30卷-312
6857(3)
维普资讯 http://www.cqvip.com

第11卷第4期 中国病毒学 Vol.11 No.4
1996年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1996

人乳头瘤病毒研究的新进展

于修平 卞继峰
(山东医科大学微生物学教研室,济南 250012)

R373.9

Research Progress on Human Papilloma Viruses

Yu Xiuping Bian Jifeng
(*Department of Microbiology, Shandong Medical University, Jinan* 250012)

关键词 人乳头瘤病毒,细胞周期调控,病毒样颗粒,基因转录 人体病毒学,肿瘤病毒
Key words Human papillomavirus(HPV), Cell cycle control, Virus-like particle(VLP), Gene transcription

人乳头瘤病毒(HPV)是一类嗜上皮性的双股DNA肿瘤病毒,它可引起人类皮肤、粘膜的多种增生性疾病。近年来,HPV相关性疾病发病率逐渐升高,严重危害人们的健康。高危型HPV与多种恶性肿瘤密切相关,在宫颈癌、喉癌、膀胱癌、皮肤癌、消化道癌、肉瘤、骨髓瘤、宫颈癌患者淋巴结中都有很高的HPV相关序列测出。HPV致癌机制,基因转录拼接及调控机理、检测手段、治疗方法成为日益迫切的研究问题,并引起了国内外学者高度重视。近年来,人乳头瘤病毒的研究已取得了多方面的成果。

1 HPV_{16}转化基因的转录及拼接

HPV_{16}基因组是断裂基因,含有内含子和外显子,在mRNA转录拼接过程中,通过对不同内含子的选择性拼除可产生不同的拼接体mRNA。HPV_{16}可能的转录拼接体mRNA如图1所示。HPV_{16} E_6E_7 ORF对HPV_{16}致癌关键基因,发生在E_6E_7 ORF内的拼接对HPV_{16}致癌能力、宫颈癌浸润和预后有重要影响。在HPV_{16}E6 ORF内有2个拼接位点,供点位于226核苷酸,受点位于409、526核苷酸。可产生2个拼接体mRNA:E_6^* Ⅰ mRNA、E_6^* Ⅱ mRNA。位于226核酸拼接供点又可与位于2708核苷酸的拼接受点产生E_6^* Ⅲ mRNA,它们分别编码相应的拼接蛋白E_6^* Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ,这些蛋白在HPV_{16}的致癌中的作用尚不清楚。在宫颈癌中转化基因以下列形式存在:E_6E_7 mRNA、E_6^* ⅠE_7 mRNA、E_6^* ⅡE_7 mRNA、E_6^* Ⅲ mRNA,其中以E_6^* ⅠE_7 mRNA丰度最高[1]。在宫颈癌脱落细胞中,E_6^* Ⅰ、E_6^* Ⅱ mRNA、丰度与CIN Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分级无明显相关。E_6^* Ⅰ在宫颈癌脱落细胞、组织切片中表达程度相似,而E_6^* Ⅱ mRNA在宫颈癌组织中则明显减少或测不出,在宫颈癌脱落细胞中则与E_6^* Ⅰ mRNA相似[2,3]。有研究认为E_6^* mRNA只是调节E_7 mRNA转录和翻译效率的产物,本身不具生物活性[4]。但最近在研究

本文于1996年1月29日收到,4月24日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

HPV_{16} E_6E_7 转译机制中发现 E_6E_7 mRNA 可以同样效率翻译完整的 E_6、E_7 蛋白[5]。E_6 ORF 内含子拼接产生的 E_6^* Ⅰ mRNA 是细胞恶性程度标志。CRPV E_6^* Ⅰ蛋白比 E_6 蛋白具有更强的转化能力[6]。

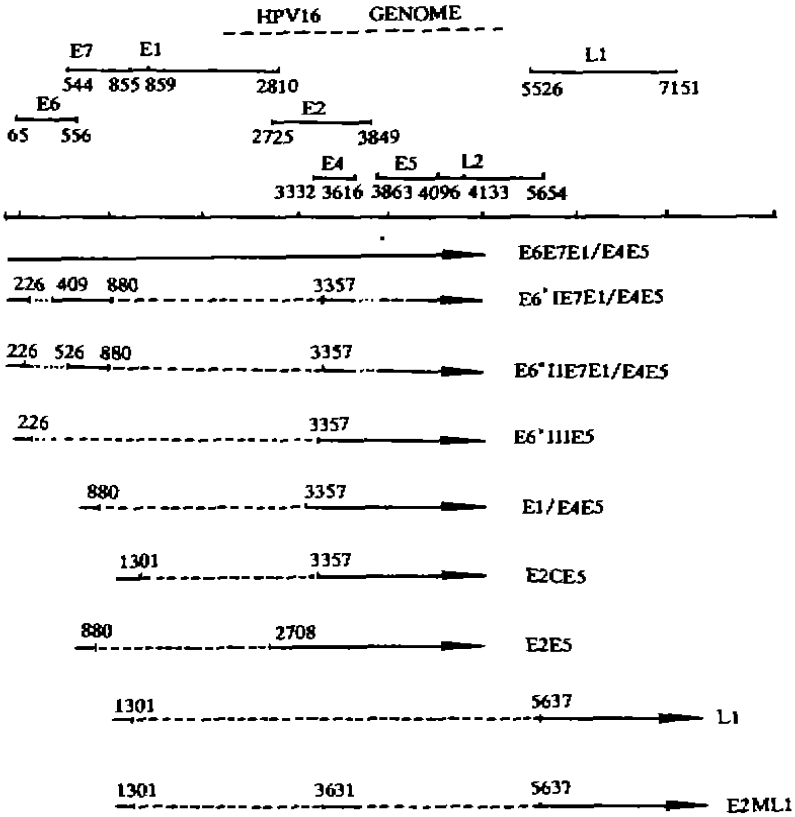

图1 HPV_{16}基因组可能的 mRNA 转录体

Fig.1 HPV_{16} mRNA species and coding potentials

在 HPV_{16}相关宫颈癌细胞中普遍存在 E_6^* Ⅲ mRNA 高水平表达，E_6^* Ⅲ mRNA 持续表达与宫颈癌诱发密切相关[1]。

E_7 ORF 是 HPV_{16}的重要转化基因。在宫颈癌细胞中 E_7 mRNA 与 E_7 蛋白稳定存在与 E_7 ORF 3′端一段侧翼序列相关，这段序列的中心位于 880 核苷酸拼接位点上，供点碱基丢失替换造成 E_7 mRNA 及蛋白的明显降低[7]。在 CIN 中，随着细胞分化程度升高，E_6 mRNA 转录无明显变化，E_7 mRNA 转录却增加许多，因此 E_7 mRNA 除从 P_{97}启动子转录外，在 E_7 ORF 内还有一个潜在的无 TATA 盒子的启动子，位于 498～767 核苷酸，转录 E_6^* Ⅲ $E_7E_1E_4$ mRNA，这个启动子活性与细胞分化有关[8]。宫颈癌细胞中，转化基因 E_6E_7 mRNA 转录水平较低，主要的转录是 E_1-E_4 mRNA，这与以前的研究有差别，原因可能在于核酸杂交中 RNA 探针设计的影响[9]。关于 HPV_{16}基因组中各开放读码框 mRNA 转录、拼接及定量还需进一步深入研

维普资讯 http://www.cqvip.com

究。mRNA差异显示技术(Differential display, DD)及RACE可为此提供可靠的研究手段。

2 HPV_{16}转化基因的转录调控

病毒基因组有效转录并不是专一的顺式元件与一种反式激活因子互相作用的结果,常是多种DNA结合蛋白与DNA之间和/或DNA结合蛋白与其他蛋白蛋互相作用的结果。乳头瘤病毒基因转录主要调节系统位于上游调节区(URR),E_2蛋白是关键调节蛋白,E_2蛋白N端是反式激活作用必不可少的。E_2 ORF编码长E_2蛋白和截短的E_2蛋白E_2C或称E_2-TR,它们的转录调节功能是拮抗的,可竞争结合E_2反应元件:$ACCN_6GGT$[10,11]。在HPV_{16}URR中有增强子:7个NF_1,3个AP_1,3个GRE,1个PVP及1个NFA结合位点[12,13]。在HPV_{16} URR中还有IL-1,TNF-α靶序列,IL-1,TNFα可与相应靶序列结合抑制E_6E_7 mRNA转录。因此IL-1,TNF-α具有抗HPV_{16}感染及HPV相关肿瘤的作用[14]。在HPV_{16} URR中有3处糖皮质激素受体靶序列GRE,它们分别起始于7386、7475、7645核苷酸,皮质激素受体(GR)结合GRE可增强病毒的转化能力,地塞米松、可的松等均可明显提高HPV_{16}转化细胞能力,有关口服避孕药及雌孕激素对HPV_{16}致癌作用的影响有不同报道。局部阴道应用含性激素的避孕药对宫颈HPV_{16}致癌的影响尚需深入研究[15]。

在HPV_{16}URR中有表皮生长因子(EGF)相应的靶序列EGFRE,位于7643~7767核苷酸,并且在EGFRE中还有一个功能重要的衰减子(Silencer)。EGF可诱导一种反式抑制因子与EGFRE结合。在无E_5蛋白参与下,EGF可抑制PHK_{160}细胞中E_6E_7 mRNA转录,有E_5蛋白表达时EGF则促进E_6E_7 mRNA表达。这可能是由于HPV_{16} E_3蛋白可刺激细胞癌基因C-jun/C-fos二聚体的高表达,C-jun/C-fos又是AP_1的一种转录因子。C-jun/C-fos二聚体结合到HPV_{16} URR中AP_1位点上,增强了启动子活性,有E_5蛋白表达时,这种作用占主要地位,EGF只对其有促进作用[16,17]。

3 HPV_{16}致癌机理及途径

肿瘤的发生是一个多因素、多步骤的复杂过程,是细胞原癌基因激活、抑癌基因失活共同作用的结果。人乳头瘤病毒与多种肿瘤密切相关。乳头瘤病毒致癌可分为两个方面:HPV_{16}基因组整合到宿主细胞染色体上,并激活相应的原癌基因。病毒转化蛋白与细胞抑癌基因产物互相作用,使后者功能丧失,导致细胞周期紊乱。HPV_{16} E_7是HPV重要的转化蛋白,E_6蛋白的独立致癌性日益受到重视。两者单独都不能转化原代细胞,它们转化细胞还需细胞癌基因参与。高危HPV与低危HPV致瘤性强弱的差异可能是由于HPV转化基因转录拼接机制的不同,HPV转化蛋白E_6、E_7与P^{53}、RB结合能力强弱不同,$16E_6>31E_6>18E_6>11E_6$,E_7蛋白也有类似的强弱顺序[18,19]。

病毒在细胞中存在的方式对其诱导细胞转化密切相关。HPV引起的良性增生性疾病中,病毒多以游离方式存在。在癌前病变中,病毒则一半以整合状态存在,一半以游离状态存在。在恶性肿瘤中,病毒则处于整合状态。病毒整合可分两种类型:在W_{12}细胞中,没有完整的HPV_{16}基因组,由于整合事件造成E_2 ORF丢失,这种方式与Siha细胞和原发宫颈癌组织中相似。另一种方式是在宿主染色体中可有多拷贝的完整的病毒基因组出现,但其两侧多伴有不完整的病毒基因片段和细胞染色体基因序列,这种方式与Caski细胞和原发性宫颈癌相似。不论病毒的整合方式如何都可导致病毒基因和侧翼序列的扩增[20,21]。病毒在宿主细胞染色

维普资讯 http://www.cqvip.com

体上无特异的整合位点，整合位点是随机的。以 Southern 和染色体原位杂交证实，HPV_{16}基因组可整合于 $8q^{21-22}$、$8q^{24}$、$2P^{24}$等染色体位点上，前两个整合位点毗邻 C－MyC 原癌基因启动子，后者则靠近 N－MyC。从而激活 MyC 癌基因启动子，造成 MyC 基因扩增和高表达。病毒基因组中整合区域多位于 E_1E_2 ORF，并造成病毒基因丢失，丢失多发生于 1417～2881 核苷酸，病毒基因片段 6102～941 核苷酸共 2745 bp 很少丢失，其中包括完整的 E_6E_7 转化基因[22]。同时转化蛋白 E_6、E_7 还可通过 cAMP 的协助激活 C－fos 基因。宫颈癌细胞中还有高频率的 Ras、erb－2 基因的突变和杂合性丢失(LOH)，并伴有细胞核型的变化，单倍体、多倍体、非整倍体出现。这可能与 HPV_{16} E_1/E_4 融合蛋白与细胞角蛋白形成复合体造成细胞骨架、中间丝等结构破坏有关[23]。病毒基因染色体整合造成 E_1E_2 区基因丢失，使 E_2 蛋白对 HPV_{16} E_6E_7 基因转录调控的丧失，与病毒致癌密切相关。

HPV_{16} E_5 ORF 是 HPV_{16}的又一个转化基因，它编码的 E_5 蛋白主要分布于细胞膜、高尔基体和内质网等细胞膜性结构上，分为跨膜区和胞外区。E_5 蛋白与生长因子受体 EGFR、β－PDGFR、CSF－IR 有密切关系。E_5 蛋白转化功能较弱，可能在细胞转化的起始阶段发挥作用，在 CIN 中有大量 E_5 mRNA 和 E_5 蛋白的转录与表达[24]。E_5 蛋白对细胞膜功能有很大影响，在 HaCaT 细胞中，E_5 蛋白可使细胞间的通道效率显著降低，E_5 蛋白的这种作用与 Connexin 43 的去磷酸化密切相关，目前在其他肿瘤细胞中也发现有 Connexin 43 功能异常[25]。E_5 蛋白还可提高 E_7 蛋白的转化能力，但对 E_6 蛋白则无这种协同作用[26]。HPV_{16}基因产物功能见表 1。

HPV_{16} E_6 蛋白是一个小分子量的核磷蛋白，有 151 或 158 个氨基酸，分子量约 19×10^3 D，位于细胞核内，有两个锌指结构，是 DNA 结合蛋白，氨基酸功能分为 4 区：其中 N 端 1～139 氨基酸完整性决定 E_6 蛋白的转化功能，它的突变与缺失则造成 E_6 与 P^{53}结合能力的下降[27]。E_6 蛋白单独可转化 NIH3T3 细胞，点突变的 E_6 ORF(227 核苷酸 G→A)与活化的 EjRas基因共转染(Contransfection)可转化 BRK 细胞。而野生 E_6 ORF 与 EjRas 只能引起 BMK 细胞永生化[28]。HPV_{16} E_6 还有转录抑制作用，可使 MMLV－LTR 和 CMV－IE 启动子活性下降 1/3～1/2，这种抑制作用是不需 P^{53}参与的[29]。在 NIH3T3 细胞中，HPV_{16} E_6 蛋白还可对含 TATA 盒子的启动子有激活作用，其机理可能为 E_6 蛋白直接作用于启动子基本元件、调节元件或影响转录复合体的形成、稳定或激活[30]。E_6 蛋白致癌关键在于 E_6 蛋白与 P^{53}结合，并导致 P^{53}降解及抑癌作用丧失，而使 P^{53}对与细胞周期密切相关的 P^{21}(WAF1)、$MTS_{1,2}$、增殖细胞核抗原(PCNA)、周期蛋白(Cyclin)、周期蛋白依赖激酶(Cyclin-dependent kinase, CDK)的调节作用丧失，细胞周期紊乱，DNA 损伤累积造成细胞癌变。E_6 蛋白与 P^{53}结合可能还需一种 E_6 相关的细胞蛋白 E_6 AP 辅佐，但仍有相反报道，体外表达 GST－E_6 融合蛋白在细胞中无 E_6 AP 时，仍可结合 P^{53}并使其降解。E_6 与 P^{53}在 E_6 AP 辅助下通过 Ubiquitin 途径降解[31]。

HPV_{16} E_7 ORF 编码一个多功能的核磷蛋白，有 97 个氨基酸，位于细胞核内，其中 E_7 蛋白的Ⅱ区是 E_7 蛋白迁移到核内的信号肽(NLS)[32]。它的结构功能相似于 AdE1A 12S mRNA 产物。氨基酸功能区分为 3 区，Ⅰ、Ⅱ区是 E_7 蛋白转化及 RB 结合部位。E_7Ⅲ是 CTL 识别表

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1　HPV_{16}ORF编码产物的功能

Tab.1　The biological effects of HPV_{16} gene products

HPV ORF	基因产物 Gene products	对细胞作用 Cell interaction	对病毒作用 Virus interaction
E_1	E_1-R, E_1-M	–	参与病毒复制 virus replicatimn
E_4	E_1-E_4	与角朊蛋白形成复体 E_4/cytokeratin complex	参与病毒扩散 virus egress
E_2	E_2, $E_2C(E_2-TR)$	ATP酶活性，调节早期基因转录 ATPase activity, early gene transcription regulation	参与病毒复制及早期基因转录 virus replication transcription regulation
E_3		–	–
E_5	E_5	与细胞生长因子相互作用 促进受体再循环，吞噬泡酸化，干扰TAP形成阻止HLA抗原递呈 growth factor interaction receptor recycle endosome acidification virus antigen processing	转化基因 transform gene
E_6	E_6, E_6^* Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ	与P^{53}形成复合体，促进P^{53}降解 E_6-P^{53}complex, P^{53} degradation	转化基因 transform gene
E_7	E_7	与RB、P^{110}、P^{107}、CyclinAE相互作用 interaction with RB、P^{110}, P^{107}, CyclinAE	转化基因 transform gene
L_1L_2	L_1, L_2	参与病毒颗粒装配 单独形成病毒样颗粒 virus assembly, virus-like particle	–

位，可激活T细胞介导的免疫应答[33]。E_7蛋白是DNA结合蛋白，有锌指结构，单独可转化NIH3T3细胞，反式激活AdV E_2启动子。与活化的EjRas基因共转染可转化人上皮细胞。E_7蛋白可干扰抑癌蛋白RB与转录因子E_2F的结合而导致细胞周期紊乱。在$G_1\rightarrow S$转变过程中，RB被磷酸化而使RB－E_2F复合体解离，E_2F被释放。E_7干扰E_2F与RB、P^{107}结合，同时E_7还可与P^{130}、CyclinA、CDK_2等细胞周期相关因子结合而导致细胞周期紊乱，使细胞发生癌变。

研究发现在转基因动物中，携带有HPV_{16} E_6 E_7基因的转基因小鼠中，有皮肤癌的发生，但P^{53}、RB蛋白仍正常表达[34,35]。还有研究发现HPV_{16} E_6蛋白与wtP^{53}共同存在于同一个细胞中[36]，虽然E_6可与野生型及突变型mtP^{53}结合并使二者降解[37]。这表明HPV致癌还有其他抑癌基因参加。

4　HPV_{16}转化基因与细胞周期调控

目前HPV_{16}致癌机理的研究已深入到HPV_{16}转化基因对细胞周期调控的影响。国外很多实验室都在人肿瘤细胞系中研究HPV_{16}转化基因E_6E_7与多瘤抑制基因$MTS_{1,2}$、P^{21}(wAF1)、P^{27}(Kip1)、CDKs和Cyclins等的相关性，阐明HPV_{16} $E_6E_7\rightarrow P^{53}$、$RB\rightarrow P^{21}$、P^{27}、$MTS_{1,2}\rightarrow$Cyclin·CDK的致癌途径[38]。深入研究HPV_{16}与癌基因、抑癌基因的关系是阐明HPV致癌机理的

维普资讯 http://www.cqvip.com

关键问题。细胞周期紊乱导致细胞无控制地增殖、终末分化丧失而导致肿瘤的发生。细胞正调控因素是由周期蛋白和相应激酶组成的成熟促进因素(MRF)和癌基因产物、激素、细胞生长因子。负调控因素与抑癌基因产物密切相关。新近发现的抑癌基因如表2所示。高等动物

表2 新发现的人肿瘤抑制基因及产物

Tab.2 Novel human tumor supressor genes and their products

抑癌基因 Tumor suppressor gene	其他名称 Other name	基因位点 Chromosome location	受控物质 Regulator	调控物质 Substracts
P^{15}	MTS_2INK4B	$9P^{21}$	TGF－β	CDK_4
P^{16}	MTS_1, Pic_1INK4A	$9P^{21}$	pRB	CDK_4
P^{21}	WAF_1CIP$_1$ Sdi_1CAP^{20}	$6P^{21.1}$	P^{53}	Cyclin A、E、D. $CDK_{2,4}$ PCNA
P^{27}	Kip_1	$12P^{12}-12P^{13.1}$	TGD－β E_6、SV_{40}	Cyclin A、E、D. $CDK_{2,4}$
P^{53}	TP^{53}	$17P^{13.1}$	E_1A、DNA Damage	P^{21}(WAF_1)、MDM_2 $ERCC_3$、$GADD_{45}$
RB		$13q^{14}$	E_1B、Cylin－CDK_4	P_{16}、E_2F、C－Myc

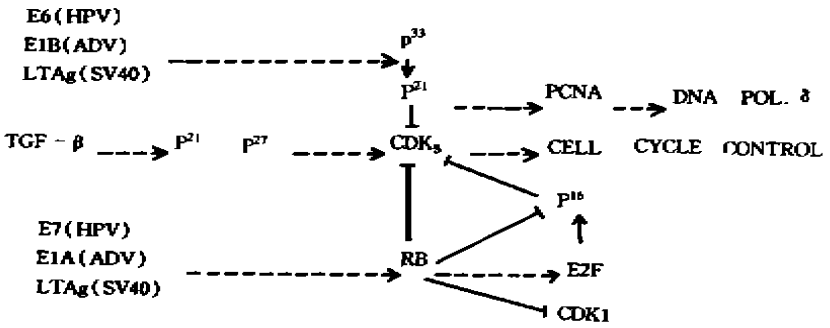

图2 HPV_{16}转化基因与细胞周期调控

Fig 2 $HPV_{16}E_6E_7$ gene expression and cell cycle control

细胞周期调控是通过Cyclin与CDK构成的体系来完成的。哺乳动物中CDKs有6种;CDK_1(CDC_2)、CDK_2、CDK_3、CDK_4、CDK_5、CDK_6;Cyclins有CyclinA、B、D、E、H等[39]。G_1/S和G_2/M过渡期由不同的CDKs参与控制。CDK_1在整个细胞周期中保持不变,但它的催化活性位于M期。CDK_1只能被CyclinA、B激活,是控制细胞分裂M期的关键酶。CDK_2可分别与CyclinA、E、D结合,但与三者的结合能力差别较大。在G_1后期,CDK_2更趋向与Cyclin E结合。CDK_2能与RB和E_2F的相关因子P^{107}形成复合体,$CDK_{4,6}$与其它CDKs性质不同,与$CDK_{2,3}$的同源性不足50%,但人鼠不同种之间,该酶同源性却高达95%,CDK_4较稳定,半衰期为4 h,与Cyclin D形成复合物。CDK_4在整个细胞周期中都有活性,但它首先出现于G_1期,因此认为它是调节G_1期的重要激酶。CDKs正调控因素有Cyclin、激素、生长因子。负调控因素有TGF－β、P^{21}(wAF_1)、P^{27}(Kip1)、P^{15}(MTS_1)、P^{16}(MTS_2)、P^{53}、RB的基因产物[40]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

AdV、HPV、SV_{40}、编码的 E_6、E_7、E_1A、E_1B、SV_{40} T 抗原都可通过 P^{53}、RB 干挠细胞周期调控[41]。图 2 表示 $HPV_{16}E_6$、E_7 与细胞周期调控的关系。图 3 表示在 $P^{53+/+}$ $RB^{-/-}$ 状况下，HPV_{16} E_6E_7 可引起细胞程序化死亡(Apoptosis, PCD)[42]。图 4 表示正常细胞周期。图 5 和 6 则表示 CDKs 调控[43]。本文所列举出的 CDKs 调控、新近发现抑癌基因及细胞周期调控机制可能是今后研究 HPV 及其他病毒致癌机理的研究方向。

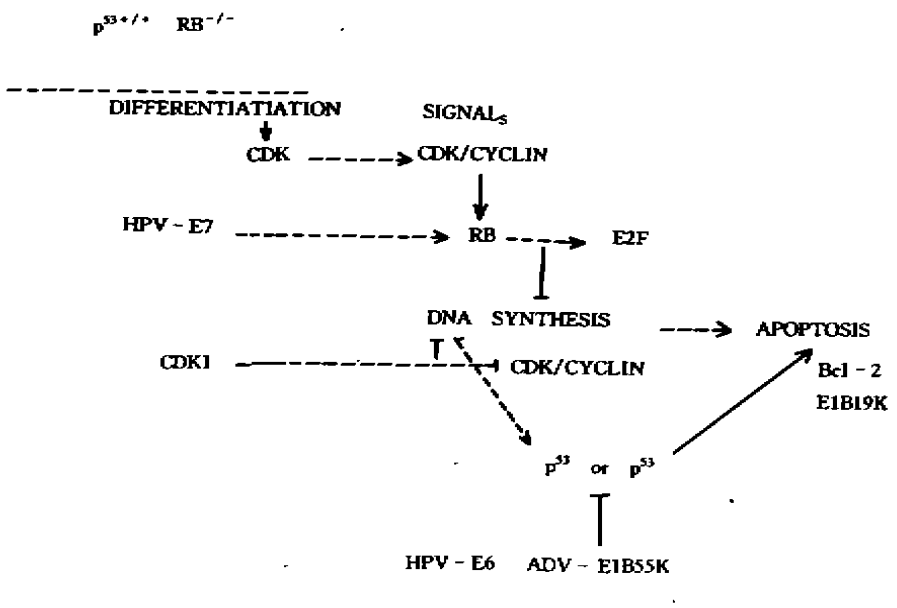

图 3　HPV_{16}转化基因与细胞程序化死亡

Fig 3　HPV_{16} transforming gene expression and apoptosis

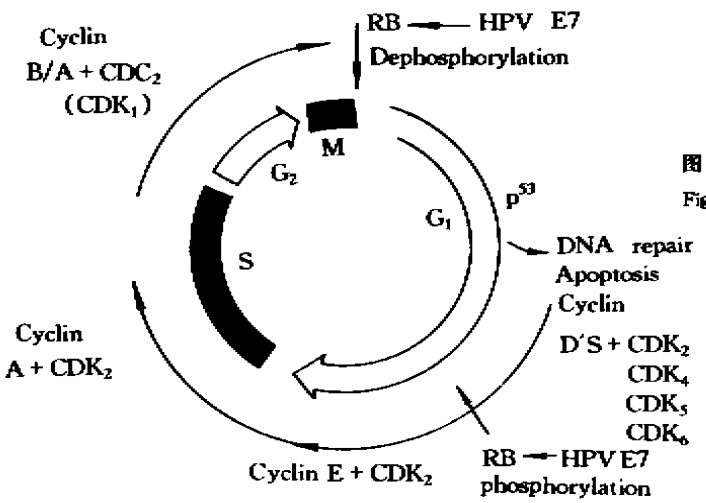

图 4　细胞周期中 Cyclin 与 CDK 相互作用

Fig 4　Combinational interactions of cyclins and CDKs

维普资讯 http://www.cqvip.com

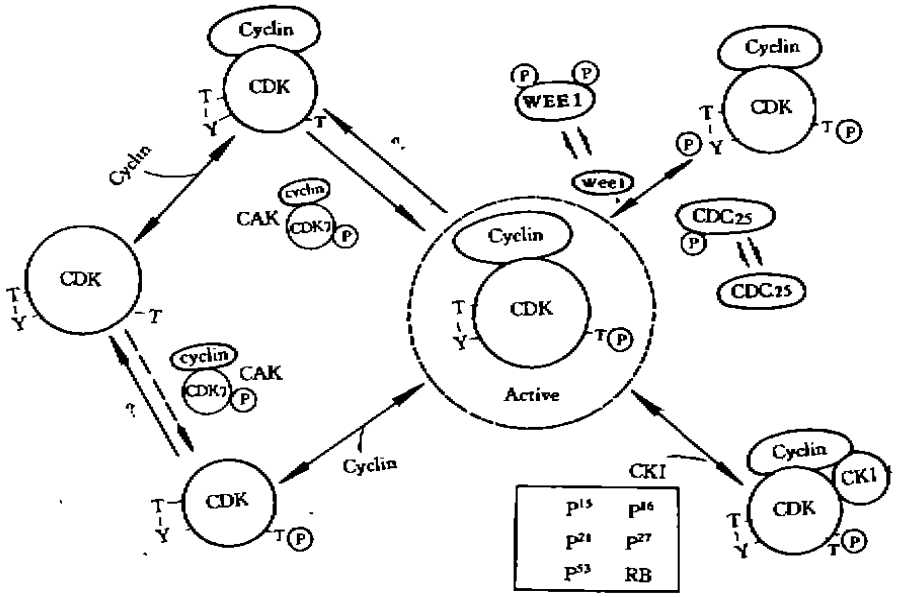

图5 周期素依赖激酶的调控

Fig 5 Principles of CDKs regulation

5 HPV感染的免疫机制

有关HPV_{16}感染与MHC分子相关性的研究日益增多。国外研究表明白种人HLA－DQw_3表型妇女感染HPV_{16}后发生宫颈癌的风险比HLA－DQw_3阴性妇女高7倍，HLA－DQw_3.DQw_1是宫颈癌易感性HLA分子，而HLA－DR_6是宫颈癌不易感分子。HLA－DR_6阴性妇女患宫颈癌风险比HLA－DR_6表型妇女高12倍。因为HLA－DQw_3表型机体清除HPV感染的能力较弱。CIN肿瘤细胞上HLA－Ⅰ类分子表达降低，更易发展为浸润癌或转移癌。应用免疫组化方法并未发现HPV_{16} DNA或RNA与HLA－Ⅰ、Ⅱ分子表达缺陷有关，而仅与CIN恶性程度有关[44－46]。由于HLA分子具有很大的种族差异，中国妇女宫颈癌易感性HLAⅡ分子、HLA－Ⅰ分子表达缺陷及其与HPV相关性尚未见报道。以免疫荧光流式细胞学技术研究HLA亚基因及HPV早期、晚期蛋白表达与HLA的相关性在国内外尚未见报道。

病毒感染与机体免疫系统相互作用是形成病毒持续感染的重要原因，HPV感染到宫颈癌的发生要经过十多年的漫长时间，HPV逃避机体免疫监视的机理尚不清楚。但其它病毒形成持续感染的机理可为HPV提供借鉴。这方面研究以HCMV、HSV、HIV、AdV较为详细。病毒逃避免疫攻击机理：1.病毒本身氨基酸序列的变异进而影响表位的酶切、与MHCⅠ、Ⅱ分子形成复合体、转运、递呈，影响TCR受体识别；2.病毒感染使靶细胞上MHC－Ⅰ、Ⅱ表达降低，使CTL不能有效识别病毒感染细胞而形成持续感染；3.病毒感染使感染和未感染细胞上MHC－Ⅰ、Ⅱ分子表达升高，导致自身免疫反应和器官移植排斥，引发自身免疫病；4.抑制细

维普资讯 http://www.cqvip.com

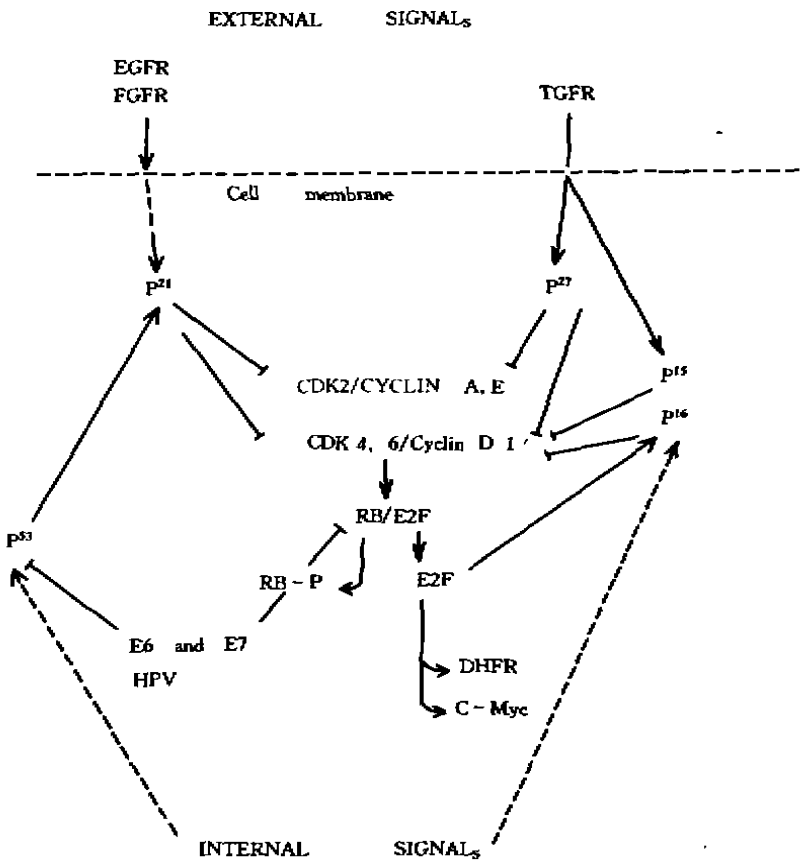

图 6　HPV 转化基因干扰细胞信号传递机制

Fig 6　HPV transforming gene and cell signal pathway

胞粘附分子 CD_{28}～$CD_{80}(B_7)$的表达和细胞因子表达;5.病毒感染机体免疫细胞造成机体免疫能力下降;6.病毒在 Immune-privileged 区域进行复[47,48]。最近研究表明 $HPV_{16}E_5$ 蛋白可通过抑制表位转运蛋白(TAP)前体抑制 HLA-Ⅰ分子对病毒抗原递呈,这为理解 HPV 形成持续感染的机理提供一条证据。总之 HPV 感染的免疫机制仍需进行深入研究[49]。

6　HPV 感染诊治展望

由于 HPV 目前尚不能体外培养,难以得到所需的病毒天然抗原,这些都限制了 HPVs 感染的诊断方法和疫苗的研究。目前常用的诊断方法是依据病毒感染的组织学特征及核酸杂交和 PCR。近来国内外学者都试图建立诊断 HPV 感染的 ELISA 试剂盒,这些研究的焦点是如何获得更接近病毒天然抗原构象的基因工程抗原。以前由于各实验室制备人工抗原方法的不同,所得结果差异较大,难以用于临床诊断。近年来研究表明乳头瘤病毒 L_1 ORF 编码的 L_1 蛋白在真核细胞中具有自身组装成病毒类似颗粒的特性(Virus-like particle, VLP)[50]。HPV L_1+L_2 VLP 共有 360 条 L_1 蛋白分子和一定数目的 L_2 分子组成,每个衣壳蛋白有 5 个 L_1 分子。其中 L_2 分子对 VLP 形成是非必需的,但它可以提高 L_1 分子的装配效率。VLP 与病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

颗粒有相似的结构和功能，只是 VLP 中不包含病毒核酸。VLP 保持了病毒抗原的天然构象，可刺激机体产生具有中和病毒感染的中和抗体。VLP 可模拟病毒感染的早期阶段与细胞膜上的受体结合粘附到细胞表面。VLP 还可与鼠红细胞膜受体结合导致红细胞凝集[51]，也可与病毒颗粒竞争结合细胞膜受体。CRPV 的 VLP 免疫动物可阻断天然病毒颗粒对小鼠的感染。HPV 所结合的细胞膜受体不具组织特异性[52,53]。对 HPV－VLP 深入研究将开发出安全有效的 VLP 疫苗和组建以 HPV－VLP 为抗原的 HPV VLP－ELISA 试剂盒。

HPV_{16} E_6E_7 转化基因的转录体 E_6E_7 mRNA、$E_6^*E_7$ mRNA 都含 E_6 ORF 的 5′端。利用 E_6 ORF 上游的反义 mRNA $AE_6$104～119 核苷酸可完全阻断 E_6E_7 mRNA 转译。而 E_7 ORF 上游反义 mRNA AE_7 562－577 只能部分阻断转化基因的转录，为利用反义基因技术治疗 HPV 相关性疾病提供了理想的基因靶位。

核酶(Ribozyme)是一类具有催化功能的 RNA，可与靶基因序列结合，并催化 RNA 的切割反应，减少病毒基因转录物，迄今设计的核酶均为锤头状结构。中国医科院基础所设计了针对 HPV_{16} E_6，E_7 mRNA 的特异的核酶，并在体外初步实验了它们对 E_6E_7 mRNA 的切割作用。核酶可望成为治疗病毒病的一种有效手段。

基因免疫(Gene immunization)又称 DNA 免疫，是将目的 DNA 直接注入机体内，表达目的蛋白，并刺激机体产生免疫反应。这种方法具有操作简便，免去了基因工程蛋白疫苗繁琐的体外纯化过程，表达产物能被正确地加工修饰，保持了外源蛋白的天然结构。HPV 基因疫苗的研究可望开发出安全有效的 HPV DNA 疫苗。

参 考 文 献

1 Sherman L, Alloul N, Golan I *et al*. Expression and splicing patterns of human papillomavirus type 16 mRNA in pre－cancerous lesions and carcinomas of cervix, in human kerationcyte immortalized by HPV16 and in cell lines established from cervical cancers. Int J Cancer, 1992, 50:356～364

2 Hsu EM, Menicol PJ, Guijon FB *et al*. Quantification of HPV 16 E6E7 transcription in cervical intraepithelial neoplasia by reverse transcriptional polymerase chain reaction Int J Cancer, 1993, 55(3):397～401

3 Menicol P, Guijon F, Wayer S *et al*. Expression of human papilloma virus type16 E6E7 gene varies quantitatively in biopsy tissue from different grades of cervical intraepihelial neoplasia. J Clip Microbiol, 1995, 33(5):1169～1173

4 David S, Helmouth P, Felixo W *et al*. Oncogenic and nononcogenic human papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanism, J Virol, 1989. 63(3):1441～1447

5 Theresa MCT, Bernd G, Bernard HH *et al*. Mechanism of translation of the bicistronic mRNA encoding HPV 16 E6E7 genes. J Gen Virol, 1994, 75(10):2663～2670

6 Foster SA, William GD, Estcheid BG *et al*. The ability of HPV proteins to target P53 for degradation *in vivo* correlates with their ability to abrogate actionmycin－D induced growth arrest. J Virol, 1994, 68(9):5698～5705

7 Belaguli NS, Pater MM, Allan P *et al*. Nucleotide 880 splice donor site required for efficient transformation and accumulation of RNA by human papillomavirus type 16 E7 gene. J Virol, 1992, 66(5):2724～2730

8 Geoftrey DH, Dana MU, Gael EP *et al*. Transcription patterns of human papillomavirus type 16 in genital intraepithelial neoplasas evidence for promoter usage within the E7 ORF during epithelial differentiation. J Gen Virol, 1992, 73:2047～2057

9 Bohm S, Wilczynski P, Pfister H *et al*. The predominant mRNA class in HPV 16 infected genital neoplasias does not encode the E6 or the E7 protein. Int J Cancer, 1993, 55:791～798

10 Masato U, Michael JL, Yasushi Y *et al*. Transactivation by the full－length E2 proteins of HPV 16 and BPV_1 *in vitro* and *in*

维普资讯 http://www.cqvip.com

trio cooperation factors. J Virol, 1994, 68(10):6655～6666

11 Tan SH, Louis ECL, Philip AW *et al*. The HPV 16 E2 transcription sites and represses the E6 promoter through displacement of spl and TFIID, J Virol, 1994, 68(10):6411～6420

12 Terence C, Doris A, Bernd G *et al*. The enhancer of human papillomavirus type 16 : binding sites for the ubiqutous transcription factors OCT－1, NFA TEF－2, NF－1 and AP－1 participate in epithelia cell specific transcription. J Virol, 1991, 65 (11):5933～5943

13 Shigeru Y, Kiyoshi T, Kazunori *et al*. Epidermal growth factor (EGF) elicit down regulation of HPV 16 E6/E7 mRNA at the transcriptional level in an EGF－stimulated human keratinocyte cell line functional role of EGF－response silencer in the HPV16 long control region. J Virol, 1991, 65 (5):2000～2009

14 Satoru K, Masakh N, Naoto H, *et al*. Regulation of the early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. Virology, 1994, 200:130～139

15 Rakesh M, Allan P, Pater MM *et al*. Multiple human papillomavirus type 16 glucocorticoid response element functional for transformation. transcient expression and DNA－protein interaction. J Virol, 1993, 67(9):5656～5659

16 Liu F, Michael RG. Promoter targetting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA－binding domains. Nature, 1994, 368:520～525

17 Takashi O, Tadahito K, Soichi X, *et al*. Association of antibodies against human papillomavirus type 16 E4 and E7 proteins with cervical cancer positive for human papillomavirus DNA. Int J Cancer, 1993, 54:624～628

18 Jeffery MA, KarL M, Peter MH *et al*. Progressive squamous epithelial neoplasias in K14－human papillomavirus type 16 trangenic mice. J Virol, 1994, 68(7):4358～4368

19 Mark AL, Laimonis AL. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus type 16 E6 protein. J Virol, 1994, 68(7): 4264～4673

20 Saewha J, Lynn B, Allen－Hffmann *et al*. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells, J Virol, 1995, 69(5):2989～2995

21 Birley HDL, Hart CA, Stacey SN *et al*. Human papillomavirus and the genital tract: old virus, new development. J Med Microbiol, 1995, 43:81～84

22 Couturier J, Sastre－Garau X, Schneider Sm *et al*. Integration of human papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for protooncogene expression. J Virol, 1991, 65(8):4534～4538

23 Doorbar J, Ely S, Sterling J *et al*. Specific interaction between HPV 16 E1－E4 and cytokeratins result in collapse of the epithelial cell intermediate filament net work. Nature, 1991, 3552:824～827

24 Randy RB, Raymondm W. Major histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infectious by nature killer cell. J Virol, 1995, 69(7):3967～3971

25 Eun－Sung H, Nottoli T, Dimaio D *et al*. the HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cell. Virology, 1995, 211:227～233

26 Veronique B, Grey M, Gu ZM *et al*. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. Virology, 1994, 203:73～80

27 Schmitt A, Harry B, Rapp B *et al*. Gomparison of the E6 and E7 genes of low－and high－risk cutaneous papillomavirus reveals strongly transforming and high RB－binding activity for the E7 protein of the low－risk human papillomavirus type 1. J Virol, 1994, 68(11):7051～7059

28 Liu ZJ, Jyosna G, Ostrow RS *et al*. The E6 gene of human papillomavirus type 16 E6 is sufficient for transformation of rat baby kidney cells in contransfection with activated Ha－Ras. Virology, 1994, 201:388～396

29 Etscheid BG, Scott AF, Galloway DA *et al*. The E6 protein of human papillomavirus type 16 functions as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppress protein, p53. Virology, 1994, 205:583～585

30 Christian D, Sophie H, Patrick V *et al*. Transcriptional activation of several heterologous promotors by the E6 protein. J Virol, 1992, 66(1):325～333

31 Lambert PF, Huichin P, Henry CP *et al*. Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and

维普资讯 http://www.cqvip.com

E7 oncogenes in the skin of transgenemilce. Proc Natl Ac d Sci USA, 1993, 90:5583～5587

32 Oelze I, Kartenbech J, Crusius K *et al*. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell－cell communication in an epithelial cell line. J Virol, 1995, 69(7):4489～4494

33 Chen LP, Thomas EK, Hu SL *et al*. Human papillomavirus type 16 E7 is a tumor rejection antigen. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:110～114

34 Stacey TS. Human cytotoxic T lymphocyte stimulated by endogenous processed human papillomavirus type 16 E7 recognize a peptide containing a HLA－AZ′ (A＊0201) motif. Immunology, 1994, 81:222～227

35 Peter FS, David PJ, Karen BF *et al*. Stomach cancer in transgenic mice expressing human papillomavirus type 16 early region genes. J Gen Virol, 1994, 75:1125－1137

36 Kong Kim K, Soo Kim Y. Analysis of p53 tumor suppressor gene mutations and human papillomavirus infection in human bladder cancer. Yonsei Med J 1995, 36 (4):320～329

37 Scherrner M, Takashi T, Huibregtse JM *et al*. Interaction of human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild and mutant human p53 protein. J Virol, 1992, 66(8):5100～5105

38 Alexander K, Nelleke AG, Jane WF *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor type. Sciense, 1994, 264:436～440

39 Chares JS. Mammalian G1 cyclins. Cell, 1993, 73(5):1059～1065

40 Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF－induced cell cycle arrest. Nature, 1994, 371(6494):257－260

41 Aikou O, Douglas JD, Eusa AS *et al*. Mutations and aitered expression of p16INK4A in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(23):11045～11049

42 Eileen W. p53, guardian of RB. Nature, 1994, 371(6494):257～260

43 David O M. Principle of CDK regulation. Nature, 1995, 374:131～133

44 Leland HH, Michael BK. Cell cycle control and human cancer. Science, 1994, 266:1821～1828

45 Cromme TV, Meijer CJLM, Snijders PJF *et al*. Analysis of MHC class I and Ⅱ expression in relation to presense of HPV genotype in premalignant and malignant cervical lesions. Br J Cancer, 1993, 67:1372～1380

46 Susan SG, Margret DK, Teresa C *et al*. HLA class II antigen expression in human papillomavirus associated cervical cancer. Cancer Res, 1992, 52:4009～4016

47 Rudolf W, Christopn T. High risk of squamous cell carcinoma of cervix for women with HLA－DQw3. Nature, 1991, 352:723～725

48 Mehal WZ, Lo MDY, Hemingtoncs. Role of human papillomavirus in determining the HLA associated risk of cervical carcinogenesis. J Clin Patnol, 1994, 47:1077～1081

49 Duggan－Keen M. Alterations in major histocompatibility concomplex expression in cervical cancer, possible consequences for immunotherapy. Papillomavirus Rep, 1994, 5:3～9

50 Koup RA Virus escape from CTL recognition. J Exp Med, 1994, 180:779～782

51 Lipford GB, Bauer S, Wagner H *et al*. Peptide engineering allow cytotoxic T cell vaccination against human papillomavirus antigen, E6. Immunology, 1995, 84:298～303

52 Li Y, Mechael AN, Jerry WS *et al*. Transcriptional response of the D－type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by the *retinoblastoma susceptibility gene product* RB. Cancer Res, 1994, 54(23):6075～6083

53 Roden RBS, Hubbert NL, Kirnbauer R *et al*. Papillomavirus L1 capsides agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. J Virol, 1995, 69(8):5147～5151