

中图分类号: R373.9

学校代码: 10081

U D C:

密 级: 公开



# 硕士学位论文

宫颈病变患者 HPV 感染及其 E6E7 对 HeLa 细胞的影响

论文作者: 徐媛  
学生类别: 全日制学术型  
学科专业: 病原生物学  
学位类别: 理学硕士  
指导教师: 李淑英教授

唐山 华北理工大学  
2022 年 6 月

**HPV Infection in Patients with Cervical Lesions and the  
Effect of E6E7 on Hela Cells**

Dissertation Submitted to  
**North China University of Science and Technology**  
in partial fulfillment of the requirement  
for the degree of  
**Master of Medicine**  
by  
**Xu Yuan**  
(**Pathogenic Biology**)

**Supervisor: Professor Li Shuying**

**June, 2022**

## 独创性说明

本人郑重声明：所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得华北理工大学以外其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

论文作者签名：徐媛 日期：2022年6月1日

## 关于论文使用授权的说明

本人完全了解华北理工大学有关保留、使用学位论文的规定，即：已获学位的研究生必须按学校规定提交学位论文，学校有权保留、送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以将学位论文的全部或部分内容采用影印、缩印或编入有关数据库进行公开、检索和交流。

作者和导师同意论文公开及网上交流的时间：

自授予学位之日起

自 年 月 日起

作者签名：徐媛

导师签名：李淑英

签字日期：2022年6月1日

签字日期：2022年6月1日

## 摘 要

**目的** 1 通过检测宫颈脱落细胞中人乳头瘤状病毒 (Human papillomavirus, HPV) 感染状况, 筛查宫颈病变早期患者。2 将携带 HPV18E6 与 E7 融合基因的质粒转染 Hela 细胞, 分析 HPV18E6 与 E7 融合基因对 Hela 细胞的影响, 为 HPV18 型感染相关疾病的防治提供科学依据。

**方法** 1 收集宫颈脱落细胞标本及其临床病理资料, 应用荧光定量 PCR 法检测标本中 15 种高危型 HPV 感染状况, 统计分析高危型 HPV 分布与临床病理特征的关系。2 应用 HPV L1 区通用引物进行多聚酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 检测 HPV 感染状况, 用 HPV58 E6 型特异性引物检测 HPV58 感染状况; 应用荧光定量 PCR 检测 HPV58 E6、E2 及人管家基因  $\beta$ -actin 的拷贝数, 通过 E2 与 E6 比值确定 HPV58 整合状态; 同时, 应用 HPV58 癌基因转录扩增方法, 分析整合型 HPV58 整合在宿主染色体的位置。3 设计携带 50bp 巨细胞病毒 Towne 开放读码框 55 (Towne open Reading Frame 55, T-ORF55) 左右同源臂的 GalK、HPV18E6E7 野生型融合基因 (HPV18Wild-type fusion gene, HPV18-wE6E7), 及 HPV18E6E7 突变型融合基因 (HPV18Mutant-type fusion gene, HPV18-mE6E7) 引物, 经 PCR 扩增后产物切胶纯化处理; 将片段 GalK 电转至 Towne 细菌人工染色体 (SW102 Towne Bacterial artificial chromosome, SW102-T-BAC) 感受态细胞, 经 GalK 和氯霉素筛选, 得到 SW102-T-ORF55-Galk-BAC 克隆, 并制备感受态细胞; 分别将所得 HPV18-wE6E7 及 HPV18-mE6E7 电转至感受态细胞, 在含有 2-脱氧-半乳糖培养基中, 通过同源重组及氯霉素抗性筛选, GalK 标记被 HPV18-wE6E7 与 HPV18-mE6E7 所替代, 获得 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 及 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 的克隆, 通过 PCR 验证质粒的正确性; 将所得正确质粒 DNA 转染 Hela 细胞, 通过逆转录 PCR 及测序分析验证融合基因的表达状况; 显微镜下观察转染组 (包括转染 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 及 SW102-T-BAC) Hela 细胞与未转染组 Hela 细胞的形态变化。利用软琼脂克隆实验和 CCK8 实验, 检测构建的 HPV18-mE6E7 融合基因对肿瘤细胞的作用。

**结果** 1 所收集的 2605 例宫颈脱落细胞标本中检出 15 种高危型 HPV 阳性标本 725 例, 其中 620 例 HPV 阳性标本发生了病理改变, 高危型 HPV 阳性率随病变程度的加重而升高。2 将 1269 例宫颈脱落细胞标本用 HPV L1 区引物检测到 295 例 HPV 阳性, 用 HPV58 型特异性引物检测到 34 例标本 HPV58 阳性。通过 HPV58 阳性标本

的整合状态分析，检测到 4 例为纯游离型，8 例为纯整合型，22 例为整合与游离的混合型；统计分析显示：宫颈病变程度与 HPV58 的病毒载量及整合状态无显著相关性；8 例 HPV58 纯整合型标本，分别整合到患者 1 号，2 号，5 号，8 号，17 号染色体。3 经 PCR 扩增获得 1400bp GalK、803bp HPV18-wE6E7 及 803bp HPV18-mE6E 片段，经电转、重组及克隆筛选获得 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 及 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 的克隆。通过测序及逆转录 PCR 分析，证明转染的 HeLa 细胞中突变型和野生型融合基因表达正确。倒置显微镜下进行形态学观察：转染了 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 的细胞出现了接触抑制，不能重叠生长。软琼脂克隆实验结果显示：稳定表达 SW102-T-ORF55-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组未见克隆形成；CCK8 结果显示：稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组生长速度比其他各组细胞生长速度要慢；表明 HPV18-mE6E7 对 HeLa 细胞有抑制作用。

**结论** 1 宫颈脱落细胞中，随宫颈病变程度的加重，高危型 HPV 阳性率呈上升趋势，提示可通过高危型 HPV 感染状况的检测，筛查早期宫颈病变患者。2 高危型 HPV E6 与 E7 基因整合在宿主染色体是随机的。3 所构建的 HPV18 突变型融合基因能够抑制 HPV18 阳性肿瘤细胞的生长。

图 20 幅；表 10 个；参 149 篇。

**关键词：**宫颈病变；宫颈癌；宫颈脱落细胞；人乳头瘤病毒；感染；融合基因

**分类号：**R373.9

## Abstract

**Objective 1** The patients with early cervical lesions will be screened through detecting Human papillomavirus (HPV) infection in cervical exfoliated cells. **2** The plasmid carrying HPV18E6 and E7 fusion gene were transfected into Hela cells, and the effect of HPV18E6 and E7 fusion gene on Hela cells was analyzed, which will be providing scientific basis for the prevention and treatment of HPV18 infection-related diseases .

**Methods 1** The cervical exfoliated cell specimens and their clinicopathological data were collected. The 15 High-risk HPV (HR-HPV) types in the samples were detected by fluorescence quantitative PCR, and the relationships between the distribution of HR-HPV and clinicopathological features were analyzed. **2** HPV infection was detected using MY09/11 primers and HPV58 was detected using HPV58 E6 specific primers; The copy number of HPV58 E6, E2 and human housekeeper gene  $\beta$ -actin was detected by quantitative fluorescence PCR, and the integration status of HPV58 was determined by the ratio of E2 to E6; At the same time, the position of HPV58 integrated into the host chromosome was analyzed through oncogene transcription amplification. **3** The primers of GalK, HPV18-wE6E7 and HPV18-mE6E7 with 50 bp ORF55 homologous arms were designed, and PCR amplifications were conducted for these corresponding gene fragments, the PCR products were purified. The GalK was electroporated to SW102-T-BAC competent cells and screened in medium containing galactose and chloramphenicol. SW102-T-ORF55-Galk-BAC clones were obtained, and the competent cells were prepared. SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC and SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC were obtained through homologous recombination and resistance screening in medium containing 2-deoxygalactose and chloramphenicol. The plasmid DNA was extracted and verified by PCR. The correct plasmid DNA was transfected into Hela cells. The expressions of HPV18-wE6E7 and HPV18-mE6E7 in transfected cells were verified by reverse transcription PCR and sequencing. The morphological changes of Hela cells in transfected groups and the untransfected group were observed under microscope. The effect of HPV18-mE6E7 fusion gene on tumor cells was detected by soft AGAR clone assay and CCK8 assay.

**Results 1** 725 specimens were 15 HR-HPV positive in 2605 cervical exfoliated cell samples, including 620 cases with pathological changes, and the positive rate of high-risk HPV increased with the severity of the disease. **2** 295 HPV positive were detected in 1269 exfoliated cervical cell samples by HPV L1 primers, among them 34 HPV58 positive were detected by HPV58 specific primers. The results showed that 4 cases were pure episome, 8 cases were pure integration, 22 cases were mixture (including integration and episome) by analyzed the integration status of HPV58 positive samples. Statistical

analysis showed that there were no significant correlation among the degree of cervical lesions with the viral load and integration status of HPV58. Eight HPV58 integration samples were integrated into chromosomes 1, 2, 5, 8, and 17, respectively. **3** 1400bp GalK, 803bp HPV18-wE6E7 and 803bp HPV18-mE6E were obtained by PCR amplification. The clones of SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC and SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC were obtained after electrotransformation, recombination and cloning screening. The expressions of HPV18-wE6E7 and HPV18-mE6E7 in transfected Hela cells were verified by sequencing and reverse transcription PCR. There were contact inhibition and no overlapping growth for transfected Hela cells with SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC through morphological observation under inverted microscope. The results of soft AGAR cloning showed that no clones were formed in Hela cells with SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC. CCK8 results showed that the growth rate of Hela cells with SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC was slower than that of other groups. These results showed that HPV18-mE6E7 inhibited Hela cells.

**Conclusions 1** The infection rate of HR-HPV were increased with the aggravation of cervical lesions, which suggested that cervical lesions will be screened through HR-HPV detection. **2** HR-HPV HPV E6 and E7 genes integration is random. **3** The constructed mutant fusion gene of HPV18-mE6E7 can inhibit the growth of HPV18 positive tumor cells.

Figure 20; Table 10; Reference 149

**Keywords:** Keywords Cervical lesions, Cervical cancer, Cervical exfoliated cells, Human papillomavirus, Infection, Fusion gene

**Chinese books catalog:** R373.

目次	
引言 .....	1
第 1 章 宫颈脱落细胞中人乳头瘤病毒感染型别分布 .....	3
1.1 材料与方法 .....	3
1.1.1 材料 .....	3
1.1.2 研究方法 .....	3
1.2 结果 .....	4
1.2.1 病理脱落细胞学组织学分型 .....	4
1.2.2 标本中感染的 HPV 分型 .....	5
1.2.3 HPV 感染状况与病理组织学类型的关系 .....	6
1.2.4 患者不同年龄组段 HPV 感染状况分析 .....	7
1.3 讨论 .....	7
1.4 小结 .....	8
参考文献 .....	8
第 2 章 HPV58 型感染及整合状况分析 .....	11
2.1 材料与方法 .....	11
2.1.1 主要仪器 .....	11
2.1.2 主要试剂 .....	11
2.1.3 溶液配制 .....	12
2.1.4 临床资料 .....	13
2.1.5 实验方法 .....	13
2.2 结果 .....	18
2.2.1 标本 DNA 质量的鉴定 .....	18
2.2.2 标本中 HPV 感染的 PCR 鉴定 .....	18
2.2.3 HPV 感染与病理细胞学分型的关系 .....	18
2.2.4 病理细胞学分型与 HPV58 病毒载量、整合率的关系 .....	19
2.2.5 HPV58 整合在宿主染色体的整合位置 .....	19
2.3 讨论 .....	22
2.3.1 本地区 HPV 感染型别特点及其与组织病理学的关系 .....	22
2.3.2 本地区 HPV 感染与宿主染色体整合状况分析 .....	22

2.4 小结 .....	23
参考文献 .....	23
第 3 章 携带 HPV18E6E7 融合基因重组病毒的构建 .....	26
3.1 材料与方法 .....	26
3.1.1 主要仪器 .....	26
3.1.2 主要试剂 .....	26
3.1.3 溶液配制 .....	26
3.1.4 材料 .....	28
3.1.5 研究方法 .....	28
3.2 结果 .....	32
3.2.1 融合基因片段的合成 .....	32
3.2.2 SW102-T-ORF55-BAC 插入 GalK 的检测 .....	32
3.2.3 HPV18-wE6E7 与 HPV18-mE6E7 表达质粒的构建 .....	33
3.2.4 转染细胞生长状况 .....	33
3.2.5 转染细胞中 T-ORF55-HPV18-wE6E7 与 T-ORF55-HPV18-mE6E7 表达状况的检测 .....	34
3.2.6 稳定转染 HPV18-mE6E7 的 HeLa 细胞克隆形成能力检测 .....	36
3.2.7 转染 HPV18-mE6E7 的 HeLa 细胞增殖速度检测 .....	37
3.3 讨论 .....	39
3.4 小结 .....	41
参考文献 .....	41
结 论 .....	44
第 4 章 综述 .....	45
4.1 人乳头瘤病毒基因结构及分型 .....	45
4.1.1 HPV 基因结构 .....	45
4.1.2 HPV 病毒分型 .....	46
4.2 病毒感染方式及致癌机制 .....	46
4.2.1 HPV 病毒感染方式 .....	46
4.2.2 HPV 病毒致癌机制 .....	47
4.3 HPV58/18 和宫颈癌 .....	48
4.3.1 HPV 58 .....	48
4.3.2 HPV18 .....	49

4.4 HPV 与其它癌症 .....	49
4.5 HPV 筛查技术 .....	50
4.5.1 细胞学 .....	50
4.5.2 组织学 .....	51
4.5.3 分子生物学 .....	51
4.6 HPV 治疗 .....	52
4.6.1 手术治疗 .....	52
4.6.2 物理治疗 .....	52
4.6.3 药物治疗 .....	52
4.6.4 免疫治疗—HPV 疫苗 .....	53
4.7 社会现状与前景展望 .....	53
参考文献 .....	54
致 谢 .....	60
在学期间研究成果 .....	62

## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文全称
APOT	Amplification of papillomavirus oncogene transcripts	癌基因转录扩增
ASCH	atypical squamous cells-cannot exclde	不能排除高级别鳞状上皮内病变
ASCUS	atypical-squamous cells of undetermined significance	未明确诊断意义的不典型鳞状上皮细胞
BAC	bacterial artificial chromosome	细菌人工染色体
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙脂
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
E	Early gene	早期基因
EDTA	ethylene diaminete traacetic acid	乙二胺四乙酸
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion	高度鳞状上皮内病变
L	Late gene	晚期基因
LBmidium	Luria-Bertani midium	LB 培养基
LCR	Long control region	长调控区
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion	低度鳞状上皮内病变
mE6E7	mutant type E6E7 fusion gene	突变型 E6E7 融合基因
NILM	negative for intraepithelial lesion or malignant lesions	未见上皮内细胞病变
ORF	open reading frame	开放性读码区
PBS	phosphate- buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymeras chain reaction	聚合酶链反
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RNase	ribonuclease	RNA 酶
wE6E7	wild type E6E7 fusion gene	野生型 E6E7 融合基因

## 引言

经全世界范围数据综合统计，宫颈癌每年新发病例约为 60.4 万，死亡人数约为 34.2 万，严重威胁妇女的健康<sup>[1]</sup>。高危型人乳头状瘤病毒（HPV）感染是宫颈病变的主要致病因子<sup>[2-4]</sup>。高危型 HPV 感染的宫颈癌患者中，约 90%感染的都是 HPV16、18、31、33、35、45、52、58 型<sup>[5]</sup>。几乎每个宫颈癌患者都和 HPV 病毒感染有关。当然，HPV 感染也和其他各种类型的恶性肿瘤有关系，包括外阴癌、阴道癌、肛门癌和阴茎癌以及生殖器疣等<sup>[6]</sup>。目前，宫颈癌筛查的主要手段有：巴氏涂片法、液基细胞学检查，但由于受到病理医生技术、制片质量、重复率较低等诸多因素的影响。近年来，宫颈筛查略向以 HPV 检测为基础的分子筛查转变<sup>[7]</sup>。

HPV 的基因编码区分两部分，晚期编码区（L 区）和早期编码区（E 区），早期编码区包括：E1，E2，E4，E5，E6 和 E7 早期基因，HPV E6、E7 基因主要是和病毒在细胞内转化功能及致癌性有关，是病毒的关键癌蛋白，E6 与 E7 蛋白能够与抑癌蛋白 p53 及 pRb 结合使其失去调节细胞周期的能力，最终使细胞上皮发生病理变化形成永生上皮细胞，从而导致宫颈癌的发生<sup>[8]</sup>。HPV 基因组通常是以正常的形态存在于正常细胞内，由宿主细胞自身的调控功能将其排出体外，而在恶性细胞中，HPV 基因继续存活，并与宿主染色体结合，从而进一步恶化。

国外有研究显示：13 种高危 HPV 中，HPV16 最常见（约占总感染率的 50%），其次 HPV18（约占总感染率的 50%），二者占宫颈癌的 70%；鳞状上皮内病变和宫颈癌患者中 HPV58 阳性率 18.3%<sup>[9]</sup>；我国不同地区 HPV58 感染率不同，广西宫颈癌患者中 HPV58 感染状况显示为 22.8%<sup>[10]</sup>，福建省流行病学调查显示女性中 HPV58 阳性率占 6.2%<sup>[11]</sup> HPV 的整合部位多数发生在 E2 区，也会使这些基因丢失。病毒基因整合到宿主细胞使其恶化可能有多种原因，E2 基因能够调控 E6E7 蛋白，但一旦 E6E7 失去功能，它的表达就会失控，从而导致 E6E7 的过度表达，另外 E6E7 转录后，其 mRNA 与宿主基因结合，使肿瘤蛋白的合成更加稳定。当一个基因在宿主细胞中稳定地表达之后，它的顺序被扰乱，基因组也被重新排列，因此 HPV 整合在于宿主细胞内，诱发并且维持了癌变的状态。为探讨宫颈脱落细胞中 HPV58 感染及整合状况，本文收集了患者的宫颈脱落细胞和临床资料，统计并分析了 HPV 感染与病理特征的关系。用 HPV L1 区通用引物进行 PCR 扩增，检测 HPV 总感染率及各型所占百分比；同时，用 HPV58E6 型特异性引物检测 HPV58 感染及整合状况，分析 HPV58 整合到染色体的位置，以便对宫颈病变患者进行早

期筛查。

目前在临床上使用的疫苗都是基于 HPV 基因表达产物 L1、L2 区域开发的预防性疫苗，包括二价、四价、九价 HPV 疫苗，目前已经在全球使用<sup>[12,13]</sup>。该预防性疫苗有很和高的免疫原性和免疫反应性，可以保护 80%的接种人群不被 HPV 感染<sup>[14,15]</sup>，激活免疫系统发生免疫应答。但是，该疫苗只是供给正常人群，对于已经感染的 HPV 所引起的病变没有治愈功效，治疗性疫苗是通过识别感染细胞中的病毒抗原，清除病毒中的抗原并且阻止病变的进一步发展，可以用于已经感染 HPV 病毒和发生病变的人群中<sup>[16]</sup>，所以，治疗相关疾病疫苗的研制是很有必要的。依据上述资料，本项研究通过构建携带 HPV18 E6E7 融合基因：包括突变型（Mutant type E6E7, mE6E7）和野生型（Wild type E6E7, wE6E7）的重组巨细胞病毒，分析 HPV18-mE6E7 及 HPV18-wE6E7 对细胞的影响，为 HPV E6 与 E7 生物学功能的研究提供了理论依据，进而为治疗性疫苗的研制奠定基础。

本研究收集了宫颈脱落细胞标本 2605 例，根据病理细胞学分型及实时荧光定量 PCR 结果，对所检标本 HPV 型别及临床资料进行了统计分析，同时，对一部分标本中 HPV58 的整合状态及整合位置进行了分析，并构建了 HPV18 E6 与 E7 融合基因的重组病毒，进一步探讨 HPV 致病相关机制，为宫颈癌的筛查和治疗提供新的靶点。

## 第1章 宫颈脱落细胞中人乳头瘤病毒感染型别分布

### 1.1 材料与方法

#### 1.1.1 材料

1) 标本纳入：于 2019 年 1 月至 2020 年 12 月，采集在华北理工大学附属医院妇科门诊就诊的 2605 例女性宫颈脱落细胞标本。这些就诊者年龄在 20~68（平均 45.0±5.0）岁，均来自于河北唐山市地区，无子宫颈锥切和子宫切除术史；以前没有进行过 HPV 检测；没有接种过 HPV 疫苗；标本采集 3 天内不使用任何药物；在非月经期女性。就诊女性包括：正常查体女性，宫颈病变患者。

2) 标本收集：由妇科门诊大夫进行标本收集。将收集到的标本分为三份放置于三个无菌保存管中，作好标记，第一份标本由病理科医师进行病理诊断；第二份标本用于 HPV 感染状况及整合状态检测；第三份标本用于 HPV 整合位点的检测。

3) 主要仪器和试剂：上海宏石医疗技术公司研制的 SLAN-96P Real-Time PCR System；圣湘科技生物公司研制的实时荧光定量 PCR 试剂盒。

#### 1.1.2 研究方法

##### 1) 病理细胞学诊断

应用离心沉淀式液基薄层压片技术制备涂片方法为：用宫颈细胞刷取宫颈脱落细胞，于已编号的含保存液的瓶内，通过轻轻震荡，可使刷头上的细胞全部脱落在细胞液中；取 2ml 细胞液于离心管（已置入玻片）中，再置入离心机内 1500 转/分，离心 3 分钟,而后甩片；拔出离心管，倒出上清液，取下玻片干燥；进行巴氏染色。

巴氏染色：

- (1) 将已固化的涂片放入 80%乙醇中 2min。
- (2) 蒸馏水洗 2min。
- (3) 苏木素液染核 10~12min，自来水冲洗。
- (4) 在盐酸-乙醇液分化约 20~30S，至涂片上显浅橘红色。
- (5) 流水冲洗 10~15min，蒸馏水洗。
- (6) 依次用 80%、95%乙醇脱水，各 2min。
- (7) 橙黄 G6 液染色 3~5min。
- (8) 用 95%的酒精洗涤 2~3 遍后，洗去多余染液。
- (9) EA36 工作液染色 3~5min。

(10) 用 95% 的酒精洗涤 2 至 3 遍，以洗去多余染液。

(11) 用无水乙醇洗净染液，二甲苯使片透明，以中性树脂来封片。

染色结果：细胞核被染成深蓝色，核仁被染成红色，鳞状上皮细胞分化成熟程度不同，其胞浆色泽也有显著区别，深粉红色为角化细胞，橙黄色为不全角化细胞，而角化前的细胞则呈浅翠绿或淡蔚蓝色。使用光学显微镜进行观察阅片，依据美国 TBS (the 2014 Bethesda system) 的分级系统，做出病理细胞学分析和诊断。

## 2) 标本 HPV 检测：

(1) 标本处理：从待检标本中提取 1ml 于 1.5ml 的 EP 管中，经瞬时离心后提取待检样本 50 $\mu$ l，再装入另一个干净 EP 管中，并加核酸释放剂 50 $\mu$ l，重新拌匀，作为待检样品的模板备用（包括阴性和阳性对照各 50 $\mu$ l）。

(2) 应用试剂盒（圣湘科技生物集团研制的实时荧光定量分析 PCR 试剂盒）进行 PCR 扩增；本试剂盒同时测试包含了 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66 及 68 型的 15 种高危型的 HPV；PCR 扩增按试剂盒说明书进行，将各种 PCR 成分按照试剂盒说明加到 200 $\mu$ l 无菌 EP 管中，分别加入（1）中的备用样品 10 $\mu$ l 作为模板（包括对照组），并做好标记。PCR 反应的循环参数：在 50 $^{\circ}$ C 与 UNG 酶反应约 2min；94 $^{\circ}$ C 为 Taq 酶活化 5min 为宜；四十个循环：94 $^{\circ}$ C 变性 15sec，57 $^{\circ}$ C 的退火、延伸和荧光采集 30sec；25 $^{\circ}$ C 运行 10 sec。

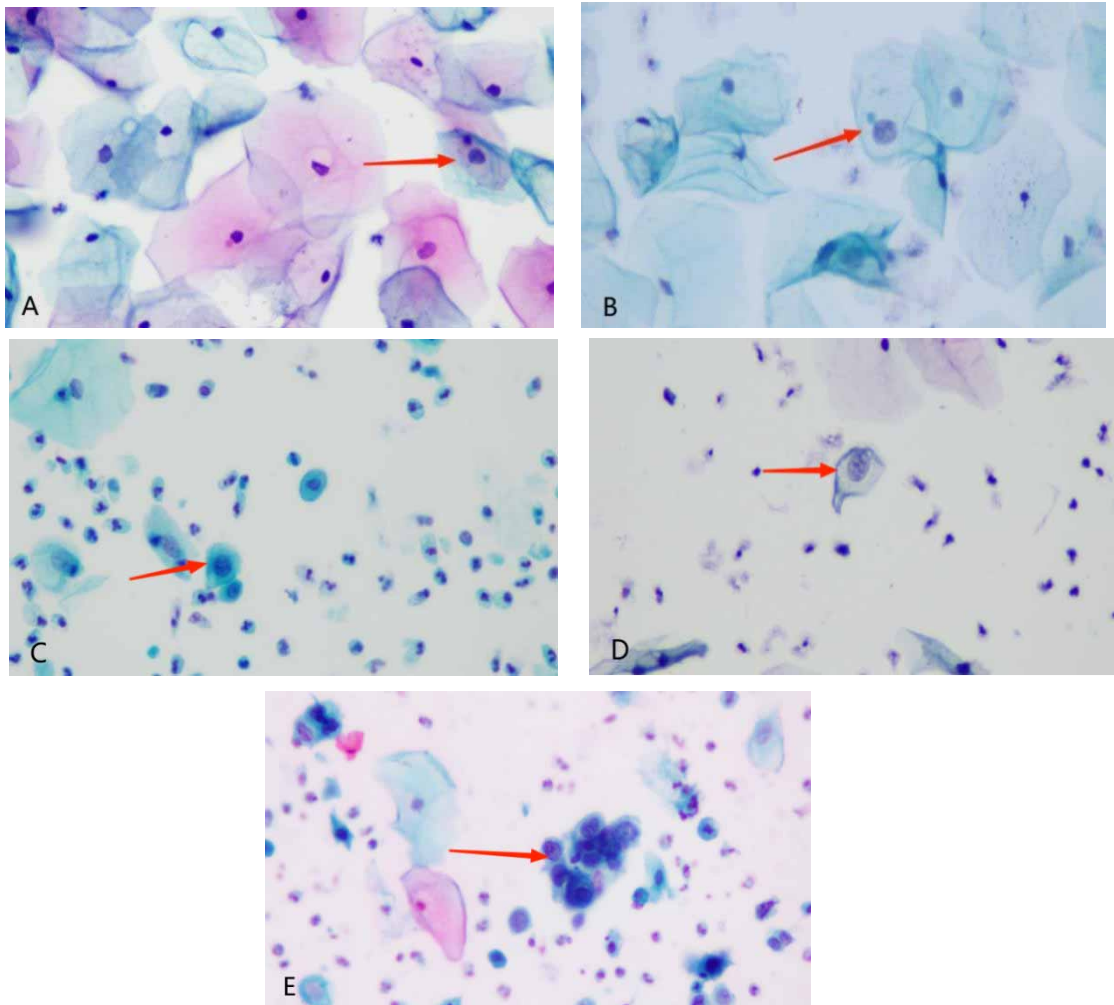
3) 统计数据处理：以 Excel 建立的数据库系统使用 SPSS17.0 软件，统计分析：组间的计数资料采用  $\chi^2$  检验，以  $P < 0.05$  为差异有显著性，以  $P < 0.01$  为差异有极显著性。统计分析宫颈脱落细胞中 HPV 感染状况与临床病理特征的相关性。

## 1.2 结果

### 1.2.1 病理脱落细胞学组织学分型

根据 Bethesda 分级系统，经病理细胞学组织学分型分析，将所收集标本诊断为如下不同组织学类型：包括无宫颈上皮内的瘤变（Negative for intraepithelial lesion or malignant lesions, NILM）、未明确诊断意义的不典型鳞状上皮细胞（Atypical-squamous cells of undetermined significance, ASCUS）、不能排除高级别鳞状上皮内病变（Atypical squamous cells-cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion, ASCH）、低度鳞状上皮内病变（Low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL）、高度鳞状上皮内病变（High-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL）。经巴氏染色可见，NILM 细胞形态细胞界限清楚，细

胞核居中（图 1A）；ASCUS 细胞形态细胞核增大，核质比轻度增高，染色质分布均匀（图 1B）；ASCH 细胞形态细胞核增大，染色质稍深染，核质比增高（图 1C）；LSIL 细胞形态细胞异型，中层细胞核的 3 倍以上，核染色质粗糙，均匀核膜轻度不规则（图 1D）；HSIL 细胞形态细胞异型明显，细胞核大，染色质深染，核膜凹凸不平，核质比明显增高（图 1E）。



A—无宫颈上皮内的瘤变（NILM）；B—不典型鳞状细胞（ASC-US）；C—不能排除高级别鳞状上皮内病变（ASC-H）；D—鳞状上皮内的低度病变（LSIL）；E—鳞状上皮内高度病变（HSIL）。

图 1 不同组织学类型的病理细胞（巴氏染色 ×400）

### 1.2.2 标本中感染的 HPV 分型

通过实时荧光定量 PCR 扩增（图 2）对 2605 例宫颈脱落细胞标本分析，检测到 725 例阳性（阳性率 27.8%）（图 3），包括 HPV16（82 例）、18（19 例）、31（26 例）、33（28 例）、35（15 例）、39（50 例）、45（11 例）、51（69

例)、52 (144 例)、53 (65 例)、56 (40 例)、58 (75 例)、59 (19 例)、66 (28 例)、68 (54 例), 当中病毒感染率最高, 而排行前五名的型别顺序为: 第一, HPV52 型, 其感染率为 5.5%; 第二, HPV16 型, 其感染率约为 3.1%; 第三, HPV58 型, 其感染率为 2.8%; 第四, HPV51 型, 其感染率为 2.6%; 第五, HPV53 型, 其感染率为 2.5%。

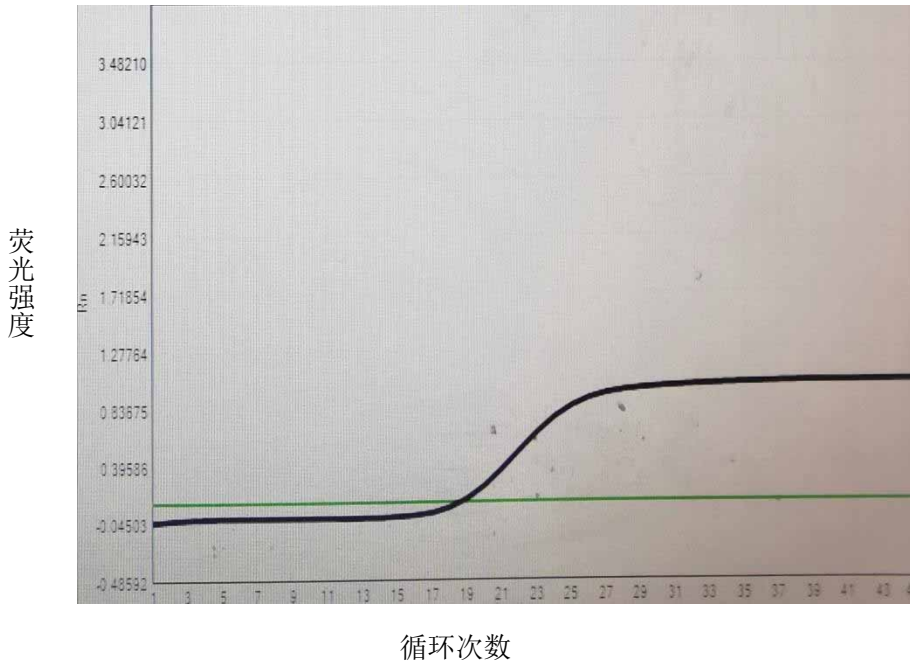


图 2 实时荧光定量 PCR 扩增曲线

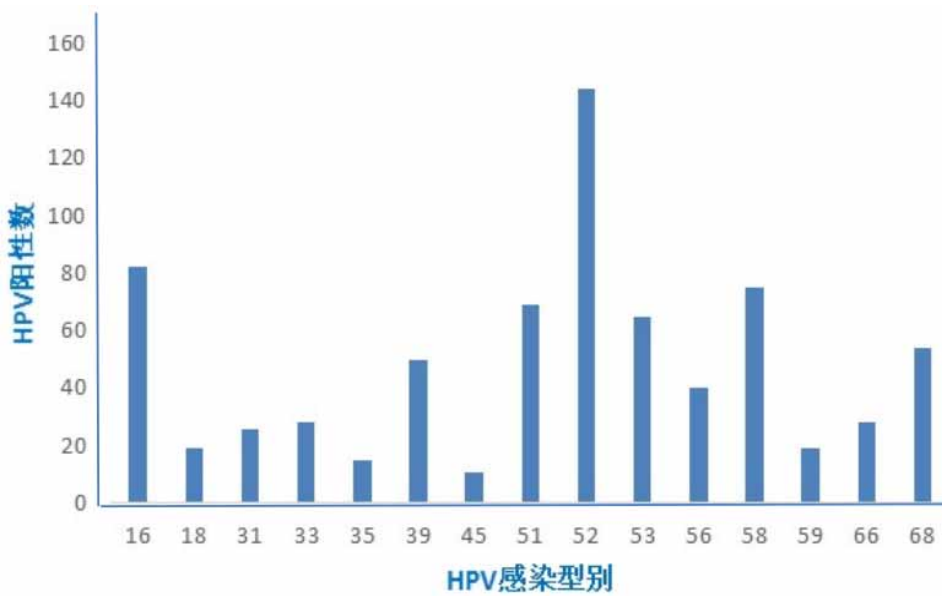


图 3 所检标本中高危型 HPV 感染状况

### 1.2.3 HPV 感染状况与病理组织学类型的关系

将所收集的标本依据病理组织学分型及 HPV 感染状况进行统计分析, 所得结果如表 1。从表 1 中可以看出, HPV 阳性率在 NILM 组为 15.19% (105/2008), ASC-US 组为 62.55% (172/275), ASC-H 组为 66.88% (105/157), LSIL 组为 81.25% (91/112), HSIL 组为 98.11% (52/53), 经统计分析显示: 不同组织学类型的 HPV 感染, 具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 并且随着患者宫颈病变程度的加重 HPV 阳性率呈现增高的趋势。

表 1 不同病理分型 HPV 感染状况

组织学类型	HPV 阳性数 (例)	HPV 阴性数 (例)	被检人数 (例)	阳性率 (%)
NILM	305	1703	2008	15.19
ASC-US	172	103	275	62.55
ASC-H	105	52	157	66.88
LSIL	91	21	112	81.25
HSIL	52	1	53	98.11
合计	725	1880	2605	27.8

注:  $\chi^2=733.415$   $P < 0.01$

#### 1.2.4 患者不同年龄组段 HPV 感染状况分析

依据患者年龄段进行分组, 将所收集标本进行分组如下: 30 岁以下组, 31~40 岁组, 41~50 岁组, 51~60 岁组, 大于 60 岁组, 不同年龄组段 HPV 阳性率存在差异, 其中在 41~50 岁组 HPV 的阳性率最高为 33.33% (239/717)。经卡方检验  $P < 0.01$ , 说明差异具有统计学意义。

表 2 不同年龄组段 HPV 感染状况

年龄 (岁)	HPV 阳性数 (例)	被检人数 (例)	阳性率 (%)
≤30	98	459	21.35
31-	215	720	29.86
41-	239	717	33.33
51-	131	490	26.73
61-	42	219	19.18
合计	725	2605	27.8

注:  $\chi^2=30.339$   $P < 0.01$

### 1.3 讨论

宫颈癌也是当今世界上所有妇女中最常见的恶性肿瘤之一<sup>[17,18]</sup>。女性和男性一

生中均有可能被感染，至少感染一次的风险大约为 50%<sup>[19]</sup>。不是所有 HPV 感染的女性都会发展为宫颈癌，只有少数发展为癌变，是因为多数 HPV 感染者都能由宿主免疫系统自动移除感染的 HPV；宫颈病变以及宫颈癌的出现与长期的 HPV 病毒感染和对宿主基因组影响有关<sup>[20,21]</sup>。宫颈病变的主要威胁原因都是高危型 HPV 感染<sup>[22]</sup>，HPV E6 和 E7 基因是宫颈病变转化的主要基因<sup>[23]</sup>，通过 HPV E6 和 E7 基因检测，进行 HPV 感染的诊断，筛查宫颈病变的早期患者<sup>[24]</sup>。

本项研究收集了 2605 例宫颈脱落细胞，均进行了高危型 HPV 检测，分析了 HPV 的感染状况的，其结果显示：有 725 例 HPV 阳性，其中，感染率位居前 3 的型别有 HPV52，16，58 与我国 HPV 感染的流行病学特点一致<sup>[25-27]</sup>。同时与东亚地区 HPV 感染型别也是基本符合<sup>[28,29]</sup>。根据病理细胞学检测结果表明：HPV 的阳性率随患者宫颈病变程度的加重而增加( $P<0.01$ )，因此采用高危型 HPV 病毒感染状况检查，可对宫颈病变患者进行早期筛查。依据患者年龄，将不同年龄组别进行 HPV 感染状况统计分析，在 41~50 岁组 HPV 的阳性率最高；该项研究结果与 Pandey<sup>[30]</sup>报道的年轻女性(20~35 岁)被认为是 HPV 感染的高危人群不一致，因此这方面还需增加更多病例进一步研究。所以女性应定期做 HPV 型别及病理细胞学诊断筛查，早期发现宫颈病变患者，做到早发现、早治疗，减少患者痛苦，可提高患者生命质量，并为宫颈病变的流行病学调查提供理论依据。

#### 1.4 小结

通过分析所检宫颈脱落细胞标本中人乳头瘤病毒感染状况及其型别分布，发现 15 种高危型 HPV 感染与患者宫颈病变程度间呈正相关性，并且感染率较高排在前三位的型别为 HPV52、HPV16 及 HPV58；提示可通过高危型 HPV 感染状况检查，筛查宫颈病变早期患者，以便及时对患者进行治疗。

#### 参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin. 2021, 71(3):209-249.
- [2] RANTSHABENG P, KASVOSVE I, NDLOVU A, et al. Prevalence of high-risk human papilloma virus in women with high-grade squamous cell intraepithelial lesions in Botswana

- using Abbott RealTime HPV assay [J]. PLoS One, 2019, 14(1):e0211260.
- [3] PARK Y, KIM TJ, HWANG CS, et al. Risk of cervical dysplasia among human papillomavirus-infected women in Korea: a multicenter prospective study [J]. J Gynecol Oncol, 2019, 30(3):e50.
- [4] KUDO A, SATO S, ITAMUCHI H, et al. Human papillomavirus type-specific persistence and reappearance after successful conization in patients with cervical intraepithelial neoplasia[J]. Int J Clin Oncol, 2016, 21(3):580-587.
- [5] ZHAI L, TUMBAN E. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy [J]. Antiviral Res, 2016, 130:101-109.
- [6] LARGERON N, PETRY KU, JACOB J, et al. An estimate of the public health impact and cost-effectiveness of universal vaccination with a 9-valent HPV vaccine in Germany [J]. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res, 2016, 15:1-14.
- [7] MBOUMBA BOUASSA RS, NODJIKOUAMBAYE ZA, et al. High prevalence of cervical high-risk human papillomavirus infection mostly covered by Gardasil-9 prophylactic vaccine in adult women living in N'Djamena, Chad[J]. PLoS One, 2019, 14(6):e0217486.
- [8] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002, 2(5):342-350.
- [9] MOLANO M, BUITRAGO O, MORENO-ACOSTA P, et al. Follow-up study of HPV58 variants in women with incident HPV58 infection from a Colombian cohort [J]. Oncol Lett, 2018, 16(2):2511-2516.
- [10] CHEN M, WANG H, LIANGY, et al. Clinical analysis of HPV58-positive cervical cancer [J]. Infect Agent Cancer, 2020, 15: 38-45.
- [11] WU C, ZHU X, KANG Y, et al. Epidemiology of Humanpapilloma virus infection among women in Fujian, China [J]. BMC Public Health, 2017, 18 (1): 95-99.
- [12] 杨菁, 皮洁, 程苾恒. 人乳头瘤病毒疫苗预防宫颈癌的研究进展[J].世界临床药物, 2016, 37(12) : 849-853.
- [13] YIH WK, KULLDORFF M, DASHEVSKY I, et al. A Broad Safety Assessment of the 9-Valent Human Papillomavirus Vaccine. Am J Epidemiol. 2021, 190(7): 1253-1259.
- [14] MACHALEK DA, GARLAND SM, BROTHERTON JML, et al. Very low prevalence of vaccine human papillomavirus (HPV) types among 18 to 35 year old Australian women, nine years following implementation of vaccination[J]. J Infect Dis, 2018, 217 (10) : 1590-1600.
- [15] LANDIER W, BHATIA S, WONG FL, et al. Immunogenicity and safety of the human

- papillomavirus vaccine in young survivors of cancer in the USA: a single-arm, open-label, phase 2, non-inferiority trial[J]. *Lancet Child Adolesc Health*, 2022 6(1): 38-48.
- [16] 陈刚, 李剑波, 高孟, 等. HMGB1 对 HPV16 型重组腺病毒载体疫苗免疫效果的影响及机制研究[J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(6) : 827-831.
- [17] SARAH L. BEDELL, LENA S. GOLDSTEIN, AMELIA R, et al. Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future[J]. *Sex Med Rev*, 2020, 8(1): 28-37.
- [18] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [19] BRIANTI P, DE FLAMMINEIS E, MERCURI SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol*, 2017, 40(2): 80-85.
- [20] AL AKEEL R. Identification of HPV Integration and Genomic Patterns Delineating the Clinical Landscape of Cervical Cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*.2015, 16(18): 8041-8045.
- [21] HU Z, MA D, et al. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(10): 5217-5236.
- [22] WU Z, QIN Y, YU L, et al. Association between human papillomavirus (HPV) 16, HPV18, and other HR-HPV viral load and the histological classification of cervical lesions: results from a large-scale cross-sectional study[J]. *J Med Virol*, 2017, 89: 535–541.
- [23] 朱丽娟, 周树林, 江希萍. 重组人干扰素  $\alpha 2b$  联合洁悠神对宫颈持续 HPV 感染患者端粒酶与 HPV16/18 E6 蛋白表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(25): 29-33.
- [24] NTANASIS-STATHOPOULOS I, KYRIAZOGLOU A, LIONTOS M, et al. Current trends in the management and prevention of human papillomavirus(HPV)infection[J]. *J BUON*, 2020, 25(3): 1281-1285.
- [25] BERRY JM, PALELSKY JM. A Review of Human Papillonmavirus Vaccines:From Basic Science to Clinical Trials[J]. *Front Biosci*,2003, 8(5): 333-345.
- [26] DANIEL B, RANGARAJAN A, MUKHERJEE G, et al. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions[J].*J Gen Virol*. 1997, 78(5):1095–1101.
- [27] 陈晓颖, 陈航, 谢书琳, 等. 福建省福清地区 10971 例女性 HPV 感染状况及基因型流行病学分析[J]. *中国当代医药*, 2021, 8(06): 160-162.
- [28] .KIM J, KIM BK, JEON D, et al. Type-Specific Viral Load and Physical State of HPV Type 16, 18, and 58 as Diagnostic Biomarkers for High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions or

- Cervical Cancer[J]. *Cancer Res Treat*, 2020, 52(2): 396-405.
- [29] AIELLO CM, ESQUE TC, NUSSEAR KE, et al. The slow dynamics of *Mycoplasma* infections in a tortoise host reveal heterogeneity pertinent to pathogen transmission and monitoring *Epidemiol Infect* [J]. *Epidemiol Infect*, 2018, 147(Sep 25): 1-10.
- [30] PANDEY D, SOLLETI V, JAIN G, et al. Human Papillomavirus (HPV) Infection in Early Pregnancy: Prevalence and Implications [J]. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2019, 2019: 4376902.

## 第2章 HPV58 型感染及整合状况分析

### 2.1 材料与amp;方法

#### 2.1.1 主要仪器

表 3 实验所用仪器及生产公司

主要仪器	采购公司
FINNPIPETTE F3 微量移液器	山东欧莱博医疗器械有限公司
微波炉	中国美的公司
电热恒温培养箱（隔水式）	常州市臣明实验仪器科技有限公司
漩涡混匀器	江苏省海门市麒麟医疗仪器厂
XMTD-600 水浴箱	北京长风仪器公司
电泳仪电源和电泳仪	北京市六一仪器厂
SCOUT SPN302F 电子天平	美国奥豪斯公司
冰箱	中国美的公司
台式离心机	上海安亭科学仪器设备厂
AF 负 30 系列的自动制冰机	意大利 Scotsman 公司
Sigma 2-16K 低温高速离心机	美国 Sigma 公司
22331Hamburg 型 PCR 仪	德国 eppendorf 公司
SLAN-96R Real-Time PCR 仪	上海宏石有限公司
CO2 培养箱	1 美国 Thermo 公司
HR40-IIA2 生物安全柜	苏洁医疗器械有限公司
恒温培养摇床	上海继普电子科技有限公司
Universal HoodI型凝胶成像仪	美国 BIO-RAD 公司
MILLI-Q 纯水机	美国 MILLIPORE 公司
SX-700 型快速自动高压灭菌器	爱来宝（济南）医疗科技公司

#### 2.1.2 主要试剂

表 4 实验用的主要试剂及生产公司

主要试剂	采购公司
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN, 德国
2xTaq PCR Master Mix	北京市艾德莱生物技术有限公司
DL2000 DNA Ladder	上海市博华生物技术有限公司
100bp DNA Ladder Maker	广州市东盛生物技术有限公司
$\lambda$ -EcoT14 I digest DNA maker	宝日医生物技术(北京)有限公司
巴氏染色液	湖北省安立信医疗生物有限公司
Ampli Taq Gold DNA 聚合酶	AB Applied Biosystems, 美国
2.5mM dNTPs	TakaRa 宝生物工程(大连)有限公司
DNA 凝胶回收试剂盒	上海市博湖生物技术有限公司
Goldview 核酸染料	上海市博华生物技术有限公司
琼脂糖	上海 GENE TECH 公司
6×电泳上样缓冲液 (LoadingBuffer)	北京市普利莱生物技术有限公司
pGEM-T easy Vector (T 载体)	上海信裕生物科技有限公司

### 2.1.3 溶液配制

#### 1) 磷酸盐缓冲液配制

称取 12.54g  $K_2HPO_4$  和 2.31g  $KH_2PO_4$  溶解在 90ml 双蒸水中, 并定容至 100ml, 高压灭菌。

#### 2) 10TBE Buffer (pH 8.3)

称取 7.44g  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ , 108g Tris, 55g  $H_3BO_3$ , 置于 1 升烧杯中, 加入 800 毫升双蒸水后, 搅拌溶液, 待其完全融化, 并用双蒸水定容至 1000ml, 室温暗处保存。

#### 3) 0.5×TBE Buffer

将 3.2 配置的 10×TBE, 取 100ml, 加 1900ml 去离子水混匀, 使其稀释成, 0.5xTBE Buffer 室温暗处保存。

#### 4) 2×Loading Buffer

用加样器吸取 100 $\mu$ l 的 6×Loading Buffer, 置于 1.5ml EP 管中, 然后向管中加入去离子水 200 $\mu$ l, 混匀即为 2×Loading Buffer。

#### 5) LB/Amp 培养基

称 5g NaCl, 2.5g Yeast Extract, 以及 5g Tryptone, 并放入 500ml 刻度烧杯中, 与此同时加入双蒸水大约 400ml, 充分混合使之融化; 慢慢地再次注入 5mol/l NaOH 溶液, 将 pH 值调整到 7.0, 然后用加双蒸水法将混合液定容至 500ml 刻度, 高压消毒灭菌后, 冷至室温温度, 加 0.5ml Ampicillin (100mg/ml) 后均匀搅拌, 4℃ 储存。

#### 6) 质粒提取用 Solution I, Solution II, Solution III

分别配置三种试剂: I 试剂配置: 量取 20ml 0.5mol/l EDTA (pH 8.0), 25mL 1mol/l tris-HCl (pH 8.0), 45mL 20%Glucose (1.11 mol/l), 再加入双蒸水 910ml。使用前每 25ml 加入 1mL RnaseA (20mg/ml); II, III 试剂配制: 备用 2 个体积 500ml 烧杯, 取 2mol/l NaOH 50mL 和 10%SDS 50ml 放入一杯中, 另一杯加 CH<sub>3</sub>COOH 50ml 和 KAC 50ml, 两个杯子加入灭菌用水定容至 500ml。三种溶液充分混匀后, 高压蒸汽灭菌 20min, 4℃ 保存。

### 2.1.4 临床资料

收集 2019 年 01 月~2019 年 12 月之间门诊就诊女性的宫颈脱落细胞标本及其相关病理资料 1269 例 (病例资料同 1.1.1)。

HPV58 E2、HPV58 E6/E7 及  $\beta$ -actin 质粒, 293 细胞基因组 DNA, 以及 Hela 宫颈癌细胞基因组 DNA 的实验材料, 在华北理工大学的基础医学院的病原生物学系 2 个实验室均有备存。

### 2.1.5 实验方法

#### 1) 引物设计与合成

HPV 感染相关疾病细胞中, HPV E6/E7 基因保持完整, 并整合在宿主细胞染色体, 其 E2 区域基因不稳定<sup>[31-33]</sup>, 容易成为 HPV E6/E7<sup>[34-36]</sup>整合入宿主细胞染色体的缺失或断裂部位; 因此, 在设计引物时, 根据 GenBank 提供的 HPV58 基因序列, 选择 HPV58 E2 的三个基因区域, 即 HPV58 E2 基因起始区 2753~2981 序列, “绞链区”或“中心区”基因 3211~3387 序列, 接近终点区基因 3740~3829 序列, 应用 VectorNTI 11 软件设计 HPV58 E2 的三对引物, 以便真实反映 HPV58 缺失或断裂情况, 并能准确分析出 HPV58 整合状态; 同时, 应用 VectorNTI 11 软件设计 HPV58 E6、P1-HPV58 E7、P2-HPV58 E7 引物, 并合成 MY09/11、 $\beta$ -actin、Oligo (dT) 17-p3 及 P3 引物 (表 5)。委托上海生工合成上述引物。

表 5 引物序列及产物大小

Primer	Sequences (5'-3')	position	Amplicon size (bp)
HPV58 E2 Primers			
HPV58 E2-1	GATGGAGGA AATATCAGCA CG	2752~2772	198
HPV58 E2-2	CTTTGATGCTACCAATGAGC	2931~2950	
HPV58 E2-3	GAAGTTGACTATGTGGGGTTG	3203~3223	189
HPV58 E2-4	CTTTGGGTCAGCAGTTTCAG	3372~3391	
HPV58 E2-5	GT AATATGTCAT CCACATGGC	3669~3689	161
HPV58 E2-6	TTACAATGACATAACACCAG	3810~3829	
MY09/11 Primers			
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGA TC	7015~7034	450
MY11	GCM CAGGGWCATAAAYAATGG	6583~6602	
HPV58 E6 Primers			
HPV58 E6-1	GTAAAGTGTGCTTACGATTGC	297~317	262
HPV58 E6-2	TACACTTGTGTTTGTCTACG	539~558	
$\beta$ -actin Primers			
Forward	CA CCC ACA CTG TGC CCA TCT	550~560	289
Reverse	GAA CCG CTC ATT GCC AAT GG	819~838	
Oligo (dT) 17-p3	GACTCGAGTCGACATCGATTTTT TTTTTTTTTTTT		
p3	GACTCGAGTCGACATCG		
P1-HPV58 E7	CTGCTATGA GCAATTATGT GAC		
P2-HPV58 E7	ACGAGGATGA AATAGGCTTG		

## 2) 标本基因组 DNA 及总 RNA 提取

应用酚氯仿方法提取收集标本基因组DNA，即：

- (1) 取宫颈脱落细胞1ml于试管内，用无菌0.9%生理盐水洗涤三次，每次离心8000rpm，3min弃上清，留取细胞。
- (2) 取洗涤浸泡好的细胞悬液1ml于约1.5ml的EP管内，加入Lysis-Buffer 500 $\mu$ l和蛋白酶k 15 $\mu$ l，在充分拌匀后55 $^{\circ}$ C的水浴中加温15min。
- (3) 加入酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）的混合物液600 $\mu$ l，反复混匀10min为宜，15000rpm常温离心10min后，取上等清液于EP管内。
- (4) 准备装有1200 $\mu$ l冰冻无水乙醇的EP管，向管中加入600 $\mu$ l上清液，然后高速低温离心10min，离心机设置15000rpm 4 $^{\circ}$ C，最后弃上清。
- (5) 向EP管中加入75%冰乙醇 600 $\mu$ l清洗沉淀物，除去残余盐类杂质，混匀后27 $^{\circ}$ C离心6min，弃上清。如清洗不净，可多次反复操作。
- (6) 室温干燥半小时，晾干DNA沉淀物。

(7) 加入TE Buffer (pH8.0), 于-20℃冰箱保存备用。

基因组 DNA 提取后进行浓度测定, 保存于-20℃。

Trizol 法提取宫颈脱落细胞总 RNA:

①用无菌生理盐水把收集的脱落细胞冲洗三遍, 然后再把冲洗好的脱落细胞转移到 10ml 离心管中, 以 1000rpm 离心 3min, 把上清扔掉, 加入 1ml Trizol, 多次吹打, 充分使细胞裂解。

②将该液体转移至 1.5ml EP 管 (经过 0.1%DEPC 水处理并灭菌), 室内温度, 静置 5min。

③加入 200 $\mu$ l 氯仿, 剧烈颠倒混匀 30s, 然后放在室内, 常温 5min 后, 于 4℃, 12000 rpm 离心 10min。

④将上层水相层移到新 1.5ml EP 管中, 添加异丙醇 (按照 1: 1 比例) 混合, 再次室温静置 10min 后。置于 4℃ 12000rpm 离心 15min 后去掉上清。

⑤75%酒精溶液提前冷却, 再加入管中 1ml 清洗管壁并沉淀, 4℃, 10000rpm 离心 10min 同样去上清液, 放置室温晾干, RNA 产物加入的无菌 DEPC 水溶解, 经电泳检测, 将所提总 RNA 于-80℃保存。

### 3) 标本质量检测

为后续实验的顺利进行, 以人管家基因  $\beta$ -actin 作内参引物 (表 5), 每例标本基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 扩增验证所提标本质量。PCR 扩增每个反应总体积为 20 $\mu$ l: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix, 2pmol/l  $\beta$ -actin 引物, 加入所提标本基因组 DNA 0.5 $\mu$ l (其浓度为 100ng/ $\mu$ l), 加入无菌双蒸水, 总体积至 20 $\mu$ l。PCR 循环参数: 95℃/5min; 然后 31 个循环: 95℃/30sec, 55℃/30sec, 72℃/30sec; 72℃/5min; 20℃保存。得到了 PCR 扩增的产物, 在 1.0%琼脂糖凝胶 (含有 0.01% GoldView II 型核酸染料染色) 电泳上检测。

### 4) 标本 HPV 检测

HPV L1 区通用引物 MY09/11<sup>[37]</sup>PCR 扩增所得产物为包括 HPV16, 18, 31, 33, 52, 58 型等二十多个型别的 HPV, 可以将其作为 HPV 总感染状况; 用表 5 中 HPV58 E6 引物 PCR 扩增检测 HPV58 感染状况。PCR 扩增体系和循环参数同上述标本质量检测程序。

### 5) HPV58 病毒载量及整合状态

分别将 HPV58 E2、HPV58 E6/E7 及  $\beta$ -actin 质粒进行倍比稀释成六个梯度, 用其作为标准品, 用表 5 中 HPV58 E2、E6 及  $\beta$ -actin 引物, 用制备的标准品做模板, 同时每一例 HPV58 阳性的样品也作为模板, 分别 PCR 扩增, 平行分析三次, 取三

次实时荧光定量 PCR 结果的平均值，计算病毒载量及整合状态；应用  $(E6copy/\beta-actincopy) \times 2$  计算每例标本病毒载量拷贝数；通过 E2/E6 的比值，分析 HPV58 整合状态<sup>[38,39]</sup>。PCR 扩增体系和循环参数同上述标本质量检测程序。

#### 6) HPV58 整合在宿主细胞染色体的位置

按照 HPV 癌基因转录扩增 (Amplification of papillomavirus oncogene transcripts, APOT) 方法，用表 5 中引物 Oligo (dT) 17-p3 将所提总 RNA 进行逆转录，即：反应体系 (20 $\mu$ l)：RNase free 的水 2 $\mu$ l，2.5mmol/l dNTPs 2 $\mu$ l，10pmol/l (dT) 17-p3 1 $\mu$ l，Total RNA 5 $\mu$ l，70 $^{\circ}$ C/10min，冰镇 2min，加入 5 $\times$ M-MLV Buffer 2 $\mu$ l，Rtase M-MLV 0.2 $\mu$ l，42 $^{\circ}$ C/50min，70 $^{\circ}$ C/15min，得到产物 cDNA。然后用 HPV58 E7 型特异性引物，完成了第二轮的 PCR 扩增；第一轮：用表 1 中 P1-HPV58 E7 和 P3 引物，通过 PCR 扩增，用所得 cDNA 作为模板；PCR 反应体系设置为 25 $\mu$ l：1 $\times$ Buffer，MgCl<sub>2</sub> 2.5mmol/l，dNTPs 0.2mmol/l，primer 10pmol/l，Taq DNA 聚合酶 1 $\mu$ l，加入上述 PCR 产物 3 $\mu$ l，加双蒸水至 25 $\mu$ l。PCR 扩增参数设定：95 $^{\circ}$ C 预变性 5min，循环参数 95 $^{\circ}$ C/1min；55 $^{\circ}$ C/1min；72 $^{\circ}$ C/3min，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 5min；4 $^{\circ}$ C 保存。

第二轮：用表 5 中 P2-HPV58 E7 和 (dT) 17-P3 引物，用上一次 PCR 扩增产物作第二次 PCR 扩增的模板，完成 PCR 扩增；设置 25 $\mu$ l PCR 反应体系：添加 1 $\times$ Buffer，上述引物 10pmol/l，MgCl<sub>2</sub> 2.5mmol/l，dNTPs 0.2mmol/l，1 $\mu$ l 的 Taq DNA 聚合酶，加入第一轮 PCR 产物 3 $\mu$ l，加双蒸水至 25 $\mu$ l。PCR 扩增参数设定：预变性 95 $^{\circ}$ C 5min 后所用 30 个循环参数如下：95 $^{\circ}$ C/1min；65 $^{\circ}$ C/1min；72 $^{\circ}$ C/3min；72 $^{\circ}$ C 延伸 5min；4 $^{\circ}$ C 保存。设置 0.01% 核酸，PCR 产物在琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

第二轮 PCR 产物切胶纯化提取法：在紫外灯下，把以上第二次 PCR 产物条带，分别在琼脂糖凝胶中切下来，放入 1.5ml EP 管中 (EP 管先称重)，放入凝胶块后继续称重，计算胶的数值；用凝胶材料试剂盒回收和纯化；在测定试剂盒中 AC 柱上必须用平衡液预先处理，然后将切过来的胶置于 1.5ml 干净的离心机管中；加入三倍体积有机溶胶/结合液 DB (如凝胶重量为 0.1g，体积视为 100 $\mu$ l，三倍体积就加 300 $\mu$ l)；放在 56 $^{\circ}$ C 水浴 10min，至胶完全溶解，期间可震荡离心机管，确保胶块完全快速溶解；加入异丙醇 (0.1g 胶就需要加入异丙醇 150 $\mu$ l)，震荡均匀；把所得溶液加入事先平衡好的吸附柱 AC 上，12000rpm，离心 1min，管中废液倒掉；(如果所加溶剂过量，就用 1 个吸附柱重复加入所得溶剂至溶剂加完)；最后一次加液体离心时，管嘴方向要比之前的转动 180 $^{\circ}$ ，弃掉所有废液；在 AC 管中事先投

入 700 $\mu$ l 漂洗溶液 WB, 12000rpm, 1min 离心, 弃掉所有废液; 之后再入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB, 12000rpm, 1min 离心, 弃掉废液; 最后将 AC 管 (已空) 再次置入离心机, 12000rpm, 2min 离心后, 所离出的液体废弃; 预先准备在一条洁净的离心机管中, 把已离心完毕的 AC 管取出后置于其中, 在吸附膜的中心部位添加了 40 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB (EB 洗脱液中应先在 65 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C 水浴中加温一下), 接着室温静放 2min, 然后 12000rpm, 1min 离心 (假如 DNA 要求较多时, 应该把 EP 管中的离心完成了的液体吸进来再重复放入到离心吸附柱中, 贴着底部垂直加入液体, 再离心 1min); 所得液体测 DNA 浓度, (范围应在 150ng/ $\mu$ l 以上); 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

感受态细胞的制备方法: 将 EcoliDH5 $\alpha$  接种到 LB 培养基板上, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 20 时, 在 LB 培养基板上挑取 5 $\alpha$  单菌落, 然后注射在 3ml 液体的 LB 培养基中, 以 180rpm 震荡速度摇匀, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 16-20h (或过夜); 次日, 将 0.2mL 过夜菌加入到 20ml 液体 LB 培养基里, 37 $^{\circ}$ C 200rpm 振摇使细菌快速生长至对数生长期 (3~3.5h); 将菌液转移至一个无菌的、用冰预冷的 5ml 离心管中, 在完全无菌条件下进行, 将培养物放入冰中使其冷却至 0 $^{\circ}$ C, 在 4 $^{\circ}$ C 4000rpm 离心 10min 后, 先倒掉溶液中的上清液, 将 0.1mol/l 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液预冷, 温度降至 4 $^{\circ}$ C, 使已沉淀的细菌菌体重悬在 2.5ml 的溶液中。4 $^{\circ}$ C 4000rpm 离心 10min, 弃菌液上清, 放 30min 于冰面上; 4 $^{\circ}$ C 4000rpm 离心 5min, 弃液体上清, 加 2ml (其中 140 $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> 中加入 50%甘油 60 $\mu$ l), 分装在 1.5ml 离心试管中, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

将第二轮产物克隆至 T 载体: 三倍稀释 T 载体, 即取 3 $\mu$ l T 载体加 6 $\mu$ l 无菌双蒸水混匀; 取 1 $\mu$ l 三倍稀释的载体 T 载体加入到 1 个 0.2ml Ep 管, 再加入 4 $\mu$ l 上述第二轮 PCR 产物混匀, 再加入 T 载体试剂盒中 Solution I 5 $\mu$ l, 室温放置一小时; 另取 1 个 0.2ml Ep 管分别加入大肠杆菌感受态细胞 16 $\mu$ l, 再加入上述液 4 $\mu$ l, 放入冰中 30min 后, 放入 42 $^{\circ}$ C 水浴 45s, 然后再放冰中 1~5min 后; 接种到 LB/Amp 平板中, 放 37 $^{\circ}$ C 培养 24h; 取 50ml LB 培养液加 50 $\mu$ l 氨苄青霉素 (Ampicillin, 100mg/ml), 然后取 2ml 放入试管中, 每个管中加 1 个菌落, 倾斜放入 37 $^{\circ}$ C 摇床 (250 值) 培养 24 小时后, 进行质粒提取。

质粒的提取: 取 1ml 上述试管中培养液移至 EP 管中, 标记 EP 管。然后在速度 5.8rpm 的离心机中离心 5min, 吸出所有上清; 加入质粒的提取液 Solution I 200 $\mu$ l, 混匀, 再加入 Solution II 400 $\mu$ l 轻轻摇匀, 最后 Solution III 300 $\mu$ l 轻摇拌匀; 于 13.2 rpm 离心 5 min 后, 吸出上清液滴入 700 $\mu$ l 异丙醇中, 于 13.2 rpm 离心 5min 后, 弃液体上清; 室温放置 5min, 加稀释 RNA 酶水 (RNA 酶: 水=1: 1000) 50 $\mu$ l, 混匀后置 -20 $^{\circ}$ C 保存。经上述克隆筛选所提取的质粒进行测序, 将测序结果

在 Genbank 中进行 nucleotide BLAST, 分析所得结果分析, 确定 HPV58 整合在患者染色体的物理位置。

### 7) 统计学分析

建立所得数据 Excel 数据库, 用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 组间比较采用  $\chi^2$  检验, 组间计数太小样本用非参数检验分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义; 采用 Spearman 进行相关性分析, 以  $P < 0.05$  为具统计学意义。

## 2.2 结果

### 2.2.1 标本 DNA 质量的鉴定

用  $\beta$ -Actin 引物, 对 PCR 扩增的产物经电泳 (琼脂糖凝胶) 结果表明: 每个标本 DNA 均经过 PCR 扩增后, 都有与阳性对照组相一致的 289bp PCR 产物 (图 4), 说明所收集的标本 DNA 可以下一步实验。

### 2.2.2 标本中 HPV 感染的 PCR 鉴定

经 MY09/11 引物扩增后, 1269 例宫颈脱落细胞标本中检测到 295 例有 HPV 感染 (图 5); 其中有 34 例为 HPV58 阳性 (图 6)。

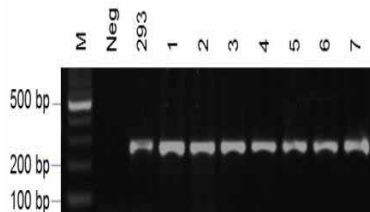


图 4 标本 DNA  $\beta$ -actin 扩增结果

M: 100bp marker; Neg: 阴性对照; 293: 以 293DNA 为模板的阳性对照; 1-7: 7 例不同标本  $\beta$ -actin 扩增的结果。

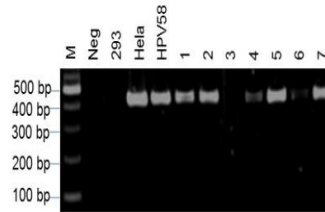


图 5 标本 DNA MY09/11 扩增结果

M: 100bp marker; Neg: 无菌水为模板的空白对; 293: 293DNA 为模板的阴性对照; HeLa: 以 HeLa 细胞 DNA 及 HPV58 阳性标本 DNA 为模板的阳性对照; 1-7: 7 例不同标本用 MY09/11 引物扩增的结果。

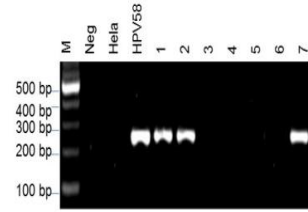


图 6 标本 HPV58 扩增结果

M: 100bp marker; Neg: 293DNA 为模板的阴性对照; HeLa: HeLa 细胞 DNA 为模板的 HPV58 型特异性对照; HPV58: HPV58E6E7 质粒 DNA 为模板的阳性对照; 1-7: 7 例不同标本 HPV58E6 扩增的结果。

### 2.2.3 HPV 感染与病理细胞学分型的关系

依据 TBS 分级系统, 将所收集 1269 例标本进行病理细胞学诊断结果为: HSIL 标本 128 例; LSIL 标本 157 例; ASCH 标本 189 例; ASCUS 标本 286 例; NILM 标本 509 例。所收集 1269 例标本中检测到 295 例 HPV 阳性, 其阳性率为 23.2%。病理细胞学检查结果与 HPV 病毒感染之间的关系 (表 6), 从表 6 可以发现, 在

病理细胞学检查结果中由 NILM 至 HSIL，随病变程度增大，HPV 阳性率呈现逐渐上升的趋势，经统计分析显示：差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 6 病理细胞学诊断结果与 HPV 感染的关系

病理学类型	病例数 (例)	HPV 阳性数 (例)	HPV 阴性数 (例)	HPV 阳性率 (%)
NILM	509	52	457	10.2
ASCUS	286	35	251	12.2
ASCH	189	49	140	25.9
LSIL	157	78	79	49.7
HSIL	128	81	47	63.3
合计	1269	295	974	23.2

$\chi^2=245.3, P < 0.05$

#### 2.2.4 病理细胞学分型与 HPV58 病毒载量、整合率的关系

34 例 HPV58 阳性标本病理细胞学诊断结果为：HSIL 标本 9 例；LSIL 标本 13 例；ASCH 标本 5 例；ASCUS 标本 7 例（表 7）。

表 7 HPV58 阳性者病毒载量及整合状态分布情况

细胞学 诊断	HPV58 病毒载量 (拷贝数/细胞)	HPV58 阳性数	HPV58 整合状态	
			非纯整合型 (%)	纯整合 (%)
ASCUS	154.59±15.02	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)
ASCH	154.56±15.31	5	4 (80.0%)	1 (20.0%)
LSIL	206.74±19.88	13	10 (76.9%)	3 (23.1%)
HSIL	203.25±17.33	9	6 (66.7%)	3 (33.3%)
合计	206.74±18.98	34	26 (76.5%)	8 (23.5%)

$\chi^2=4.66, P > 0.05$

按照 HPV58 E2 与 E6 比值，确定 HPV58 整合状态，结果显示：34 例 HPV58 阳性标本中，有 4 例 E2/E6=1，为纯游离型；8 例标本 E2/E6=0，为完全整合型；22 例标本中  $0 < E2/E6 < 1$ ，为整合与游离的混合型。我们将完全整合型与非完全整合型进行非参数检验分析发现：病理细胞学诊断结果中病变程度与 HPV58 整合无显著相关性 ( $\text{trend}^2=4.66, P > 0.05$ )。但从表 7 的完全整合型与非完全整合型所占百分比趋势看，随病变程度加重，整合型百分比呈现升高的趋势，非整合型百分比呈现下降的趋势，这可能与完全整合型病例较少有关。

#### 2.2.5 HPV58 整合在宿主染色体的整合位置

将 8 例 HPV58 完全整合型标本进行 APOT 分析后，将第二轮 PCR 产物克隆至 T 载体，经筛选并培养提取质粒，测序，将所得序列结果在 Genbank 中进行 Blast 分析，发现 8 例整合型标本的一部分为 HPV58 E7 基因序列，另一部分为人染色体的一部分；HPV58 部分与 GenBank 提供的 HPV58 序（D90400）相比较，其中有 5 例标本 HPV58 DNA 有一处碱基 A 突变为 G（图 7），这可能与当地流行株有关；8 例整合型标本中有 1 例整合到宿主 1 号染色体（图 8），2 例整合到宿主 2 号染色体（图 9），1 例整合到宿主 5 号染色体（图 10），3 例整合到宿主 8 号染色体（图 11），1 例整合到宿主 17 号染色体（图 12）。

	99	158
Query 1	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
Query 2	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
Query 3	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
Query 4	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
Query 5	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
Query 6	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
Query 7	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
Query 8	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
Sbjct 764	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	823
Consensus	CCACGGTTCGTTTGTGTATCAACAGTCAACAACCGACGTACGAACCCCTACAGCAGCTGC	
	159	216
Query 1	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	
Query 2	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	
Query 3	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	
Query 4	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	
Query 5	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	
Query 6	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	
Query 7	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	
Query 8	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	
Sbjct 824	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	881
Consensus	TTATGGGCACATGTACCATTGTGTGCCCTAGCTGTGCACAGCAATAAACACCATCTGC	

图 7 整合型 HPV58 标本测序后在 GenBank 序列比对结果

Query1~8 中序列 99~216，为 8 例整合型 HPV58 标本测序结果，其中标本 1，2，3，4，6 在 125 位置有一个碱基 A 突变为 G；Sbjct764~881 序列，为 GenBank 中 HPV58E7-E1 基因序列的一部分。

Query 258	CTGTGTCCTATAAATTCTCTATATATTTTCCAGCCTTTTATAGCTGTATATCTTATATG	317
Sbjct 142715	CTGTGTCCTATAAATTCTCTATATATTTTCCAGCCTTTTATAGCTGTATATCTTATATG	142774
Query 318	CAGTATGGTGTGGATTTGCTTTGTGAGCCAATCCAAGACTGTTTTCCATTTAATAGGT	377
Sbjct 142775	CAGTATGGTGTGGATTTGCTTTGTGAGCCAATCCAAGACTGTTTTCCATTTAATAGGT	142834
Query 378	GAGCCAAGTCCATTTTTACATCACAGATAACAGGGAACCACCTTGTCTATTTTATTTG	437
Sbjct 142835	GAGCCAAGTCCATTTTTACATCACAGATAACAGGGAACCACCTTGTCTATTTTATTTG	142893

图 8 整合型 1 号标本测序后在 GenBank 序列比相对匹配基因序列

Query: 整合型 1 号标本 PCR 扩增测序结果；Sbjct: 整合型 1 号标本与人 1 号染色体相匹配基因序列。

Query 271	GGGTGCCAAATGGGCACAAATTCAGCAGCCTTGAGGAGGGCACCCTAAGGTTTTACCATC	330
Sbjct 112607	GGGTGCCAAATGGGCACAAATTCAGCAGCCTTGAGGAGGGCACCCTAAGGTTTTACCATC	112666
Query 331	AGTACTGTTTAAATGAAAACAAAATCATCGACACAATTTAAATGTATTTGCTGTGGGATG	390
Sbjct 112667	AGTACTGTTTAAATGAAAACAAAATCATCGACACAATTTAAATGTATTTGCTGTGGGATG	112726
Query 391	AGCTTGTGTTTCTGAGAACAAGTGGCGCGTGGGCCAGCTTTGTCTCTCCCAAGTGGTT	450
Sbjct 112727	AGCTTGTGTTTCTGAGAACAAGTGGCGCGTGGGCCAGCTTTGTCTCTCCCAAGTGGTT	112786

图 9 整合型 2 号标本测序后在 GenBank 序列比相对匹配基因序列

Query: 整合型 2 号标本 PCR 扩增后测序结果；Sbjct: 整合型 2 号标本基因序列与 5 号染色体相匹配基因序列。

```

Query 259      CTTGTTCTTTGGCCAGCCAAGGTTACGGCGATTCTCCCATGGGATCTTGAGGGACCAA 318
                |||
Sbjct 38064411 CTTGTTCTTTGGCCAGCCAAGGTTACGGCGATTCTCCCATGGGATCTTGAGGGACCAA 38064352
Query 319      GCTGCTGGGATTGGGAAGGAGTTTACCCTGACCGTTGCCCTAGCCAGGTTCCAGGAGG 378
                |||
Sbjct 38064351 GCTGCTGGGATTGGGAAGGAGTTTACCCTGACCGTTGCCCTAGCCAGGTTCCAGGAGG 38064292
Query 379      CCTCACCATACTCCCTTTTCAGGGCCAGGGCTCCAGCAAGCCAGGGCAAGGATCCTGTGC 438
                |||
Sbjct 38064291 CCTCACCATACTCCCTTTTCAGGGCCAGGGCTCCAGCAAGCCAGGGCAAGGATCCTGTGC 38064232
    
```

图 10 整合型 3 号标本测序后在 GenBank 序列比对相匹配基因序列

Query: 整合型 3 号标本 PCR 扩增后测序结果; Sbjct: 整合型 3 号标本与人 17 号染色体相匹配基因序列。

```

A1  Query 254      GTCCTATAAATCTCTATATATTTCCAGCCTTTTATAGCTGTATATCTTATATGCAGT 313
                |||
Sbjct 242108883 GTCCTATAAATCTCTATATATTTCCAGCCTTTTATAGCTGTATATCTTATATGCAGT 242108942
Query 314      ATGGTGTTTGATTTTGCTTTGTGAGCCAATCCAAGACTGTTTTCCATTTAAATAGGTGAGC 373
                |||
Sbjct 242108943 ATGGTGTTTGATTTTGCTTTGTGAGCCAATCCAAGACTGTTTTCCATTTAAATAGGTGAGC 242109002
Query 374      CAAGTCCATTTTACATCACAGATAACAGGGAACCACCTTGTCTATTTTATTTGCTTT 433
                |||
Sbjct 242109003 CAAGTCCATTTTACATCACAGATAACAGGGAACCACCTTGTCTATTTTATTTGCTTT 242109062

A2  Query 265      TGTGACAGTTACTTTTTTCTGAGTCCTATAAATCTCTATATATTTCCAGCCTTTTA 324
                |||
Sbjct 243057058 TGTGACAGTTACTTTTTTCTGAGTCCTATAAATCTCTATATATTTCCAGCCTTTTA 243057117
Query 325      TAGCTGTATATCTTATATGCAAGTATGGTGTGATTGCTTTGTGAGCCAATCCAAGAC 384
                |||
Sbjct 243057118 TAGCTGTATATCTTATATGCAAGTATGGTGTGATTGCTTTGTGAGCCAATCCAAGAC 243057177
Query 385      TGTTTTCCATTTAATAGGTGAGCCAAGTCCATTTTACATCACAGATAACAGGGAACCA 444
                |||
Sbjct 243057178 TGTTTTCCATTTAATAGGTGAGCCAAGTCCATTTTACATCACAGATAACAGGGAACCA 243057237
    
```

图 11 整合型 4, 5 号标本测序后在 GenBank 序列比相匹配基因序列

Query: 整合型 4, 5 号标本 PCR 扩增后测序结果; Sbjct: 分别是人 2 号染色体与整合型 4, 5 号标本相匹配基因序列。

```

B1  Query 266      TCACATGTTCTCACTTTATCCATAGTGTACCTATCACTTATAATGAAGAAAAACCAAC 325
                |||
Sbjct 175256      TCACATGTTCTCACTTTATCCATAGTGTACCTATCACTTATAATGAAGAAAAACCAAC 175315
Query 326      ATTTTATATTCATTTCCCTTTAGGGTATGCATTTTATACATCTGACTTTAACTGATAA 385
                |||
Sbjct 175316      ATTTTATATTCATTTCCCTTTAGGGTATGCATTTTATACATCTGACTTTAACTGATAA 175375
Query 386      ATGACTGTAAGAGGTGTATCTTTATGGAATGTAGAGGATTTGTTCCAAAAAGGAGCT 445
                |||
Sbjct 175376      ATGACTGTAAGAGGTGTATCTTTATGGAATGTAGAGGATTTGTTCCAAAAAGGAGCT 175435

Query 261      TTCATTCCTTTTAGGGTATGCATTTTATACATCTGACTTTAACTGATAAATGACTGTA 320
                |||
B2  Sbjct 1512104   TTCATTCCTTTTAGGGTATGCATTTTATACATCTGACTTTAACTGATAAATGACTGTA 1512163
Query 321      AAGAGGTGTATCTTTATGGAATGTAGAGGATTTGTTCCAAAAAGGAGCTGATGCTGCC 380
                |||
Sbjct 1512164   AAGAGGTGTATCTTTATGGAATGTAGAGGATTTGTTCCAAAAAGGAGCTGATGCTGCC 1512223
Query 381      GTTCTCAGTGACAAAGTTGATGCGTGTTCATGTCTGTCTGCTCCAGGTACCTCAGGAT 440
                |||
Sbjct 1512224   GTTCTCAGTGACAAAGTTGATGCGTGTTCATGTCTGTCTGCTCCAGGTACCTCAGGAT 1512283

B3  Query 257      TCTCACATGTTCTCACTTTATCCATAGTGTACCTATCACTTATAATGAAGAAAAACCA 316
                |||
Sbjct 1565444   TCTCACATGTTCTCACTTTATCCATAGTGTACCTATCACTTATAATGAAGAAAAACCA 1565503
Query 317      ACATTTTATATTCATTTCCCTTTAGGATATGCATTTTATACATCTGACTTTAACTGAT 376
                |||
Sbjct 1565504   ACATTTTATATTCATTTCCCTTTAGGATATGCATTTTATACATCTGACTTTAACTGAT 1565563
Query 377      AAATGACTGTAAGAGGTGTATCTTTATGGAATGTAGAGGATTTGTTCCAAAAAGGAG 436
                |||
Sbjct 1565564   AAATGACTGTAAGAGGTGTATCTTTATGGAATGTAGAGGATTTGTTCCAAAAAGGAG 1565623
    
```

图 12 三例整合型 6, 7, 8 号标本测序后在 GenBank 序列比对结果

Query: 三例整合型 5, 6, 7 号标本测序结果; B1, B2, B3 中 Sbjct: 三例整合型 6, 7, 8 号标本序列与人 8 号染色体相匹配的基因序列。

## 2.3 讨论

### 2.3.1 本地区 HPV 感染型别特点及其与组织病理学的关系

宫颈癌发病率仅次于乳腺癌，是妇女发病率比较高的恶性病变癌症之一<sup>[40]</sup>。目前全世界认识的人类宫颈癌产生的最主要病因为高危型 HPV 感染，而且呈现年轻化趋势<sup>[41,42]</sup>。本研究对 1269 例门诊就诊女性宫颈脱落细胞标本分析结果显示 295 例 HPV 阳性，其阳性率为 23.2%，近年研究发现，HPV 基因型别分布在随时间而发生改变，HPV58 从感染优势基因逐渐下降，可能与疫苗的接种有关<sup>[43-45]</sup>。

病理细胞学检查结果显示：HPV 感染率伴随着患者宫颈病变严重程度的增大，出现增多的趋势，宫颈病变也越来越重，高危型 HPV 阳性率升高。说明高危型 HPV 的病毒感染和宫颈癌存在着很大的联系，所以有必要加强 HPV 的筛查，及早诊断和预防宫颈病变。有些细胞学检查阳性的患者高危型 HPV 为阴性，可能因为感染后细胞形态发生改变而出现特殊的病理变化，当高危型 HPV 感染消失后，细胞整体结构逐渐恢复正常。

### 2.3.2 本地区 HPV 感染与宿主染色体整合状况分析

高危型 HPV 感染以及整合在宫颈病变中起着重要作用，而随着宫颈病变的进展，HPV 整合样本比例和数量逐渐增加<sup>[46]</sup>，HPV58 的整合普遍与宫颈癌的临床分期有关。KIM 等的有研究表明：HPV16、18 及 58 型感染的 HSIL 病人中，由于病变程度的增加，病毒载量和整合状况进一步增强，所以，HPV16、18 及 58 型感染者的病毒载量和整合状态可成为 HSIL 患者确诊的重要生物学标志<sup>[47-49]</sup>；María del R 等人研究显示：在 HPV16 及 58 型感染的宫颈病变患者中，HPV E2 基因的断裂情况与宫颈病变程度无关<sup>[50]</sup>；LONG 等研究显示：HPV16、33 及 58 型感染患者中病毒载量与病变程度有关<sup>[51-53]</sup>。这些研究结果表明：高危型 HPV 感染患者的病毒载量和整合状态作为宫颈病变诊断的标记尚未确定。我们通过对 34 例 HPV58 阳性标本病毒载量进行 Spearman 相关分析显示：所收集标本中 HPV58 阳性感染者的病毒载量与宫颈病变程度之间无相关性（ $rs=0.196$ ， $P=0.597$ ），通过计算 E2/E6 比率，进行整合状态分析发现：4 例为纯游离型，8 例为完全整合型，22 例为整合与游离的混合型，表明 HPV58 感染的宫颈病变患者中，整合型高于游离型，但统计分析显示：HPV58 感染型宫颈病变患者中，宫颈病变程度与整合状态无显著相关性（ $P>0.05$ ）；8 例整合型标本进行定位分析显示：标本 1 HPV58 整合到宿主 1 号染色体，标本 2，3 感染的 HPV58 整合到宿主 2 号染色体，标本 4 感染的 HPV 58 整

合到宿主 5 号染色体, 标本 5,6,7 感染的 HPV58 分别整合到宿主 8 号染色体, 标本 8 感染的 HPV58 整合到宿主 17 号染色体; 从这些结果可以看出 HPV58 随机整合到宿主细胞染色体中, 不同患者感染的 HPV58 整合在宿主的不同的染色体, 标本 8 整合基因倒置说明宿主染色体上整合的 HPV 基因没有固定的方式及固定的位置, 说明是随机整合的。高危型 HPV 整合及感染均可发生在宫颈上皮内瘤变和宫颈癌上, 且整合率与病变程度呈正相关。

HPV 基因组的整合, 导致了 HPV E1 或 E2 区基因断裂, 并使一些区域 DNA 片段随整合而丧失, 从而导致 E6 和 E7 基因与宿主细胞染色体融合并相互作用, 造成宿主细胞对 DNA 合成修复能力显著降低, 产生错误的基因组结构, 导致宿主细胞 DNA 重排以及宿主基因不稳定, 从而向恶性转化发生<sup>[54-57]</sup>。HPV58 整合位点容易在免疫相关基因中出现, 也可在肿瘤相关基因中出现<sup>[58-60]</sup>。

## 2.4 小结

所检宫颈脱落细胞标本中, 患者所感染的 HPV58 与 GENBANK 提供 HPV58 序列相比较, 其中有个别基因发生了突变, 这可能与当地流行株有关; 8 例整合型标本分别整合到宿主不同的染色体, 表明高危型 HPV 整合是随机的。

## 参考文献

- [31] 黄卓敏, 江曼茹, 王楚莹, 等. Brd4 与 HPV-16 病毒 E2 在宫颈脱落细胞中的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(19): 3198-3201.
- [32] ANAYANNIS NV, SCHLECHT NF, BEN-DAYAN M, et al. Association of an intact E2 gene with higher HPV viral load, higher viral oncogene expression, and improved clinical outcome in HPV16 positive head and neck squamous cell carcinoma [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0191581.
- [33] MCBRIDE AA. The papillomavirus E2 proteins [J]. J Virology, 2013, 445(1-2): 57-79.
- [34] SHI WJ, LIU H, WU D, et al. E6/E7 proteins are potential markers for the screening and diagnosis of cervical pre-cancerous lesions and cervical cancer in a Chinese population [J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 6251-6258.
- [35] ZHANG W, CHE Q, TAN H, et al. Marine Streptomyces sp. derived antimycin analogues suppress HeLa cells via depletion HPV E6/E7 mediated by ROS-dependent ubiquitin-proteasome system [J]. Sci Rep, 2017, 7(8): 42180.
- [36] 杨光, 陈青, 洪颖, 等. 人乳头瘤病毒 E7 蛋白检测子宫颈上皮内病变的价值[J]. 中国妇产科

- 临床杂志, 2017, 18 (2): 128-130.
- [37] 杜筱英, 刘奇, 汤俊明, 等. 基于 P G M Y 09/11 引物的 P C R 法检测高危型 H P V 的效果观察[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(10): 932-935.
- [38] 高雯, 丁玲, 宋志超, 等. 人乳头瘤病毒 16 早期基因 E2 和 E6 与核不均一核糖核蛋白 E2 在宫颈癌变中的作用及其交互效应[J]. 中华预防医学杂志, 2020, 54(1): 92-98.
- [39] 李肖甫, 樊婷婷, 智艳芳, 等. HPV-16 E2 结合位点甲基化水平与宫颈病变的相关性研究[J]. 现代妇产科进展, 2018, 27(4): 259- 262+267.
- [40] BHATLA N, AOKI D, SHARMA DN, et al. Cancer of the cervix uteri [J]. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2018, 143(S2): 22-36.
- [41] 陈万青, 李贺, 孙可欣, 等. 2014 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(1): 5-13.
- [42] GUGLIELMORONCO, JOAKIMDILLNER, K MIRIAMELFSTRÖM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials [J]. THE LANCET, 2014, 383(9916): 524-532.
- [43] HYE-LIM K, HYOUNNG J K, DON Y C, et al. The production and immunogenicity of human papillomavirus type 58 virus-like particles Produced in Saccharomyces cerevisiae [J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(5): 813-820.
- [44] CAROZZI FM, OCELLO C, BURRONI E, et al. Effectiveness of HPV vaccination in women reaching screening age in Italy[J]. Journal of Clinical Virology, 2016, 84(11):74-81.
- [45] PAAVONEN J, NAUD P, SALMERÓN J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women[J]. TheLancet, 2009, 374(9686): 25-31.
- [46] VINOKUROVA S, WENTZENSEN N, KRAUS I, et al. Type -dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions[J]. Cancer Res, 2008, 68(1): 307-313.
- [47] KOSHIOL J, LINDSAY L, PIMENTA JM, et al. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis[J]. Am J Epidemiol, 2008, 168(2): 123-137.
- [48] LIU J, LU Z, et al. Viral load and integration status of HPV58 associated with cervical lesion severity in women of Northeast China[J]. Jpn J Clin Oncol. 2017, 47(2): 123-129.
- [49] HU Z, ZHU D, WANG W, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer

- identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(2): 158–163.
- [50] MARÍA DEL R GONZÁLEZ-LOSA, MARYLIN PUERTO-SOLIS, JUAN TENORIO RUIZ. Analysis of E2 gene integrity in HPV16 and HPV58 viruses isolated from women with cervical pathology [J]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2016, 111 (12): 770-773.
- [51] 李博涵, 谭桂春, 曲芃芃. 高危型人乳头瘤病毒阳性患者宫颈病变风险预测方法及进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2019, 46 (1): 98-103.
- [52] 庄涛, 何洋,等.AIM2 在宫颈癌组织中的表达及其与 HPV16 病毒载量的相关性分析[J]. *现代肿瘤医学*. 2021, 29(20): 3614-3618.
- [53] CHEN L, DONG B, ZHANG Q, et al. HR-HPV viral load quality detection provide more accurate prediction for residual lesions after treatment: a prospective cohort study in patients with high-grade squamous lesions or worse [J]. *Med Oncol*, 2020, 37(5): 37-42.
- [54] ZHE XY, XIN HZ, PAN ZZ, et al. Genetic variations in E6, E7 and the long control region of human papilloma- virus type 16 among patients with cervical lesions in Xinjiang, China [J]. *Cancer Cell International*, 2019, 19 (65) : 7-42.
- [55] HANG D, GAO L, SUN M, et al. Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of human papillomavirus 16 European and Asian variants[J].*Journal of Medical Virology*, 2014, 86(4): 618-626.
- [56] KASUKAWA H, HOWLEY P M, BENSON J D. A fifteen-amino-acid peptide inhibits human papillomavirus E1-E2 interaction and human papillomavirus DNA replication in vitro [J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(10): 8166-8173.
- [57] PANZ Z, SONG Y N,ZHE X Y, et al. Screening for HPV infection in exfoliated cervical cells of women from different ethnic groups in Yili,Xinjiang,China[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3468-3475.
- [58] 张静, 等. 高危型 HPV DNA 整合导致宫颈癌的临床检测分析[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2018, 2(3): 85-90.
- [59] WANG L, DAI S Z, CHU H J, et al. Integration sites and genotype distributions of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2013, 14(6): 3837-3841.
- [60] OLMEDONIEVA L, MUÑOZBELLO J O, CONTRERASPREDES A, et al. The Role of E6 Spliced Isoforms (E6\*) in Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis [J]. *Viruses*, 2018, 10(1): 45-50.

## 第3章 携带 HPV18E6E7 融合基因重组病毒的构建

### 3.1 材料与方法

#### 3.1.1 主要仪器

表8 实验主要仪器和生产公司

主要仪器	采购公司
SIM-F140AY65 型制冰机	日本 SANYO 有限公司
Molecular Imager Gel Doc XR 凝胶成像仪	美国 Bio-rad 有限公司
电转仪	美国 Bio-rad 公司
DNA 浓度测量仪	美国 Thermo 公司
Multifuge XIR 台式离心机	美国 Thermo 公司
4℃低温离心机	美国 Thermo 公司
-80℃冰箱	美国 Thermo 公司
CO <sub>2</sub> 培养箱	美国 Thermo 公司
Vortex-Cenie 涡旋混合器	美国 Scientific Industries 企业
SHP-250 生化培养箱	上海森信实验设备有限公司
HR40-IIA2 生物安全柜	中国海尔企业
电泳仪电源和电泳仪	北京市六一仪器总厂
恒温摇床 DDH2-300	江苏太仓实验设备厂
恒温水浴锅 HX-1050	北京博医康实验设备有限公司
22331 Hamburg 梯度 PCR 仪	德国 Eppendorf 责任公司
SX-700 型快速自动高压灭菌器	爱来宝（济南）医疗科技公司
BW-20 切胶仪	Wealtec 有限公司
OLYMPUS-CKX41 显微镜	日本 OLYMPUS 有限公司

#### 3.1.2 主要试剂

用于 PCR 的 2×Taq RCR Master Mix 购于新贝（上海）生物科技有限公司；用于核酸检测的 GelRed 核酸扩增染料购于上海源叶技术有限公司；1kb plus DNA Ladder 购买于北京市康润诚业生物技术有限公司；琼脂多糖凝胶纯化、回收试剂盒购买于新贝（上海）生物技术有限公司；DMEM 液体培养基采购于北京市亚米生物技术开发公司。

#### 3.1.3 溶液配制

1) 10%DMEM 培养基（40ml）：用量筒量取 DMEM36ml，同时量取胎牛血清（FBS）4ml，向 DMEM 中加入胎牛血清，注意轻轻摇晃混匀，放于 4℃冰箱备用。

2) 1M Tris-HCL 溶液

- (1) 称量 121.1g 放入到 1l 的烧杯中。
- (2) 往烧杯里加入灭菌蒸馏水 800ml, 使 Tris 充分融化后可用玻璃棒拌匀。
- (3) 用浓 HCL 调节 pH 值至 8.0。
- (4) 再加入无菌蒸馏水定容至溶液体积为 1l。
- (5) 灭菌后, 冷却至室温, 保存备用。

3) 10%SDS 溶液

- (1) 称量 SDS 10g 放在 200ml 的烧杯中。
- (2) 加入 80ml 蒸馏水, 放在水浴箱 (68℃) 中加热, 搅拌至完全溶解。
- (3) 用浓 HCL 调节 pH 值到 7.2。
- (4) 往其中添加蒸馏水, 使总体积为 100ml, 储存在常温下使用。

4) 20%Glucose 溶液

- (1) 称量 Glucose 20g 放入 200ml 的烧杯中。
- (2) 先添加灭菌蒸馏水至 200ml 的烧杯中, 搅拌至固体试剂充分融化。
- (3) 加蒸馏水定容至溶液体积为 100ml。
- (4) 灭菌后, 保存于室温条件下备用。

5) LB 培养基

- (1) 称酵母提取物 5g, 胰化蛋白胨 10g, NaCl 10g 置于同一个烧杯中使用。
- (2) 向 (1) 中加入蒸馏水 800ml, 轻轻混匀至化学试剂充分溶解。
- (3) 用 2N NaOH 调节溶液的 pH 值至 7.0。
- (4) 加入蒸馏水将溶液体积定容至 1l。
- (5) 用高压蒸汽灭菌 30 分钟, 温室储存后使用。

6) M9 培养基

- (1) 称取  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 12.8g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 3.0g, NaCl: 0.5g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 1.0g。
- (2) 在上述试剂中加入蒸馏水 150ml。
- (3) 用 2N NaOH 调节 pH, 使其到 7.4, 并且定容到 200ml。
- (4) 121℃ 高压灭菌 20 分钟, 备用。

7) 5×M63 培养基

- (1) 称取  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 10g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 68g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 2.5mg。
- (2) 在以上各物质中添加 1l 的蒸馏水, 使用 KOH 调节溶剂的 pH 值至 7.0。
- (3) 121℃ 高压灭菌 30 分钟, 4℃ 保存备用。

8) Galk 培养基与脱 Galk 培养基

(1) 1.5%琼脂的配制：准备电子天平称，无菌烧杯。准确量取琼脂粉 3g，放入烧杯中，加水 200ml。

(2) 半乳糖（20%）溶液的配制：准备干净烧杯，精确称量 2g 半乳糖于杯中，为使溶液浓度达到 20%，再加入无菌蒸馏水 10ml。

(3) 2-脱氧 D-半乳糖（20%）溶液的配制：向无菌玻璃瓶中加入 5ml 蒸馏水，再加入 1g 2-脱氧-D-半乳糖

上述 (1) (2) (3) 试剂在 121℃ 下 25 分钟的高压蒸汽消毒，4℃ 储存。

(4) Galk 培养基配制过程：取上述配制的 1.5%琼脂溶液（使其温度大约为 55℃）200ml，然后，分别量取 0.625ml 生物素，50ml 5×M63 培养基，2.5ml 20% 半乳糖溶液，0.250ml MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液，1.125ml 亮氨酸，0.250 ml 氯霉素，加入到 200ml 备好的琼脂中，混匀充分，倒入无菌培养皿中，琼脂厚度大约 0.4mm，室温下放凉凝固，备存于 4℃ 冰箱中。

(5) 脱 Galk 培养基配制：参照 (4) Galk 培养基配制成份，并将加入的 20% 半乳糖溶液更换成 20%2-脱氧 D-半乳糖 2.5ml 和 50%的甘油 1ml，其它成分不变。

#### 9) 琼脂糖凝胶

称取 0.2g 琼脂糖，置于 200ml 洁净三角瓶中，加入 0.5×TBE 20ml，加热，溶化，室温冷却至 50℃ 左右，加入 1μl 的 Goldview 核酸染料，倒入配胶槽，备用。

### 3.1.4 材料

质粒：带有半乳糖激酶的质粒（plasmid of galactose kinase, pGalK）；巨细胞病毒减毒株 Towne 对人没有感染性，该菌株人工染色体（SW102 Towne Bacterial Artificial Chromosome, SW102-T-BAC）中包含了所有 CMV 基因组和氯霉素抗性基因，由美国罗格斯大学新泽西医学院朱桦教授惠赠，并在此实验室保存。

细胞株：Hela 细胞株是 HPV18 阳性宫颈癌细胞株。

### 3.1.5 研究方法

#### 1) 融合基因 HPV18

E6E7 片段的合成：利用 HPV18 型 E7、E6 基因的基因编码区域，得到 E7、E6 基因编码的氨基酸序列，分别将 HPV18 型 E7 和 E6 结合位点的 2 个关键氨基酸，E7 第 27 位半胱氨酸和第 29 位的谷氨酸分别变为甘氨酸，E6 第 32 位与 67 位的半胱氨酸变为甘氨酸，将 E6 和 E7 的转化活性敲去，修正 E6 和 E7 终止密码子，并加以修饰，使其继续编码氨基酸，构建 HPV18 型 E6E7 突变的融合基因（HPV18-

mE6E7)，以 HPV18 型野生型 E6E7 融合基因（HPV18-wE6E7）作为对照。将构建融合基因片段委托北京赛思莱博技术有限公司进行了研究。

表 9 实验中所需引物的合成

引物名称	序列	产物大小 (bp)
Galk Primers		
Galk Forward	Gagaccacgacgcgcctcatcgtctgctggattggcccgcgacgaagatgcctgtgac aattaatcatcgga	1400
Galk Reverse	Cagacgatacacaagttaacgcagactaccaggcaccagatcctggattctcagcactgt cctgctcctt	
Galk Check Primers		
Check Forward	ctatatctcctctctacaggc	1726
Check Reverse	gaagttacgcgttgagagac	
HPV18E6E7 Primers		
HPV18E6E7 Forward	Gagaccacgacgcgcctcatcgtctgctggattggcccgcgacgaagatgatggcgcg ctttgagatcc	803
HPV18E6E7 Reverse	Cagacgatacacaagttaacgcagactaccaggcaccagatcctggattctcctgctg ggatgcacaccac	
HPV18E6E7 check Primers		
Check Forward	ctatatctcctctctacaggc	1229
Check Reverse	gaagttacgcgttgagagac	

2) 携带 Towne 开放读码框 55 左/右同源臂的 GalK、HPV18-wE6E7 及 HPV18-wE6E7 片段合成

根据 GenBank 公司提供的 Towne 株巨细胞病毒（FJ616285.1）的基因序列，设计了 GalK（T-ORF55-GalK）、T-ORF55-HPV18-wE6E7 与 T-ORF55-HPV18-mE6E7 的融合基因片段的引物（表 9）。由北京赛思莱博技术有限公司进行引物的合成。

用表 9 中引物，分别用 pGalK、HPV18-wE6E7、HPV18-mE6E7 质粒为模板，PCR 扩增 T-ORF55-GalK、T-ORF55-HPV18-mE6E7 及 T-ORF55-HPV18-wE6E7 片段。PCR 的扩增步骤：预变性 95℃，5min；然后三十五个循环反应（95℃，30 秒；55℃，30 秒；72℃，1 分钟）；延伸 72℃，5 分钟；20℃保存。采用 1.0%琼脂糖凝胶电泳法对 PCR 产物进行检测，切胶将其分离纯化，回收所得各个片段。

### 3) SW102-T-BAC 感受态细胞的制备

(1) 取 SW102-T-BAC 50μl 放于事先加入 2ml LB 液体培养基和 2μl 的氯霉素（浓度为 12.5mg/ml）的无菌试管中置于 32℃摇床培养 24h。

(2) 将在上述培养液中，加入 50ml LB 液体培养基和 50μl 氯霉素（浓度为 12.5mg/ml）的无菌培养瓶中，做好标记，放置于 32℃摇床振摇培养 3 小时。

(3) 培养 3h 后 SW102-T-BAC 菌瓶放在冰上静止 10 分钟，然后将再放置于 42℃ 恒温水浴摇床，200rpm/min 摇 15min。

(4) 菌液培养 15 分钟，放入 50ml 离心管中，以 4℃ 4500rpm/min 转速离心 10min，去掉上清液。

(5) 加入无菌冰中冷却的蒸馏水 30ml，充分吹打混匀，然后 4500rpm/min 4℃ 离心 5min，去掉上清液。在重复此步骤一次。

(6) 向管中加入 10mL 10%的甘油，4500rpm/min 4℃ 离心 5min，去掉上清液。

(7) 向管中加入 200ml 10%的甘油，吹打混匀，以每管 50 $\mu$ l 进行分装，于 -80℃ 保存，备用。

#### 4) 重组病毒的构建

对切胶进行提纯和回收，将得到的 T-ORF55-GalK 电转至 SW102-T-BAC 感受态细胞；然后添加 1ml LB 培养溶液，放于三十二摄氏度摇床振摇孵育 1h 后，离心弃除上清液；再用 M9 液对沉淀物进行二次洗涤，将沉淀物均匀涂在含 GalK 的培养基上，于 32℃ 培养三天，长出菌落；挑选其中 3 个菌落，并进行质粒 DNA 提取。用表 8 GalK Check Primers 检验 GalK 的准确性，由此得到的质粒名为 SW102-T-ORF55-GalK-BAC。并在此基础上又制备了它的感受态细胞，保存于 -80℃。

制备 SW102-T-ORF55-GalK-BAC 感受态细胞（方法同 SW102-T-BAC 感受态细胞的制备）：分别把 T-ORF55-HPV18-mE6E7 与 T-ORF55-HPV18-wE6E7 片段，电转到感受态细胞的 SW102-T-ORF55-GalK-BAC，（方法同 GalK 电转到感受态细胞）震荡时间加长至四倍左右。用 1ml M9 清洗液混悬沉降物，之后采用高倍比稀释法（10 倍、100 倍），再取 100 $\mu$ l 涂于脱 GalK 培养基，同样培养三天后，经脱 GalK 培养基筛选后取两个菌落验证正确性。用表 9 HPV18E6E7 Check Primers 引物，PCR 扩增检测该菌落正确性，将正确克隆分别命名为 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC，SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC。

#### 5) 转染

将常规培养的 HeLa 细胞，接种在 12 孔培养板上，待细胞生长到汇合度大约为 60% 时，再将脂质体、质粒 SW102-T-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 与 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 依次加以溶液进行稀释，然后混合在室温下孵育 20 分钟，加入到已在 12 孔板上培养的 HeLa 细胞中，每一种质粒被添加到 3 个复孔中，与其余 3 个孔形成空白对照。在质粒转染后 24 时更换细胞营养液，利用倒置显微镜来观测细胞生长发育状况。当所有空隙都长满时，将细胞消化，并转至直径为 10 厘米的培养皿中，接着再进行细胞的扩展，并对其生长状况进行观测。

## 6) HPV18-mE6E7 与 HPV18-wE6E7 在转染细胞中表达状况的检测

(1) 细胞 RNA 的提取：待细胞生长发育到汇合度达 80%至 90%时，用胰酶消化处理后，加入培养液轻柔吹打所有细胞使它们形成细胞悬液（吹打流程中防止产生气泡）；将细胞混合液转入消毒好的 10mL 离心管中，在离心机上以 1000rpm 的离心速度离心 3min；弃混合液上清，加入 1ml Trizol，反复吹打所有细胞，完全裂解细胞；将细胞裂解液转移至 EP 管中（提前用 0.1%DEPC 水处理过此管）；用灭菌的镊子盖好 EP 管盖，完全混匀，室温静置 5min；加入 0.2ml 氯仿，将 EP 管盖紧后用力颠倒混匀约 30s，室温静置 5min；低温离心机于 4℃下 12000rpm 离心 10min；取上层水相至一新的 EP 管中（约 700 $\mu$ l），加等体积异丙醇，完全混匀，室温静置 10min；于 4℃ 12000rpm 离心 15 min，弃上清溶剂；加 1ml75%的冰预冷过得酒精（用 0.1%消毒过的 DEPC 处理水配制）冲洗沉淀物及管壁，4℃ 10000rpm 离心 10min，将所有上清液弃掉干净，在空中晾干 10min 后，加入 60mlDEPC 灭菌过的水融化沉淀物，经电泳检测后，-80℃下储存备用。

(2) 逆转录：首先将所提取的 RNA 进行逆转录，反应体系为（20 $\mu$ l）：RNase free H<sub>2</sub>O 9.2 $\mu$ l，dNTP mixture 1 $\mu$ l，Oligo（dT）18 primer 1 $\mu$ l，总 RNA 2.8 $\mu$ l，在 PCR 仪上 70℃ 5min，然后置于冰上。在上述反应管中加入 5 $\times$ first-strand Buffer 4 $\mu$ l，M-MuLV reverse transcriptase 1 $\mu$ l，RNA inhibitor 1 $\mu$ l，在 PCR 仪上进行逆转录，42℃ 50min，70℃ 15min，获得 cDNA。

(3) PCR 检测：反应体系（20 $\mu$ l）：1 $\times$ Buffer，MgCl<sub>2</sub> 2.5mmol/l，dNTPs0.25mmol/l，primer 2pmol/l，1U ExTaq DNA 聚合酶，加入 1 $\mu$ l 的 cDNA 作为模板，加双蒸水至 20 $\mu$ l。反应条件同(2)。PCR 产物可在含有 0.01% Gold View（核酸染料）的 1.5%琼脂糖凝胶上电泳实验测定，在电泳后可以用凝胶成像仪拍照并记下实验数据。同时，还对所得 PCR 产物进行了测序研究。

## 7) 软琼脂克隆实验

(1) 底层软琼脂制备：配制 1.5%琼脂 10ml，高温消毒，待其降温至大约 50℃，再往里面添加 10ml 已准备好的 2 $\times$ DMEM 营养液，并轻轻混均，取 0.8ml 分别加入至 24 孔板的每个样品孔，并且在室温下放置凝固。

(2) 上层琼脂培养基制备：10ml 含有 0.7%的琼脂，降温至 50℃左右，快速加入 10ml 含 20%血清的 2 $\times$ DMEM 营养液和稳定表达 SW102-T-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 及未转染的 Hela 对数生长期细胞（浓度为 3 $\times$ 10<sup>3</sup>个/ml），将其混合倒入 24 孔培养皿，底部铺设 1.5%软琼脂，每类细胞都需要接种 6 个复孔，待液体琼脂固化后，在其最上层

加入 0.8ml 细胞孵育液，将培养板放入 5%CO<sub>2</sub>、约 37℃的培养箱中、且具有一定的湿度条件下，培养十三天，每两到三天更换最上层细胞培养液，每日用倒置显微镜对软琼脂内的细胞克隆进行观察，并进行了详细的记录。根据克隆形成率的计算方法，按照每个细胞分裂三次、增殖为八个，作为一个克隆），其统计方法是克隆形成率（%）=克隆数/接种细胞数×100%。

### 8) CCK-8 增殖实验

将稳定表达 SW102-T-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 与 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的 HeLa 细胞常规培养后，在对数生长期，用 0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA 将单层培养细胞进行消化；再以 10%的 DMEM 培养液混合，以 3×10<sup>3</sup>个 cell/mL 的细胞在 96 孔培养皿中进行接种，每孔添加 200μL，每种细胞设置 3 个复孔；空白孔只加 DMEM 培养基；将平皿放置于二氧化碳培养箱中，37℃，5%CO<sub>2</sub>，在饱和湿度下进行培养；细胞培养 24h 后，每孔加入 CCK-8 溶液 10μl（孔内无气泡），37℃，再培养 3 小时，用酶标仪测定 450nm 处的吸光度，并记录结果，统计分析。

## 3.2 结果

### 3.2.1 融合基因片段的合成

根据 GenBank 提供 HPV18 E7、E6 基因编码区序列，对氨基酸加以改造，改变了 E6 和 E7 的转化活性，去除终止密码子，构建的 HPV18-wE6E7 与 HPV18-mE6E7 融合基因序列如（图 13）。

HPV18 E6E7 融合基因						
	E6			E7		
突变位点	第 32 位	第 67 位	终止子	第 27 位	第 29 位	终止子
原序列	...TGT...	...TGT...	...TAA TA...	...TGT...	...GAG...	...TAA
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
mE6E7	...GGT...	...GGT...	...CCAATC...	...GGT...	...GGG...	...GGA
wE6E7	...TGT...	...TGT...	...CCAATC...	...TGT...	...GAG...	...GGA

图 13 HPV18-wE6E7 与 HPV18-mE6E7 融合基因序列

### 3.2.2 SW102-T-ORF55-BAC 插入 GalK 的检测

GalK 插入 SW102-T-ORF55-BAC 质粒后，在 GalK 选择培养基中培养 3d，从长出的菌落中选取 2 个克隆，经培养后提取其 DNA，用琼脂糖凝胶电泳法检测

PCR 扩增产物后，检测到 1726 bp PCR 产物（图 14），与预期 PCR 产物相一致，表明所得 GalK 克隆正确，将其命名为 SW102-T-ORF55-GalK-BAC。

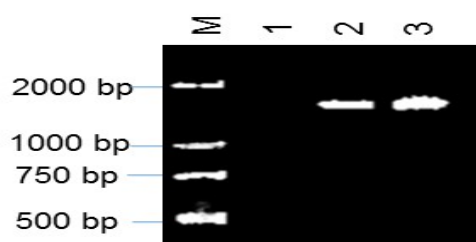


图 14 GalK 克隆到 SW102-T-ORF55-BAC 检测结果

M: DL2000 ladder; 1: 阴性对照; 2-3: GalK 片段插入 SW102-T-ORF55-BAC 感受态细胞后，长出的 2 个菌落，PCR 扩增检测的结果。

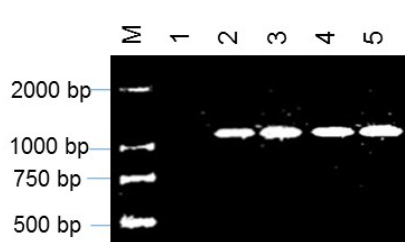


图 15 融合基因片段替代 GalK 检测结果

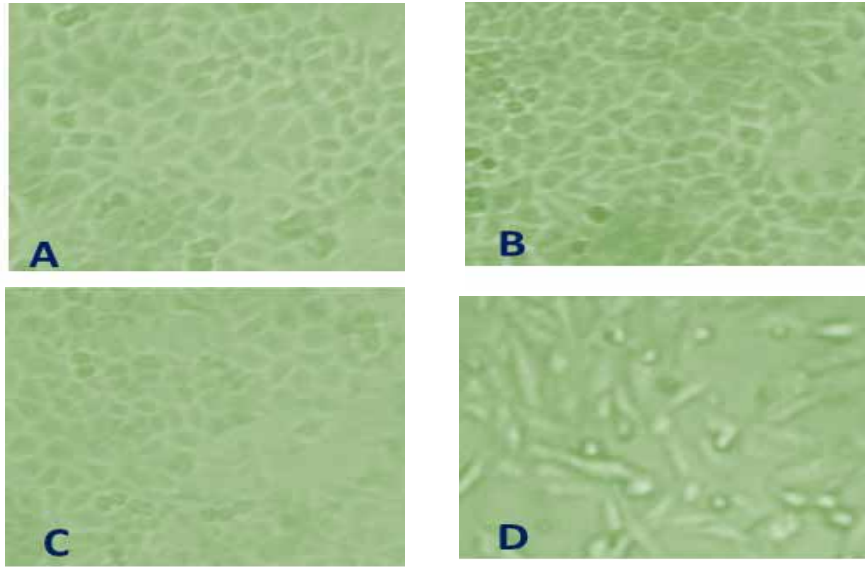
M: DL2000 ladder; 1: 阴性对照; 2-3: HPV18-wE6E7 替代 GalK 后，所选 2 个克隆为模板 PCR 扩增后电泳结果，4-5: HPV18-mE6E7 替代 GalK 所选 2 个克隆质粒为模板 PCR 扩增后电泳结果。

### 3.2.3 HPV18-wE6E7 与 HPV18-mE6E7 表达质粒的构建

带有 T-ORF55 左右同源臂的 HPV18-mE6E7 与 HPV18-wE6E7 片段，分别电转到感受态细胞 SW102-T-ORF55-GalK-BAC，在含有 2-脱氧-半乳糖及氯霉素的培养基中进行培养 3 天，结果显示菌落生长，分别选取 2 个菌落培养并提取质粒 DNA，PCR 扩增产物经琼脂糖电泳后检测到 1229 bp 的产物（图 15），该片段符合预期值，表明 HPV18-wE6E7 与 HPV18-mE6E7 分别已经连接至 T-ORF55 位置。将正确质粒命名为 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 与 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC。

### 3.2.4 转染细胞生长状况

分别将 SW102-T-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 与 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 经脂质体介导分别转染 Hela 细胞，经过 8d 培养，采用倒置显微镜观察，未转染的细胞（作为对照组）、转染 SW102-T-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的细胞形态没有变化，而转染 SW102-T-ORF55-mE6E7-BAC 的细胞，没有重叠生长的细胞发生了接触抑制，其形态也由原来多角形向长梭形转变（图 16）。



A—作为对照的Hela细胞形态； B—转染了SW102-T-BAC的Hela细胞形态； C—转染了SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC的Hela细胞形态； D—转染了SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC的Hela细胞形态

图16 各组转染与未转染的Hela细胞的形态（倒置显微镜下观察结果 ×200）

### 3.2.5 转染细胞中 T-ORF55-HPV18-wE6E7 与 T-ORF55-HPV18-mE6E7 表达状况的检测

转染的各组细胞培养到第 15 天，经胰蛋白酶消化，逆转录 PCR 检测 T-ORF55-HPV18-wE6E7 与 T-ORF55-HPV18-mE6E7 表达状况，结果显示：逆转录 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后，检测到转染 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 与 SW102-T-BAC 的细胞，分别可观察到约 1229bp、1229bp 及 426bp 的 PCR 产物（图 17）。

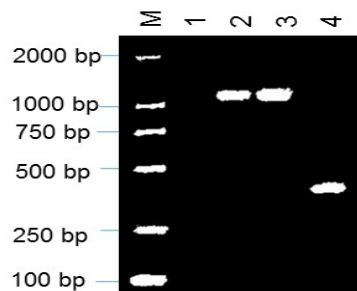


图17 转染细胞中HPV18-wE6E7与HPV58-mE6E7表达状况的检测

M为DL2000 DNA ladder，1：对照组Hela细胞培养后提取细胞RNA，逆转录PCR扩增产物电泳的结果；2：SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC转染Hela细胞，经培养提取RNA，逆转录PCR扩增产物电泳结果；3：SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 转染Hela细胞，经培养提取RNA，逆转录PCR产物电泳结果；4： SW102-T-BAC转染Hela细胞，经培养提取RNA，逆转录PCR扩增产物电泳的结果。

```

Query 429 TACTATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCAC 488
|||||
Sbjct 101 TACTATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCAC 160
Query 489 GGAACCTGAACACTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATT 548
|||||
Sbjct 161 GGAACCTGAACACTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATT 220
Query 549 GGAACCTACAGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTATAGAGACAG 608
|||||
Sbjct 221 GGAACCTACAGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTATAGAGACAG 280
Query 609 TATACCCCATGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTATTCTAGAATTAGAGAATTAAG 668
|||||
Sbjct 281 TATACCCCATGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTATTCTAGAATTAGAGAATTAAG 340
Query 669 ACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTGGAAAACTAACTAACACTGGGTATA 728
|||||
Sbjct 341 ACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTGGAAAACTAACTAACACTGGGTATA 400
Query 729 CAATTTATTAATAAGGTGCCTGCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACTTAG 788
|||||
Sbjct 401 CAATTTATTAATAAGGTGCCTGCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACTTAG 460
Query 789 ACACCTTAATGAAAAACGACGATTTCAACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCA 848
|||||
Sbjct 461 ACACCTTAATGAAAAACGACGATTTCAACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCA 520
Query 849 TTCGTGCTGCAACCGAGCAGCAGGAACGACTCCAACGACGCAGAGAAACACAAGTATA 908
|||||
Sbjct 521 TTCGTGCTGCAACCGAGCAGCAGGAACGACTCCAACGACGCAGAGAAACACAAGTATA 580
Query 909 ATATTAAGTAATGCATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCC 968
|||||
Sbjct 581 ATATTAAGT-ATGCATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCC 639
Query 969 CCAAAATGAAATCCGGTTGACCTTCTATGTCACGAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGA 1028
|||||
Sbjct 640 CCAAAATGAAATCCGGTTGACCTTCTATGTCACGAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGA 699
Query 1029 AAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCCAGAGCCGAACCACA 1088
|||||
Sbjct 700 AAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCCAGAGCCGAACCACA 759
Query 1089 ACGTCACACAATGTTGTGTATGTTGTAAGTGTGAAGCCAGAATTGAGCTAGTAGTAGA 1148
|||||
Sbjct 760 ACGTCACACAATGTTGTGTATGTTGTAAGTGTGAAGCCAGAATTGAGCTAGTAGTAGA 819
Query 1149 AAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAGCAGCTGTTTCTGAACACCCTGCCTTTGT 1208
|||||
Sbjct 820 AAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAGCAGCTGTTTCTGAACACCCTGCCTTTGT 879
Query 1209 GTGTCGGTGGTGTGCATCCAGCAGGGA 1236
|||||
Sbjct 880 GTGTCGGTGGTGTGCATCCAGCAGTAA 907

```

图18A 逆转录PCR扩增产物测序检测转染SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC细胞中 HPV18-wE6E7表达结果

Query429~1236: 为转染SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC细胞, 逆转录PCR扩增产物测序分析结果;

Sbjct105~910: 为GenBank中HPV18E6E7基因序列。

```

Query 429 TACTATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCAC 488
          |||
Sbjct 101 TACTATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCAC 160
Query 489 GGAAGTGAACACTTCACTGCAAGACATAGAAAATACCGGTGTATATTGCAAGACAGTATT 548
          |||
Sbjct 161 GGAAGTGAACACTTCACTGCAAGACATAGAAAATACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATT 220
Query 549 GGAAGTACAGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTATAGAGACAG 608
          |||
Sbjct 221 GGAAGTACAGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTATAGAGACAG 280
Query 609 TATACCCCATGCTGCATGCCATAAAGGTATAGATTTTTATTCTAGAATTAGAGAATTAAG 668
          |||
Sbjct 281 TATACCCCATGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTTATTCTAGAATTAGAGAATTAAG 340
Query 669 ACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTGAAAAACTAACTAAGACTGGGTATA 728
          |||
Sbjct 341 ACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTGAAAAACTAACTAAGACTGGGTATA 400
Query 729 CAATTTATTAATAAGGTGCCTGCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAAACTTAG 788
          |||
Sbjct 401 CAATTTATTAATAAGGTGCCTGCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAAACTTAG 460
Query 789 ACACCTTAATGAAAAACGACGATTTCAACAATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCA 848
          |||
Sbjct 461 ACACCTTAATGAAAAACGACGATTTCAACAATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCA 520
Query 849 TTCGTGCTGCAACCGAGCAGCAGAGGAACGACTCCAACGACGCGAGAAACACAAGTAGG 908
          |||
Sbjct 521 TTCGTGCTGCAACCGAGCAGCAGAGGAACGACTCCAACGACGCGAGAAACACAAGTATA 580
Query 909 ATATGGAGGTATGCATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGGGCC 968
          |||
Sbjct 581 ATATTTAA-GTATGCATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCC 639
Query 969 CCAAATGAAATTCGGTTGACCTTCTAGGTCACGGGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGA 1028
          |||
Sbjct 640 CCAAATGAAATTCGGTTGACCTTCTATGTCACGAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGA 699
Query 1029 AAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCGACGAGCCGAACCACA 1088
          |||
Sbjct 700 AAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCGACGAGCCGAACCACA 759
Query 1089 ACGTCACACAATGTTGGGTATGGGTGGTAAGGGTGAAGCCAGAATTGGGCTAGTAGTAGA 1148
          |||
Sbjct 760 ACGTCACACAATGTTGGGTATGGGTGGTAAGGTGAAGCCAGAATTGAGCTAGTAGTAGA 819
Query 1149 AAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAGCAGCTGTTTCTGAACACCCTGTCTTTGT 1208
          |||
Sbjct 820 AAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAGCAGCTGTTTCTGAACACCCTGTCTTTGT 879
Query 1209 GGGTCCGTGGTGTGCATCCAGCAGGGA 1236
          |||
Sbjct 880 GTGTCCGTGGTGTGCATCCAGCAGTAA 907
    
```

图18B 逆转录PCR扩增产物测序检测转染SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC细胞中 HPV8-mE6E7表达结果

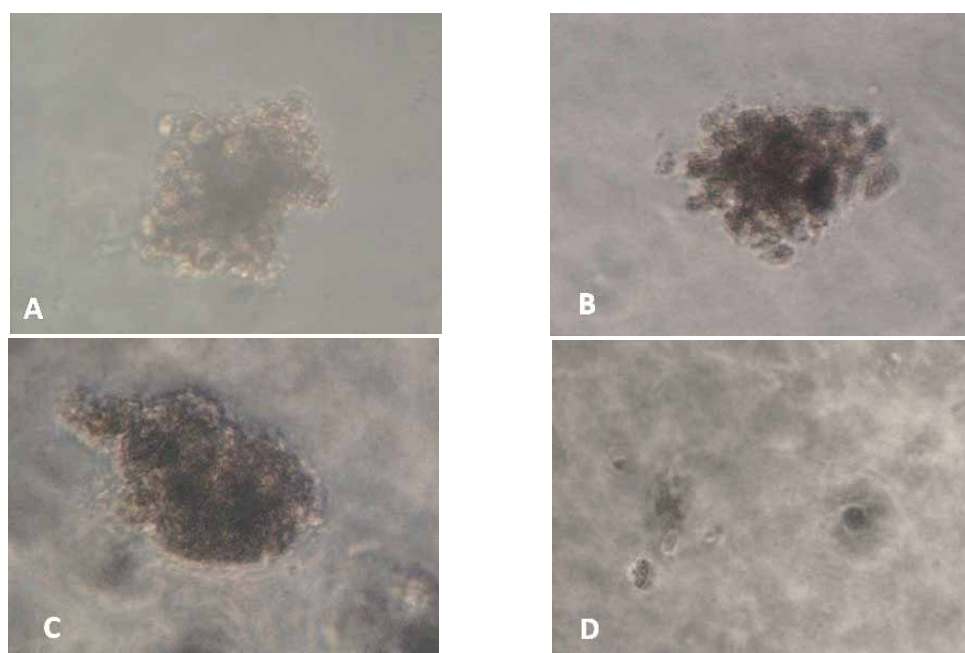
Query429~1229为转染SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC细胞，逆转录PCR扩增产物测序分析结果； Sbjct105~910，为GenBank中HPV18E6E7基因序列。

经测序分析结果表明 HPV18-wE6E7 与 HPV18-mE6E7 稳定表达于转染细胞中。逆转录 PCR 扩增产物测序分别检测转染 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 与 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 细胞中 HPV18-wE6E7 与 HPV8-mE6E7 表达结果（图 18）。

### 3.2.6 稳定转染 HPV18-mE6E7 的 HeLa 细胞克隆形成能力检测

当培养时间到达第 5 天，在倒置显微镜下可以观察到未转染细胞、稳定表达

SW102-T-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组有分化现象，而稳定表达 SW102-T-ORF55-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组未见克隆形成；培养 13 天后，克隆数量显著增加，细胞聚集性生长（图 19），克隆形成率分别为 87.5%（175/200），86.0%（172/200），89.5%（179/200）。稳定表达 SW102-T-ORF55-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组未见克隆形成。



A—未转染的 HeLa 细胞组形成的典型克隆；B—稳定表达 SW102-T-BAC 的 HeLa 细胞组形成的典型克隆；C—稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组形成的典型克隆；D—稳定表达 SW102-T-ORF55-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组未见克隆形成。

图 19 软琼脂克隆形成实验

### 3.2.7 转染 HPV18-mE6E7 的 HeLa 细胞增殖速度检测

将稳定表达 SW102-T-BAC（Hela/T-BAC）、SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC（Hela/ T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC）与 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的 HeLa（Hela/ T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC）细胞组及未转染的 HeLa 细胞组（作为对照组）常规培养后，接种于 96 孔板，各组细胞同步化，使细胞处于同一个生长状况后，分别以培养 1，2，3，4，5，6 天的 6 个重复孔先后加入 CCK-8 后的 OD 值的均数，检测细胞增长状况，可见：各组细胞先后加入 CCK-8 后的 OD 值在细胞培养了 1 天后，稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组、未转染的 HeLa 细胞组及稳定表达 SW102-T-BAC 的 HeLa 细胞组 OD 值开始

超过了稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组的 OD 值, 随着培养时间的增加, 这一差异越来越大, 3 天后这一差异明显, 差异有统计学意义  $P < 0.05$  (表 10)。提示: 稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组生长速度比稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组、未转染的 HeLa 细胞组及稳定表达 SW102-T-BAC 的 HeLa 组细胞生长速度慢; 表明 HPV18-mE6E7 对 HeLa 细胞有抑制作用 (图 20)。

表 10 CCK8 法检测不同细胞不同时间的细胞活力 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	时间 (d)		
	0	1	2
HeLa	0.27±0.04	0.58±0.11	0.79±0.23
HeLa/T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC	0.20±0.03	0.48±0.11	0.69±0.13
HeLa/T-BAC	0.23±0.05	0.55±0.12	0.76±0.18
HeLa/T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC	0.29±0.06 <sup>▲</sup>	0.62±0.21	0.89±0.15
F	4.535	1.013	1.379
P	0.014	0.408	0.278

注: HeLa 细胞组为对照组。▲表示与 HeLa/T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 细胞组比较,  $P < 0.05$ 。

表 10 (续)

Groups	Time (d)			
	3	4	5	6
HeLa	0.98±0.21	1.42±0.23	1.76±0.28	2.07±0.25
HeLa/T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC	0.81±0.21	1.01±0.27	1.27±0.21*	1.59±0.16*
HeLa/T-BAC	0.93±0.17	1.39±0.35	1.69±0.22	1.95±0.23
HeLa/T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC	1.09±0.27	1.59±0.46 <sup>▲</sup>	1.93±0.31 <sup>▲</sup>	2.69±0.31 <sup>▲△</sup>
F	1.704	3.125	7.067	21.226
P	0.198	0.049	0.002	<0.001

注: HeLa 细胞组为对照组。\*与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ▲与 HeLa/T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 细胞组比较,  $P < 0.05$ ; △与 HeLa/T-BAC 细胞组比较,  $P < 0.05$ 。

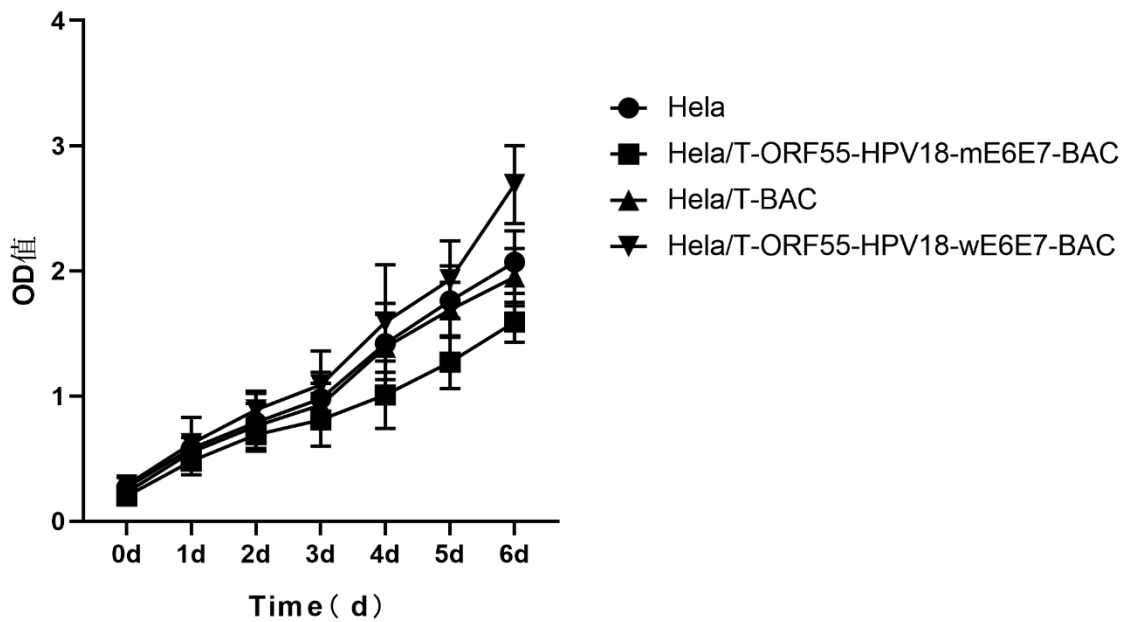


图 20 CCK-8 法检测细胞生长状况

### 3.3 讨论

HPV 感染 HPV16 和 18 型感染在全世界范围内很多见，没有特别明显的地区或地域差异，有明显地域差异的是 HPV58 型的感染分布，在亚洲地区有很高的感染率，特别是我国南方地区已经位居第一，超过了 HPV18<sup>[61]</sup>。80%以上的宫颈癌病变患者可检测出高危型 HPV18 型及 16 型感染<sup>[62-64]</sup>，因此根据 HPV 流行病学的分布特点分析，HPV16 型、HPV18 型感染为主要的疫苗研究对象<sup>[65,66]</sup>，但是各国家各地区差异显著，此疫苗对 HPV58 型感染所致的宫颈病变没有作用<sup>[67-69]</sup>。在疫苗的抗肿瘤的反应中，预防性疫苗已普遍应用于临床，多数预防疫苗由病毒 L1 和 L2 组成的病毒颗粒作为抗原，引起机体产生特异性中和抗体，只适合未感染 HPV 的女性<sup>[70-72]</sup>。HPV18 E6E7 融合蛋白疫苗可以与放射疗法结合，具有协同抗肿瘤的作用，它主要是利用树突状细胞提成 E6E7 蛋白，使机体产生细胞和体液免疫<sup>[73-75]</sup>。

HPVE6/E7 基因是 HPV 相关恶性肿瘤维持恶性表型的关键蛋白<sup>[76]</sup>，在恶性肿瘤细胞中 HPV 不断持续表达，都依赖于此蛋白，表明 E7 和 E6 蛋白是 HPV 阳性癌细胞中的特异病毒性抗原，在病毒的复制过程中，E5 与 E6、E7 蛋白在细胞的转化中共同发挥作用，E5 或许在癌症早期发挥作用<sup>[77]</sup>，而 E6E7 作用于下游蛋白，通过各种信号转导和分子机制使细胞发展成永生细胞<sup>[78,79]</sup>。

HPVE6/E7 蛋白可以作为的理想靶抗原用于 HPV 阳性肿瘤的免疫治疗，但如果将具有潜在致癌性野生型 HPVE6/E7 基因作特异抗原，进行疫苗的研制<sup>[80]</sup>，将

会增加致癌风险。因此，必须改造 E6/E7 基因中致癌的序列，使其无致癌的活性，才能作为治疗性疫苗的抗原<sup>[81-83]</sup>。我们将 HPV18E7 基因和 pRB 基因的结合位点，E6 基因降解 P53 基因位点进行了修饰，使一些致癌序列改造为非致癌序列，通过敲除 E7 与 E6 基因的致癌性，并对 E6 与 E7 的终止密码子进行编码，构建出 HPV18E6 与 E7 的融合基因，从而在保留了 HPV18E6 和 E7 的抗原性的基础上，同时又消除了其致癌活性，并确保了它们的编码序列正确<sup>[84]</sup>。因此，这项关于 E6E7 基因结合位点的 HPV18 基因序列变化的研究，是基于 E6 序列的关键氨基酸是半胱氨酸和谷氨酸，它的密码子分别是 TGT 和 GAG，E7 结合的部位的关键氨基酸是半胱氨酸，密码子是 GGT 和 GGG，把这些氨基酸都改为甘氨酸。因此，这些氨基酸的碱基序列编码被我们更改后，构建了新的融合基因，经过改造有效的保证了 E6/E7 读码框的序列的正确性，E6/E7 的抗原的免疫原性也有了保证，可以诱导细胞代谢减慢或凋亡<sup>[85-88]</sup>，因此得到构建重组携带 HPV18-wE6E7 与 HPV18-mE6E7 融合基因的重组病毒，为治疗宫颈病变的脱落细胞的疫苗研制提供依据。

通过重组病毒转染细胞观察形态学改变，分析其对细胞的影响，判断构建的携带融合基因的重组病毒是否成功。通过软琼脂克隆实验观察转化后的 HeLa 细胞的集落形成能力<sup>[89,90]</sup>，未转染细胞、稳定表达 SW102-T-BAC、SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组有克隆形成，随着天数增加克隆细胞堆积生长，其在软琼脂中形成克隆的能力反映了细胞的恶性程度；而稳定表达 SW102-T-ORF55-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组未见克隆形成，表明构建的突变型融合基因对肿瘤细胞的抑制作用。E6E7 蛋白是一种特殊的细胞免疫蛋白，其高表达率和高转化率、可使人上皮细胞永生化，E7 蛋白氨基端的 pRb 结合位点和 E6 蛋白对 P53 活性位点的特殊氨基酸发生突变，使 E7、E6 蛋白的转化率降低，但仍然保持了较好的抗原性和免疫原性，突变型 E6E7 基因能使其表达的 E6E7 蛋白迁移至引流淋巴结进入 T 细胞，从而激发靶向细胞介导的免疫应答，具体抑瘤机制在今后的实验中进一步研究。CCK8 增殖实验可以通过检测活细胞内脱氢酶判断细胞克隆形成，存活，凋亡情况，稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组的 OD 值，随着培养时间的增加而减低稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-mE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组增长速度比稳定表达 SW102-T-ORF55-HPV18-wE6E7-BAC 的 HeLa 细胞组、未转染的 HeLa 细胞组及稳定表达 SW102-T-BAC 的 HeLa 组细胞生长速度慢，同样表明构建的融合基因对肿瘤细胞的凋亡和生长有调控作用。为 HPV18 感染相关疾病的早期诊断和治疗提供了重组病毒。通过对所构建的重组病毒深层次的分析，进一步了解了其免疫原性和免疫反应性，为今后 HPV18 感染的

临床研究打下了基础。

### 3.4 小结

本实验获得了 T-ORF55-HPV18-wE6E7 及 T-ORF55-HPV18-mE6E7 重组病毒；所构建的突变型融合基因能够抑制肿瘤细胞的生长，为相关疾病的治疗提供了依据。

### 参考文献

- [61] CHAN CK, AIMAGAMBETOVA G. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination-Review of Current Perspectives[J]. *J Oncol*, 2019, 2019:3257939.
- [62] WANG X, ZENG Y, HUANG X, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in invasive cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia, and asymptomatic women in southeast China[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 2897937.
- [63] LIAO L, CHENG H, ZENG F, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes among women with high-grade squamous intraepithelial lesion and invasive cervical cancer in Ganzhou, China[J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33: e22708.
- [64] 顾卓伟, 邱丽华, 高华, 等. 生殖道感染与宫颈癌及宫颈癌前病变的相关性研究[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(23): 4439-4442.
- [65] ARBYN M, XU L, et al. Efficacy and safety of prophylactic HPV vaccines. A Cochrane review of randomized trials[j]. *Expert Rev Vaccines*, 2018, 17(12): 1085-1091.
- [66] ARBYN M, XU L, SIMOENS C, et al. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 5(5): 548-549.
- [67] ZHU B, LIU Y, ZUO T, et al. The prevalence, trends, and geographical distribution of human papillomavirus infection in China: The pooled analysis of 1.7 million women [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(11): 5373-5385.
- [68] ZHAO S, ZHAO X, HU S, et al. Distribution of high-risk human papillomavirus genotype prevalence and attribution to cervical precancerous lesions in rural North China[J]. *Chin J Cancer Res*, 2019, 31(4): 663-672.
- [69] JIN R, QIAN H, ZHANG Y, et al. The prevalence and genotype distribution of human papillomaviruses among women in Taizhou, China [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(39): e17293.

- [70] SASLOW D, KIMBERLY S, ANDREWS BA, et al. Human papillomavirus vaccination guideline update: American Cancer Society Guideline Endorsement [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(5): 375-385.
- [71] NAMVAR A, BOLHASSANI A, HASHEMI M. HPV16 L2 improves HPV16 L1 gene delivery as an important approach for vaccine design against cervical cancer[J]. *Bratisl Lek Listy*. 2016, 117(3): 179-184.
- [72] KALIAMURTHI S, et al. Cancer Immunoinformatics: A Promising Era in the Development of Peptide Vaccines for Human Papillomavirus-induced Cervical Cancer[J]. *Curr Pharm Des*. 2018,24(32):3791–3817.
- [73] ANNUNZIATA C, BUONAGURO L, BUONAGURO FM, et al. Characterization of the human papillomavirus (HPV) ntegration sites into genital cancers[J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(4): 803-808.
- [74] BROTHERTON JML, TABRIZI SN, PHILLIPS S, et al. Looking beyond human papillomavirus (HPV) genotype 16 and 18: defining HPV genotype distribution in cervical cancers in Australia prior to vaccination[J]. *Int J Cancer*, 2017,141(8): 1576–1584.
- [75] DEPUYDT CE, CRIEL AM, et al. Changes in type-specific human papillomavirus load predict progression to cervical cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2012,16(12): 3096 – 3104.
- [76] BACAJ P, BURCH D, et al. Human papillomavirus infection of the skin[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2018, 142(6): 700-705.
- [77] KELL B, JEWERS RJ, CASON J, et al. Detection of E5oncoprotein in human papillomavirus type 16-positive cervical scrapes using antibodies raised to synthetic peptides [j]. *J General Virol*, 1994, 75(9): 2451-2456.
- [78] DIOGO L B, CLÁUDIA B P C, SHAYANY P F, et al. The papillomavirus E5 gene does not affect EGFR transcription and overall survival in cervical cancer[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(8): 1283-1289.
- [79] CHEN Z, JING Y, WEN Q, et al. E6 and E7 Gene Polymorphisms in Human Papillomavirus Types-58 and 33 Identified in Southwest China[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e171140.
- [80] 欧丽滢, 刘浩, 陈茵, 等. TCT 与 HPV E6/E7 RNA 定量检测筛查对宫颈癌及癌前病变患者的临床价值[J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36,(10):1614-1618.
- [81] 黄丹, 王紫薇, 鞠梅, 等. 人乳头瘤病毒感染及诊疗新动向[J]. *中国临床新医学*, 2021, 14(03): 245-250.
- [82] SHIN HY, YANG W, LEE EJ, et al. Establishment of five immortalized human ovarian

- surface epithelial cell lines via SV40 T antigen or HPV E6/E7 expression[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205297.
- [83] HOPPE-SEYLER K, BOSSLER F, BRAUN JA, et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets[J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(2): 158-168.
- [84] 张卉, 赵莉, 任皎, 等. HPV11 型 L2E7 融合蛋白的原核表达及其免疫效果观察[J]. *中国实验和临床病毒学杂志*, 2007, 21(2): 156-158.
- [85] YUANHANG ZHU, CHENCHEN REN, LI YANG, et al. Performance of p16/Ki67 immunostaining, HPV E6/E7 mRNA testing, and HPV DNA assay to detect high-grade cervical dysplasia in women with ASCUS[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(271): 1-9.
- [86] ALDO F CLEMENTE-SOTO, ENRIQUE SALAS-VIDAL, CESAR MILAN-PACHECO, et al. Quercetin induces G2 phase arrest and apoptosis with the activation of p53 in an E6 expression-independent manner in HPV-positive human cervical cancer-derived cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19(3): 2097-2106.
- [87] A R KREIMER, A FERREIRO-IGLESIAS, M NYGARD, et al. Timing of HPV16-E6 antibody seroconversion before OPSCC: findings from the HPVC3 consortium[J]. *Annals of Oncology*, 2019, 30(8): 1335-1343.
- [88] INTURI RAVITEJA, JEMTH PER. CRISPR/Cas9-based inactivation of human papillomavirus oncogenes E6 or E7 induces senescence in cervical cancer cells[J]. 2021, 562(10): 92-102.
- [89] WU S, LI JT, ZHONG RG, et al. A synergistic transformation response induced by HPV 16 E6E7 gene and MCA/TPA[J]. *Shandong Med J*, 2012, 52(17):35-38.
- [90] DU FENG, ZHAO XIAODI, FAN DAIMING. Soft Agar Colony Formation Assay as a Hallmark of Carcinogenesis[J]. *Bio-protocol*, 2017, 7(12): 2351-2353.

## 结 论

1 高危型 HPV 感染与患者宫颈病变程度间呈正相关性，可通过高危型 HPV 感染状况检查，筛查宫颈病变早期患者，及时对患者进行治疗。

2 高危型 HPV 整合是随机的。

3 构建的 HPV18 突变型 E6 与 E7 融合基因能够抑制肿瘤细胞的生长，为宫颈癌的治疗提供了科学依据。

## 第 4 章 综述

全球范围宫颈癌发病率及死亡率位居女性恶性肿瘤的第二位，其作为目前唯一确定病因的癌症广受关注，大多数的宫颈癌都是由高危型人乳头瘤病毒感染所引起，这是一种嗜上皮性 DNA 病毒，在感染过程中可通过整合进机体基因组导致基因组不稳定，进而使抑癌基因失活促使癌症的发生。目前发现的 100 多种 HPV 亚型可大概分为高危和低危型，高危型的致癌性更高。本文旨在对人乳头瘤病毒包括基础结构、感染方式、筛查以及治疗方式在内的现阶段情况作简要介绍，其次总结 HPV 58 及 18 两种分型涉及的相关研究。

在世界卫生组织 2019 年的统计中，癌症被报道是影响 112 个国家的生存率的主要原因之一<sup>[91]</sup>。2021 年 9 月，WHO 发布的一则关于癌症的报道数据中显示大约 30% 的癌症病例是由人乳头瘤病毒（HPV）和肝炎等致癌感染引起<sup>[92]</sup>。目前仍没有特效药可以治疗癌症，而且癌症的发生发展所发生的分子机制也有很大差异，治疗癌症的成本也相对较高，因此罹患癌症的病人负担极重，除了需要忍受癌症所带来的身体上的病痛外，还要承担高昂的治疗费用。2021 年 1 月，国际癌症研究机构（IARC）报告对 2020 年全球主要类型的癌症发病情况做了总结，分析了全球不同地区不同国家癌症发病率的差异<sup>[93]</sup>，并对未来癌症发病的规律进行了预估。癌症起源于正常细胞，具体发病原因并不清楚，卫生机构通常建议人们从注意外部的物理化学及生物致癌物的角度预防癌症。在诸多癌症问题中，有一类癌症的诱因于 1989 年被 Keerti Shah 发现，即宫颈癌。

### 4.1 人乳头瘤病毒基因结构及分型

#### 4.1.1 HPV 基因结构

人乳头瘤病毒（HPV）是一种能够感染上皮细胞的 DNA 病毒，直径 52~55 纳米，由一个约 8kb 的双链封闭环状基因组和一个非包膜的二十面体衣壳组成。HPV 基因组分为三个区域：长控制区（LCR）调节病毒基因的表达和复制，含有早期启动子、调控病毒和细胞蛋白转录的调控位点；早期编码区（E）区，编码病毒基因表达、复制和存活所需的蛋白质；以及编码病毒结构蛋白的晚期编码（L）区域<sup>[94]</sup>。E 和 L 指的是这些蛋白在病毒生命周期中首次表达的阶段。对应至病毒基因组中，编码蛋白复制的序列为 E1-E7，编码蛋白组装的序列为 L1-L2<sup>[95]</sup>。E1 和 E2 调节病

毒基因组的复制及转录，E4 促进病毒蛋白的成熟，E5、E6、E7 则作为主要的致癌基因，其编码的致癌蛋白是导致宫颈上皮癌变的重要因子<sup>[96]</sup>。L 区包括 L1、L2 两种晚期基因，约占基因组的 40%，分别编码 L1 和 L2 蛋白。L1 蛋白可组装成病毒样颗粒，作为一种特异性免疫抗原因为它具有较强的免疫原性，因此可以进一步诱发机体的免疫反应<sup>[97]</sup>，L2 蛋白由于 N 端残基暴露于病毒表面，因此在介导病毒对细胞的吸附以及进一步被内吞入胞以及囊泡转运过程中发挥一定作用<sup>[98]</sup>。

#### 4.1.2 HPV 病毒分型

科学家们根据人乳头瘤病毒基因组的 DNA 序列将其划分为多种类型，HPV 病毒的分型主要得益于分子生物学的发展，其中病毒 DNA 序列测序和分析技术成为了 HPV 病毒分型的主要依据和方法<sup>[99]</sup>。证据表明，乳头状瘤病基因组是非常保守的，且通过突变或重组发生序列改变的几率非常低。目前已经确定的 HPV 分型别大约有 200 多种，大部分在进化系统中属于  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  属<sup>[100]</sup>。国际癌症研究署将 12 种  $\alpha$ -HPV (HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58 和 59) 确定为高危型 HPV，这些种类的 HPV 的感染与肛门生殖器和头颈部上皮的高级别病变、癌症关系密切<sup>[101]</sup>，HPV 感染的一个标志是其长期持续多年，对于高危类型来说，这是发展为癌症的先决条件。 $\beta$ -HPV 则主要引起皮肤病变<sup>[102]</sup>。

## 4.2 病毒感染方式及致癌机制

### 4.2.1 HPV 病毒感染方式

目前认为 HPV 主要有 5 种感染途径：分别为性传播，间接接触，皮肤密切接触，母婴传播和医源性感染。首先 HPV 的感染，主要通过性传播，大多数性活跃的人一生中至少会感染一次，但 HPV 中的大多数类型不会引起症状，其次依靠人体的免疫力也可以对这些低位 HPV 进行清除，而高危型 HPV 的感染可能会持续存在并导致癌症的发生。若健康人与 HPV 病毒携带者发生直接性的皮肤接触，HPV 便有可能通过皮肤上的细小伤口进行感染进而使健康人感染上 HPV 病毒，间接接触则是指健康人接触感染患者的私密衣物所导致的感染。医生作为与各类感染源密切接触机会最高的人群，在日常诊治过程当中应该做好各项防护工作，若所使用的医疗器械没有彻底消毒，HPV 病毒便会通过这些途径传染至病人体内。孕妇持续感染 HPV 病毒也可能会导致宫颈出现病变，并且当分娩时病毒可能通过垂直传播传染婴儿。

#### 4.2.2 HPV 病毒致癌机制

HPV 癌蛋白主要是 E6 和 E7，在宿主细胞宫颈病变过程中发挥着不可估量的作用。HPV 过度表达 E6 和 E7 癌蛋白破坏了宿主中肿瘤抑制基因的正常功能。整合后，病毒蛋白就会开始对正常宿主细胞产生影响。宿主细胞已经进化出机制来修复通过 DNA 损伤进而抑制 DNA 损伤。只有受损的 DNA 得到修复，细胞才能继续分裂。如果细胞无法修复 DNA 损伤，则会发生细胞凋亡<sup>[103]</sup>。

高危人乳头瘤病毒感染和 HPV 基因组整合到宫颈鳞状上皮细胞的宿主染色体中是宫颈病变肿瘤进展的关键早期事件。2015 年中国科研院的团队对全基因组进行了测序，并且研发了整合筛查技术，对基因的整合位点和它们的整合机制做了深入研究，他们复核了已报道过的一些位点，此外还发现了新的整合位点，并首次揭露了 HPV 病毒整合进人类基因组的具体机制，他们发现这些同源的微小 DNA 片段会富集在人类基因组与 HPV 基因组的整合位点周围，在 HPV 感染时，会有一些的几率导致当地的基因组片段变得不稳定，容易断裂或错配，这会激活 DNA 修复机制，而这一机制由人体中同源的微小 DNA 片段介导的，HPV 会与这些微小的同源 DNA 片段竞争，提前将自身的 DNA 基因与已断裂的宿主基因组发生融合，进而完成整合过程，进而导致抑癌基因 p53 和 Rb 的失活导致癌症的发生<sup>[104]</sup>。

大部分 HPV 可在 12-24 个月内被人体清除，只有 10-15%持续存在，但持续感染 HPV 的女性可能会发展为宫颈上皮内瘤变（CIN），最后发展为浸润性宫颈癌（ICC）<sup>[105]</sup>。研究人员推测在高级别宫颈上皮内瘤变向浸润性宫颈癌转变时还有其他因素促进了这种恶化<sup>[106]</sup>。事实上，研究表明，HPV 感染的细胞会通过正常驻留细胞合谋并诱导形成支持性和免疫抑制性的感染后微环境（PIM）来积极重塑局部环境，从而支持病毒的持续存在、传播和促进发病机制宫颈肿瘤<sup>[107]</sup>。前文提到，HPV 是一种嗜上皮性的 DNA 病毒，主要感染上皮内分化差的基底角质鳞化上层细胞，角质细胞由于表达丰富的模式识别受体（PRR），因此能够识别各种各样入侵的病原体并及时调动周围的免疫细胞触发机体免疫反应，HPV 则是通过干扰这种细胞间信号传递方式来逃避免疫监视<sup>[108]</sup>。PIM 主要由病毒感染细胞、先天和适应性免疫细胞、局部基质成分及其衍生的生物活性物质组成，具有免疫抑制、炎症和氧化应激、ECM 重塑、血管生成转换和代谢等五个关键特征。重新编程是指高危 HPV（hr HPV）癌蛋白共同作用以改变转录程序并干扰受感染角质形成细胞中的蛋白质功能，积极阻碍免疫警报功能和抗原呈递机制。它们还扰乱了氧化还原平衡，从而为病毒 DNA 整合创造了机械可行性。此外，角质形成细胞中的 hr HPV

癌蛋白调节 ECM 分子和血管生成因子的水平，诱导 PIM 中的代谢重编程<sup>[109]</sup>。

### 4.3 HPV58/18 和宫颈癌

不同亚型 HPV 的对宫颈癌发生发展影响大小不一致，高危型 HPV 感染的宫颈癌患者中约 90% 感染的是 HPV16、18、31、33、35、45、52、58 型<sup>[110]</sup>。在 HR HPV 类型中，HPV16 占世界宫颈癌的一半以上，而 HPV18 占 16.5%，是第二大致癌类型<sup>[111]</sup>。一项国外研究显示，HPV58 在鳞状上皮内病变和宫颈癌患者中阳性率为 18.3%<sup>[112]</sup>，且 HPV58 是东亚地区的第三大主要类型宫颈癌病因，具有较强的地理分布特征，而 HPV18 阳性率在宫颈癌患者中的比率偏高，因此接下来选择对 HPV58 和 18 在介导宫颈癌发生发展中发挥的作用做简要介绍。

#### 4.3.1 HPV 58

HPV58 在全球宫颈癌的病因中排名第六或第七，但它是东亚第三大主要类型，在 10% 至 18% 的宫颈癌和癌前病变中发现，在其它地方却较为罕见<sup>[113]</sup>，基于该病毒基因组，HPV-58 的变体被分类成 4 个变体谱系（A，B，C 和 d）和 7 个亚型（A1 A2，A3，B1，B2，D1 和 D2）<sup>[114]</sup>，HPV 58 的基因组是一个环状双链 DNA，长度约为 7.9kb，由六个早期开放阅读框（ORF）（E1、E2、E4、E5、E6 和 E7）和两个晚期开放阅读框（ORF）组成（L2 和 L1）、E5 和 L2 之间的一个小的非编码区，以及长控制区（LCR）<sup>[115]</sup>。

韩国的一项对 13 个城市 1881 名女性的人乳头瘤病毒基因型分布及其与宫颈细胞学结果进行分析的数据显示，上皮内病变患者中最常见的三种 HR-HPV 类型是 HPV-52、58 和 16<sup>[116]</sup>。这些发现与在中国东南部和日本人群中进行的研究相似<sup>[117]</sup>。这表明 HPV58 的分布具有一定的地理多样性，但目前解释这种现象的潜在机制仍不够充分。Paul KS Chan 实验室结合发育分析和生物信息学技术对 HPV58 全基因组变异的进化历史进行了研究<sup>[118,119]</sup>，他们的研究表明，HPV58 大约在 478600 年之前开始出现变体，这个分化时间点正好在智人与尼安德特人/丹尼索瓦人形成的中间时期，现在欧亚大陆变异的扩大可能是病毒通过基因流动从尼安德特人/丹尼索瓦人传播到非非洲现代人类的结果，同时全基因组序列特征分析发现了 HPV58 基因上 3 个氨基酸变化，16 个同义核苷酸变化，和一个 12bp 的插入与 E7 T20I/G63S 变体紧密相关，具有较高的致癌潜力，其次还有 G41R/G63D、T20I/G63S 两种变异株，其中 T20I/G63S 变异（V1）与宫颈癌的流行病学关联性更强。因此，他们认为 V1 比其他两个变体具有更强的致癌性。2019 年，Paul KS

Chan 实验进一步研究了 HPV58V1 变异株为何致癌能力更强的作用机制<sup>[120]</sup>，与原型 ( $P < 0.05$ ) 和其他变体相比，V1 的过表达增强了原代鼠上皮细胞的集落形成能力，暗示其具有更高的永生化潜力。进一步的实验表明，V1 和原型都增强了 NIH/3T3 细胞的锚定独立生长 ( $P < 0.001$ )，这意味着它们比其他两种变体更强的转化能力。此外，它们具有更强的降解 pRb 的能力 ( $P < 0.001$ )，这是 E7 驱动的肿瘤发生的主要效应途径。

在一篇 2018 年的研究中<sup>[121]</sup>，研究者筛选了来自川南及邻近地区的 2013 年至 2017 年间被诊断为携带 HPV 的患者，进一步分析了 HR-HPV 亚型分布，并使用实时 RT-PCR 检测了患者的病毒载量，病毒载量随着病变程度的加重而增加。鉴于这样的结果 HPV58 有望成为宫颈癌前病变前的生物标志。有时宫颈上皮细胞坏死或者凋亡，病毒的载量也可以减低，可能是由于病毒丢失的过多。而且病毒的载量是一个动态变化的过程，如果处于整合期的病毒不容易被检测到。宫颈病变许多因素影响如长期情绪低落、吸烟、分娩等，所以高假阳性率是目前使用人乳头瘤病毒 (HPV) 检测作为高级鳞状上皮内病变或宫颈癌 (HSIL+) 诊断工具的主要障碍。使用实时聚合酶链反应测定分别来自 240、83 和 79 名 HPV 16、18 和 58 名感染女性的宫颈细胞中 E6 和 E2 基因的类型特异性病毒载量。结果表明类型特异性总病毒载量与 HSIL+ 显著相关 (HPV16、18 和 58 的曲线下面积分别为 0.914、0.937 和 0.971)，表明在检测 HSIL+ 方面具有出色的性能，特定类型的归一化总病毒载量是 HSIL+ 的强大诊断生物标志物<sup>[122]</sup>。研究结果可为进一步研究 HPV58 的流行病学、预防和治疗性疫苗开发提供基础数据。

#### 4.3.2 HPV18

宫颈癌可分为鳞癌、腺癌和腺鳞癌三种类型，通常我们认为致癌最高的两种高危 HPV 亚型是 HPV16 和 18。宫颈癌样品中 HPV16 感染是最常见的，HPV18 次之。相关实验研究表明 HPV16 在宫颈鳞癌中更为常见，但 HPV18 感染在腺癌中更常见<sup>[123]</sup>。相比于宫颈鳞癌，早期腺癌在诊断时更不易被发现，且腺癌恶性程度更高，发展迅速，预后的情况也更差<sup>[124]</sup>。从宫颈上皮内瘤变进化至宫颈癌需要数年时间，鉴于 HPV18 对宫颈腺癌的发生发展起到至关重要的作用，以 HPV18 靶分子作为生化检测指标，则有可能大大提高宫颈腺癌被及时发现的概率，从而提高宫颈癌治愈率以及降低致死率。

#### 4.4 HPV 与其它癌症

除了宫颈癌之外，随着人们生活方式的改变，HPV 所导致的癌症类型越来越多。从传播方式看，HPV 主要通过性传播，因此性交方式的多样性提高了 HPV 所致的癌症类型。丹麦一项研究表明，人乳头瘤病毒还导致 40~85% 的肛门癌、阴茎癌、阴道癌和外阴癌以及癌前病变<sup>[125]</sup>。在所描述的不同病毒类型中，HPV 16 和 18 分别存在于 65.6%和 5.1%的所有 HPV 相关肛门癌中<sup>[126]</sup>。在这种情况下，宫颈感染可以作为肛门生殖器感染的 HPV 储存库，肛门生殖器感染可以作为宫颈感染的病毒库<sup>[127]</sup>。肛门癌在女性与同性男同性恋之间较为常见，是普通男性的 15 倍<sup>[128,129]</sup>。

头颈部鳞状细胞癌（HNSCC）是世界第六大最常见的癌症类型<sup>[130]</sup>。几乎所有这些上皮恶性肿瘤都是头颈部鳞状细胞癌（SCCHN），其最重要的危险因素是烟草和酒精<sup>[131]</sup>。研究表明，人乳头瘤病毒（HPV）是导致特定 SCCHN 亚群的原因<sup>[132]</sup>。正如在其他 HPV 相关恶性肿瘤中所证实的那样，HPV-16 是在病毒相关 HNSCC 中检测到的最普遍的病毒类型<sup>[133]</sup>。

Syrjänen（1982）首次提出了 HPV 感染与食管癌之间的关联。Harrison 的内科学原理在其第 18 版中已经考虑了食管癌中的 HPV 病因病理学作用<sup>[134]</sup>。目前，HPV 被认为是不吸烟或饮酒的个体发生 EC 的主要危险因素<sup>[135]</sup>。由于 HPV 还可以通过母婴之间的垂直传播进行感染，因此，HPV 与眼科恶性肿瘤有关，包括结膜和泪囊鳞状肿瘤以及 3 岁或以上儿童的视网膜母细胞瘤<sup>[136]</sup>。

## 4.5 HPV 筛查技术

由于 HPV 所致的癌症的形成需要较长时间，因此早期 HPV 筛查与早期 HPV 治疗可以帮助提高 HPV 治疗的成功率以及降低致癌率、致死率。提高 HPV 筛查的准确率以及研发更多的筛查手段刻不容缓，筛查的目的是为了提早发现能够转化为宫颈癌的癌前病变的存在，从而达到降低发病率以及致死率的目的。目前 HPV 检测方法主要依赖三种手段分子生物学，细胞学和组织学。

### 4.5.1 细胞学

正常细胞与癌变细胞存在形态学上的差异，因此医生可通过观察患者子宫颈部细胞来判断患者体内是否有 HPV 感染的情况。Papanicolaou 博士与纽约医院的妇科病理学家 Herbert Traut 博士于 1943 年在书中公开了他们的研究成果，通过阴道涂片诊断子宫上皮病变，在显微镜下能正确观察阴道和子宫颈的正常和病变涂片而且可以按级别分类<sup>[137]</sup>，这是宫颈癌前病变和宫颈癌最普通的病理筛查法，通过巴

氏涂片法的筛查，明显降低了宫颈癌的发病率<sup>[138]</sup>。随着科学检测方法的更新，巴氏涂片法逐渐被液基细胞学检测（TCT）代替。TCT主要是引入了液基薄层制片技术，通过该技术能够有效去除非宫颈细胞成分，例如宫颈中粘液，炎症性细胞以及血液，并通过计算机辅助系统帮助识别可疑细胞。相比于巴氏涂片法，TCT能够将细胞处理成为单层细胞，能够有效解决由于细胞成团而引起的无法仔细观察单个细胞的问题。目前有两种由FDA批准的基于液体的单层细胞学方法：PrepStain系统以及ThinPrep Pap Smear方法。ThinPrep Pap Smear还可用于取样的免疫组化染色，用相应的HPV亚型的分子探针处理，通过观察感染细胞细胞核的颜色的深浅（淡蓝色代表低拷贝数，蓝黑色代表高拷贝数）进行感染与否的判别；其次TCT检测方法中细胞被固定液固定，因此细胞结构能够被尽量完整地保存下来。除此之外细胞学检测方法还包括DNA倍体分析技术以及宫颈光电筛查系统<sup>[139]</sup>。巴氏涂片法诊断标准分为5级：正常-炎症-可疑癌-高度可疑癌-癌。

#### 4.5.2 组织学

当发现疑似可疑细胞时应当通过阴道镜窥察或阴道镜活检来明确是否发生癌变，取病理组织做进一步检验。活检可用于通过观察HPV感染的特征性病理特征（例如在具有非典型细胞核的终末分化的角质形成细胞中的上皮增生（棘皮症）和退行性细胞质空泡化（嗜酸细胞增多症）来确认大多数诊断。阴道镜检查过程中应有目的地进行多点活检，活检部位包括醋酸白区域、化生区域或高级别病变区域<sup>[140]</sup>。醋酸白通常可用于判断病变程度，碘实验则用于判断发生病变的具体部位。通常，检查整个子宫颈的重点是2个区域：鳞柱交界处或“SCJ”和转化区。SCJ是鳞状上皮和柱状上皮的交界处子宫颈，通常位于子宫颈外口在近些年来的子宫颈癌筛查过程中有关阴道上皮内瘤变的情况屡被发现，因此在进行阴道镜检查时，还需要注意一些特殊部位，例如子宫颈下阴道上部分，这个区域也易发生病变，特别是在子宫颈未发现显著病变时更应该主动观察阴道内壁位置<sup>[141]</sup>。

#### 4.5.3 分子生物学

目前基于分子生物学方法分为类型特异性和通用型PCR，类型特异性PCR是以HPV的E7开放阅读框序列为靶分子，通过聚合酶链式反应实现对采样的检测。通用型PCR则是通过靶向HPV基因组的保守区域设计通用型引物。但这种方法也存在着定量不准确以及出现假阴性的情况。2003年，FDA批准将高危HPV检测与细胞学（或“联合检测”）结合用于宫颈癌筛查，尤其是30岁及以上的女性。

## 4.6 HPV 治疗

CIN1 病变通常不需要任何治疗，除非病变持续超过 2 年，或者怀疑尚未检测到的更晚期疾病，或者细胞学、阴道镜或组织病理学检查异常进展到更高级别。目前 HPV 感染治疗方法可分为手术、物理、药物以及免疫治疗。应当根据病患的病情不同选择恰当的方式进行治疗。

### 4.6.1 手术治疗

手术治疗目的在于通过切除病灶，适当激发机体免疫反应，促进 HPV 转阴。手术治疗适合 HPV 阳性，CIN II-III 级以及宫颈癌患者。手术方法包括宫颈锥切术、宫颈环切术以及子宫全切术等。宫颈锥切术是一种通常用于治疗原位腺癌（AIS）和微浸润癌的切除方法。在这两种情况下，严格控制切除的深度和范围显得尤为重要<sup>[142]</sup>。锥切术是指由外向内呈圆锥形的形状切下宫颈组织，切下的组织经过病理巴氏染色可以确认病变发展到哪种程度，以便安排后续的治疗；同时也是对病变部位起到了切除的作用。早期锥切术需通过解剖刀进行，手术时间长需要住院。现在更方便的则是子宫颈环行电切术，即 LEEP 刀，这种方法简便易行不用住院，耗时短。对于已经绝经的妇女，颈管会有不同程度的萎缩，锥切可能会导致颈管粘连，在这种情况下可考虑子宫全切术。

### 4.6.2 物理治疗

物理治疗主要包括冷冻消融，电凝治疗，微波治疗，激光治疗，聚焦超声以及光动力疗法。这些物理疗法通过低温和高能量是病变部位细胞发生结构以及功能上的坏死，进而脱落。可以有效阻止肿瘤细胞的进一步扩散并激发机体的免疫反应。

### 4.6.3 药物治疗

目前对于 HPV 感染仍无特效药可用，但从 HPV 本身作为病毒这类病原体来看，主要以提高自身免疫力，口服抗病毒药物以及宫颈病变局部位外敷药为主。重组人干扰素  $\alpha 2\beta$  作为免疫调节药物具有广谱抗病毒作用，该干扰素可降低端粒酶与 HPV16/18 蛋白表达水平<sup>[143]</sup>。咪喹莫特乳膏临床用于去疣效果良好。研究表明，局部使用抗病毒药物 5-FU 是年轻女性 CIN 2 的有效药物治疗方式，且 5-FU 易于获得，对于那些想治疗但希望避免切除手术的 CIN2 年轻女性是可行的治疗手段<sup>[144]</sup>。

#### 4.6.4 免疫治疗—HPV 疫苗

目前,能够对 HPV 病毒起到预防作用的疫苗已经被研发并投入使用,这种疫苗预估可以预防 70%-90%的侵袭性癌症病例<sup>[145]</sup>,较新的研究还是侧重于治疗性疫苗的研究,因为预防性疫苗并不能解决现存的宫颈病变患者。

预防性疫苗是依据体液免疫原理利用结构蛋白 L1 或者 L2 帮助人体产生细胞和体液免疫能力,刺激机体产生特异性抗体,当病毒侵入上皮组织细胞时,能与其特异性的结合,发挥抗原抗体的中和作用。目前用于预防的 HPV 疫苗有 3 种,分别是九价、四价以及二价,价数越高可免疫的 HPV 类型相对较多。二价疫苗可以预防 HPV16 和 18 两种高危亚型引起的 70%的宫颈癌,推荐 9~25 岁的女性使用;四价疫苗相比于二价疫苗则多了对 HPV6 和 11 的预防,也因此对 90%的尖锐湿疣起到预防作用,推荐 20~45 岁女性进行疫苗的有效接种;现目前价数最高的九价疫苗除了二价四价所拥有的免疫亚型还可预防 HPV31、33、45、52 以及 58 五种亚型,预防范围除了宫颈癌之外也扩大到对阴道癌以及低级宫颈癌变的预防<sup>[146]</sup>,建议 16~26 岁的女性接种。HPV 早期蛋白 E6 和 E7 是 HPV 相关肿瘤和癌前病变形和增殖所必需的,且在正常组织不表达,因此 E6、E7 蛋白是目前研发 HPV 治疗性疫苗的研究热点。

治疗性疫苗根据组成成分的不同可分为载体疫苗、蛋白疫苗、肽类疫苗、DNA 疫苗及细胞疫苗等<sup>[147]</sup>。这些疫苗是通过将编码 HPV 特异性抗原的 DNA 片段导入人体进而诱导人体产生并呈递该抗原,诱发特异性免疫反应,达到有效清除病变的目的。但接种疫苗并不意味能够 100%地预防宫颈癌,因此适龄女性应当定期进行宫颈癌筛查,其次在接种过 HPV 疫苗之后,其它的预防宫颈癌的措施也要做到位。通过定期体检我们可及时地发现 HPV 感染,通过一些干预措施可阻断病灶发展成宫颈癌。

#### 4.7 社会现状与前景展望

随着全民受教育程度的提高,人们,特别是女性,对自身健康状态的防范意识越来越强,作为唯一可通过接种疫苗预防的癌症,近些年来在中国的城市甚至农村里,HPV 疫苗开始出现供不应求的情况,这体现出人们教育水平,生活水平的提高以及医疗意识的增强。目前宫颈癌疫苗有二价四价和九价,但进口 HPV 疫苗的研发主要是基于欧美 HPV 流行病学调查数据,因此存在可能不完全适合中国人使用的情况。既往研究表明<sup>[148]</sup>,HPV 感染的流行率因地域而异,他们的研究进一步

表明城市 HPV 感染率与农村相似，华东、华北和东北地区的 HPV 感染负担较高，中高经济水平人群 HPV 感染率较高，总的来说，HPV 感染受地理区域、经济条件、文化习惯和人口迁移的影响。因此，不同地区感染 HPV 亚型的种类可能存在较大差异，理想情况下，人们应当可以根据年龄，地区以及生存环境的差异而选择合适自己的 HPV 疫苗。目前，国产馨可宁二价疫苗已经上市，它能够预防最主要两种高危型人乳头瘤病毒 HPV16/18。国产疫苗技术也比较成熟，在可预见的未来，提前接种疫苗的方式将会成为女性预防宫颈癌重要手段之一。

除了女性之外，近年来男性感染 HPV 病毒的几率也大大提升，大约 40% 的阴茎癌被认为是由 HPV 感染引起的<sup>[149]</sup>，阴茎癌主要包含鳞状细胞组织学，尽管存在几种亚型，包括基底样、疣状、角化和疣状。基底细胞样和疣状组织学与 HPV 感染有关，而其余亚型很少含有 HPV DNA，已经提出两种病理生理机制导致阴茎癌及其相关的癌前病变的发展，第一个与促炎状况有关，如慢性龟头炎、包茎和地衣硬化/闭塞性龟头炎，第二个是由于 HPV 感染。已经描述了数百种 HPV 病毒的基因型影响皮肤和粘膜部位，并根据它们与宫颈恶性肿瘤的关联通常分为“低风险”和“高风险”。虽然 13 到 15 种 HPV 类型被描述为宫颈癌的高风险，但只有 1 种 HPV 类型，即 HPV16，被认为是导致阴茎癌的原因。世卫组织于 2007 年首次得出 16 型人乳头瘤病毒（HPV）是口咽癌（OPC）和口腔癌的病因。鉴于中低收入国家有大量女性暴露于 HPV 病毒种且疫苗接种率低，在可预见的未来将需要通过筛查和治疗癌前病变来预防宫颈癌。综上所述：由于感染 HPV 病毒而引起的疾病以及肿瘤引起了全球各地的关注，除了最开始认为的女性相关宫颈癌之外，男性相关的阴茎癌等也逐渐走入人们的眼帘，随着文化的开放程度的扩大，人们性交方式的改变使得 HPV 感染的方式增多，例如 HPV 感染所引起的口腔癌，这在男女当中都存在着。除了年轻男性和女性之外，性生活不活跃的老人以及儿童也受到了影响，因此，切实有效的对 HPV 病毒的性质、感染方式以及治疗方法的科普教育显得尤为重要。鼓励偏远地区的人们积极参与 HPV 筛查，在有条件的城市鼓励人们接种疫苗；此外，科学技术的发展也推动着疫苗的开发以及临床治疗方式的发现，这需要广大科研工作者的齐心协力以及医生精湛的诊疗手段。HPV 是否还有别的感染途径？更好的治疗 HPV 的手段以及 HPV 疫苗的开发都是未来需要探索明确的地方。

## 参考文献

- [91] CAO W, CHEN H, YU Y, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chinese medical journal, 2021,

- 134(7): 783-791.
- [92] ARALDI RP, SANT'ANA TA, MÓDOLO DG, et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview[J]. *Biomed Pharmacother*. 2018, 106: 1537-1556.
- [93] HYUNA SUNG, JACQUES FERLAY, REBECCA L SIEGEL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [94] 丁璐, 程忠平. HPV 致宫颈癌机制研究进展[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2020, 41(03): 388-393.
- [95] 王致萍, 柳欣林, 王大宁, 等. 人乳头瘤病毒致癌蛋白 E6 的结构与功能研究进展[J]. *病毒学报*, 2019, 35(02): 292-299.
- [96] CHAKRABARTI O, KRISHNA S. Molecular interaction of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression[J]. *J Biosci*, 2003, 28(3): 337-348.
- [97] GUPTA G, GIANNINO V, RISHI N, et al. Immunogenicity of next-generation HPV vaccines in non-human primates: Measles-vectored HPV vaccine versus *Pichia pastoris* recombinant protein vaccine[J]. *Vaccine*, 2016, 34(39): 4724-4731.
- [98] YAN HUAN, et al. Efficient Inhibition of Human Papillomavirus Infection by L2 Minor Capsid-Derived Lipopeptide[J]. *mBio*, 2019, 10(4): e01834-e01819.
- [99] SCHIFFMAN M, CASTLE PE, JERONIMO J, et al. Wacholder, Human papillomavirus and cervical cancer[J]. *The Lancet*, 2007, 370(9590): 890-907.
- [100] EGAWA N, EGAWA K, GRIFFIN J, et al. Human Papillomaviruses: Epithelial Tropisms and the Development of Neoplasia[J]. 2015, *Viruses*, 7(7): 3863-3890.
- [101] JOURA EA, et al. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(10): 1997-2008.
- [102] BACAJ P, BURCH D. Human Papillomavirus Infection of the Skin[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2018, 142(6): 700-705.
- [103] LONGWORTH MS, LAIMINS LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(2): 362-72.
- [104] ZHENG HU, DA ZHU, WEI WANG, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(2): 158-63.
- [105] BARRA F, DELLA CORTE L, NOBERASCO G, et al. Advances in therapeutic vaccines for

- treating human papillomavirus-related cervical intraepithelial neoplasia[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2020, 46(7): 989-1006.
- [106] ŁANIEWSKI P, ILHAN ZE, HERBST-KRALOVETZ MM. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy[J]. *Nat. Rev. Urol.*,2020,17:pp. 232-250.
- [107] LO CIGNO I, CALATI F, ALBERTINI S, et al. Subversion of Host Innate Immunity by Human Papillomavirus Oncoproteins[J]. *Pathogens*, 2020, 9(4): 292.
- [108] MOODY C. Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating KeratinocytesSubversion of Host Innate Immunity by Human Papillomavirus Oncoproteins[J]. *Viruses*, 2017, 9(9): 212-236.
- [109] YUAN Y, CAI X, SHEN F, et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer[J]. *Cancer Lett*, 2020, 497: 243-254.
- [110] DE MARTEL C, PLUMMER M, VIGNAT J, et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(4): 664-670.
- [111] CROW J M. HPV: The global burden[J]. *Nature*, 2012, 488: S2–S3.
- [112] MOLANO M, BUITRAGO O, MORENO-ACOSTA P, et al. Follow-up study of HPV58 variants in women with incident HPV58 infection from a Colombian cohort[J]. *Oncol Lett*, 2018, (2): 2511-2516.
- [113] LI N, FRANCESCHI S, HOWELL-JONES R, et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(4): 927-35.
- [114] BURK RD, HARARI A, CHEN Z. Human papillomavirus genome variants[J]. *Virology*, 2013, 445(1-2): 232-243.
- [115] HO L, CHAN SY, BURK RD, 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.
- [116] E.H. NAH,S. CHO,S. KIM,et al. Human Papillomavirus Genotype Distribution Among 18,815 Women in 13 Korean Cities and Relationship With Cervical Cytology Findings[J]. *Ann Lab Med*, 2017, 37(5):426-433.
- [117] JING L, ZHONG X, HUANG W, et al. HPV genotypes and associated cervical cytological abnormalities in women from the Pearl River Delta region of Guangdong province, China: a cross-sectional study[J]. *Infec Dis*, 2014, 14:388.

- [118] LIN H, MA YY, MOH JS, et al. High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 101(1): 40-45.
- [119] CHEN Z, HO WCS, BOON SS, et al. Ancient Evolution and Dispersion of Human Papillomavirus 58 Variants[J]. *J Virol*, 2017, 91(21): e01285-17.
- [120] LAW PT, BOON SS, HU C, et al. Oncogenic comparison of human papillomavirus type 58 E7 variants[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 1517-1527.
- [121] LONG W, YANG Z, LI X, et al. HPV-16, HPV-58, and HPV-33 are the most carcinogenic HPV genotypes in Southwestern China and their viral loads are associated with severity of premalignant lesions in the cervix[J]. *Virol J*, 2018, 5(1): 94.
- [122] KIM J, KIM BK, JEON D, et al. Type-Specific Viral Load and Physical State of HPV Type 16, 18, and 58 as Diagnostic Biomarkers for High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions or Cervical Cancer[J]. *Cancer Res Treat*, 2020, 52(2): 396-405.
- [123] 王芳, 李全荣, 邱琳, 等. 宫颈高级别上皮内瘤变及宫颈癌患者 HPV 检测分析[J], *福建医药杂志*, 2021, 43(01): 39-41.
- [124] BRINK AA, ZIELINSKI GD, MEIJER CJ, et al. Clinical relevance of human papillomavirus testing in cytopathology[J]. *Cytopathol*, 2005, 16(1): 7-12.
- [125] OLSON I, JØRGENSEN T, KOFOED K, et al. Incidence and coast of anal, penile, vaginal and vulvar cancer in Denmark[J]. *BMC Public Health*, 2012, 12:1082.
- [126] ZEE R, RICHEL O, VRIES H, et al. The increasing incidence of anal cancer: can it be explained by trends in risk groups?[J]. *Neth J Med*, 2013, 71(8): 401-411.
- [127] MOSCICKI A, SCHIFFMAN M, BURCHELL A, et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers[J]. *Vaccine*, 2012, 5(05): F24-F33.
- [128] LAWTON M, NATHAN M, ASBOE D. HPV vaccination to prevent anal cancer in men who have sex with men Sex[J]. *Sex Transm Infect*, 2013, 89():342-343.
- [129] MACHALIK D, GRULICH A, HILLMAN R, et al. The study of the prevention of anal cancer (SPANC): design and methods of a three-year prospective cohort study[J]. *BMC Public Health*, 2013, 13:946.
- [130] ARGIRIS A, KARAMOUZIS MV, RABEN D, et al. Head and neck cancer[J]. *Lancet*, 2008, 371(9625): 1695-1709.
- [131] ARGIRISA, ENG C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer[J]. *Cancer Treat Res*, 2003, 114: 15-60.

- [132] D'SOUZA G, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(19): 1944-1956.
- [133] RETTIG EM, D'SOUZA G. Epidemiology of head and neck cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2015, 24(3): 379-396.
- [134] CHANG F, SYRJÄNEN S, SHEN Q, et al. Evaluation of HPV, CMV, HSV and EBV in esophageal squamous cell carcinomas from a high-incidence area of China.[J]. *Anticancer Research*, 2000, 20(5C): 3935-3940.
- [135] HERBSTER S, FERRARO C, KOFF N, et al. HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters[J]. *Cancer Lett*, 2012, 326(1): 52-58.
- [136] NAKAMURA Y, MASHIMA Y, KAMEYAMA K, et al. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridisation, and polymerase chain reaction[J]. *Br J Ophthalmol*, 1997, 81(4): 308-313.
- [137] Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, et al. Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future[J]. *Sex Med Rev*, 2020, 8(1): 28-37.
- [138] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [139] 邹普润, 周卫华, 夏柳, 等. 宫颈癌早期筛查方法的研究进展[J]. *湖北民族大学学报(医学版)*, 2020, 37(04): 48-51.
- [140] 康山. 子宫颈癌的规范化诊断[J]. *中国实用妇科与产科杂志* 2021, 37(01): 37-41.
- [141] 宋芳, 王建东, 张师前, 等. 阴道上皮内瘤变诊治专家共识(2020)[J]. *ibid*, 2020, 36(08): 722-728.
- [142] BASU P, TAGHAVI K, HU SY, et al. Management of cervical premalignant lesions[J]. *Curr Probl Cancer*, 2018, 42(2): 129-136.
- [143] 朱丽娟, 周树林, 希萍. 重组人干扰素  $\alpha 2b$  联合洁悠神对宫颈持续 HPV 感染患者端粒酶与 HPV16/18 E6 蛋白表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(25): 29-33.
- [144] RAHANGDALE L, LIPPMANN QK, GARCIA K, et al. Topical 5-fluorouracil for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2: a randomized controlled trial[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2014, 210(4): 314 e1-314 e8.
- [145] 刘佳兰, 董建新, 郝洋, 等. 宫颈人乳头瘤病毒感染的治疗进展[J]. *当代医学*, 2021, 27(26): 191-194.

- [146] 黄丹, 王紫薇, 鞠梅. 人乳头瘤病毒感染及诊疗新动向[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(03): 245-250.
- [147] 徐帅师, 聂文佳, 张咏梅. 宫颈人乳头瘤病毒感染治疗方法研究进展[J]. 病毒学报, 2021, 37(03): 740-747.
- [148] ZHU B, LIU Y, ZUO T, et al. The prevalence, trends, and geographical distribution of human papillomavirus infection in China: The pooled analysis of 1.7 million women[J]. Cancer Med, 2019, 8(11): 5373-5385.
- [149] 马胜利. HPV 感染与阴茎癌的关系[J]. 国外医学: 泌尿系统分册, 1998,5:224-226.

## 致 谢

硕士研究生时间即将结束，这段学习生活经历使我充满了感恩和不舍！感恩遇见，我深切感受到自己是在多位老师，同学，亲友的关爱帮助下，才走到今天。

三年来我尊敬的恩师李淑英教授无论生活上还是学习上都给予了我无微不至的关怀。李老师为人谦和，品德高尚，学识渊博，严谨求实，在我迷茫的人生路上做了引路人。从课题的选择、文献的阅读、中期报告直至论文的完成，恩师都倾注了很多心血。她严谨的治学精神和精益求精的工作态度深深的激励着我，必将使我受益终身。在生活上我的恩师更是对我关爱有加，疫情期间，单位缺人，紧急调我回岗，老师如母亲般的反复的叮咛，给了我很大的精神支持，使我懂得了很多做人的道理和对待人生的态度。在此，衷心的感谢我的恩师对我的谆谆教诲和悉心培养！

感谢华北理工大学基础医学院实验平台的技术支持和老师们专业知识的传授。感谢华北理工大学附属医院检验科石峻主任，孟爱国主任，在工作学习上给予了我很大支持，感谢病理科老师唐慧，刘爱东耐心讲解，使我收获颇多。还要感谢我的师姐杜阳阳，王静，同窗好友杨佳宁，苏静慧，我们相聚在这里，结交了一份深厚坚定的友情。感谢我的挚友王亮同学，每当我在学习上有了疑惑时他都耐心给我解答，特别是论文撰写过程中，我学到了很多新知识。感谢他们不辞辛苦的无私的为我提供帮助，没有他们的帮助就没有我这篇论文的顺利完成，是她们给了我前进的动力！

感谢在百忙之中参加论文评阅，答辩及提出宝贵意见的专家和老师，是她们给了我一个审视自己科研成果的一个机会，为我今后的发展指明了方向。

最后感谢母校培养了我，在今后的工作学习中我会加倍努力，获得更多的成果回报他们。再次感谢他们，祝我的母校再创辉煌，祝我的老师，亲人，朋友幸福安康！

## 在学期间研究成果

徐媛，女，1985年8月出生，汉族，中共党员，河北省唐山市人，2010年毕业于河北北方学院，获得学士学位。2019年9月攻读硕士学位。

### 在学期间发表论文和著作：

徐媛(第一作者)，宫颈脱落细胞中人乳头瘤病毒58型感染及整合状况分析[J]. 西安交通大学学报(医学版)，2022, 43(2):234-240.

徐媛(第一作者)，携带HPV18融合基因重组病毒的构建,实用医学杂志增刊[J], 2022, 已接收录用, 待排版.

杨佳宁, 李娜, 董鸿铭, 徐媛, 李淑英★. EB病毒编码的BARF1对GES-1细胞的影响. 中国人兽共患病学报. 2021, 37(12): 1071-1083.

杨佳宁, 徐媛, 李淑英. 食管癌患者HPV感染状况Meta分析. 华北理工大学学报(医学版). 2022, 24(02):118-127.

### 科研成果和奖励：

河北省级科技计划：参与申报了2022年度河北省省级科技计划项目，项目名称：外泌体运载蚯蚓纤溶酶抗肿瘤机制的研究。

获得奖励：研一二等奖学金，研二三等奖学金，研三一等奖学金。