯化的 YY1 蛋白结合, Dong XP 等^[42] 报道, HPV16-URR 序列上 SP1 结合位点 (nt7842-nt7847) 和 YY1 蛋白结合位点 (nt7840-nt7848) 重叠, SP1 与 YY1 竞争性地结合在这一位点上, 该位点上 nt7843 的 A→G 突变可使 p97 活性提高 4-7 倍。同样, YY1 结合位点上 nt7484A→C、nt7488G→A 的突变和 nt7785 C→T 的突变会使其转录活性提高 2-4 倍^[43]。Watts KJ^[44] 等分离得到得突变株 nt7792C→T (YY1 结合位点) 的突变, 同时 nt7676 (Oct-1/PEF-1) 或 nt7894 (PSM) 的突变可大大提高转录活性, 其活性是原型的 7-11 倍。可见, URR DNA 的缺失、突变或重排均可使 E6、E7 转化基因过度表达, 增强其转化细胞的能力, 从而使 HPV16 更易引起宫颈癌。

4. POU 家族及其与 URR 的关系

4.1 POU 家族的概况

POU 名称源于三类哺乳动物转录因子的首字母的缩写, 它们分别是垂体特异性转录因子 Pit-1^[45], 八聚体结合蛋白 Oct-1^[46] 和 Oct-2^[47], 以及线虫中枢神

经转录因子 Unc-86^[48]。这些 POU 基因家族的成员与后面发现的其它成员的共同特点是具有称为 POU 结构域的双向 DNA 结合结构域^[49]。

4.1 POU 家族的功能

POU 转录因子由于参与细胞分化和具有组织特异性表达的特点而格外受研究者的青睐。自从 1988 发现具有 POU 结构域的转录因子以来, 现在已经积累了大量有关 POU 转录因子生物功能方面的知识。目前已知的 POU 转录因子有 40 多种, 它们分布于各种器官系统。皮肤中主要的 POU 转录因子主要有: Oct-1, Tst-1/Oct-6 和 Skn-1/Oct-11^[50]。Oct-1 不具有组织细胞特异性, 在处于增殖期与分化期的角化细胞中都能检测到; Oct-6 和 Skn-1 主要在上基底细胞层中表达; 并且 skn-1 选择性地在表皮细胞中表达^[51, 52, 53]。

在人角化细胞中, Oct-11/Skn-1a 刺激分化标志蛋白 K10 和小 pro-rich 包膜蛋白 SPRR2A 的表达, 而 Oct-6 抑制与增殖相关的 K5 与 K14 基因的表达, 表明 Oct-6 也具有促进分化的功能。然而, 其他人还发现 Oct-6 RNA 存在于所有正常活表皮细胞中, 并且包括 Skn-1a 在内的几种 POU 家族成员能够抑制分化依赖性内皮蛋白启动子。

除此以外, POU 转录因子家族的另外两个 POU 因子 Brn-3a 和 Brn-3b 最初在神经细胞中发现, 后来发现在宫颈细胞中也存在, 并具有调节 HPV16 和 HPV18 基因转录的功能; 这两个转录因子都能直接与病毒的上游调控区结合, 但是两因子发挥着相反的功能。Brn-3a 直接与 HPV 的上游调控区结合刺激 E6/E7 癌基因转录, Brn-3b 则抑制 E6/E7 的表达。P670 启动子在未分化的角化细胞中受到抑制, 在细胞分化时被激活。

4.3 Skn-1a 在 HPV 诱导癌症的作用

POU 结构基因 *Skn-1* 可以通过不同的剪接方式而翻译成三种 Skn-1 异型体, 这些蛋白的 N-末端各不相同, 从而可以适用于各种启动子。在不同的表皮细胞样本、内鳞状上皮细胞和培养的人角化细胞中这些异型体的表达模式各不相同。

Skn-1a和Skn-1d1作为转录激活蛋白高亲和性地与*SPRR2A*八聚体位点结合；而Skn-1d2不能影响*SPRR2A*的表达^[54]。

由于 skn-1a 是上皮细胞特异性转录因子、具有分化依赖性表达的特点^[55]，skn-1a 的基因表达与上皮细胞的分化状态相关， skn-1a 的基因转录产物在处于分化中的上基底细胞中可检测到，而在未分化的基底细胞中检测不到^[56]。对 skn-1a 的研究有助于探讨 HPV 病毒诱导的癌症形成过程。KAZUNORI YUKAWA 等发现 skn-1a 结合到 HPVURR 的启动子临近区域的转录调控区，激活 HPV18 和 HPV16 E6/E7 启动子的转录活性^[57]。即使在非上皮细胞中，异常表达的 skn-1a 也能激发病毒 E6/E7 启动子的活性。而将 skn-1a 在 HPV18 URR 的启动子临近区域的结合位点突变将彻底破坏 skn-1a 对 E6/E7 启动子的转录激活^[56]。对于 P670 启动子而言，分化特异性转录因子 Skn-1a 替换 YY1 结合到 HPV16 的 P670 启动子上将 P670 从抑制状态激活^[57]，激活 P670 启动子转录 E7 癌蛋白^[56]。在 nt 542 处发现启动 E7 mRNA 转录的 P542 启动子，令人吃惊的是 P542 启动子附近-E-框下游与 E7 起始密码子重叠处发现了一个 Skn-1a 结合位点，Skn-1a 与该位点结合并抑制 P542 启动子的活性^[58]。由此可见 Skn-1a 对 HPV 诱导癌症形成的调控非常复杂，但用现有的模式系统研究 hSkn-1a 对 HPV 复制的影响将是很有意义的事。

参考文献

- 1 Zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1288: 55-78.
- 2 Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985 : Implications for prevention and projections of future burden[J]. Int J Cancer , 1993 , 55 (6) : 891 - 903.
- 3 Gerard CM, Baudson N, Kraemer K, Bruck C, Garcon N, Paterson Y, Pan ZK, Pardoll D. Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations on tumor growth[J]. Vaccine , 2001 , 19 (17219) : 2 583 - 2 589.
- 4 zur Hausen, H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in

carcinogenesis[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92: 690-698.

5 Poprdvu NC, Zimonjic D, Dipaolo JA. Viral integration, fragile Sites, and protooncogenes in human meoplasia[J]. Hum Gen, 1990, 84: 383-386.

6 Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein[J]. Oncogene, 1996, 13(11): 2323-30.

7 Funk JO, Waga S, Harry LB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein[J]. Genes and Deve, 1997, 11: 2090-2100.

8 Alani RM, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(1): 330-337.

9 Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells[J]. J Biol Chem, 1998, 273(11): 6439-45.

10 Song S, Gulliver GA, Lambert PF. Human papillomavirus type E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53 independent pathways[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2290-2295.

11 Chen J J, Hong YH, Rustamzadeh E, Baleja JD, Androphy EJ. Identification of an helical motif sufficient for association with papillomavirus E6[J]. J Biol Chem, 1998, 273(22), 13537-13544.

12 Tong X, Howley P M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(9): 4412-4417.

13 Steenbergen RDM, Parker JN, Isren S, Snijders PJF, Walboomers JMM, Meijer CJLM, Broker TR, Chow LT. Viral E6/E7 transcription in the basal layer of organotypic cultures without apparent p21cip1 protein precedes immortalization of HPV 16 and 18 transfected human keratinocytes[J]. J Virol, 1998, 72: 749-757.

14 Snijders J, Duin M V, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Meijer CJ. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA[J]. Cancer Res, 1998, 58: 3812-3818.

15 Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: A review [J]. Int J Gynecol Cancer, 2003, 13: 103-110.

16 O'Connor M, Chan S Y, and Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control regions of genital HPVs, part III-A, p. 21-40. In G Myers, H. U. Bernard, H. Delius, C. Baker, J. Icenogle, A. Halpern, and C. Wheeler (ed.), Human papillomaviruses 1995 compendium[B]. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.M. USA.

- 17 Furth PA, Baker, CC. An element in the bovine papillomavirus late 3' untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels[J]. J Virol, 1991, 65:5806-5812
- 18 Kennedy IM., Haddow JK, Clements JB. A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability[J]. J Virol, 1991, 65:2093-2097
- 19 Romanczuk H, Thierry F, Howley PM. Mutational analysis of cis element involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 p97 and type 18 p105 promoters[J]. J virol, 1990, 64: 2849-2859
- 20 Sailaja G, Watts RM, Bernard HU. Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers[J]. J Gen Virol, 1999, 80:1715-1724
- 21 Ishiji T, Lace MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen T H, Cripe T P, Xiao J H, Davidson I, Chambon P, and Turek L P. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells[J]. Embo J, 1992, 11:2271-2281.
22. Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, and Bernard HU. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription[J]. J Virol, 1991, 65: 5933-5943.
23. O'Connor M, Bernard H U. Oct-1 activates the epithelial specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NF1 at a conserved composite regulatory element[J]. Virology, 1995, 207: 77-88.
24. Nurnberg W, Artuc M, Vorbrueggen G, Kalkbrenner F, Moelling K B, Azarne-tzki M, Schadendorf D. Nuclear proto-oncogene products transactivate the human papillomavirus type 16 promoter[J]. Br J Cancer, 1995, 71: 1018-1024.
- 25 Pattison S, Skainik DG and Roman A. CCAAT displacement protein, a regulator of differentiation-specific gene expression, binds a negative regulator element within the 5' end of the human papillomavirus type 16 long control region[J]. J Virol, 1997, 71: 2013-2044.
26. Mack DH, and Laimins LA. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9102-9106.
- 27 Bauknecht T, and Shi Y. Overexpression of C/EBPbeta represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein[J]. J Virol, 1998, 72: 2113-2124.
28. Kyo S, Inoue M, Nishio Y, Nakanishi K, Akira S, Inoue H, Yutsudo M, Tanizawa O, and Hakura A. NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region[J]. J Virol, 1993, 67: 1058-1066.
29. Jundt F, Herr I, Angel P, Zur Hausen H, and Bauknecht T. Transcriptional control of human papillomavirus type 18 oncogene expression in different cell lines: role of transcription factor

- YY1[J]. *Virus Genes*,1995,11: 53-58.
- 30 Apt D, Chong T, Liu Y, and Bernards H U. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16[J]. *J Virol*, 1993, 67: 4455-4463.
- 31 Nurnberg W, Artuc M, Nawrath M, Lovric J, Stuting S, Moelling K, Czarnetzki BM, and Schadendorf D. Human c-myc is expressed in cervical carcinomas and transactivates the HPV-16 promoter[J]. *Cancer Res*, 1995,55: 4432-4437.
- 32 Bednarek PH, Lee BJ, Gandhi S, Lee E, and Phillips B. Novel binding sites for regulatory factors in the human papillomavirus type 18 enhancer and promoter indentified by in vivo footprinting[J]. *J Virol*, 1998,72: 708-716.
- 33 Han, M A, Jenkins G R, Tolleson WH, Creek KE, and Pirisi L. Retinoic acid inhibition of human papillomavirus type 16-mediated transformation of human keratinocytes[J]. *Cancer Res*, 1993, 53: 905-909.
- 34 Artsch D, Boye B, Baust C, zur Hausen H, and Schwarz E. Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic receptor beta gene in non-tumorigenic and HeLa hybrid cells[J]. *Embo J*,1992, 11: 2283-2291.
- 35 Woodworth CD, Lichti U, Simpson S, Evans CH, and DiPaolo JA. Leukoregulin and gamma-interferon inhibit human papillomavirus- immortalized human cervical cells[J]. *Cancer Res*, 1992,52: 456-463.
- 36 Khan MA, Tolleson W., Gangemi J D, and Pirisi L. Inhibition of growth, transformation, and expression of human papillomavirus type 16 E7 in human keratinocytes by alpha interferons[J]. *J Virol*,1993, 67: 3396-3403.
- 37 Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations[J]. *J Virol*, 1993,67(11):6413-6423.
- 38 Chen Z. Storch K A. Shillito, E J. Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells, and their functional consequences [J]. *Cancer Research*,1997, 57, 1614-1619.
- 39 Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillo-mavirus type 16[J].*J Gen Virol*,1999;80 (Pt 4):1035-43.
- 40 Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity[J].*J Gen Virol*, 2000,81(Pt 8):1975-81.
- 41 Dong XP, Pfister H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16[J].*J Gen Virol*, 1999;80: 2097-2101.
- 42 Tornesello M L, Buonaguro F M, Buonaguro L, Salatiello I, Beth-Giraldo E, Giraldo G. Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of

- human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas[J]. *J Gen Vir*, 2000, 81: 2969–2982.
- 43 Park JS, Hwang ES, Lee CJ, Kim CJ, Rha JG, Kim SJ, Namkoong SE, Um SJ. Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia[J]. *Gynecol Oncol*, 1999, 74(1): 23–9.
- 44 Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR. Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia[J]. *J Clin Microbiol*, 2001; 39(5): 2009–14.
45. Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox- containing protein[J]. *Cell*, 1988, 55: 505–518.
46. Sturm RA, Das G, Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain[J]. *Genes Dev*, 1988, 2: 1582–1599.
47. Muller MM, Ruppert S, Schaffner W, Matthias P. A cloned octamer transcription factor stimulates transcription from lymphoid-specific promoters in non-B cells[J]. *Nature*, 1988, 336: 544–551.
48. Finney M, Ruvkun G. The unc-86 gene product couples cell lineage and cell identity in *C elegans*[J]. *Cell*, 1990, 63: 895–905.
49. Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkun G, Horvitz HR. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products[J]. *Genes Dev*, 1988, 2: 1513–1516.
50. Andersen B, Hariri A, Mark RP, and Rosenfeld MG. Characterization of Skn-1a/i POU Domain Factors and Linkage to Papillomavirus Gene Expression[J]. *J Bio Chem*, 1997, 272: 15905–15913.
51. Andersen B, Schonemann MD, Flynn SE, Pearse RVd Singh H, Rosenfeld MG. Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2-related factors expressed in epidermis[J]. *Science*, 1993, 260: 78–82.
52. Goldsborough AS, Healy LE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Willison KR, Ashworth A. Cloning, chromosomal localization and expression pattern of the POU domain gene Oct-11[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 127–134.
53. Andersen B, Weinberg WC, Rennekampff O, McEvilly RJ, Bermingham Jr JR, Hooshmand F, Vasilyev V, Hansbrough JF, Pittelkow MR, Yuspa SH, Rosenfeld MG. Functions of the POU domain genes Skn-1a/i and Tst-1/Oct-6/SCIP in epidermal differentiation[J]. *Genes*, 1997, 11: 1873–1884.
54. Cabral A, Fischer DF, Vermeij WP, and Backendorf C. Distinct Functional Interactions of Human Skn-1 Isoforms with Ets-1 during Keratinocyte Terminal Differentiation[J]. *J Bio Chem*, 2003, 278: 17792–17799.
55. Kukimoto I, and Kanda T. Displacement of YY1 by differentiation specific transcription

factor hSkn-1a activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16[J]. J Virol, 2001,75:9302-9311.

56. Andersen B, Weinberg WC, Rennekampff O, McEvilly RJ, Bermingham Jr JR, Hooshmand F, Vasilyev V, Hansbrough JF, Pittelkow MR, Yuspa SH, Rosenfeld MG .Functions of the POU domain genes Skn-1a/i and Tst-1/Oct-6/SCIP in epidermal differentiation[J]. Genes,1997, 11:1873-1884.

57. Yukawa K, Butz K, Yasui T, Kikutani H, Hoppe-Seyler F.Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation dependent epithelial factor Epoc-1/skn-1a[J]. J Virol, 1996, 70:10-16.

58. Jacob A G, Christina N H, Jeppe V, Birger S M, Norrild B. A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA[J]. J Gen Virol,2003,84: 3429-3441.

论文第一部分

新疆株人乳头状瘤病毒16型上游调控区DNA多态性

及其功能分析

【摘要】 目的 探讨新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒16型(Human Papillomavirus 16, HPV16)上游调控区(upstream regulatory region, URR)的变异及其与新疆维吾尔族妇女宫颈癌发生的关系。方法 从19份中国新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织标本中提取DNA, 以此DNA为模板, PCR扩增HPV16 URR DNA片段, PCR产物直接测序或克隆后测序, 分析新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织HPV16 URR DNA多态性。构建pGL3-Basic-URR质粒, 将其转染HeLa, SiHa细胞, 48小时后检测荧光素酶活性。结果 PCR检测结果显示宫颈癌组织中HPV16 URR阳性率为89.47%(17/19); 测序和序列分析表明, 与HPV16原型比较, HPV16 URR核苷酸多处发生变异, URR区在核苷酸水平上形成11种突变模式(xju-1~xju-11), xju-1和xju-4突变模式各占23.53%(4/17), 其余各突变模式均占5.88%(1/17), 各模式与HPV16URR原型比较, 同源性在98.50%~99.68%之间。在各位点的突变中, 7192位(G→T)、7520位(G→A)的突变(100%, 17/17)在新疆地区趋于恒定, 该两处突变在亚裔美洲型(AA)中普遍存在, 与病毒感染及宫颈癌发生相关; 7729位(A→C)、7843位(A→G)、7792位(C→T)的突变可显著提高启动子的转录活性; 其余突变尚未见报道, 部分突变为新疆地区分离的HPV16 URR所特有。荧光素酶活性分析表明, URR突变后其转录活性均比德国标准株URR的高, 其中xju-7在SiHa细胞中启动荧光素酶表达的活性是标准株的2.16倍, 在HeLa细胞中是标准株的1.94倍, 成组t检验均有显著差异。结论 中国新疆南部HPV16URR基因发生变异, HPV16 URR的突变与HPV16的系统发生以及新疆维吾尔族妇女高发宫颈癌存在一定关系。

【关键词】 人乳头瘤病毒16型；宫颈癌；上游调控区；多态性

Polymorphism and function analyse of HPV16 upstream

regulatory region from Xinjiang Uygur Women

【Abstract】 Objective To investigate the mutations of Human Papillomavirus 16 type(HPV16)upstream regulatory region(URR) from the cervical cancer biopsies in southern Xinjiang Uygur women, and the relationship between the mutations and the high incidence of cervical cancer in southern Xinjiang. **Methods** The tissue DNA was extracted from cervical carcinoma biopsies. HPV16 URR DNA fragments were amplified by PCR, HPV16 URR DNA segments were sequenced and analyzed. The polymorphism of HPV16 URR DNA was analyzed. **Results** The positive rate of HPV16 URR was 89.47%(17/19) by PCR. These DNAs were sequenced, in comparison with the previously published sequence of the prototype HPV16 URR, some mutations were detected in the URRs. The mutations of all the seventeen HPV16 URR fragments belonged to eleven patterns(xju-1~xju-11)at nucleic acid level, xju-1 and xju-4 each accounted for 23.53%(4/17), and other mutation patterns accounted for 5.88%(1/17) respectively. Their nucleotide sequence homology to the previously published sequence of prototype HPV16URR were 98.50% to 99.68%. There were two mutations, nt7192 (G→T) and nt7520 (G→A), found in all seventeen URR fragments and tended to constantly in the Xinjiang area, The two mutations were ubiquity in the Asian-American type, conferred much more strong infection activity and carcinogenicity to this virus; and the mutations nt7729 (A→C)、nt7843 (A→G)、nt7792 (C→T) could enhance its transcription activity considerably. Other mutations have not yet seen reporting. Partial mutations of Xinjiang area separation HPV16 URR were unique. Analysis of the luciferase activity demonstrated that the transcription activities of all the URR mutated strains were elevated compared with the German prototype. The luciferase activity of xju-7 was 2.16 times higher than the German prototype in SiHa cells, and was 1.94 times

higher than the German prototype in HeLa cells, and t-test for pooled data revealed the discrepancy of the two was notable. **Conclusion** HPV16 type URR genes from cervical carcinoma biopsies in Xinjiang Uygur women had some mutations. It suggested that there were some relationships between the mutations of HPV16 URR and HPV16 phylogeny and the high incidence of cervical cancer in the south of Xinjiang.

【Key words】 Human papillomavirus type 16; Cervical Carcinoma; upstream regulatory region; Polymorphism

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 是一类具有严格宿主范围和嗜组织特异性的小DNA病毒, 主要感染人的皮肤或粘膜上皮细胞, 引起感染部位发生良性和恶性病变。宫颈癌的发生与高危型人乳头瘤病毒的感染密切相关, 超过90%的宫颈癌患者可检测出HPV DNA, 有近50%的患者可检测到 HPV16DNA^[1, 2, 3]。

HPV16 病毒基因组含有 7906 个碱基(bp)[<http://hpv-web.lanl.gov>], 基因组由 3 个部分组成: 早期区(early region, E)、晚期区(late region, L)和上游调节区(upper region of regulation, URR), E 区包含了与转化有关的 E6 和 E7 基因, L 区包括编码病毒衣壳蛋白的基因, URR 含有启动子和多个顺式作用元件, 通过与转录因子的相互作用调节病毒基因表达。

核酸杂交和 HPV16 E6、L1、L2 和 URR 核苷酸序列分析表明, HPV16 存在多态性, 目前, 将世界范围不同种族、不同人群中分离的 HPV16 区分为 5 种主要的种系发生群^[4, 5], URR 是 HPV 变异最多的区域, 该区启动并调控 HPV 癌基因 E6/E7 的表达, 许多细胞因子和转录因子可通过与 URR 结合调控 HPV E6/E7 基因的表达^[6], URR 内顺式作用元件的点突变或缺失突变可改变 URR 的调控功能, 使 E6、E7 转化基因过度表达, 增强其转化细胞的能力, 从而使 HPV16 更易引起宫颈癌。

新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区, 患病率高达459-590/10万, 已

有的调查表明,新疆南部维吾尔妇女高发宫颈癌与HPV16感染密切相关,其宫颈癌组织中HPV16检出率达77.6%~82.6%^[7,8]。我们已报道了新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPV16E6^[9,10]基因、L1基因^[11]及L2基因^[12]的变异情况。本文对新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤16型上游调控区DNA多态性进行分析,并对突变的URR以探讨该区宫颈癌组织中HPV16 URR DNA突变的规律及其突变与该地区宫颈癌高发的可能关系。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌组织标本

采取2002年11月~2003年10月新疆医科大学第三附属医院(新疆肿瘤医院)19例宫颈癌手术或活检标本(经病理检查确诊为宫颈癌),标本采集量约0.8 g,患者均为新疆南部维吾尔族妇女,年龄30岁~66岁,中位年龄50岁,术前未进行放化疗。标本-80℃保存。

1.2 质粒、菌种和细胞

克隆质粒pMD18-T购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒pGL3-Basic, pSV- β -Gal,菌种DH5 α 均为本实验室保存。Hela、SiHa细胞购自上海细胞库。

1.3 主要试剂

基因组提取试剂盒、核酸内切酶、DNA marker、Taq多聚酶、T₄DNA连接酶及PCR片段回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。Dulbecco's Modified Eagle Medium购自GIBCO公司,脂质体Lipofectamine购自Invitrogen公司。

1.4 引物的设计与合成

根据Seedorf等^[13]1985年发表的HPV16型DNA全序列设计引物。上游引物P₁的序列为:5'-gTCCTgAAACATTgCAgTTCTCT-3',下游引物P₂的序列为:5'-gCTTgTgTAACTATTgTgTCA-3'。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.5 宫颈癌组织 DNA 的提取

按 TaKaRa Minibest Animal Tissue Genomic DNA Extraction Kit Ver. 2.0 说明书进行。同时按该法提取 SiHa 细胞基因组。

1.6 PCR 扩增

以宫颈癌组织及 SiHa 细胞 DNA 为模板, 加 HPV16 URR 引物, 按常规方法扩增 HPV16 URR DNA 片段。扩增参数: 95℃5min; 94℃45sec, 55℃30sec, 72℃1min, 35 个循环; 72℃7min。

1.7 HPV16 URR DNA 序列测定及分析

用 PCR 片段回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收 PCR 产物, 分别用 HPV16 URR P1、P2 进行 DNA 测序。用 DNAMAN version 5.2.2 软件对序列进行分析。

1.8 PMD18-T/HPV16URR重组质粒的构建

将7个HPV16 URR PCR回收片段与克隆载体pMD18-T 用T₄DNA连接酶16℃连接过夜, 连接产物转化至*E. coli* DH-5 α 中, 经Amp⁺筛选、增菌培养后提取质粒, 酶切鉴定正确的质粒用pMD18-T载体特异性引物BcaBEST primer RV-M和BcaBEST primer M13-47引物分别测序, 并与同一标本PCR产物直接测序的结果比较, 验证PCR回收片段直接测序的可信度。

1.9 pGL3-Basic-URR质粒的构建

用HindIII和Kpn I 分别酶切重组质粒pMD18-T/URR和pGL3-Basic, 琼脂糖凝胶中回收目的条带。将回收的URR和pGL3-Basic用T₄DNA连接酶16℃连接过夜, 连接产物转化至*E. coli* DH-5 α 中, Amp⁺抗性筛选、增菌培养后提取质粒, 酶切鉴定其正确性。并将以上重组质粒命名为pGL3-B-xju1, xju2, xju3, xju4, xju7, xju9, C。

1.10 细胞转染和荧光素酶活性检测

在含10%新生小牛血清的DMEM中培养的SiHa、HeLa两种细胞接种至24孔板中, 转染前一天, 胰酶消化细胞并计数, 细胞铺板, 使其在转染日密度为70-90%。

细胞铺板在0.5ml含血清,不含抗生素的正常生长的培养基中。按LIPOFECTAMINE 2000转染试剂转染步骤将上述构建的7种(pGL3-B-xju1, xju2, xju3, xju4, xju7, xju9, C)重组质粒(1 μ g)和pSV- β -Gal共转染HeLa, SiHa细胞。并外加一组pGL3-Basic转染HeLa, SiHa细胞作为校正 β -Gal组, 每组重复3次。48h后收集被转染的细胞, 按Promega试剂盒说明书制备裂解液, 对荧光素酶活性进行测定, β -Gal活性测定按Invitrogen公司转染细胞抽提物中测定 β -gal表达的方法进行。

1.11 荧光素酶活性的统计分析

β -gal活性由转染pGL-Basic的HeLa, SiHa细胞进行校正, 7组共转染细胞裂解液中 β -gal活性(OD值)减去转染pGL3-Basic的HeLa, SiHa细胞裂解液中 β -gal活性(OD值)。荧光素酶相对活性为各细胞裂解液荧光强度除以1000倍的校正后 β -gal活性(OD值)。求每组平均值、方差, 利用SPSS9.0软件, 按等方差假设, 对实验组与C组进行两组数据的成组t检验, 求得P值。

2 结 果

2.1 宫颈癌组织中HPV16 URR基因的扩增

19份标本有17份标本为HPV16URR阳性, 图1所示为4份样品PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果, 可见一约为936bp的扩增条带, 其大小与预计相符。

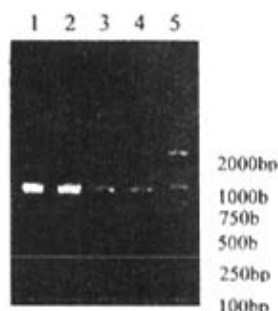


图1 PCR扩增URR结果

Fig.1 Amplication of HPV16 URR

1~4. HPV16 URR PCR products

5. DL2000 marker

2.2 pMD18-T/HPV16 URR 重组质粒的构建

将 HPV16URR PCR 回收片段与克隆载体 pMD18-T 连接, 重组质粒用 *Sal I* 和 *BamH I* 酶切, 酶切得到约 2700bp、600 和 350bp 的三个条带, 与预期相符。

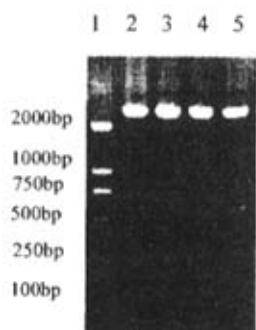


图2 pMD18-T/URR的酶切鉴定

Fig. 2 RE analysis recombinant plasmid pMD18-T/URR

1:DL2000 marker

2-5:pMD18-T/URR digested by *Sal I* and *BamH I*

2.3 HPV16 URR 基因序列测定及一级结构分析

测序结果表明 PCR 扩增得到的均为 HPV16URR 基因, 分离的 HPV16 URR 区全长 936bp, 大小与德国标准株 URR 区一致, 核酸序列发生多处突变。17 个分离株 URR 基因在核苷酸水平形成 11 种突变模式, 分别命名为 xju-1~xju-11, BLAST 和 DNAMAN version 5.2.2 分析表明, 各模式与 HPV16 原型比较, 同源性在 98.50%~99.68%之间, 其中 7192 位 (G→T), 7520 位 (G→A) 的突变在 17 个 HPV 16 URR 分离片段中均存在, 6 个分离片段在 7713 位发生了 T→G 的突变, 在 7167 和 7173 位各有 4 个分离片段发生 A→G 和 A→C 的突变, 3 个分离片段分别在 7203 和 7791 位发生 T→C 和 C→T 的突变, 在 7174 位、7449 位、24 位各有 2 个分离片段发生突变, 7116 位等 21 位点在 1 个分离片段中发生突变。突变模式 xju-1 和 xju-4 均占 23.53%(4/17), 其余突变模式各占 5.88%(1/17), 表 1 显示了 URR 区的突变情况 (见下页)。

表 1 宫颈癌组织中 HPV16 URR 基因序列的变异分析

序列	ref	xju-1	xju-2	xju-3	xju-4	xju-5	xju-6	xju-7	xju-8	xju-9	xju-10	xju-11	Frequency(%)*
位点													
7116	T							C					1/17 (5.88)
7122	T							C					1/17 (5.88)
7128	T					C							1/17 (5.88)
7139	A								G				1/17 (5.88)
7167	A				G								4/17 (23.53)
7173	A				C								4/17 (23.53)
7174	A									C		C	2/17 (11.76)
7176	T											C	1/17 (5.88)
7192	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	17/17 (100)
7200	T											C	1/17 (5.88)
7203	T									C	C	C	3/17 (17.65)
7247	T										C		1/17 (5.88)
7269	C											T	1/17 (5.88)
7286	A											C	1/17 (5.88)
7288	A											C	1/17 (5.88)
7295	T										C		1/17 (5.88)
7428	G											A	1/17 (5.88)
7449	T		C							C			2/17 (11.76)
7493	T								G				1/17 (5.88)
7520	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	17/17 (100)
7560	A								G				1/17 (5.88)
7661	A						G						1/17 (5.88)
7713	T	G							G		G		6/17 (35.29)
7729	A											C	1/17 (5.88)
7780	T											C	1/17 (5.88)
7791	C			T			T	T					3/17 (17.65)
7792	A						G						1/17 (5.88)
7826	T					C							1/17 (5.88)
7841	G											A	1/17 (5.88)
7867	G									A			1/17 (5.88)
24	C										T	T	2/17 (11.76)
Frequency		4/17	1/17	1/17	4/17	1/17	1/17	1/17	1/17	1/17	1/17	1/17	
%+		23.53	5.88	5.88	23.53	5.88	5.88	5.88	5.88	5.88	5.88	5.88	

注释：+该突变模式在 17 个 HPV16 URR 分离片段中出现的频率；* 该点突变在 17 个 HPV16URR 分离片段中出现的频率。

2.4 pGL3-Basic-URR质粒的构建

重组质粒pGL3-Basic/URR用 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切鉴定，酶切得到约 5100bp、950bp 两个条带，与预期相符。表明 HPV16-URR 已插入 pGL3-Basic 载体中。

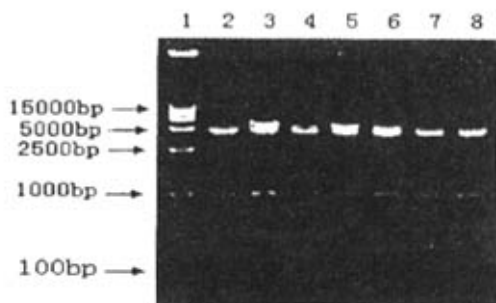


图3 pGL3/URR的酶切鉴定

Fig.3 RE analysis recombinant plasmid pGL3/URR

1:DL2000 marker

2-8:pGL3/URR digested by *Kpn* I and *Hind* III

2.5 荧光素酶活性分析

用 7 种表达质粒转染 SiHa 和 HeLa 细胞, 其中 C 组为德国标准株 URR, 依此为对照。在这两种细胞系中, 发现 6 个 HPV URR 片段均可驱动荧光素酶表达并且高于标准株, 转染 SiHa 细胞系结果见图 4 和表 2, xju-7 启动荧光素酶表达的活性是标准株的 2.16 倍, 成组 t 检验两者有显著差异 ($P < 0.05$); 转染 HeLa 细胞系结果见图 5 和表 3, xju-7 启动荧光素酶表达的活性是标准株的 1.94 倍, 成组 t 检验二者差异显著 ($P < 0.05$)。

表2 荧光素酶活性检测结果 (SiHa)

	xju-1	xju-2	xju-3	xju-4	xju-7	xju-9	C
1	1.23	0.75	0.5	1.18	1.53	0.67	0.86
2	0.69	0.62	0.65	0.96	1.59	0.94	0.44
3	1.35	1.37	1.26	0.64	1.86	0.81	1.11
平均值	1.09	0.91	0.80	0.93	1.66	0.81	0.77
方差	0.12	0.161	0.16	0.07	0.03	0.02	0.11
P(双尾)	0.367	0.735	1.000	0.648	0.026	0.998	

1-3: 试验重复; P(双尾): 实验组与 C 组进行等方差成组 t 检验所得

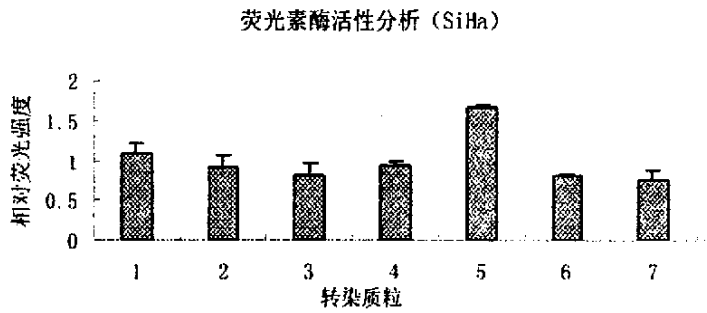


图4 荧光素酶活性检测结果 (SiHa) 柱状图

Fig4 Luciferase activities in transfected SiHa cells with different recombinant plasmids

- 1: transfected SiHa cells with pGL3-B-xju-1
- 2: transfected SiHa cells with pGL3-B-xju-2
- 3: transfected SiHa cells with pGL3-B-xju-3
- 4: transfected SiHa cells with pGL3-B-xju-4
- 5: transfected SiHa cells with pGL3-B-xju-7
- 6: transfected SiHa cells with pGL3-B-xju-9
- 7: transfected SiHa cells with pGL3-B-xju-C

表3荧光素酶活性检测结果 (HeLa)

	xju-7	xju-9	C
1	3.59	2.95	1.3
2	3.16	1.45	1.53
3	2.58	2.29	1.96
平均值	3.11	2.23	1.6
方差	0.26	0.56	0.11
P(双尾)	0.0125	0.253	

1-3: 试验重复; P(双尾): 实验组与C组进行等方差成组t检验所得

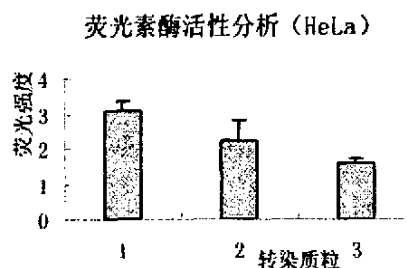


图5 荧光素酶活性检测结果 (HeLa) 柱状图

Fig5 Luciferase activities in transfected HeLa cells with different recombinant plasmids

- 1: transfected HeLa cells with pGL3-B-xju-7;
- 2: transfected HeLa cells with pGL3-B-xju -9;
- 3: transfected SiHa cells with pGL3-B-xju-C;

讨 论

宫颈癌是一类严重威胁妇女生命健康的疾病, 宫颈癌的发病率和死亡率高, 并有逐年上升的趋势。高危型人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与宫颈癌发病关系密切, 在 80-90%的宫颈癌组织中可检测到 HPV-16 和/或

HPV-18 的存在, HPV 16 和 HPV 18 被认为是妇女宫颈癌的主要病原^[1~3]。然而, HPV 的存在并不是引发妇女宫颈癌的充分条件, 在一些正常的或轻微异常的宫颈癌组织中也可检测到 HPV 16、HPV 18 的存在, 很多感染者无临床症状, 病毒在体内呈潜伏状态, 已有的研究表明病毒的变异、病毒的持续性感染和反复感染、病毒 DNA 拷贝数以及机体的免疫状态等因素与高危型 HPV 感染者发展为宫颈癌相关, 其中病毒的持续性感染和反复感染以及病毒 DNA 在宫颈组织中的高拷贝数可由高危型 HPV 的型内变异引起^[14, 15]。

URR 包含 E6 前端的 P97 启动子, 启动 HPVE6/E7 致癌基因的转录, 同时, URR 还含有多个细胞因子和转录因子结合位点, AP1、GRE、NF1、NF-IL6、OCT-1、SP1、TEF-2、YY1 等多种细胞因子对 URR 区的启动子具有激活或抑制作用。URR 的突变可通过阻遏子结合位点的缺失和激活因子结合能力的增强而增强 URR 区的启动活性。

本研究通过PCR扩增得到新疆株HPV16 URR片段, 大小为936bp, 与德国标准株URR区一致。17个分离株URR基因序列与德国标准株相比发生了多处点突变, 共计31个位点的81个核苷酸发生了突变, 在核苷酸水平形成11种突变模式, 各模式与HPV16原型比较, 同源性在98.50%~99.68%之间, 之前曾对该19份病料中的E6基因、L1基因和L2基因的突变进行检测, 与HPV16原型比较, 其同源性分别在99.56%~99.78%、99.69%~99.87%和99.37%~99.79%之间, 说明URR区的突变较早期基因和晚期基因的突变更为频繁。在11种突变模式中, xju-1和xju-4各占23.53%(4/17), 其余突变模式各占5.88%(1/17), 表明从系统发生学而言, HPV16 URR在新疆地区有形成主流突变模式的趋势, 但又存在大量散在的突变。

在各位点的突变中, 7192位(G→T), 7520位(G→A)的突变在17个HPV 16 URR分离片段中均存在, 该两处的突变与Veress G^[16]等人在1999报道的AA型分离株变异一致, 与Kurvinen K^[17]等报道的7193位(G→T), 7521位(G→A)实为同一突变(参考序列不同); Park JS^[18]等从韩国妇女宫颈癌变组织中分离得到的

URR也发生了 7520位(G→A, 100%, 37/37)的突变, 说明该两处的突变在亚裔美洲型(AA)中是普遍现象, 这两处的突变在新疆地区趋于恒定, 与病毒的种系发生有关。Schmidt M^[19]等从波兰宫颈癌患者分离得到的HPV16URR片段均发生7520位(G→A)的突变, 并认为是宫颈癌患者与无症带菌者主要的区别, 与标准株相比, 这两处突变的病毒株显示出更强的侵染活性, 突变株的转录活性略高于标准株^[16], 提示该两处的突变与新疆地区妇女高发宫颈癌可能存在一定的关系。

据报道^[16], 亚裔美洲型(AA)URR转录活性的提高主要由于3' URR末端7660-7890区间碱基的突变所致, 此后, Kammer C^[20]等分离的AA型和NA型URR的转录活性分别是德国标准株的3.3和2.7倍, 并认为主要由于URR 7619-124位碱基的突变所致。在17个分离的URR片段中, 此区间内有9个位点的16个核苷酸发生了突变, 其中有一些突变已有报道, 如此区间7729位(A→C)突变的URR的转录活性是标准株的2-4倍^[18]; 位于YY1结合位点的7792位(C→T)突变可显著提高启动子的转录活性^[21], 该两处突变分别存在于分离URR片段的xju-11和xju-6突变模式中。Dong XP等^[22]报道, HPV16-URR序列上存在SP1结合位点(7842nt-7847nt)和YY1蛋白结合位点(7840nt-7848nt), SP1与YY1竞争性地结合在这一位点上, 该区段上7843的A→G突变可使p97活性提高4-7倍, 在xju-11突变模式中发生的7841(G→A)突变亦位于SP1和YY1结合位点, 该突变可能改变p97启动活性。Picconi MA^[23]等在亚裔美洲型(AA)的一支分离AQ-51中发现了7841位(G→A)突变, 该突变在韩国妇女中也较普遍^[18]。

荧光素酶活性分析表明新疆株URR突变后, 其转录活性均比德国标准株URR的高。其中, 含有7791位(C→T)突变的xju-7表现出较高的转录活性, 结果与Park JS^[18]和Watts KJ^[21]报道的7792位(C→T)突变可显著提高启动子的转录活性相似, 所以, 新疆株URR区位于YY1结合位点的7791位(C→T)突变同样可显著提高启动子的转录活性。xju-2也具有较高的荧光素酶活性, 与其它突变模型

相比, xju-2含7449位(T→C)特殊的突变, 其它各株均无该突变。此突变位点与YY1和E2 结合区之间, 提示此区域的位点突变将大大影响URR的转录活性。

总之, URR的突变谱进一步表明新疆株HPV16属亚裔美洲型(AA), 其中一些突变与病毒的感染和宫颈癌的发生相关, 一些突变可提高病毒基因的转录水平。其余突变尚未见报道可提高病毒基因的转录水平, 其中7116、7122、7128、7176、7203、7247、7295、7428、7449、7493、7713位的突变为新疆地区分离的HPV16 URR所特有, 提示新疆株HPV16发生存在独立性, 新疆株HPV16 URR区的突变与HPV16的系统发生以及新疆维吾尔族妇女宫颈癌的发生有关。同时, 部分新疆株HPV16 URR区的突变会提高启动子的转录活性, 这便会增加癌基因E6/E7的表达, 从而提高感染细胞的转化和癌变几率, 提示新疆维吾尔妇女宫颈癌的高发可能与HPV16 URR区的突变有关。

参 考 文 献

- 1 Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2003,88(1):63-73.
- 2 Hwang TS, Jeong JK, Park M, Han HS, Choi HK, Park TS. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray[J]. Gynecol Oncol, 2003,90(1):51-56.
- 3 Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities[J]. Int J Cancer. 1996,69(5):364-368.
- 4 Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective[J]. J Virol, 1997,71(3):2463-2472.
- 5 Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments[J]. J Virol, 1995,69(12):7743-7753.
- 6 Arany I, Grattendick KJ, Whitehead WE, Ember IA, Tying SK. A functional interferon regulatory factor-1 (IRF-1)-binding site in the upstream regulatory region (URR) of human papillomavirus type 16[J]. Virology, 2003, 310(2):280-286.
- 7 李庭芳,古丽那,库尔班,王涛.新疆伽师县夏普桃勒乡妇女宫颈癌防治的研究[J].新疆医

学院学报,1996,19(3):199~203.

8 拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班, Amy E Noffersinger. 维吾尔妇女子宫颈癌中 p53 基因的表达和 HPV DNA 检测研究[J]. 新疆医学院学报, 1997, 20(2): 77-81.

9 马正海, 钱东, 马纪, 林任勇, 阐明, 钟哲, 张富春, 张秋云. 中国新疆维吾尔妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒 16 型 E6 基因的克隆和序列分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 38(3): 399-404.

10 马正海, 梅新娣, 张富春. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 E6 基因突变分析[J]. 癌症, 2004, 23 (9): 1016~1020.

11 马正海, 张富春, 梅新娣, 马彩玲, 刘开江. 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.

12 马正海, 梅新娣, 张富春. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 L2 基因多态性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12): 968- 972.

13 Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. Virology, 1985, 145(1):181-185.

14 Hwang TS, Jeong JK, Park M, Han HS, Choi HK, Park TS. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray[J]. Gynecol Oncol, 2003, 90(1):51-56.

15 Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, Lapointe N, Forest P, de Ladurantaye M, Roger M. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9):3388-3393.

16 Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16[J]. J Gen Virol, 1999, 80 (Pt 4):1035-1043.

17 Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(11):1402-1410.

18 Park JS, Hwang ES, Lee CJ, Kim CJ, Rha JG, Kim SJ, Namkoong SE, Um SJ. Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia[J]. Gynecol Oncol, 1999, 74(1):23-29.

19 Schmidt M, Kedzia W, Gozdzicka-Jozefiak A. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers[J]. J Clin Virol, 2001, 23(1-2):65-77.

20 Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity[J]. J Gen Virol, 2000, 81:1975-1981.

21 Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR. Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia[J]. J Clin Microbiol, 2001,

39(5):2009-2014.

22 Dong XP, Pfister H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16[J].J Gen Virol,1999, 80:2097-2101.

23 Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, Mbayed V, Villa LL, Gronda J, Campos R, Teyssie A. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina[J].J Med Virol,2003, 69(4):546-552.

论文第二部分

***Skn-1a* 转录因子激活 HPV E6/E7 致癌基因的表达**

摘要: 目的 人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus HPV) 是一类具有严格宿主范围和嗜组织特异性的小 DNA 病毒, *Skn-1a* 是调控上皮细胞分化的转录因子, 它可以通过与 HPV URR 区启动子的结合激活 HPV 早期基因的表达, 继而促进细胞的癌变。将 *Skn-1a* 的真核表达质粒通过脂质体转染 HeLa 和 SiHa 细胞, 探讨 *Skn-1a* 对 HPV18 及 HPV16 癌基因表达调控的规律。方法 将 pcDNA3-*Skn-1a* 质粒通过脂质体转染 HeLa 和 SiHa 细胞, 48 小时提取细胞总 RNA, 反转录 cDNA, 以 β -actin 为内标, 半定量 HPV18E6、HPV16E6、HPV16E7 的表达。结果 *Skn-1a* 能够显著激活 HPV18 E6、HPV16E6、HPV16E7 基因的表达, 为进一步研究 *Skn-1* 与宫颈癌发生的关系提供了条件。

关键词: 人乳头瘤病毒; *Skn-1a*; 癌基因

Transcription factor *Skn-1a* activates the expression of Human papillomaviruses E6/E7 genes

Abstract: Objective Human papillomaviruses (HPV) are small DNA viruses that have strict host specificity and tissue specificity. *Skn-1a* was a POU transcription factor that regulated the differentiation of epithelia. *Skn-1a* activated the expression of HPV early gene via binding to promoters within HPV URR, thereby promoting cancer. Constructing eukaryotic expression plasmids with *Skn-1a*, then transfecting HeLa and SiHa cells by liposome-mediated method. So as to study how *Skn-1a* influenced the expression of HPV18 and HPV16 oncogenes. Method HeLa and SiHa cells were transfected with the constructed plasmid pcDNA3-*Skn-1a* by Liposome-mediated method. Then extracted total RNA in 48 hours, and reverse transcribed RNA into cDNA. Semiquantitative PCR analysed the expression of

HPV18E6、HPV16E6 and HPV16E7 with β -actin as inner standard, the *Skn-1a* transfected cell-derived cDNA as templates. **Results** *Skn-1a* activated the expression of HPV18 E6、HPV16E6 and HPV16E7 gene considerably. Facilitating further studies on the relationship between *Skn-1a* and the cause of cervical cancer.

Key words: Human papillomavirus; *Skn-1a*; oncogene

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 是一类具有严格宿主范围和嗜组织特异性的小DNA病毒, 主要感染人的皮肤或粘膜上皮细胞, 引起感染部位发生良性和恶性病变。能够引起宫颈恶性病变的人乳头瘤病毒称为高危型人乳头瘤病毒 (high-risk HPV), 包括: HPV16, 18, 31, 33和 45型。宫颈癌的发生与高危型人乳头瘤病毒的感染密切相关, 有99.7%的宫颈癌患者可检测出 HPV DNA, 有近50%的患者可检测到高危型HPV-16DNA^[1]。

HPV16病毒基因组含有7906个碱基(bp) [<http://hvp-web.lanl.gov>], 基因组由3个部分组成: 早期区(early region, E)、晚期区(late region, L)和上游调节区(upper region of regulation, URR), E区包含了与细胞转化有关的E6和E7基因, L区包括编码病毒衣壳蛋白的基因, URR含有启动子和多个顺式作用元件, 通过与转录因子的相互作用调节病毒基因表达。

目前普遍认为病毒癌蛋白E6、E7在病毒诱导癌症形成过程中起着至关重要的作用。通过特异破坏HPV16E6/ E7的mRNA可以阻止细胞永生化^[2], 表明E6、E7基因在细胞的永生化和肿瘤表型的发展、维持方面起重要作用。E6通过E6AP-泛素途径降解p53蛋白, 因此在高危型HPV16“永生化”细胞和宫颈癌细胞中, p53蛋白含量比正常细胞要低2~3倍, 半衰期则从几个小时降到20min左右^[3], 并使p53蛋白控制的G1/S节点失去控制; 而E7高亲和地与pRB结合使pRB蛋白失活, 破坏E2F/ pRB复合体, G1/ S期转换所需的基因得以转录^[4]。p53和pRB在调控细胞周期和细胞凋亡方面起着重要作用, 它们的失活造成这些调控机制

失活,从而HPVE6/E7为基因突变的积累和突变细胞的存活提供了条件。除此以外,研究发现E7还能直接作用于细胞周期重要调节蛋白CyclinA, CyclinE, cdk2, p21 和p27^[5,6],使细胞周期紊乱;E6 还能通过p53 非依赖性途径促使细胞增殖或通过激活端粒酶和灭活G2关卡使正常细胞永生化或使癌前病变发展为癌^[7],导致细胞染色体不稳定和基因突变增加以及外源DNA 整合到染色体中机率大大升高。

人乳头瘤病毒感染人皮肤或粘膜的基底上皮细胞,在这些细胞中其基因组以极低转录活性的附加体状态存在,且拷贝数量极少。基底层细胞分裂产生子代细胞转移到上皮细胞的上层并经历了末端分化。基底层细胞分化至最外层角质细胞过程为10到14天,在此期间,随着表皮细胞的分化,基底上层细胞中病毒DNA的复制和早期基因的转录水平逐渐提高^[8]。病毒的复制及新病毒的产生与上皮细胞的分层和分化成平行关系。然而,在细胞分层和分化过程中,病毒必须复制基因组和结构蛋白以形成新的病毒颗粒。相矛盾的是,病毒基因组在细胞中的扩增是一个死亡丢失的过程。同时,分化细胞中不含有病毒复制所需的组分。因此,病毒必须刺激细胞返回细胞分裂周期进入细胞周期S相。病毒早期蛋白E6、E7、E5是刺激细胞进入S相和病毒复制的必要条件。所以,调控上皮细胞的分层、分化和病毒早期蛋白的表达同步。

病毒早期蛋白的表达、病毒颗粒的复制与上皮细胞分层分化的紧密同步关系无疑给研究者提供了研究调控病毒早期蛋白表达的线索。人们推测病毒可能利用调控基底上皮细胞分层分化的转录因子调控病毒早期蛋白表达。有报道转录因子YY1、skn-1a 和 CDP 参与了分化依赖型 HPV 基因表达^[8,9,10]。其中 POU 转录因子因组织特异性表达、决定细胞特异性和在发育中起着重要作用而尤其引人注目。这些 POU 基因家族的成员与后面发现的其它成员的共同特点是具有称为 POU 结构域的双向 DNA 结合结构域^[11]。Skn-1a, Oct-1 和 Tst-1 都是八聚体结合 POU 蛋白,它们结合的靶序列通常是 5-ATGCAAAT-3^[12], Oct-1 作为转录因

子广泛存在各种细胞中,而 Skn-1a 只在上皮细胞中表达,对上皮细胞和角化细胞的分化起着十分重要的作用^[13]。Bogi Andersen 等发现 Skn-1a 和 Tst-1 都能通过八聚体-DNA 结合结构域(POU 结构域)激活 HPV-1A 的 E6 启动子^[14]。研究发现用分化特异性转录因子 Skn-1a 替换 YY1 能够激活 HPV16 的 P670 启动子,该启动子正位于 E7 开放阅读框中,在未分化的角化细胞中因 YY1 结合而受到抑制,细胞分化时被激活,推测 Skn-1a 取代 YY1 结合到 P670 上而启动病毒粒子复制^[9]。

我们将 skn-1a 亚克隆至 pcDNA3.1 上,命名为 pcDNA3-skn-1a. 通过脂质体介导转染至 HeLa 和 SiHa 细胞,探讨 Skn-1a 对 HPV18 及 HPV16 癌基因表达调控的规律。为进一步研究 *Skn-1* 与宫颈癌发生的关系提供条件。

1. 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞和质粒

HeLa 细胞、SiHa 细胞、pcDNA3, 含转录因子 Skn-1a 的真核表达载体 pcDNA3-Skn-1a、DH5 α 菌种均为本室保存。

1.1.2 酶和试剂

反转录酶(AMV), rTaqE 均购自大连宝生物工程公司。Dulbecco's Modified Eagle Medium 购自 GIBCO 公司,脂质体 Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司。小牛血清购自上海生工生物工程技术有限公司,其余常用试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物设计与合成

根据已发表的 HPV16E6, HPV16E7 和 HPV18E6 基因的序列设计下列引物, HPV16E6P1 的序列为: 5'-CACAggAgCgACCCAgAAA-3', HPV16E6P2 的序列为: 5'-gACCATACATCgACCggTCCAC-3', HPV16E7P1 的序列为:

5'-CACgTAgAgAAACCCAgCTgTAA-3', HPV16E7P2 的序列为:
5'-gCAggATCAgCCATggTAGATT-3',

HPV18E6P1的序列为: 5' -CCAgAAACCGTTgAATCC-3',

HPV18E6P2的序列为: 5' -gTCCATgCATACTTAATA-3'。依据已发表人类 β -actin基因的序列设计以下引物, β -actinP1: CTggAACggTgAAggTgAC, β -actinP2: TgCATTgTTACAggAAgTCCCT。引物由大连宝生生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取与定量

碱裂解法大提质粒pcDNA3, pcDNA3-Skn-1a, PEG4000纯化, 用紫外分光光度仪检验其纯度并进行定量, 然后将pcDNA3, pcDNA3-Skn-1a质粒稀释至 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.2.2 细胞转染

在含 10%新生小牛血清的 DMEM 中培养的 SiHa、HeLa 细胞接种至 24 孔板中, 转染前一天, 胰酶消化细胞并计数, 细胞铺板, 使其在转染日密度为 70-90%。细胞铺板在 0.5ml 含血清, 不含抗生素的正常生长的培养基中。按 LIPOFECTAMINE 2000 转染试剂转染步骤将质粒 pcDNA3, pcDNA3-Skn-1a 转染两种细胞。48h 后收集被转染的细胞, 提取总 RNA。

1.2.3 总RNA的提取

每孔加 $200 \mu\text{l}$ TRIzol, 反复吹吸, 吸至 1.5ml EP管中混匀, 室温放置5分钟; 加 40ml 氯仿, 盖紧EP管, 摇匀, 室温放置2-3分钟; 4°C , 12000rpm, 离心15min, 取上清于 1.5ml EP管中; 加 $100\mu\text{l}$ 异丙醇, 室温放置10分钟; 4°C , 12000rpm, 离心10min, 弃上清; 用 150ml 75%乙醇洗沉淀, 4°C , 7000rpm, 离心5min, 弃上清室温干燥; 加 $30\mu\text{l}$ DEPC水溶解, 放置低温冻存。琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量。

1.2.4 RT-PCR

以宫颈癌组织总RNA为模板, oligo(dT)18为引物进行RT-PCR扩增。反转录

cDNA第一链的参数为: 42℃ 1h; 95℃ 5 min; 4℃ 10min。

1. 2. 5半定量PCR

以cDNA为模板PCR HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6及 β -actin 基因。PCR HPV16E6和HPV16E7扩增参数为: 95℃ 4min; 95℃ 40s, 52℃ 40s, 72℃ 30s, 72℃ 7min; 分别做25个循环和30个循环。PCR HPV18E6扩增参数为95℃ 4min; 95℃ 40s, 40℃ 40s, 72℃ 50s; 72℃ 7min; 25 cycle。PCR β -actin扩增参数为: 95℃ 4min; 95℃ 40s, 55℃ 40s, 72℃ 30s; 72℃ 7min; 分别做25个循环和30个循环。将分别扩增的HPV18E6、HPV16E6、HPV16E7基因片段和细胞内参照 β -actin基因片段电泳, 在 β -actin基因片段亮度几乎一致的条件下, 比较转染不同质粒的细胞中HPV早期基因的表达差异。

1. 2. 6 条带亮度比值分析

用凝胶成像仪软件读取PCR条带的各亮度值, 并用本底亮度值校正(条带亮度值-本底亮度值)得到绝对亮度, 最后求的HPV16E6、HPV16E7、HPV18E6基因的绝对亮度与 β -actin绝对亮度的比值。

2 结果

2. 1细胞总RNA的提取

将pcDNA3和pcDNA3-Skn-1a质粒转染Hela、SiHa细胞, 48h后, 提取细胞后总RNA(以未转质粒的细胞作为阴性对照)。结果见图1和图2。

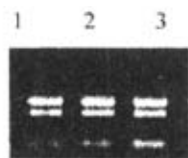


图1: 提取总SiHa细胞总RNA

Fig.1:extracted total RNA of SiHa cell

1:extracted total RNA from SiHa cell;

2:extracted total RNA from SiHa transfected with pcDNA3;

3:extracted total RNA from SiHa transfected with pcDNA3-skn-1a;

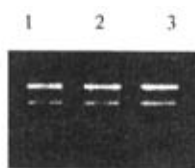


图2: 提取总HeLa细胞总RNA

Fig.2:extracted total RNA of HeLa cell

1:extracted total RNA from HeLa cell;

2:extracted total RNA from HeLa transfected with pcDNA3;

3:extracted total RNA from HeLa transfected with pcDNA3-skn-1a;

2.2 半定量 RT-PCR 检测癌基因转录水平

HPV18E6的半定量RT-PCR如图3所示,内参 β -actin基因片段在亮度几乎一致下,转染pcDNA3-Skn-1a的HeLa细胞RT-PCRHPV18E6的明显亮于其他处理。

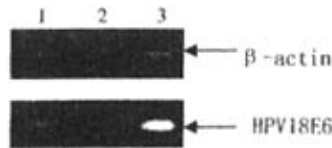


图3: 半定量RT-PCRHPV18E6 (25个循环)

fig.3:semi-quantity RT-PCR HPV18 E6 (25 cycles)

1:PCR β -actin & HPV18 from HeLa cDNA;

2:PCR β -actin & HPVE6 from HeLa cDNA transfected with pcDNA3;

3:PCR β -actin & HPVE6 from HeLa cDNA transfected with pcDNA3-skn-1a;

HPV16E6、HPV16E7的半定量RT-PCR如图4 (25个循环)和图5 (30个循环)所示。在25个循环情况下,内参 β -actin基因片段在亮度几乎一致下,转染pcDNA3-Skn-1a的SiHa细胞RT-PCRHPV16E6和E7可见一清晰条带,而其余处理未见明显条带(图4)。在30个循环条件下,内参 β -actin基因片段在亮度几乎一致下,转染pcDNA3-Skn-1a的SiHa细胞RT-PCRHPV16E6的亮度高于其它处理(图5)。

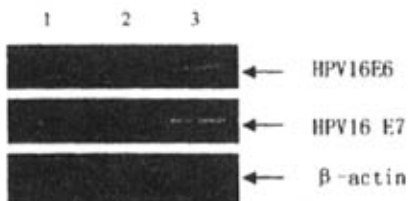


图4: 半定量RT-PCRHPV16E6\ E7 (25个循环)

fig.4: semi-quantity RT-PCR HPV16 E6\ E7(25cycles);

1:PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA;

2:PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA transfected with pcDNA3;

3:PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA transfected with pcDNA3-skn-1a;

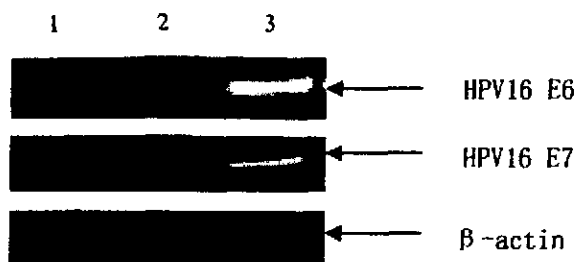


图5:半定量RT-PCR HPV16E6\E7 (30个循环)

fig.5: semi-quantity RT-PCR HPV16 E6\E7(30cycles);

1:PCR β-actin & HPV16E6 from SiHa cDNA;

2:PCR β-actin & HPV16E6 from SiHa cDNA transfected with pcDNA3;

3:PCR β-actin & HPV16E6 from SiHa cDNA transfected with pcDNA3-skn-1a;

2.3 半定量 RT-PCR 条带亮度比较

HPV18E6 (25 个循环) 的半定量 RT-PCR 条带亮度比较如图 6 所示, 转染 pcDNA3-Skn-1a 的 HeLa 细胞 RT-PCR HPV18E6 的条带与 HELa 细胞 RT-PCR HPV18E6 的条带的亮度比值约是 2.8, 与转染 pcDNA3 的 HeLa 细胞 RT-PCR HPV18E6 的亮度比值约是 3.5。

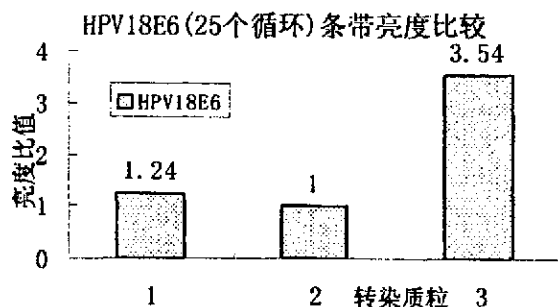


图6: 半定量RT-PCR HPV18E6 (25个循环) 的结果

Fig. 6: the result of semi-quantity RT-PCR HPV18 E6 (25 cycles)

1:PCR β-actin & HPV18 from HeLa cDNA;

2:PCR β-actin & HPV18 from HeLa cDNA transfected with pcDNA3;

3:PCR β-actin & HPV18 from HeLa cDNA transfected with pcDNA3-skn-1a;

HPV16E6、HPV16E7 的半定量 RT-PCR 条带亮度比较如图 7 (25 个循环) 所示, 转染 pcDNA3-Skn-1a 的 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E6 基因条带与 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E6 基因条带的亮度比值约是 6.2, 与转染 pcDNA3 的 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E6 基因条带的亮度比值约是 9.0。转染 pcDNA3-Skn-1a 的 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E7 (25 个循环) 基因条带与 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E7 基因条带的亮度比值约是 5.4, 与转染 pcDNA3 的 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E7 基因条带的亮度比值约是 13.0。

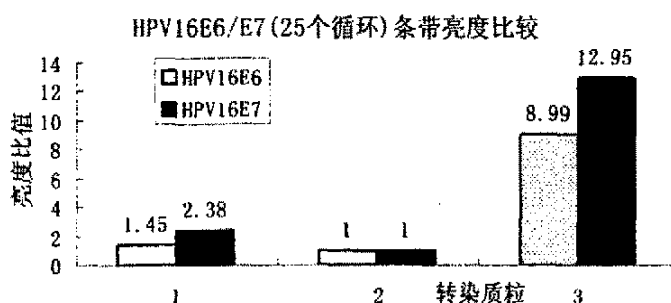


图7: 半定量HPV16E6/E7 (25个循环) 的结果

Fig.7: the result of semi-quantity RT-PCR HPV16 E6\ E7(25cycles)

1: PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA;

2: PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA transfected with pcDNA3;

3: PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA transfected with pcDNA3- skn-1a;

HPV16E6、HPV16E7 的半定量 RT-PCR 条带亮度比较如图 9 (30 个循环) 所示, 转染 pcDNA3-Skn-1a 的 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E6 基因条带与 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E6 基因条带的亮度比值约是 12.6, 与转染 pcDNA3 的 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E6 基因条带的亮度比值约是 7.9。转染 pcDNA3-Skn-1a 的 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E7 基因条带与 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E7 基因的条带的亮度比值约是 3.6, 与转染 pcDNA3 的 SiHa 细胞 RT-PCR HPV16E7 基因条带的亮度比值约是 3.7。

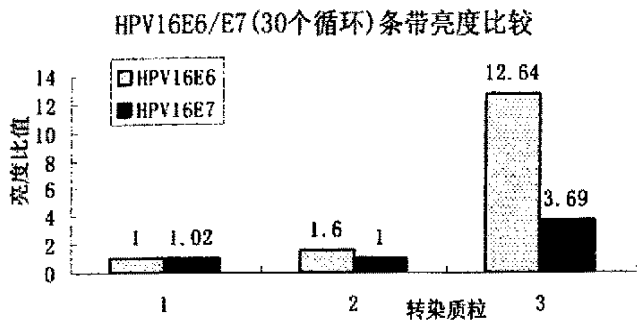


图8: 半定量HPV16 E6/E7(30个循环)的结果

Fig.8: the result of half-quantity RT-PCR HPV16 E6/E7(30cycles);

- 1:PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA;
- 2:PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA transfected with pcDNA3;
- 3:PCR β -actin & HPV16E6 from SiHa cDNA transfected with pcDNA3-skn-1a.

3 讨论

人乳头瘤病毒 (HPV) 感染宫颈鳞状上皮细胞的基底细胞层, 并保持着潜伏感染状态^[15], 而在高度鳞状上皮细胞内损伤 (HSLs), 鳞状细胞癌和腺癌中, HPV基因组整合到宿主细胞基因组中, 并且病毒癌基因E6/E7高度表达^[16]。最近的研究表明在宿主细胞基因组中没有发现HPV16和HPV18基因组固定的整合位点^[17], 说明在HPV诱导的宫颈癌发生过程中, 靶位点插入突变或临近癌基因的激活作用甚微。推测HPV诱导宫颈癌的发生与病毒E6/E7癌蛋白的表达联系紧密^[18]。HPV癌基因的转录调控与细胞调控机制相关, 并且与伴随着HPV诱导癌症的形成显著增加E6/E7蛋白的表达量有关^[19]。E6与p53形成复合物后与细胞泛素连接酶E6AP结合, 通过蛋白复合体降解p53^[20]。E7与pRB结合使pRB失活^[21]。P53和pRB在调控细胞周期和细胞凋亡中起着至关重要的作用^[4,20]。通过抑制p53和pRB以及其他调控机制, HPV E6/E7为癌症的形成提供了条件: 基因突变的积累和突变细胞的存活^[21]。同样E6/E7的表达也造成了感染细胞的永生化; E6可以某种未知机制

增强端粒酶活性^[7]，而E7破坏限制上皮细胞增殖的p16^{ink4a}依赖性途径^[22]。现有的研究表明病毒癌蛋白E6/E7的这些功能在HPV诱导癌症形成中起到重要作用。

很多文献报道病毒癌蛋白E6/E7的表达可能导致病毒诱导癌症的形成^[23, 24, 25, 26, 27]。但是在人皮肤或粘膜的基底上皮细胞中，人乳头瘤病毒基因组以极低转录活性的附加体状态存在，且病毒粒子数量极少。病毒癌基因E6/E7的转录产物几乎不能检测到，它们的转录产物伴随着上层细胞的分化而增加，到上层基底细胞时已达到较高水平^[9]。由此可见，似乎病毒利用了基底上皮细胞分层分化的调控机制表达病毒癌基因E6/E7，基因产物病毒癌蛋白E6/E7激活晚期基因的转录和病毒复制。

POU转录因子由于参与细胞分化和具有组织特异性表达的特点而格外受研究者的青睐。自从1988发现具有POU结构域的转录因子以来，现在已经积累了大量有关POU转录因子生物功能方面的知识。目前已知的POU转录因子有40多种，它们分布于各种器官系统。POU转录因子家族的共同特点是具有称为POU结构域的双向DNA结合结构域。皮肤中主要的POU转录因子有：Oct-1，Tst-1/Oct-6和Skn-1^[14]。Oct-1不具有组织细胞特异性，在处于增殖期与分化期的角化细胞中都能检测到；Oct-6和Skn-1主要在上基底细胞层中表达；并且skn-1选择性地在上皮细胞中表达^[13, 28, 29]。在人角化细胞中，Skn-1a刺激分化标志蛋白K10和小pro-rich包膜蛋白SPRR2A的表达，而Oct-6抑制与增殖相关的K5与K14基因的表达，表明Oct-6也具有促进分化的功能。Bogi Andersen和Ali Hariri等发现Skn-1a和Tst-1能通过八聚体DNA结合位点而结合到HPV-1A的E6启动子上^[14]。因此，分化相关POU结构域因子Skn-1a和Tst-1可能促进了上皮细胞的分化和HPV基因的表达。而在很多不同的细胞系统中，Oct-1转录因子的过量表达会抑制HPV18E6/E7启动子^[30, 31] HPV-1AE6^[14]启动子的活性。P670启动子在未分化的角化细胞中受到抑制，在细胞分化时被激活。除此以外，POU转录因子家族的另外两个POU因子Brn-3a和Brn-3b最初在神经细胞中发现，后来发现在宫颈细胞中也存

在,并具有调节HPV16和HPV18基因转录的功能;这两个转录因子都能直接与病毒的上游调控区结合,但是两因子发挥着相反的功能。Brn-3a直接与HPV的上游调控区结合刺激E6/E7癌基因转录,Brn-3b则抑制E6/E7的表达。可见,十多种因子通过复杂的相互作用共同决定着HPV增强子和启动子的活性^[32]。

由于 skn-1a 是上皮细胞特异性转录因子、具有分化依赖性表达的特点^[29], skn-1a 的基因表达与上皮细胞的分化状态相关,skn-1a 的基因转录产物在处于分化中的上基底细胞中可检测到,而在未分化的基底细胞中检测不到^[13]。对 skn-1a 的研究有助于探讨 HPV 病毒诱导的癌症形成过程。即使在非上皮细胞中,异常表达的 skn-1a 也能激发病毒 E6/E7 启动子的活性。而将 skn-1a 在 HPV18 URR 的启动子临近区域的结合位点突变将彻底破坏 skn-1a 对 E6/E7 启动子的转录激活^[8]。接着 Bogi Andersen 等发现 POU 结构基因 *Skn-1a/i* 可以通过不同的剪接方式而翻译成两种转录因子 Skn-1a 和 Skn-1i, Skn-1i 在正常的表皮细胞中表达量相对较少,能够在真核细胞提取物中与八聚体结合,但不能激活基因表达。Skn-1a 能通过八聚体 DNA 结合位点而结合到 HPV-1A 的 E6 启动子上。因此,分化相关 POU 结构域因子 Skn-1a 可能为上皮细胞的分化与 HPV 的基因表达提供了某种分子连接^[17]。后来又发现了三种 Skn-1 异型体,这些蛋白的 N-末端各不相同,从而可以适用于各种启动子。在不同的表皮细胞样本、内鳞状上皮细胞和培养的人角化细胞中这些异型体的表达模式各不相同。Skn-1a 和 Skn-1d1 作为转录激活蛋白高亲和性地与 *SPRR2A* 八聚体位点结合;而 Skn-1d2 不能影响 *SPRR2A* 的表达^[33]。对于 P670 启动子而言,分化特异性转录因子 Skn-1a 替换 YY1 结合到 HPV16 的 P670 启动子上将 P670 从抑制状态激活^[9]。在 nt 542 处发现启动 E7 mRNA 转录的 P542 启动子,令人吃惊的是 P542 启动子附近-E-框下游与 E7 起始密码子重叠处发现了一个 Skn-1a 结合位点^[9], Skn-1a 与该位点结合并抑制 P542 启动子的活性^[34]。由此可见 Skn-1a 对 HPV 诱导癌症形成的调控非常复杂,用现有的模式系统研究 skn-1a 对 HPV 复制的影响将是很有意义

的事。

本研究用脂质体介导法转染 HeLa 和 SiHa 细胞,结果显示在用 pcDNA3-skn-1a 转化细胞中,HPV18 和 HPV16 E6/E7 癌基因转录产物都有显著提高(图 3、4、5、6),表明 Skn-1a 能刺激 E6/E7 癌基因的表达。同时可见,在未用 pcDNA3-skn-1a 质粒转染的癌细胞中也检测到了少量 E6/E7 癌基因的转录产物,说明 E6/E7 癌蛋白与宫颈癌的形成与维持中起着重要作用,这些结果与前人报道的在未分化的基底上皮细胞中几乎检测不到 E6/E7 的基因产物相一致。已有报道用 CAT 或荧光素酶基因作为报告基因研究 Skn-1a 对 HPV E6/E7 癌基因的调控作用^[8, 9, 14, 33, 35],用瞬时转染法^[14, 33]、CaPO₄共沉淀法^[8, 36]转染癌细胞;我们首次用脂质体介导法将 pcDNA3-skn-1a 质粒转化癌细胞,并且用 RT-PCR 法代替报告基因检测法,避免了 CaPO₄在转染过程中对细胞的损害,报告基因对细胞的伤害和对结果的干扰。结果表明,skn-1a 可以激活 HPV16 和 HPV18 的阳性细胞中 E6/E7 基因的表达。提示 HPV16 和 HPV18 的阳性细胞中病毒基因处于活化状态,多种转录因子可与病毒 URR 相互作用调节病毒基因的表达。然而,有报道指出 HPV16 中含有 E7 的弱启动子 p542,skn-1a 能够降低 p542 启动子的转录活性,从而使 HPV16 E7 基因的表达下降^[34];也有报道 Skn-1a 能解除启动子 P670 的抑制状态,使 HPV16E7 基因表达量成倍增多^[9]。可见,HPV16 的阳性细胞中有几套 E7 启动表达机制,确保了细胞中 E7 基因在分化细胞中的表达;其中以组成型表达 p97 启动子转录的多顺反子 mRNA 最丰富^[33, 34]。本实验的结果也表明,skn-1a 对 HPV16 E7 有转录激活作用,可提高 HPV16E7 基因表达量。HPV 病毒诱导癌症产生过程中受到多种调控因子的作用,它们之间的相互作用关系十分复杂,研究它们对探讨 HPV 诱导宫颈癌的形成很有意义。

参考文献

1. Walboomers JM., Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, and Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical

- cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999,189:12-19.
2. Shirasawa H, Tomita Y, Sekiya S, Takamizawa H, and Simizu B. Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas[J]. J Gen Virol, 1987, 68:583-591.
3. Werness BA, Levine AJ, and Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53[J]. Science,1990, 248:76-79
4. Balsitis S, Dick F, Lee D, Farrell L, Hyde R K, Griep AE, Dyson N, and Lambert PF, Examination of the pRb-Dependent and pRb-Independent Functions of E7 In Vivo[J].J. Virol, 2005, 79: 11392 - 11402.
5. Pei XF, Sherman L, Sun YH. HPV216 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium[J]. Carcinogenesis, 1998, 19 (8): 1481~1486.
6. Martin L G, Demers GW, Galloway DA. Disruption of the G1/ S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E[J]. J V i rol, 1998, 72 (2): 975~985.
7. Klingelhutz A J, Foster SA, and McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16[J]. Nature,1996, 380:79-82.
8. Yukawa K, Butz K, Yasui T, Kikutani H, and Hoppe-Seyler F. Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation dependent epithelial factor Epoc-1/skn-1a[J]. J Virol, 1996,70:10-16.
9. Kukimoto, I., and T. Kanda. Displacement of YY1 by differentiation specific transcription factor hSkn-1a activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16[J]. J Virol, 2001, 75:9302-9311.
10. O'Connor, M J, Stunkel W, Koh C H, Zimmermann H, and Bernard H U. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element[J]. J. Virol, 2000, 74:401-410.
11. Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkun G, Horvitz HR The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products[J]. Genes,1988, 2:1513-1516.
12. Klemm JD, Rould MA, Aurora R, Herr W, Pabo CO. Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules[J]. Cell,1994, 77:21-32
13. Andersen B, Schonemann MD, Flynn SE, Pearse RVd Singh H, Rosenfeld MG. Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2-related factors expressed in epidermis[J]. Science, 1993,260:78-82
14. Bogi Andersen, Ali Hariri, Pittelkowi MR, and Rosenfeld MG. Characterization of Skn-1a/i POU domain factors and linkage to papillomavirus gene expression [J]. J Bio Chem,1997, 272:15905-15913.

15. zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis[J]. *J Nat Cancer Inst*, 2000, 92:690-698.
16. Stoler, M.H., C.R. Rhodes, A. Whitbeck, S.M. Wolinsky, L.T. Chow, and T.R. Broker. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias[J]. *Hum Pathol*, 1992, 23:117-128.
17. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, and Doeberitz MK. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions[J]. *Oncogene*, 2002, 21:419-426.
18. von Knebel Doeberitz M. Papillomaviruses in human disease. Part II. Molecular biology and immunology of papillomavirus infections and carcinogenesis[J]. *Eur J Med*, 1992, 1:485-491.
19. zur Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression[J]. *Lancet*, 1986, ii:489-491.
20. Huibregtse JM, Scheffner M, and Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18[J]. *EMBO J*, 1991, 10:4129-4135.
21. White AE, Livanos EM, and Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins[J]. *Genes Dev*, 1994, 8:666-677.
22. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, and Klingelutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells[J]. *Nature*, 1998, 396:84-88.
23. Halbert, C L, Demers GW, and Galloway DA. The E7 gene of human papillo- mavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells[J]. *J Virol*, 1991, 65:473-478.
24. Hawley-Nelson, P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, and Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes [J]. *EMBO J*, 1989, 8:3905-3910.
25. Hudson, J B, Bedell MA, McCance DJ, and Laimins LA. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18[J]. *J Virol*, 1990, 64:519-526.
26. Matlashewsk, G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, and Crawford L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells[J]. *EMBO J*, 1987, 6:1741-1746.
27. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, and Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes[J]. *J Virol*, 1989, 63:4417-4421.
28. Goldsborough AS, Healy LE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Willison KR, Ashworth A. Cloning, chromosomal localization and expression pattern of the POU domain gene Oct-11[J].

Nucleic Acids Res, 1993, 21:127-134.

29. Andersen B, Weinberg WC, Rennekampff O, McEvilly RJ, Bermingham Jr JR, Hooshmand F, Vasilyev V, Hansbrough JF, Pittelkow MR, Yuspa SH, Rosenfeld MG. Functions of the POU domain genes Skn-1a/i and Tst-1/Oct-6/SCIP in epidermal differentiation[J]. *Genes Dev*, 1997,11:1873-1884.

30. Hoppe-Seyler F, Butz K, and zur Hausen H. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1[J]. *J Virol*, 1991, 65: 5613-5618.

31. Morris P, Dent C, Ring C, and Latchman D. The octamer binding site in the HPV16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non-cervical cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993. 21:1019-1023

32. O'Connor, M, Chan S Y, and Bernard H U. Transcription factor binding sites in the long control regions of genital HPVs, part III-A, p. 21-40. *Human papillomaviruses 1995 compendium*[B]. 1995, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.M. USA.

33. Cabral A, Fischer DF, Vermeij WP, and Backendorf C. Distinct Functional Interactions of Human Skn-1 Isoforms with Ese-1 during Keratinocyte Terminal Differentiation[J]. *J Bio Chem*, 2003, 278: 17792-17799.

34. Glahder JA, Hansen CN, Vinther J, Madsen BS, and Norrild B. A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA[J]. *J Gen Viro*, 2003, 84: 3429- 3441.

35. Jeffrey H, Ruth A F, Margaret E. Chamberlin S, Jonathan C V. Characterization of the regulatory domains of the Human Skn-1a/Epoc-1/ Oct-11 POU transcription factor[J]. *J Bio Chem*, 1999, 274: 26399-26406.

论文第三部分

新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型

E7 基因突变分析

摘要: 目的 本研究旨在检测HPV16E7基因在新疆南部维吾尔族妇女宫颈癌组织中的突变。方法 从35份新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织标本中提取组织DNA, 作为模板, PCR扩增HPV16 E7全长基因, PCR 产物直接测序或克隆后测序, 分析新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织HPV16E7基因的突变。结果 PCR检测结果宫颈癌组织中HPV16E7阳性率为82.86% (29/35); 27个E7分离片段的测序和序列分析表明, 26个分离株E7基因与原型相同, 1个分离株E7基因核苷酸发生2处突变, 既647位(在HPV16基因组中的位置)的A→G, 氨基酸由Asn变异为Ser; 845位的T→C, 氨基酸不变。结论 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌患者感染的HPV16中存在E7基因的变异株, 该变异株可能是由人口流动传入。

关键词: 人乳头状瘤病毒 16 型; 宫颈癌; E7; 基因突变

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Human Papillomavirus 16 E7 gene Variants in Xinjiang Uygur Women with Cervical Carcinoma

Abstract Objective This study was designed to investigate the variant of HPV16 E7 from cervical carcinoma biopsies in Xinjiang Uygur Women. **Methods** The tissue DNA was extracted from 35 cervical carcinoma biopsies Uygur women in the south of Xinjiang. HPV16E7 genes were amplified by PCR from the cervical carcinoma tissue DNA. Nucleotide sequences of the HPV16 E7 genes were determined with direct or sub-cloning sequencing methods to analyze the mutations of HPV16 type

E7 gene. Results The result of PCR showed that the positive rate of HPV16 E7 was 82.86%(29/35). The DNA was sequenced. By analyzing the mutations of 27 E7 gene from 29 cases, we found 26 HPV16 E7 among the 27 cases were maintained to be prototype, two mutations were detected in one E7 gene among the 27 cases, one was 647(A→G), resulting in amino acid Ser substituted for Asn; the other was 845(T→C), without variation of amino acids. **Conclusions** There is a variant strain of HPV16 E7 gene from cervical carcinoma biopsies in the Uygur Women from southern XinJiang, the variant strain might be introduced into the region by floating population.

Key words: Human Papillomavirus Type 16; Cervical cancer; E7; Gene mutation

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一类具有严格宿主范围和嗜组织特异性的小DNA病毒, 可引起人生殖道和肛门皮肤、粘膜产生良性和恶性肿瘤。约80%的宫颈癌发生与高危型HPV 的感染密切相关, 其中以HPV16 为主^[1]。HPV16基因组主要由早期基因区(early region, E区)、晚期基因区(later region, L区)和长控制区(long control region, LCR)组成, E区有6个开放读码框架(open reading-frame, ORF), 即E1, E2, E4, E5, E6, E7, 其中与转化有关的为E6和E7癌基因。E7 基因作为HPV16 的主要转化基因之一, 能与Ras 基因协同作用, 并可灭活抑癌蛋白Rb, 从而促使HPV16 感染细胞发生转化、癌变^[2]

目前, 将世界范围不同种族、不同人群中分离的HPV16区分为5 种主要的种系发生群^[3]。Icenogle等的研究表明^[4], 世界不同地区的宫颈癌组织中普遍存在HPV 16E7 变异株。新疆南部维吾尔族聚居区是我国宫颈癌高发区, 患病率高达459~590/10万, 已有的调查表明, 新疆南部维吾尔族妇女高发宫颈癌与HPV16 感染密切相关, 其宫颈癌组织中HPV16检出率高达77.6%~82.6%^[5]。我们已报道了新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPV16E6基因、L1基因及L2基因^[6]

的变异情况。为了解我国宫颈癌患者组织中HPV 16E7 基因结构特点, 本研究通过对新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织中HPV 16E7 基因的克隆及一级结构序列分析, 检测该地区HPV16E7基因的突变, 为该地区宫颈癌组织中感染HPV16基因突变积累分子流行病学资料。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌组织

采取 2000 年 2 月~2003 年 10 月新疆医科大学附属肿瘤医院 36 例宫颈癌手术或活检标本(经病理检查确诊为宫颈癌), 患者年龄在 36.0 岁~65.5 岁, 中位年龄 48.5 岁, 术前未进行放化疗。标本-80℃保存。

1.2 主要试剂及材料

克隆质粒 pUCm-T 购自上海生工生物工程公司, 菌种 *E. coli* DH5 α 为本室保存。核酸内切酶、DNA marker、Taq 多聚酶、T₄DNA 连接酶及 PCR 片段回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 Seedorf 等 1985 年发表的 HPV16 型 DNA 全序列^[7], 利用 Perkin Elmer (PE) 公司 primer express 软件设计跨 HPV16 E7 整个阅读框的 1 对引物。引物 1 的序列为: 5' - CACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA- 3'; 引物 2 的序列: 5' - GCAGGATCAGCCATGGTAGATT -3'。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 宫颈癌组织 DNA 的提取

按 TaKaRa Minibest Animal Tissue Genomic DNA Extraction Kit Ver. 2.0 说明书进行。

1.5 PCR 扩增

以宫颈癌组织 DNA 为模板, 加 HPV16 E7 引物, 按常规方法扩增 HPV16 E7

基因片段。扩增参数: 95℃5min; 94℃30sec, 55℃30sec, 72℃1min , 35 个循环; 72℃7min。

1.6 HPV16 E7 基因序列测定及分析

用PCR片段回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收PCR产物, 分别用HPV16 E7P1、P2 进行正反向 DNA 测序, 正反向测序结果互相校正。用 DNAMAN version 5.2.2 软件对序列进行对比分析。

1.7 pUCm-T /HPV16 E7 重组质粒的构建

将一 HPV16E7PCR 回收片段与克隆载体 pUCm-T 用 T₄DNA 连接酶 16℃连接过夜, 连接产物转化至 *E. coli* DH-5 α 中, 经蓝白斑筛选、增菌培养后提取质粒, 酶切鉴定其正确性, 测序验证 PCR 回收片段直接测序的可信度。

2 结果

2.1 宫颈癌组织中 HPV16 E7 DNA 片段的扩增结果

以宫颈癌组织 DNA 为模板, 用 HPV16 E7 引物进行 PCR 扩增, 35 份标本中有 29 份标本为 HPV16E7 阳性 (阳性率 82.86%), 图 1 所示为 8 份样品 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果, 可见一清晰扩增条带, 大小约为 297bp。

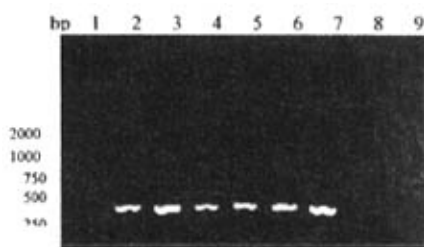


图1 PCR扩增HPV16 E7基因

Fig.1 Amplification of HPV16 E7 Gene

1. DL2000 Marker, 2~9. Amplification of HPV16 E7 PCR

2.2 pUCm-T/HPV16E7 重组质粒的构建

将一 HPV16 E7PCR 回收片段与克隆载体 pUCm-T 连接, 重组质粒用 *EcoR* I 和 *Hind*III 酶切, 切出约 300bp 的 DNA 片段 (图 2), 该重组质粒用 pUCm-T 通用引物进行测序, 测序结果与该 PCR 回收片段直接测序的结果一致, 说明 PCR 回收片段直接测序的结果是可信的。

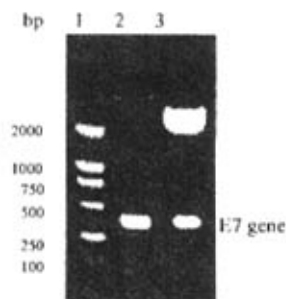


图2 重组质粒pUCm-T/HPV16E7酶切鉴定

Fig2 RE Analysis Recombinant Plasmid pUCm-T/HPV16 E7.

1.DL2000 Marker; 2. Amplification of HPV16 E7 gene;

3. pUCm-T/HPV16E7 by *EcoR* I and *Hind*III

2.3 HPV16E7 基因序列测定及一级结构分析

29 份标本 PCR 扩增产物测序结果表明扩增产物均为 HPV16E7 基因, 其中 2 个 E7 PCR 回收片段测序结果较差, 不进行突变分析, 其余 27 个 E7 PCR 回收片段测序结果与德国标准株进行比较, 结果显示, 测序结果表明 PCR 扩增得到的均为 HPV16E7 基因, E7PCR 回收片段测序结果与德国标准株进行比较, 其中 26 个分离株 E7 基因与原型相同, 1 个分离株 E7 基因核苷酸发生两处突变, 既 647 位 (在 HPV16 基因组中的位置) 的 A→G, 核苷酸三联密码由 AAT 变为 AGT, 氨基酸由 Asn 变异为 Ser; 845 位的 T→C, 核苷酸三联密码由 TCT 变为 TCC, 氨基酸不变 (图 3、图 4)。

REF	ATGCATGGAGATACACGCTACATTGCATGAAATATATGTTAGATTTGCACCCGAGACAACT	60
XJ	-----	60
REF	GATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGAGAGGATGAAATAGATGGT	120
XJ	-----G-----	120
REF	CCAGCTGGACAAAGCAGAAACCGGACAGAGCCCATTAACAATATTGTACCTTTTGTTCAG	180
XJ	-----	180
REF	TGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTGGTACTTTGGAA	240
XJ	-----	240
REF	GACCTGTTAATGGGACACCTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCAAA	297
XJ	-----G-----	297

图3 HPV16新疆株E7基因核酸序列与参考株的同源性比较

Fig3 Comparison of the Nucleotide Acid Sequence of HPV16E7 gene between Xinjiang strain and REF.

REF	MYGDTFTLREYMLDLQPEITTDLYCYEQINDSSSEEDRIDGPAGQAEFDRAHYNIVTFCK	60
XJ27	-----G-----	60
REF	CDSTLRLOVQSTHWVDIKTLEDLNGTIGTVCPIGQKP	93
XJ27	-----	93

图4 HPV16新疆株E7蛋白氨基酸序列与参考株的同源性比较

Fig4 Comparison of the Amino Acid Sequence of HPV16E7 Protein between Xinjiang strain and REF.

3 讨论

新疆是宫颈癌高发的地区之一，为了解新疆宫颈癌患者组织中HPV16E7 基因的结构特点，本研究对新疆地区宫颈癌活检组织中HPV16 E7 基因进行了克隆及一级结构序列分析。应用PCR 技术从29例宫颈癌组织中扩增出HPV16(新疆株) E7基因。对克隆到的27例HPV16E7基因经过正反向测序分析，结果表明：26个分离株E7基因与原型相同， 1个分离株E7基因核苷酸发生2处突变，既647位（在HPV16基因组中的位置）的A→G，氨基酸由Asn变异为Ser；845位的T→C，氨基酸不变。该突变与湖北^[8]、北京^[9]等地的报道均不相同。

HPV16 E7蛋白N端区包括pRb结合位点和CK II 磷酸化位点，具有强抗原性，16~37位氨基酸含两个独立的结构域，其中21~29位氨基酸介导pRb抑癌蛋白的

结合,是与pRb结合的最关键位点。E7和pRb蛋白之间的相互作用是恶性转化的最重要机制之一。HPV16 E7基因第29位密码子突变导致氨基酸由天门冬酰胺变为丝氨酸(Asn→Ser),丝氨酸被磷酸化,蛋白质构象和极性可能发生改变,从而改变生物学功能如结合pRb的能力,影响HPV的转化作用和免疫原性等生物学特性^[10]。在韩国妇女中E7 N29S变异会提高E7的致癌性^[11]。

以上两个位点的突变在HPV16亚洲型中普遍存在,突变率高达94.6%^[12],提示该变异株属亚洲型,且该突变序列与Fu,L等在GenBank(注册号:AF534061)中登陆的东亚型E7基因一致。据文献报道,以上两个位点的突变在一些国家和地区妇女宫颈癌患者感染的HPV16中也不同程度地存在,日本妇女宫颈癌患者感染的HPV16中,647位A→G的突变率为60.0%(9/15),846位T→C的突变率为46.7%(7/15)^[13];在香港妇女宫颈癌患者感染的HPV16中,两个位点的突变率分别为58.0%和52.9%^[12]。另外,647位A→G的置换突变在不同人群中分布各异^[12]:中国中部(四川)占14.3%,韩国占59.5%,在德国仅发现0.9%,坦桑尼亚36.4%,而在瑞典未发现该突变,但在以上人群感染的HPV16中,没有发生846位T→C的置换突变,说明该亚洲分离株在以上人群中不流行。

基于以上分析,我们推测该变异可能是由人口流动传入新疆地区。

参考文献

- [1] Stoler MH. Human Papillomavirus and Cervical Neoplasia: A Model for Carcinogenesis[J]. Int J Gynecol Pathol, 2000, 19 (1): 16 - 28.
- [2] De Geest K, Bergman CA, Turyk ME. Differential Response of Cervical Intraepithelial and Cervical Carcinoma Cell Line to Transforming Growth Factor-beta 1[J]. Gynecol Oncology, 1994, 55: 376 - 385.
- [3] Yamada T, Manos MM, Peto J. Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worldwide Perspective [J]. J Virol, 1997, 71(3): 2463-2472.
- [4] Icenogle JP, Sathya P, Miller DL. Nucleotide and Amino Acid Sequence Variations in the L1 and E7 Open Reading Frames of Human Papillomavirus Type 6 and Type 16 [J]. Virology, 1991, 184: 101 - 107.
- [5] 拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班, Amy EN. 维吾尔妇女子宫颈癌中 p53 基因的表达和

HPV DNA 检测研究[J]. 新疆医学院学报, 1997, 20 (2): 77-81.

[6] 马正海, 梅新娣, 张富春. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 L2 基因多态性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12): 968-972.

[7] Seedorf K, Kraemmer G, Duerst M. Human papillomavirus type 16 DNA Sequence [J]. Virology, 1985, 145(1): 181-185.

[8] 伍欣星, 赵文先, 丁晓华, 丁红珍, 干人宝. 人乳头瘤病毒(地方株) 16 型 E7 基因一级结构及其变异[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1996, 16 (6) : 395~ 398.

[9] 左亚刚, 王家璧, 许雪梅, 朱明昭, 刘方, 司静懿, 宋国行. 北京地区人乳头瘤病毒 16E6E7 基因变异和序列分析[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36 (11): 650-652.

[10] Edmonds C, Vousden KH. A Point Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein [J] . J Virol, 1989, 63(6): 2650-2656.

[11] Song YS, Kee SH, Kim JW. 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.

[12] Paul K. S. Chan, Ching Wan Lam, Tak Hong Cheung. Human Papillomavirus Type 16 Intratypic Variant Infection and Risk for Cervical Neoplasia in Southern China[J]. J Infect Dis, 2002, 186(5): 696-700.

[13] Kuroda T, Yoshinari M, Okamura K. Sequence Variation of Human Papillomavirus Type 16 E7 in Preinvasive and Invasive Cervical Neoplasias[J]. Virus Genes, 1994, 9(1): 85-92.

致 谢

衷心感谢尊敬的导师张富春教授在我攻读硕士学位期间给予的关心和帮助,以及在论文撰写工作中给予的悉心指导。本文得以顺利完成凝聚着导师张富春教授的辛勤培养和殷切期望,在此对导师张富春教授致以诚挚的感谢和崇高的敬意。教授严谨求实的治学态度、具有前瞻性的思维、活跃的学术思想、持之以恒的工作热情、对科学执着追求的精神、博大的胸怀以及诚实待人的品格给我以鞭策,使我受益匪浅。

马正海老师从毕业论文的设计、具体实施、结果分析以及最后的论文撰写都给与了耐心指导和帮助,在此表示诚挚的谢意。另外,马正海老师严谨求实的治学态度,稳健踏实的做事风格,缜密细致的思维方式是我学习的榜样。

在实验过程中,马纪老师、兰海燕老师、曾幼玲老师、恩特马克老师、李铁杰老师、冯晓黎老师、庄淑珍博士在实验中给予了许多实验建议、技术指导,钟喆老师在使用仪器和材料发放方面也给予了许多帮助,在此深表感谢。同时感谢金牛公司的彭涛在荧光素酶检测实验中给予的支持。

在本论文的完成过程中,我还得到本实验室全体师兄、师姐、师弟和师妹的关心和帮助。他们积极进取、勤奋好学和团结互助的精神营造了实验室中良好的学术氛围和科研环境,在此深表感谢。我将永远珍惜这段与大家共同进步的美好时光。同时感谢所有帮助和关心过我的老师、同学和朋友。

最后,深深感激辛勤抚育和培养我的父母和亲人,他们持之以恒的鼓励和支持使我顺利完成学业。

本研究的所有实验工作均在新疆大学生命科学与技术学院生物资源基因工程重点实验室完成,论文资金来源教育部重点项目。

个人简历

余勤 男 1976/10/25 汉族

动物学专业 生物技术研究方向 硕士学位

主要从事病毒分子生物学研究

联系方式: 8583259, yumail2000@yahoo.com.cn

简历:

1997年9月——2001年7月: 新疆大学生命科学技术学院——学士学位

2001年9月——2003年9月: 就职于新疆维吾尔自治区人民医院;

2003年9月——2006年7月: 新疆大学生命科学技术学院

新疆生物资源基因工程重点实验室——硕士研究生

参与课题:

Brn-3a 对 HPV16 基因转录调控的研究

新疆维吾尔族妇女宫颈组织感染真菌中 HPV16 增殖研究

研究生期间论文发表情况:

1. 余勤, 马正海, 尼格买提·热西旦, 刘开江, 张富春. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 E7 癌基因突变分析. (《地方病通报》已接受)。
2. 余勤, 马正海, 王艳萍, 热西旦, 张富春. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型上游调控区 DNA 多态性分析 (已投稿)
3. 王艳萍, 马正海, 余勤, 热西旦, 尼格买提, 马彩玲, 张富春. 宫颈癌组织中转录因子 *Skn-1a* cDNA 的克隆及表达, 新疆医科大学学报, 2006, (5): 9-13

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文研究作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责任由本人承担。

论文作者签名： 余勤 日期： 2006.5.28

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解新疆大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权新疆大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文作者签名： 余勤 导师签名： 张永春 日期： 2006.5.28

新疆维吾尔妇女宫颈癌组织中HPV16上游调控区突变及其与宫颈肿瘤发生关系的研究

作者：[余劭](#)
学位授予单位：[新疆大学](#)

参考文献(128条)

1. Zur Hausen H [Papillomavirus infections-a major cause of human cancer](#) 1996
2. Pisani P, Parkin DM, Ferlay J [Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985: Implications for prevention and projections of future burden](#) 1993(06)
3. Gerard CM, Baudson N, Kraemer K, Bruck C, Garcon N, Paterson Y, Pan ZK, Pardoll D [Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations on tumor growth](#) 2001(17219)
4. zur Hausen H [Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis](#) 2000
5. Poprdvu NC, Zimonjic D, Dipaolo JA [Viral integration, fragile Sites, and protooncogenes in human meoplasia](#) 1990
6. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P [Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein](#) 1996(11)
7. Funk JO, Waga S, Harry LB, Espling E, Stillman B, Galloway DA [Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein](#) 1997
8. Alani RM, Munger K [Human papillomaviruses and associated malignancies](#) 1998(01)
9. Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM [The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus \(HPV\)-positive and HPV-negative cells](#) 1998(11)
10. Song S, Gulliver GA, Lambert PF [Human papillomavirus type E6 and E7 oneogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53- dependent and p53 independent pathways](#) 1998
11. Chen J J, Hong YH, Rustamzadeh E, Baleja JD, Androphy EJ [Identification of an helical motif sufficient for association with papillomavirus E6](#) 1998(22)
12. Tong X, Howley P M [The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton](#) 1997(09)
13. Steenbergen RDM, Parker JN, Isren S, Snijders PJF, Walboomers JMM, Meijer CJLM, Broker TR, Chow LT [Viral E6/E7 transcription in the basal layer of organotypic cultures without apparent p21cip1 protein precedes immortalization of HPV 16 and 18 transfected human keratinocytes](#) 1998
14. Snijders J, Duin M V, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Meijer CJ [Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA](#) 1998
15. Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS [The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: A review](#) 2003
16. O' Connor M, Chan S Y, Bernard HU [Transcription factor binding sites in the long control regions of genital H-PVs, part III-A](#) 1995

17. [Furth PA, Baker CC](#) An element in the bovine papillomavirus late 3' untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels 1991
18. [Kennedy IM, Haddow JK, Clements JB](#) A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability 1991
19. [Romanczuk H, Thierry F, Howley PM](#) Mutational analysis of cis element involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 p97 and type18 p105 promoters 1990
20. [Sailaja G, Watts RM, Bernard HU](#) Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers 1999
21. [Ishiji T, Lace MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen T H, Cripe T P, Xiao J H, Davidson I, Chambon P, Turek L P](#) Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells 1992
22. [Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU](#) The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription 1991
23. [O'Connor M, Bernard H U](#) Oct-1 activates the epithelial specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NF1 at a conserved composite regulatory element 1995
24. [Nurnberg W, Artuc M, Vorbrueggen G, Kalkbrenner F, Moelling K B, Azarne-tzki M, Schadendorf D](#) Nuclear proto-oncogene products transactivate the human papillomavirus type 16 promoter 1995
25. [Pattison S, Skainik DG, Roman A](#) CCAAT displacement protein, a regulator of differentiation-specific gene expression, binds a negative regulator element within the 5' end of the human papillomavirus type 16 long control region 1997
26. [Mack DH, Laimins LA](#) A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells 1991
27. [Bauknecht T, Shi Y](#) Overexpression of C/EBPbeta represses human papillomavirus type18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein 1998
28. [Kyo S, Inoue M, Nishio Y, Nakanishi K, Akira S, Inoue H, Yutsudo M, Tanizawa O, Hakura A](#) NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region 1993
29. [Jundt F, Herr I, Angel P, Zur Hausen H, Bauknecht T](#) Transcriptional control of human papillomavirus type 18 oncogene expression in different cell lines: role of transcription factor YY1 1995
30. [Apt D, Chong T, Liu Y, Bernards H U](#) Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16 1993
31. [Nurnberg W, Artuc M, Nawrath M, Lovric J, Stuting S, Moelling K, Czarnetzki BM, Schadendorf D](#) Human c-myc is expressed in cervical carcinomas and transactivates the HPV-16 promoter 1995
32. [Bednarek PH, Lee B J, Gandhi S, Lee E, Phillips B](#) Novel binding sites for regulatory factors in the human papillomavirus type 18 enhancer and promoter identified by in vivo footprinting 1998

33. [Han M A, Jenkins G R, Tolleson WH, Creek KE, Pirisi L Retinoic acid inhibition of human papillomavirus type 16-mediated transformation of human keratinocytes 1993](#)
34. [Artsch D, Boye B, Baust C, zur Hausen H, Schwarz E Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic receptor beta gene in non-tumorigenic and HeLa hybrid cells 1992](#)
35. [Woodworth CD, Lichti U, Simpson S, Evans CH, DIPaolo JA Leukoregulin and gamma-interferon inhibit human papillomavirus- immortalized human cervical cells 1992](#)
36. [Khan MA, Tolleson W, Gangemi J D, Pirisi L Inhibition of growth, transformation, and expression of human papillomavirus type 16 E7 in human keratinocytes by alpha interferons 1993](#)
37. [Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations 1993\(11\)](#)
38. [Chen Z, Storthz K A, Shillitoe E J Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells, and their functional consequences 1997](#)
39. [Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillo-mavirus type 16 1999\(04\)](#)
40. [Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity 2000\(08\)](#)
41. [Dong XP, Pfister H Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16 1999](#)
42. [Tornesello M L, Buonaguro F M, Buonaguro L, Salatiello I, Beth-Giraldo E, Giraldo G Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas 2000](#)
43. [Park JS, Hwang ES, Lee CJ, Kim CJ, Rha JG, Kim SJ, Namkoong SE, Um SJ Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia 1999\(01\)](#)
44. [Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia 2001\(05\)](#)
45. [Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M The pituitary-specific transcription factor GHF- 1 is a homeobox- containing protein 1988](#)
46. [Sturm RA, Das G, Herr W The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain 1988](#)
47. [Muller MM, Ruppert S, Schaffner W, Matthias P A cloned octamer transcription factor stimulates transcription from lymphoid-specific promoters in non-B cells 1988](#)
48. [Finney M, Ruvkun G The unc-86 gene product couples cell lineage and cell identity in C elegans 1990](#)
49. [Herr W, Sturm PA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkun G, Horvitz HR The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and](#)

50. Andersen B, Hariri A, Mark RP, Rosenfeld MG Characterization of Skn-1a/i POU Domain Factors and Linkage to Papillomavirus Gene Expression 1997
51. Andersen B, Schonemann MD, Flynn SE, Pearse RVd Singh H, Rosenfeld MG Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2-related factors expressed in epidermis 1993
52. Goldsborough AS, Healy LE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Willison KR, Ashworth A Cloning, chromosomal localization and expression pattern of the POU domain gene Oct-11 1993
53. Andersen B, Weinberg WC, Rennekampff O, McEvilly RJ, Bermingham Jr JR, Hooshmand F, Vasilyev V, Hansbrough JF, Pittelkow MR, Yuspa SH, Rosenfeld MG Functions of the POU domain genes Skn-1a/i and Tst-1/Oct-6/SCIP in epidermal differentiation 1997
54. Cabral A, Fischer DF, Vermeij WP, Backendorf C Distinct Functional Interactions of Human Skn-1 Isoforms with Ets-1 during Keratinocyte Terminal Differentiation 2003
55. Kukimoto I, Kanda T Displacement of YY1 by differentiation specific transcription factor hSkn-1a activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16 2001
56. Andersen B, Weinberg WC, Rennekampff O, McEvilly RJ, Bermingham Jr JR, Hooshmand F, Vasilyev V, Hansbrough JF, Pittelkow MR, Yuspa SH, Rosenfeld MG Functions of the POU domain genes Skn-1a/i and Tst-1/Oct-6/SCIP in epidermal differentiation 1997
57. Yukawa K, Butz K, Yasui T, Kikutani H, Hoppe-Seyler F Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation dependent epithelial factor Epoc-1/skn-1a 1996
58. Jacob A G, Christina N H, Jeppe V, Birger S M, Norrild B A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA 2003
59. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis 2003(01)
60. Hwang TS, Jeong JK, Park M, Han HS, Choi HK, Park TS Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray 2003(01)
61. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities 1996(05)
62. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective 1997(03)
63. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, E7, and L1 coding segments 1995(12)
64. Arany I, Grattendick KJ, Whitehead WE, Ember IA, Tying SK A functional interferon regulatory factor-1 (IRF-1)-binding site in the upstream regulatory region (URR) of human papillomavirus type 16[外文期刊] 2003(02)
65. 李庭芳, 古丽娜, 库尔班, 王涛 新疆伽师县夏普桃勒乡妇女子宫颈癌防治的研究 1996(03)

66. [拉莱·苏祖克](#), [古丽娜·库尔班](#), [Amy E Noffersinger](#) [维吾尔妇女子宫颈癌中p53基因的表达和HPV DNA检测研究](#) 1997(02)
67. [马正海](#), [钱东](#), [马纪](#), [林仁勇](#), [闻明](#), [钟哲](#), [张富春](#), [张秋云](#) [新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒16型E6基因的克隆和序列分析](#)[期刊论文]-[生物化学与生物物理进展](#) 2001(3)
68. [马正海](#), [张富春](#), [梅新娣](#), [马彩玲](#), [刘开江](#) [新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPV16型E6基因突变分析](#)[期刊论文]-[癌症](#) 2004(9)
69. [马正海](#), [张富春](#), [梅新娣](#), [马彩玲](#), [刘开江](#) [新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头状瘤病毒16型L1基因突变谱分析](#)[期刊论文]-[中华医学杂志](#) 2004(12)
70. [马正海](#), [梅新娣](#), [张富春](#) [新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPV-16型L2基因多态性分析](#)[期刊论文]-[中华微生物学和免疫学杂志](#) 2004(12)
71. [Seedorf K](#), [Krammer G](#), [Durst M](#), [Suhai S](#), [Rowekamp WG](#) [Human papillomavirus type 16 DNA sequence](#) 1985(01)
72. [Hwang TS](#), [Jeong JK](#), [Park M](#), [Hah HS](#), [Choi HK](#), [Park TS](#) [Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray](#) 2003(01)
73. [Mayrand MH](#), [Coutlee F](#), [Hankins C](#), [Lapointe N](#), [Forest P](#), [de Ladurantaye M](#), [Roger M](#) [Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis](#) 2000(09)
74. [Veress G](#), [Szarka K](#), [Dong XP](#), [Gergely L](#), [Pfister H](#) [Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16](#) 1999(04)
75. [Kurvinen K](#), [Yliskoski M](#), [Saarikoski S](#), [Syrjanen K](#), [Syrjanen S](#) [Variants of the long control region of human papillomavirus type 16](#) 2000(11)
76. [Park JS](#), [Hwang ES](#), [Lee CJ](#), [Kim CJ](#), [Rha JG](#), [Kim SJ](#), [Namkoong SE](#), [Um SJ](#) [Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia](#) 1999(01)
77. [Schmidt M](#), [Kedzia W](#), [Gozdzicka-Jozefiak A](#) [Intratypic HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers](#) 2001(1-2)
78. [Kammer C](#), [Warthorst U](#), [Torrez-Martinez N](#), [Wheeler CM](#), [Pfister H](#) [Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity](#) 2000
79. [Watts KJ](#), [Thompson CH](#), [Cossart YE](#), [Rose BR](#) [Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia](#) 2001(05)
80. [Dong XP](#), [Pfister H](#) [Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16](#) 1999
81. [Picconi MA](#), [Alonio LV](#), [Sichero L](#), [Mbayed V](#), [Villa LL](#), [Gronda J](#), [Campos R](#), [Teyssie A](#) [Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina](#) 2003(04)
82. [Walboomers JM](#), [Jacobs MV](#), [Manos MM](#), [Bosch FX](#), [Kummler JA](#), [Shah KV](#), [Snijders PJ](#), [Peto J](#), [Meijer CJ](#), [Munoz N](#) [Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide](#) 1999
83. [Shirasawa H](#), [Tomita Y](#), [Sekiya S](#), [Takamizawa H](#), [Simizu B](#) [Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas](#) 1987

84. [Werness BA, Levine AJ, Howley PM Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53 1990](#)
85. [Balsitis S, Dick F, Lee D, Farrell L, Hyde R K, Griep AE, Dyson N, Lambert PF Examination of the pRb-Dependent and pRb-Independent Functions of E7 In Vivo 2005](#)
86. [Pei XF, Sherman L, Sun YH HPV216 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium 1998\(08\)](#)
87. [Martin L G, Demers GW, Galloway DA Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E 1998\(02\)](#)
88. [Klingelhutz A J, Foster SA, McDougall JK Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16 \[外文期刊\] 1996](#)
89. [Yukawa K, Butz K, Yasui T, Kikutani H, Hoppe-Seyler F Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation dependent epithelial factor Epoc-1/skn-1a 1996](#)
90. [Kukimoto I, T Kanda Displacement of YY1 by differentiation specific transcription factor hSkn-1a activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16 2001](#)
91. [O'Connor M J, Stunkel W, Koh C H, Zimmermann H, Bernard H U The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element \[外文期刊\] 2000](#)
92. [Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkun G, Horvitz HR The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and Caenorhabditis elegans unc-86 gene products 1988](#)
93. [Klemm JD, Rould MA, Aurora R, Herr W, Pabo CO Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules 1994](#)
94. [Andersen B, Schonemann MD, Flynn SE, Pearse R V d Singh H, Rosenfeld MG Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2-related factors expressed in epidermis 1993](#)
95. [Bogi Andersen, Ali Hariri, Pittelkowi MR, Rosenfeld MG Characterization of Skn-1a/i POU domain factors and linkage to papillomavirus gene expression 1997](#)
96. [zur Hausen H Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis 2000](#)
97. [Stoler M H, C R Rhodes, A Whitbeck, S. M. Wolinsky, L. T. Chow, T. R. Broker Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias 1992](#)
98. [Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz MK Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions 2002](#)
99. [von Knebel Doeberitz M Papillomaviruses in human disease. Part II. Molecular biology and immunology of papillomavirus infections and carcinogenesis 1992](#)
100. [zur Hausen H Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression 1986](#)
101. [Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18 1991](#)

102. [White AE, Livanos EM, Tlsty TD Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins 1994](#)
103. [Kiyono T, Foster SA, Koop JJ, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells 1998](#)
104. [Halbert C L, Demers GW, Galloway DA The E7 gene of human papillomavirus type16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells 1991](#)
105. [Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes 1989](#)
106. [Hudson J B, Bedell MA, McCance DJ, Laimins LA Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18 1990](#)
107. [Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells 1987](#)
108. [Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes 1989](#)
109. [Goldsborough AS, Healy LE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Willison KR, Ashworth A Cloning, chromosomal localization and expression pattern of the POU domain gene Oct-11 1993](#)
110. [Andersen B, Weinberg WC, Rennekampff O, McEvelly RJ, Birmingham Jr JR, Hooshmand F, Vasilyev V, Hansbrough JF, Pittelkow MR, Yuspa SH, Rosenfeld MG Functions of the POU domain genes Skn-1a/i and Tst-1/Oct-6/SCIP in epidermal differentiation 1997](#)
111. [Hoppe-Seyler F, Butz K, zur Hausen H Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1 1991](#)
112. [Morris P, Dent C, Ring C, Latchman D The octamer binding site in the HPV16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non-cervical cells 1993](#)
113. [O' Connor M, Chan S Y, Bernard H U Transcription factor binding sites in the long control regions of genital HPVs, part III-A, p. 21-40. Human papillomaviruses 1995 compendium 1995](#)
114. [Cabral A, Fischer DF, Vermeij WP, Backendorf C Distinct Functional Interactions of Human Skn-1 Isoforms with E2F-1 during Keratinocyte Terminal Differentiation 2003](#)
115. [Glahder JA, Hansen CN, Vinther J, Madsen BS, Norrild B A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA 2003](#)
116. [Jeffrey H, Ruth A F, Margaret E, Chamberlin S, Jonathan C V Characterization of the regulatory domains of the Human Skn-1a/Epoc-1/Oct-11 POU transcription factor 1999](#)
117. [Stoler MH Human Papillomavirus and Cervical Neoplasia: A Model for Carcinogenesis 2000\(01\)](#)
118. [De Geest K, Bergman CA, Turyk ME Differential Response of Cervical Intraepithelial and Cervical Carcinoma Cell Line to Transforming Growth Factor-beta 1 1994](#)
119. [Yamada T, Manos MM, Peto J Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worldwide Perspective 1997\(03\)](#)
120. [Icenogle JP, Sathya P, Miller DL Nucleotide and Amino Acid Sequence Variations in the L1 and E7](#)

121. [拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班, Amy E N](#) [维吾尔妇女子宫颈癌中p53基因的表达和 HPV DNA检测研究](#) 1997(02)
122. [Seedorf K, Kraemmer G, Duerst M](#) [Human papillomavirus type 16 DNA Sequence](#) 1985(01)
123. [伍欣星, 赵文先, 丁晓华, 丁红珍, 干人宝](#) [人乳头瘤病毒\(地方株\)16型E7基因一级结构及其变异](#) 1996(06)
124. [左亚刚, 王家璧, 许雪梅, 朱明昭, 刘方, 司静懿, 宋国兴](#) [北京地区人乳头瘤病毒16E6E7基因变异和序列分析](#)[期刊论文]-[中华皮肤科杂志](#) 2003(11)
125. [Edmonds C, Vousden KH](#) [A Point Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein](#) 1989(06)
126. [Song YS, Kee SH, Kim JW](#) [Major Sequence Variants in E7 Gene of Human Papillomavirus Type 16 from Cervical Cancerous and Noncancerous Lesions of Korean Women](#) 1997(02)
127. [Paul K, S Chan, Ching Wan Lam, Tak Hong Cheung](#) [Human Papillomavirus Type 16 Intratypic Variant Infection and Risk for Cervical Neoplasia in Southern China](#) 2002(05)
128. [Kuroda T, Yoshinari M, Okamura K](#) [Sequence Variation of Human Papillomavirus Type 16 E7 in Preinvasive and Invasive Cervical Neoplasias](#) 1994(01)

本文读者也读过(10条)

1. [谢强](#) [HPV16 E6E7基因的优化重组与去致癌性研究](#)[学位论文]2007
2. [陈春莲, 彭俊, 余敏君, 尹卫国, 朱翠明, 万艳平](#) [GFP-HPV18 E2删除突变体融合蛋白真核表达载体的构建与鉴定](#)[期刊论文]-[南华大学学报\(医学版\)](#) 2007, 35(5)
3. [李元朝](#) [HPV16之E2蛋白CTL表位的设计及其功能研究](#)[学位论文]2005
4. [李迪, 谷鸿喜, 庄敏, 张凤民](#) [人乳头瘤病毒重组质粒的构建及蛋白表达](#)[期刊论文]-[中国公共卫生](#)2004, 20(4)
5. [李靖](#) [人乳头瘤病毒58型\(HPV58\)酿酒酵母复制系统的建立及病毒早期基因E2功能的研究](#)[学位论文]2009
6. [姜波玲](#) [HPV L1共同保守序列多肽多价性的HPV阳性临床标本的检测](#)[学位论文]2007
7. [安菊生, 王德华](#) [080树突状细胞为基础的疫苗治疗宫颈癌:一项15例患者个体化治疗的临床实验结果](#)[期刊论文]-[国外医学\(妇产科学分册\)](#) 2004, 31(6)
8. [乔云波](#) [子宫颈病变的流行病学和循证医学](#)[会议论文]-2002
9. [汪江华, 府伟灵, 刘明华, 王颖莹, 薛强, 黄君富, 朱前勇, WANG Jianghua, Fu Weiling, Liu Minghua, Wang Yingying, XUE Qiang, Huang Junfu, ZHU Qianrong](#) [压电基因传感器芯片技术在快速检测人乳头瘤病毒中的应用](#)[期刊论文]-[中华医学杂志\(英文版\)](#) 2002, 115(3)
10. [汪云, 肖岚, 吕凤林, WANG Yun, XIAO Lan, L\(U\) Feng-lin](#) [HPV18E2蛋白CTL表位多肽的构建与表达](#)[期刊论文]-[局解手术学杂志](#)2007, 16(6)

引用本文格式: [余勐](#) [新疆维吾尔妇女宫颈癌组织中HPV16上游调控区突变及其与宫颈癌发生关系的研究](#)[学位论文]硕士 2006