371-372, 379

维普资讯 http://www.cqvip.com

(14)

文章编号：0253-3626(2000)04-0371-02

16型人乳头状瘤病毒E6、E7与宫颈癌、宫颈炎关系的初步研究

R737.33a.2
R711.32a.2

徐 波[1]，胡丽娜[1]，顾美礼[1]，任 红[2]

（1. 重庆医科大学第二临床学院妇产科 重庆 400010；2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010）

摘 要：目的 了解重庆地区宫颈癌、宫颈炎发病与16型人乳头状瘤病毒（HPV16）E6、E7的关系。**方法** 运用PCR，分子生物学技术进行HPV16 E6、E7的扩增和克隆。**结果** 重庆地区宫颈癌、宫颈炎组织中HPV16 E6,E7总检出率分别为70%和65%。**结 论** 重庆地区HPV16感染与宫颈癌、宫颈炎的发生相关。E7原癌蛋白可能与宫颈癌发生早期有关，而E6原癌蛋白可能与宫颈癌形成晚期关系密切。

关键词： 16型人乳头状瘤病毒；宫颈癌；宫颈炎；PCR

中国图书分类法分类号： R737.6；R711.32 **文献标识码：** A **收稿日期：** 1999-12-28

Primary study on human papillomavirus type 16 E6,E7 in biopsies of cervical carcinoma and cervicitis

XU Bo, et al

(Department of Obstetrics and Gynecology, Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016)

Abstract: Objective To learn whether HPV16 E6, E7 correlate with cervical carcinoma and cervicitis in Chongqing. **Methods** Amplification and cloning of HPV16 E6, E7 genes were performed by PCR and molecular biological techniques. **Results** Detection rates of HPV16 E6, E7 in biopsies of cervical carcinoma and cervicitis were 70% and 65% in Chongqing. **Conclusion** HPV16 infection might correlate with cervical carcinoma and cervicitis occurrence in Chongqing. E6 might function on advanced stage of cervical carcinoma while E7 might function on early stage.

Key Words: HPV16; Cervical carcinoma; Cervicitis; PCR

宫颈癌、宫颈炎是妇科常见疾病，严重威胁妇女生命和生殖健康。宫颈癌的病因研究早已引起学者广泛重视。早在70年代，德国学者首先提出人乳头状瘤病毒（human papillomavirus, HPV）的病因假说[1]。近年来，流行病学和分子生物学的研究已经证实宫颈病变与HPV感染的关系非常密切。流行病学调查资料表明宫颈癌、宫颈炎组织中HPV DNA的检出率极高。分子生物学研究阐明高危型HPV（16、18型等）E6、E7原癌蛋白在肿瘤发生，细胞周期调控，凋亡调节中起重要作用，是宫颈癌发生的重要原因[2]。我们对重庆地区宫颈癌、宫颈炎活检组织中HPV16 E6、E7进行了PCR检测，从而为本地宫颈癌病因，治疗的研究打下一定的基础。

作者介绍： 徐 波（1974- ），男，博士生

1 材料和方法

1.1 宫颈病变组织的获取

20例宫颈癌活检组织分别取自重庆医科大学临床学院、第二临床学院、重庆市肿瘤医院的重庆籍患者。病理报告为宫颈鳞状上皮细胞癌。20例宫颈炎活检组织取自重庆医科大学临床学院、第二临床学院的重庆籍患者。病理报告为宫颈炎症。获取组织后立即投入-70℃冰箱保存。

1.2 宫颈病变组织DNA的提取

用上海华舜生物工程有限公司柱式组织基因组DNA抽提试剂盒提取。操作程序按试剂盒操作手册进行。

1.3 HPV16 E6、E7 PCR 引物的设计

根据德国标准株序列[3]设计。E6、E7引物的5'端分别有HindIII，XbaI和EcoRI，HindIII酶切位点，由上海生工生物工程公司合成。

E6上游引物：5' - TTGAAGCTTATGCACCAAAAGAG AACTGCAATG - 3'；下游引物：5' - CATTCTAGATTAC AGCTGGGTTTCTCTACGTG - 3'。E7上游引物：5' - GGC

维普资讯 http://www.cqvip.com

GAATTCATGCATGGAGATACACCTAC-3'；下游引物：5'-GGCAAGCTTATGGTTTCTGAGAACAGATGG-3'。

1.4 试剂和仪器

高保真Taq DNA聚合酶为加拿大Sangon产品。核酸限制性内切酶和T4 DNA连接酶是Promeagar产品。PCR产物纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司；质粒提取试剂盒，胶回收试剂盒是Boehringer Mannheim产品。ITPG，X-gal是sigma产品。PCR扩增仪(PE 2400 美国)，核酸电泳仪(Bio-Rad美国)。

1.5 菌种，质粒

受体菌XL1-blue，质粒pBKS(+)由重庆医科大学病毒性肝炎研究所任红教授赠送。含标准株HPV16 DNA全序列质粒pBR322-HPV16由德国Dr. Zur Hausen赠送。

1.6 PCR扩增HPV16 E6、E7

从宫颈病变活检组织中提取DNA，以此为模板，用上述上下游引物分别扩增HPV16 E6、E7。反应体系为：总体积100μl，其中含模板DNA 0.5μg，dNTP（10mmol/L）2μl，引物各20pmol/L，Taq聚合酶4u。扩增条件为：94℃变性7min后，进行两类共30次循环。94℃ 40s，45℃ 1min，72℃ 1min，10次循环后94℃ 30s，55℃ 1min，72℃ 1min，20次循环，最后72℃延伸7min。

1.7 PCR产物的克隆与序列测定

扩增的PCR产物纯化后，用相应的限制性内切酶分别酶切载体pBKS(+)和片段，按摩尔比1:3 15℃连接过夜；连接产物转化受体菌，挑选白斑菌落，提取质粒，经PCR和酶切鉴定后，将成功克隆的pBKS(+)-HPV16 E6/E7送上海基康生物技术有限公司进行序列测定。

1.8 统计学处理

所有数据用四格表卡方检验。

2 结 果

2.1 PCR产物电泳鉴定

PCR 30次循环后，扩增产物在1%琼脂糖凝胶上，于约500，300bp处见清晰的扩增带。分别与标准株HPV16 E6、E7扩增产物处于同一水平。（见图1）。

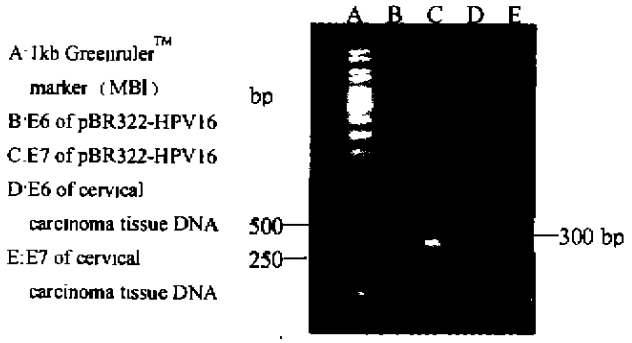


图1 宫颈癌组织DNA PCR产物1%琼脂糖电泳分析

2.2 扩增产物的序列鉴定

测序结果表明扩增产物大小与标准株完全一致[3]。E6的基因序列与标准株完全相同。E7有两处碱基发生了点突变，第43位密码子由标准株CAA变为TAA，第76位密码子由标准株CGT变为TGT。

2.3 宫颈癌、宫颈炎组织HPV16 E6、E7的检出结果

宫颈癌、宫颈炎组织HPV16 E6、E7的总检出率分别为70%、65%。HPV16 E6的检出率在宫颈癌和宫颈炎组织中有显著性差异。（见表1）

表1 20例宫颈癌、20例宫颈炎组织HPV16 E6、E7 PCR检出结果

组织	E6		E7		E6或E7
	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性率
宫颈癌	9	11	14	6	70%
宫颈炎	1	19*	13	7**	65%

* $P<0.01$，** $P>0.05$

3 讨 论

宫颈病变与HPV的密切关系已经越来越受到广大学者的关注。流行病学资料表明，宫颈癌组织中HPV DNA的检出率高达90%，宫颈炎组织中HPV DNA的检出率可达50%。但由于各国各地的卫生状况、检测水平的差异，各地报道的HPV总感染率差别较大。研究表明，高危型HPV（16,18型等）与宫颈癌的关系十分密切，其中HPV16占绝对优势[4]。我们对重庆地区20例宫颈癌，20例宫颈炎病变组织进行了HPV16 E6、E7的PCR检测，结果HPV16感染的阳性率为65%～70%，可见重庆地区HPV16的感染与宫颈病变存在一定的关系。

HPV16致宫颈癌的机制主要与两个早期开放读码框架E6、E7编码的早期原癌蛋白E6、E7密切相关。早年的研究表明，高危型HPV16 E6、E7能使原代鼠细胞，人上皮细胞永生化。在动物模型的研究中，HPV16 E6、E7也能诱导裸鼠发生肿瘤。最近，Song S[5]等将HPV16 E6、E7转入小鼠皮肤上皮基底细胞，使其表达E6、E7原癌蛋白，结果诱发了皮肤肿瘤。有趣的是，只表达E7原癌蛋白的，大多发展为良性肿瘤，而仅表达E6原癌蛋白的，却大多发展为恶性肿瘤。因此，Song S 认为E7原癌蛋白可

(下转第379页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

导广谱β-内酰胺酶，国内仅我们实验室有，故本文研究的17种β-内酰胺类抗生素对SHV-2、SHV-4、SHV-5的酶稳定性结果为国内首次报道。关于头孢他美的酶稳定性研究，国内以前亦未见报道。由于常用的酶稳定性试验只是在单一底物条件下测定酶对抗生素的相对水解率，而相对水解率将随底物浓度的改变而改变，故这只能用为定性和初定量的指标。要系统地完整地了解抗生素对β-内酰胺酶的稳定性尚有待进一步从分子药理学水平上着手，定量研究β-内酰胺酶的酶动力学特征并从分子水平鉴别抗生素的抗菌作用与耐酶能力的优缺点，从而为择优选拔换代新产品提供实验依据和理论基础[3]。

参 考 文 献

[1] 戴自英. 实用抗菌药物学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1992:17-25.

[2] *Minami S. Yotsuji. A Inoue M. et al. Induction of* β-lactamase by various β-lactam antibiotics in Enterobacter cloacae[J].Antimicrob Agent Chemother. 1980; 18:382-385.

[3] 闫淑雅，李家泰. β-内酰胺酶在细菌耐药中的作用及开展β-内酰胺酶动力学研究的意义[J]. 中国抗生素杂志，1989;14(1):68-75.

[4] Gootz TD, et al. Characterization of β-lactamase induction in Enterobacter clacae[J]. Antimicrob Agent Chemother, 1983;23(1):91-97.

[5] 钱元恕，王其南. 15种β-内酰胺抗生素对β-内酰胺酶的稳定性及体外抗菌活性比较[J]. 中华传染病杂志，1992;10(3):135-139.

[6] Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum β-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1989;33(8):1131-1136.

[7] 黎世能，王浴生，雷 军. 氨曲南和亚胺培南对β-内酰胺酶稳定性和抑酶效应的研究[J]. 中国药理学通报，1994;10(2):133-135.

[8] 张普柱，张明良. β-内酰胺酶抑制剂的进展[J]. 国外医药抗生素分册，1993;14(2):115-118.

[9] Gurchinoff JC, Sulperazon Review of the published literature[C].1994;10:24-78.

[10] Neu HC, Chin NX, Labthavikul P. In vitro activity and β-lactamase stability of two oral cephalosporins, ceftetrame (Ro 19-5247) and cefetamet (Ro 15-80474)[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1986;30(3):423-428.

[11] Nukaga M, Tsukamoto K, Yamaguchi H, et al. Interaction of oxyimino β-lactams with a class C β-lactamase and a mutant with a spectrum extended to β-lactams[J]. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38(6):1374-1377.

[12] Scully BE, Julesk, Nen HC. In vitro activity and β-lactamase stability of cefodizime, an aminothiazolyl iminomethoxy cephalosporin[J]. Antimicrob Agents Chemother. 1983;23(6):907-913.

（上接第372页）

能与肿瘤形成的早期有关，而E6原癌蛋白可能与肿瘤形成的晚期关系密切。无独有偶，对重庆20例宫颈癌、20例宫颈炎病变组织进行HPV16 E6、E7 PCR检测的结果表明，两组病变组织HPV16 E7的检出率无统计学差异，而宫颈癌组织中，HPV16 E6的检出率明显高于宫颈炎组织，两者存在统计学差异。据推测，在人类，HPV16 E7原癌蛋白可能与宫颈癌发生的早期有关，而E6原癌蛋白可能与宫颈癌的形成关系密切。HPV16 E6的检测可否作为协助临床判断宫颈癌及其预后的指标，相关的研究正在进行中。

参 考 文 献

[1] Zur Hausen H. human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer[J]. Virology, 1991;184:9-13.

[2] Sasagawa T. Inoue M. Inoue H et al. induction of uterine cervical neoplasias in mice by human papillomavirus type 16 E6/E7 genes[J]. Cancer Res 1992;52:4420-4426.

[3] Seedorf K, Krammer G. Durst M et al. human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. Virology. 1985;145:181-185.

[4] Douglas R. Lowy. Kirnbauer R et al. genital human papillomavirus infection[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994;91:2436-2440.

[5] Song S, Pitot HC, Lambert PF,et al. the human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals[J]. J Virol 1999;73(7):5887-5893.