

Variation Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E6 Gene in Zhenjiang City

Yao Wu¹, Liang Wu^{2*}, Qing Yin^{1*}, Yaling Zhou¹, Zhiqing Zou², Xiaoyue Dai², Xugan Jiang², Shengxia Chen²

¹The Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

²School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

Email: *yinqingyinqing@aliyun.com, *wl_ujs@163.com

Received: Nov. 22nd, 2018; accepted: Dec. 7th, 2018; published: Dec. 14th, 2018

Abstract

Objective: To study the variation of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6 gene sequence in Zhenjiang city, and provide epidemiological data for HPV prevention and cure. **Methods:** HPV virus typing detection kit was used to screen HPV infection from cervical abscission cells' samples in our hospital. The full-length of E6 genes was amplified from HPV-16 samples by PCR assay. The E6 gene sequence was analyzed by BLAST website to find the mutation site. The phylogenetic tree analysis was performed using MEGA 5.0 software with neighbor-joining (NJ) method. **Results:** There were 35 samples that had HPV-16 virus in total 650 samples. In 35 samples of HPV-16 virus, 25 samples of HPV-16 E6 genes had base missense mutations at position 220, the mutation frequency was 57%; and 14 samples of HPV-16 E6 genes had base missense mutations at position 178, the mutation frequency was 40%; 8 samples of HPV-16 E6 genes had base synonymous mutation at position 702, the mutation frequency was 23%. The results of phylogenetic tree analysis indicated that the predominantly HPV-16 type in Zhenjiang was mainly Asian variants, and no African type 1, African type 2, Asian American and North American variants were detected. **Conclusion:** There is a general mutation in HPV-16 E6 gene in Zhenjiang city, and the general mutation would cause canceration probability increase. Our results also provide some support for improvement of HPV vaccine for Chinese people.

Keywords

HPV-16, E6 Gene, Gene Variation

镇江地区人乳头状瘤病毒16型E6基因变异分析

吴瑶¹, 吴亮^{2*}, 阴晴^{1*}, 周亚玲¹, 邹治情², 戴晓玥², 姜旭淦², 陈盛霞²

¹江苏大学附属医院检验科, 江苏 镇江

²江苏大学医学院, 江苏 镇江

*通讯作者。

文章引用: 吴瑶, 吴亮, 阴晴, 周亚玲, 邹治情, 戴晓玥, 姜旭淦, 陈盛霞. 镇江地区人乳头状瘤病毒 16 型 E6 基因变异分析[J]. 临床医学进展, 2018, 8(10): 935-943. DOI: 10.12677/acm.2018.810155

摘要

目的: 研究镇江地区人乳头瘤病毒16型(HPV-16) E6基因变异情况, 为HPV防治提供流行病学数据。**方法:** 采用HPV分型检测试剂盒筛选我院女性患者宫颈脱落细胞样本中HPV-16型病毒阳性标本, 并利用E6基因特异性引物扩增HPV-16型病毒阳性标本中病毒E6基因全长。PCR产物经测序后, 采用BLAST比对分析基因突变位点, 并使用软件MEGA 5.0以邻接法(Neighbor Joining, NJ)进行进化树分析。**结果:** 从650例样本检出35例HPV-16型病毒阳性, 感染率为27.3%。在35例HPV-16型病毒样本中, 20例样本的E6基因在220位核苷酸发生碱基错义突变, 突变频率为57%; 14例样本的E6基因在178位核苷酸发生碱基错义突变, 突变频率为40%; 另有8例样本的E6基因在702位核苷酸发生碱基同义突变, 突变频率为23%。进化树分析结果表明, 镇江地区流行株主要为亚洲变异型, 没有发现非洲1型, 非洲2型, 亚洲美洲及北美洲变异型。**结论:** 镇江地区HPV-16型病毒的E6基因普遍存在突变, 该突变可能导致感染者癌变概率的增加, 同时分析本地区HPV病毒突变热点区域和保守区域也可以为研究针对中国人群的宫颈癌疫苗的研制提供线索。

关键词

HPV-16, E6基因, 基因变异

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤, 其发病率仅次于乳腺癌和结直肠癌, 全球每年确诊 53 万例患者, 其死亡率超过 50%, 而每年新发病例的 80%集中于发展中国家[1]。我国的宫颈癌发病率居妇科恶性肿瘤之首, 每年有 13.5 万人发病[2]。虽然宫颈癌的发生涉及诸多因素, 其中持续性 HPV-16 高危型病毒感染已被公认为是引起宫颈癌以及发展成为浸润性宫颈癌的最重要因素[3]。

HPV-16 型病毒的 E6 基因是重要致癌基因, 大量宫颈癌病例研究结果表明, 超过 99%的宫颈癌样本中, 病毒 E6 基因整合入宿主细胞并获得表达, 导致正常细胞的周期失控进而发生癌变[4]。近年来, 研究者关注到 HPV-16 型病毒 E6 基因的突变会造成 HPV-16 病毒致癌能力变化[5] [6] [7], 并且 E6 基因突变存在地理区域集中分布现象[8]。目前尚无镇江地区 HPV-16 型病毒 E6 基因研究报道。本研究分析了镇江地区 HPV-16 病毒 E6 基因变异情况和 HPV-16 病毒毒株亲缘关系, 为 HPV 感染的治疗以及开发适合中国人群的宫颈癌疫苗提供流行病学资料。

2. 材料

2.1. 研究对象

样本取材于江苏省镇江市江苏大学附属医院进行 HPV 检测的妇女宫颈脱落细胞样本。实验对象的具体纳入标准及排除标准如下:

实验对象的纳入标准:

- 1) 检查者为女性;
- 2) 检查者为镇江籍, 无外地长期居住史;
- 3) 检查者年龄大于 25 岁, 小于 60 岁;
- 4) 检查者若为经期正常妇女, 应在月经来潮后的 10~18 天为最佳检查时间;
- 5) 检查者三天内未作阴道冲洗, 未使用避孕药膏等阴道内用药物;
- 6) 检查者 24 小时内未有性行为;
- 7) 检查者 24 小时内未使用醋酸或碘液涂抹阴道。

实验对象的排除标准:

- 1) 检查者非镇江籍;
- 2) 检查者曾有外地长期居住史;
- 3) 检查者年龄小于 25 岁, 或者大于 60 岁;
- 4) 检查者正处于月经期, 或者月经期前后三天;
- 5) 检查者三天内曾行阴道冲洗, 或使用过避孕药膏等阴道内用药物;
- 6) 检查者 24 小时内有性行为;
- 7) 检查者 24 小时内使用过醋酸或碘液涂抹阴道。

2.2. 试剂和仪器

HPV 分型检测试剂盒购自亚能生物技术(深圳)有限公司; $2 \times$ PCR Master Mix 预混液购自美国 Thermo 公司; DNA Marker 购自大连宝生物公司; PCR 引物由苏州泓讯生物技术公司合成; 分子杂交仪(YH-H16) 购自深圳亚能生物技术有限公司; PCR 扩增仪和凝胶电泳成像分析系统均购自美国 *Bio-Rad* 公司; 水平电泳套件购自上海天能生物公司; 低温高速离心机为美国 Thermo 公司产品。

3. 方法

3.1. 样本采集流程

将专用毛刷深入患者宫口处 2 cm~3 cm 并顺时针旋转以获取足够上皮细胞, 将取样后毛刷放入专用细胞保存液中, 用于后续 HPV-DNA 检测。

3.2. HPV-DNA 检测和分型

严格按照人乳头瘤病毒基因分型(23 型)检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)说明书进行操作。该试剂盒用于体外定性检测宫颈脱落细胞样本中的人乳头瘤病毒(HPV) DNA, 能够检测出 23 种 HPV 基因型, 包括 17 种高危型: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82; 6 种低危型: HPV6, 11, 42, 43, 81, 83。具体方法如下:

1) HPV-DNA 提取

充分洗脱宫颈刷上的样本, 13,000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 保留管底的细胞块, 加入裂解液 50 μ L 悬浮沉淀, 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min, 13,000 r/min 离心 10 min, 保留上清待用。

2) PCR 扩增

取出 PCR 反应管, 分别加入已提取的待测样本 DNA 5 μ L, 反应总体积 25 μ L, 最后加入 1 滴矿物油, 每次试验设置一个阴性质控和一个阳性质控。PCR 按以下条件进行扩增: 50 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 42 $^{\circ}$ C 90 s; 72 $^{\circ}$ C 30 s; 40 cycles; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

3) 杂交

首先将 PCR 扩增产物预变性, 形成单链 DNA, 利用 DNA 双链碱基互补的原理, 将 PCR 产物加入到固定有不同 HPV 亚型探针的低密度基因膜片上, 共 23 种基因型, 进行杂交。杂交后配制显色液显色。

4) 结果判读

HPV 分型杂交膜上共有 23 种基因型, 并设有生物素(Biotin)及内对照点质控点。两质控点阳性, 其他点阴性, 应判定为 HPV 分型检测结果为阴性。两质控点阳性, 其他点有 1 个或 1 个以上 HPV 分型点为阳性, 根据膜条 HPV 分型分布图判断阳性点, 确定 HPV 病毒类型。选取其中 35 例 HPV-16 阳性标本用于后续研究。

3.3. E6 基因扩增

根据 HPV-16 型病毒 NC001526 株设计 E6 特异性扩增引物, 引物序列为 E6-F: 5'-AACTAAGGGCGAACCGAAATC-3'和 E6-R: 5'-CTCCTCCTCTGAGCTGTCATTT-3'。PCR 反应体积为 25 μ L, 其中宫颈脱落细胞 DNA 样本 2 μ L (<100 ng), PCR 反应上下游引物为 0.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应产物以 10 g/L 浓度琼脂糖凝胶电泳检测结果。

3.4. E6 基因分析

E6 基因测序由苏州泓讯生物技术公司完成。凡发现突变的样品均经 PCR 重新扩增, 并再次测序以排除 PCR 过程中碱基错配而可能产生的误差。对测序获得的 E6 基因序列与标准株基因序列进行比对。

3.5. E6 基因进化树分析

将已测序获得的 E6 基因通过生物学在线软件 BLAST 进行比对, 使用 MEGA 5.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)开展进化树分析。本研究所使用的 HPV16 型病毒 E6 基因的参比序列和登录号如下:

- 1) 非洲变异型: 非洲 1 型(Africantype1): AF472508; 非洲 2 型(Africantype2): AF472509;
- 2) 美洲变异型: 亚洲美洲变异型(Asian-American): AF402678; 北美变异型(North-American): U34116;
- 3) 亚洲变异型: 东亚变异型(East Asian): AF534061; 中国甘肃(Gan Su): EU918764; 中国新疆(Xin Jiang): FJ006723; 泰国变异型(Thailand): FJ610152;
- 4) 欧洲变异型: 德国变异型(European German): AF536179。

4. 结果

4.1. 镇江地区 HPV-16 型病毒感染情况

2017 年 6 月至 2018 年 5 月期间, 共检测样本 650 例, 其中检出 HPV 病毒感染 128 例, HPV 病毒感染率为 19.7%。被检出的 128 例 HPV 病毒患者中, 35 例为 HPV-16 型病毒感染, 感染率为 27.3%。

HPV 感染年龄分布, 128 例女性 HPV 感染在 25~30 岁、31~40 岁、41~50 岁、51~60 岁年龄区间 HPV 的感染率分别为 37.8%、35.4%、18.3%、8.5%。可见 HPV 感染高峰在 25~40 岁这个年龄段。但 HPV 感染者的年龄差异无显著性($P > 0.05$)。提示女性生殖道 HPV 感染普遍存在于性活跃人群中。

4.2. HPV-16 型病毒 E6 基因 PCR 扩增结果

35 例 HPV-16 型病毒样本均可扩增出 E6 基因, 产物大小为 623 bp (见图 1)。经 BLAST 比对确认为 HPV-16 型 E6 基因。

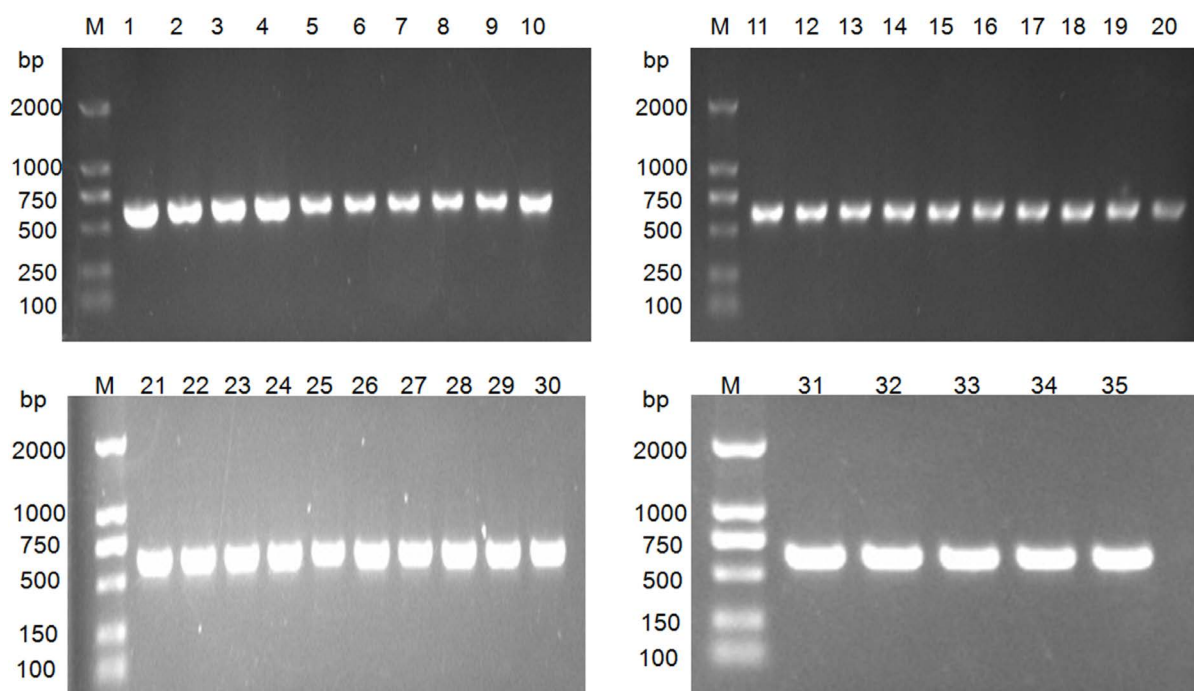


Figure 1. PCR electropherogram of HPV-16 E6 protein gene

图 1. HPV16 型 E6 蛋白基因 PCR 电泳图

4.3. HPV-16 型病毒 E6 基因突变分析

本研究中 HPV-16 型病毒 E6 基因序列与标准株比较发现, 20 例样本第 220 位核苷酸发生从 T 到 G 的改变, 其相应的编码氨基酸由天门冬氨酸(Asp)突变为谷氨酸(Glu), 突变频率为 57%, 14 例样本第 178 位核苷酸发生 T 到 G 的碱基突变, 其相应的编码氨基酸由天门冬氨酸(Asp)突变为谷氨酸(Glu), 突变频率为 40%; 8 例样本第 702 位核苷酸发生从 G 到 A 的碱基突变, 但相应编码氨基酸突变为同义突变, 突变频率为 23%; 第 135 位核苷酸上共有 6 例样本发生碱基突变, 总突变率约 17%, 其中 3 例样本发生从 T 到 A 的碱基突变, 其相应的编码氨基酸由缬氨酸(Val)突变为天门冬氨酸(Asp), 另 3 例样本发生从 T 到 C 的碱基突变, 其相应的编码氨基酸由缬氨酸(Val)突变为丙氨酸(Ala) (见表 1)。

4.4. HPV-16 型病毒 E6 基因核苷酸序列进化树分析

35 例 HPV-16 型病毒 E6 基因与其他国内外 HPV-16 型病毒经 Mega5.0 软件分析, 从进化树图可得出镇江地区 HPV-16 型病毒 E6 基因的进化树很明显与非洲变异株不在同一分支上, 欧洲变异株与亚洲变异株遗传关系密切, 另外新疆变异株与欧德变异株也在同一分支上, 其遗传关系也非常密切。镇江地区分离 HPV-16 样本中, 仅 ZJ-25 株与泰国变异株在同一分支, 其它样本均与东亚变异株在同一分支, 没有样本与非洲变异型(非洲 1 型, 非洲 2 型)及亚洲美洲、北美洲变异体在同一分支。由此可得出, 人乳头瘤病毒 HPV-16 型具有地域性分布(图 2)。

5. 讨论

HPV 的感染是导致宫颈癌发生的首要病因。在全世界范围内, 最常见诱发宫颈癌发生的感染亚型为 HPV-16。根据流行病学资料, 相同 HPV 类型的不同突变株存在生物学差异, 并且可能导致不同的致癌风险[9]。大量流行病学资料显示, HPV-16 变异株具有不同的生物学活性和致癌潜能, 其中某些位点(如

L83V 等)变异与宫颈癌的发生和发展密切相关[10] [11], 并且这些突变株的致癌能力具有地域性[4], 如欧美地区流行的 HPV-16 变异株主要是 G350 (L83V)位点突变[12], 而东亚地区主要是 G178 (D25E)位点突变[13]。

Table 1. HPV-16 E6 nucleotide mutation (only variable site listed)

表 1. HPV-16 E6 基因核苷酸变异位点(只列出有变异的位点)

| Strain | HPV-16 E6 nucleotide mutation site | | | | | | | | | |
|-----------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 135 | 142 | 178 | 220 | 643 | 697 | 698 | 702 | 708 | 711 |
| prototype | T | A | T | T | G | T | C | G | G | T |
| ZJ-01 | A | | | G | T | | | | A | |
| ZJ-02 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-03 | A | | G | | | | | A | | |
| ZJ-04 | | | | | | | | A | | |
| ZJ-05 | C | | | G | | | | A | | |
| ZJ-06 | | | G | | | | | | | |
| ZJ-07 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-08 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-09 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-10 | C | | G | | | | | A | | |
| ZJ-11 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-12 | | | G | | | | | | | |
| ZJ-13 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-14 | | | | G | | | | A | | |
| ZJ-15 | | | G | | | | | | | |
| ZJ-16 | | | G | | | | | | | |
| ZJ-17 | | | G | | | | | | | |
| ZJ-18 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-19 | | | G | | | | | | A | |
| ZJ-20 | | | | G | | G | A | | | |
| ZJ-21 | | G | G | | | | | | | |
| ZJ-22 | C | | G | | | | | | | |
| ZJ-23 | | | | G | | | | A | | |
| ZJ-24 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-25 | | | | G | | | | | | A |
| ZJ-26 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-27 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-28 | | | G | | | | | | | |
| ZJ-29 | | | G | | | | | A | | |
| ZJ-30 | A | | G | | | | | | | |
| ZJ-31 | | G | | G | | | | | | |
| ZJ-32 | | | | G | | | | | | |
| ZJ-33 | | | | G | | | A | A | | G |
| ZJ-34 | | | G | | | | | | | |
| ZJ-35 | | | | G | | | | | | |

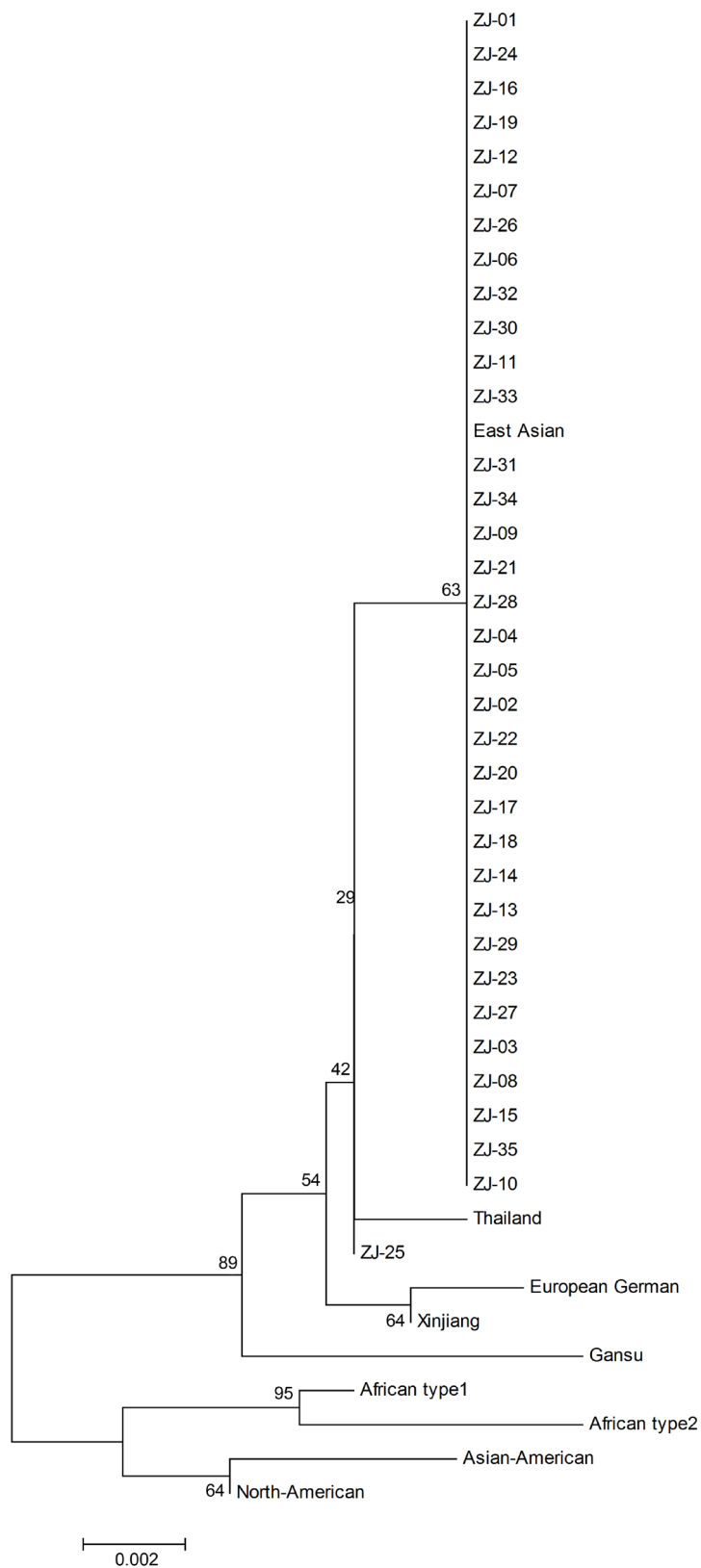


Figure 2. Phylogenetic tree constructed from 623 bp fragment of 35 HPV-16 E6 variants
图 2. HPV-16 E6 变异型 623 bp 片段进化树

目前江苏省镇江地区 HPV-16 型病毒 E6 基因变异情况研究尚为空白。我们的研究表明, 我市 HPV-16 型病毒 E6 基因最常见突变位点为第 220 位核苷酸, 碱基由 T 突变为 G, 其编码氨基酸由天门冬氨酸(Asp)突变为谷氨酸(Glu); 其次较常见突变位点为第 178 位核苷酸, 发生 T 到 G 的碱基突变, 其相应的编码氨基酸由天门冬氨酸(Asp)突变为谷氨酸(Glu); 第 702 位核苷酸上的碱基突变为无义突变; 第 135 位核苷酸有 6 例发生碱基突变, 其中有 3 例发生从 T 到 A 的碱基突变, 相应编码氨基酸由缬氨酸(Val)突变为天门冬氨酸(Asp), 另 3 例发生从 T 到 C 的碱基突变, 其相应的编码氨基酸由缬氨酸(Val)突变为丙氨酸(Ala)。综上所述, 我市 35 株 HPV-16 型病毒 E6 基因中碱基错义突变频率为 T220G (57%), T178G (40%), T135A (9%), T135C (9%); 相应的氨基酸错义突变依次为: D39E (57%), D25E (40%), V11D (9%), V11A (9%)。HPV-16 型病毒 E6 蛋白的 D25E 变异是东亚人群中较常见的一种与病毒致癌能力相关的变异, 是导致中国人和韩国人宫颈癌发生的高危因素[14] [15]。我们的研究发现, 镇江地区 HPV-16 型病毒 E6 蛋白也存在较高的类似变异, 该情况应该引起临床医生的高度重视。

宫颈癌的进展涉及多种因素, 大多数 HPV-16 感染会在感染后一到两年内自动被免疫系统清除, 只有一小部分 HPV 病毒感染发展成为宫颈癌[9]。根据致癌性 HPV 可分为高危型和低危型。常见高危型 HPV 有: 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 和 73 型等[16]。其中危险性最大的是 HPV16 型和 HPV18 型病毒, 70% 的宫颈癌由其引起[17]。常见低危型 HPV 有: 6、11、42、43、44 和 54 型等, 常引起良性病变如尖锐湿疣等[18] [19]。HPV 病毒基因组为双链环状 DNA, 长 7.5 kb~8.0 kb。可分为三个功能区: 1) 早期区(Early region E 区): 分别编码 E1、E2、E4、E5、E6、E7 等六个早期蛋白, 这些蛋白在病毒 DNA 复制、转录和翻译调控等方面起重要作用; 2) 晚期区(Later region L 区): 编码主要外壳蛋白 L1 和次要外壳蛋白; 3) 非编码区(Non-coding region): 含有 HPV 基因组 DNA 的复制起点和 HPV 表达所必需的调控原件[20] [21]。其中 HPV-16 E6 基因是重要的病毒致癌基因, 使用细胞系模型和宫颈癌的实验数据表明, 在超过 99% 的临床样品中, 病毒的 E6 基因被保留和表达[4]。E6 蛋白可结合泛素蛋白酶(E6AP)形成复合体, 再与 P53 蛋白特异结合, 使其降解, 从而导致细胞周期失控。同时基于 HPV-16 E6 基因区域单核苷酸多态性(SNPs)系统发育模式, 可将 HPV-16 定义为 6 个亚型: 欧洲型(E), 亚洲型(As), 非洲 1 型(Af1), 非洲 2 型(Af2), 亚洲美洲型(AA)和北美型(NA) [21]。HPV-16 谱系有地理区域集中分布现象, 存在民族性差异, 并且与其他疾病也存在一定相关性[8]。其中 E6 基因序列变化(突变)使得 HPV-16 型中分支不同致癌能力也存在差异[5] [6] [7]。

本研究结果提示 D25E 和 D39E 两种变异是镇江地区 HPV-16 型病毒最主要的变异类型, 该研究结果可以为未来 HPV 疫苗的进一步优化提供线索。在下一步研究中, 我们拟进一步探讨镇江地区 HPV-16 型病毒 E6 蛋白 D25E 和 D39E 变异与宫颈癌发生的相关性以及致癌机制。

基金项目

国家寄生虫种质资源共享服务平台(平台-TDRC-22); 镇江市社会发展项目(SH2017024)。

参考文献

- [1] Haq, Z., Mahjour, J. and Khan, W. (2013) Communicable Diseases in the Eastern Mediterranean Region: Prevention and Control 2010-2011. *Eastern Mediterranean Health Journal*, **19**, 888-891. <https://doi.org/10.26719/2013.19.10.888>
- [2] Arbyn, M., Castellsague, X., deSanjose, S., et al. (2011) Worldwide Burden of Cervical Cancer in 2008. *Annals of Oncology*, **22**, 2675-2686. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr015>
- [3] Almajhdi, F.N., Senger, T., Amer, H.M., et al. (2014) Design of a Highly Effective Therapeutic HPV16 E6/E7-Specific DNA Vaccine: Optimization by Different Ways of Sequence Rearrangements (Shuffling). *PLoS ONE*, **9**, e113461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113461>
- [4] Vinokurova, S.V. (2016) Genetic and Epigenetic Mechanisms of Regulation of Human Papillomavirus. *Advances in*

- Molecular Oncology*, **3**, 18-25. <https://doi.org/10.17650/2313-805X.2016.3.2.18-25>
- [5] Cornet, I., Gheit, T., Iannacone, M.R., *et al.* (2013) HPV 16 Gene Variation and the Development of Cervical Cancer Worldwide. *British Journal of Cancer*, **108**, 240-244. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.508>
- [6] Chang, Y.J., Chen, H.C., Pan, M.H., *et al.* (2013) Intra Typic Variants of Human Papillomavirus Type 16 and Risk of Cervical Neoplasia in Taiwan. *Journal of Medical Virology*, **85**, 1567-1576. <https://doi.org/10.1002/jmv.23651>
- [7] Zehbe, I., Voglino, G., Delius, H., *et al.* (1998) Risk of Cervical Cancer and Geographical Variations of Human Papillomavirus 16 E6 Poly Morphisms. *Lancet*, **352**, 1441-1442. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61263-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61263-9)
- [8] Van Aardt, M.C., Dreyer, G., Pienaar, H.F., *et al.* (2015) Unique Human Papillomavirus-Type Distribution in South African Women with Invasive Cervical Cancer and the Effect of Human Immunodeficiency Virus Infection. *International Journal of Gynecological Cancer*, **25**, 915-925.
- [9] Bernard, H.U., Calleja-Macias, I.E. and Dunn, S.T. (2006) Genome Variation of Human Papilloma Virus Types: Phylogenetic and Medical Implications. *International Journal of Cancer*, **118**, 1071-1076. <https://doi.org/10.1002/ijc.21655>
- [10] Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., *et al.* (1998) Human Papillomavirus 16 E6 Variants Are More Prevalent in Invasive Cervical Carcinoma than the Prototype. *Cancer Research*, **58**, 829-833.
- [11] Chansaenroj, J., Theamboonlers, A., Junyangdikul, P., *et al.* (2012) Whole Genome Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Multiple Infection in Cervical Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **13**, 599.
- [12] Del Refugio, G.L.M., Laviada, M., Teran, M.A., *et al.* (2004) Molecular Variants of HPV Type 16 E6 among Mexican Women with LSIL and Invasive Cancer. *Journal of Clinical Virology*, **29**, 95-98. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00094-5)
- [13] Sun, Z., Lu, Z., Liu, J., *et al.* (2013) Genetic Variations of E6 and Long Control Region of Human Papillomavirus Type 16 from Patients with Cervical Lesion in Liaoning, China. *BMC Cancer*, **13**, 459. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-459>
- [14] Cai, H.B., Chen, C.C. and Ding, X.H. (2010) Human Papillomavirus Type 16 E6 Gene Variations in Chinese Population. *European Journal of Surgical Oncology*, **36**, 160-163. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2009.07.186>
- [15] Choi, B.S., Kim, S.S., Yun, H., *et al.* (2007) Distinctive Distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S Intratypic Asian Variants in Korean Commercial Sex Workers. *Journal of Medical Virology*, **79**, 426-430. <https://doi.org/10.1002/jmv.20826>
- [16] Senior, K. (2002) Cervical Cancer Research Focuses on the HPV E7 Gene. *The Lancet Oncology*, **3**, 585. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00886-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00886-0)
- [17] Smith, J.S., Lindsay, L., Hoots, B., *et al.* (2007) Human Papilloma Virus Type Distribution in Invasive Cervical Cancer and High-Grade Cervical Lesions: A Meta Analysis Update. *International Journal of Cancer*, **121**, 621. <https://doi.org/10.1002/ijc.22527>
- [18] Muñoz, N., Bosch, F.X., De, S.S., *et al.* (2003) Epidemiologic Classification of Human Papilloma Virus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **348**, 518-527. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>
- [19] Vaeteewoottacharn, K., Jearanaikoon, P. and Ponglikitmongkol, M. (2003) Co-Mutation of HPV16 E6 and E7 Genes in Thai Squamous Cervical Carcinomas. *Anti Cancer Research*, No. 23, 1927-1932.
- [20] NarisawaSaito, M. and Kiyono, T. (2007) Basic Mechanisms of High Risk Human Papilloma Virus-Induced Carcinogenesis: Roles of E6 and E7 Proteins. *Cancer Science*, **98**, 1505-1511. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x>
- [21] Yamada, T., Wheeler, C.M., Halpern, A.L., *et al.* (1995) Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages in United States Populations Characterized by Nucleotide Sequence Analysis of the E6, L2, and L1 Coding Segments. *Journal of Virology*, **69**, 7743-7753.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-8712，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：acm@hanspub.org