高危型 HPV 复制相关蛋白在宫颈组织中的研究 *

吴欣欣[1] 玛依努尔·尼牙孜[2△]
(1 石河子大学 新疆 石河子 832022；2 新疆维吾尔自治区人民医院妇科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要：人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus,HPV)复制机制的研究，对复制与宫颈病变的相关性可提供重要的依据。HPV 是有衣壳包裹的小型环状双链 DNA 病毒。其基因组可分早期及晚期蛋白编码区和一个调控区。高危型 HPV 通过 E1、E2 蛋白及 Ori 序列启动复制。高危型 HPV 在宫颈上皮细胞中的复制是分化依赖型的，在高危型 HPV 感染的成熟的宫颈表皮细胞中，HPV E7 蛋白使细胞再次进入增殖分裂期，HPV-DNA 得以复制，但同时 E7 蛋白亦会诱发宿主细胞染色体不稳定，增加癌变风险。由此推理，高危型 HPV 的复制与宫颈癌的发病有一定相关性。目前有学者对高危型 HPV 的复制机制，复制与致癌的关系方面正开展相关研究。

关键词：HPV 复制；E1 E2 E7 蛋白；染色体稳定性
中图分类号：R737.33 文献标识码：A 文章编号：1673-6273(2012)07-1391-03

Research of High-Risk HPV Replicative Proteins in Cervical Tissue*

WU Xin-xin[1], *Mayineur·Niyazi*[2△]
(1.Shihezi University,Shihezi City in Xinjaing, 832022;
2.Gynecological Department, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, 830000, China)

ABSTRACT: The research of HPV replication process can contribute to how how HPV leads to cervical cancer. HPV is a micro circle double-strand DNA virus with viral particles. HPV-DNA genomes consist of early and late coding regions as well as squences that regulate trancription and replication. E1and E2 polypeptides and the ori sequences are basic elements to start replication.The replicative life cycle of HPVs is tightly coupled to the differentiation state of the host keratinocyte, with high level viral genome replication occuring in differentiated epithelial cellds. E7 protein induces unscheduled DNA replicatin in differentiated keratinocytes. However E7 protein meanwhile causes chromosome instability and enhances the progress of cancerization. So the replication of HPV is approximately related to carcinogenesis. Reseaches of replication process and the relationship between replication and carcinogenesis are expending.

Key words: HPV replication; E1 E2 E7; Chromosome instability
Chinese Library Classification(CLC):R737.33 Document code: A
Article ID:1673-6273(2012)07-1391-03

随着乳头瘤病毒体外培养的成功，上世纪 80 年代，分子生物学家成功测序了乳头瘤病毒家族 (PV) 的基因序列，发现 HPV 的基因组可分为两个编码区和一个调控区。编码区分为 E 区和 L 区, E 区分为 E6、E7、E1、E2、E4、E5 基因，编码相应的早期蛋白，早期蛋白主要参与病毒 DNA 的复制、转录和细胞转化。L 区分为 L1 和 L2 基因，编码晚期蛋白，L1、L2 蛋白为衣壳蛋白, 主要参与病毒颗粒的组装和 DNA 包装 [1]。本文就 HPVE2、E7 基因与复制机制的关系做一综述。

1 E2 蛋白在复制中的作用

E2 蛋白在病毒 DNA 复制和转录调控中都起着重要的作用。E2 蛋白以同型二聚体的形式存在，相对分子质量约 50 k。N- 末端由富含谷氨酸的 a 螺旋组成，可与 EI 蛋白的解旋酶域连接，形成 E1/E2 起始前复合物。C- 末端为 DNA 结合域，可与 DNA Ori 序列 (Ori 是一段位于 URR 和早期基因开放阅读框之间，约 60-80bp 的保守结构) 的 E2 BS 结合，结合后可使 DNA 弯曲。E1/E2 复合物通过与 DNA Ori 区的 E1 BS、E2 BS 结合，启始 DNA 的复制；一旦病毒 DNA 复制进入延伸阶段，在分子伴侣 Hsp40 和 Hsp70 的协助下，E2 蛋白再从起始复合物中释放，转为低特异性的 E1 复合物，E1 发挥解旋酶活性并促使病毒 DNA 复制[3]。E2 蛋白在病毒 DNA 复制中的作用见图 1。

E2 蛋白通过 E1/E2 复合体可增强 E1 蛋白特异性。E1/E2 复合体与 Ori 区结合的特异度是单独 E1 与之结合的 100 倍。E2 蛋白虽然只是起辅助作用, 但在复制过程中必不可少[4]。

总之，在 DNA 复制起始过程中，HPV E1 蛋白首先与 DNA 聚合酶 a 相互作用。然后再与 E2 蛋白结合形成起始复合物[2], 最后和 E1BS、E2BS 结合，同时发挥解旋酶和 ATP 水解的作用，从而启始病毒 DNA 复制。

* 基金项目：国家自然科学基金项目(81050021)
作者简介：吴欣欣(1984-)，女，硕士研究生，主要研究方向：妇科肿瘤。电话：18999119260 Email:729009679@qq.com
△通讯作者：玛依努尔·尼牙孜，Email：mynr68@yahoo.com.cn
(收稿日期：2011-10-13 接受日期：2011-11-14)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

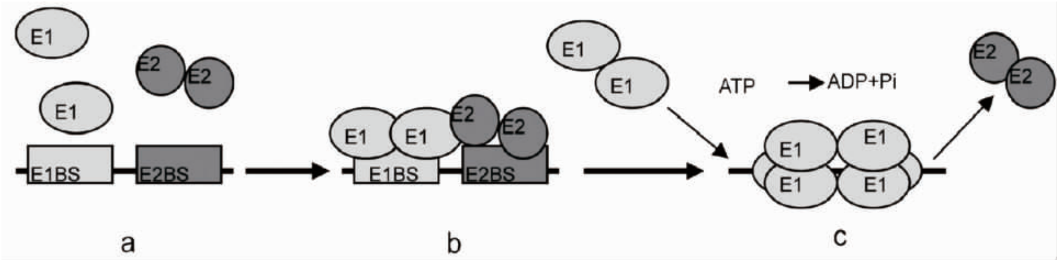

图 1　E1 和 E2 蛋白与 Ori 结合的示意图

Figure1 Diagram of Ori and E1、E2 polypeptide

2 不同的复制周期

在宫颈上皮基底细胞中，只观察到 HPV DNA，表面没有病毒衣壳蛋白的包装。只有在宫颈上皮的表层细胞中，才发现有衣壳蛋白的病毒颗粒。可见，HPV 的增殖方式是细胞分化依赖型的[4]。HPV 基因组的复制可以分为三个时期[5]：建立期（estabilshment）、维持期（maintenance）、扩增期（amplication）。各增殖周期 HPV 的复制方式不同。

HPV 通过破损的黏膜进入机体，潜伏于表皮细胞和基底层细胞间，随后，病毒粒子与基底细胞表面的受体结合进入细胞即进入建立期[3,5]：HPV 质粒样基因组移向宿主细胞核，启动几个周期的复制，使 HPV 保持在 20-50 个拷贝数。之后在维持期，随着细胞每进入 S 期而复制一次，期间是通过 E2 蛋白调节 E1、E2 的表达来调节病毒拷贝数的[5]，当病毒拷贝数及 E2 蛋白数量较低时，E2 蛋白激活启动子上调 E1、E2 蛋白，进而启动复制增加拷贝数[5]。当拷贝数及 E2 蛋白数量过高时，E2 蛋白抑制转录，进而降低拷贝数[5]。这样使得 HPV 病毒载量保持稳定。

随着 HPV 基因组的复制和宫颈上皮细胞的分裂，一些上皮细胞离开基底层并开始分化，未被 HPV 感染的基底层细胞在分化为角质细胞后即停止分裂，细胞核也逐步退化；而 HPV 感染的细胞在分化的同时仍然保持分裂和增殖活性，并促使病毒 DNA 复制，使每个细胞中病毒基因组的拷贝数达到并维持在几百，甚至几千拷贝[3]，这便是扩增期。研究证实在扩增期，HPV 的大量复制与 E7 蛋白的表达密切相关[6]。

3 E7 蛋白在复制中的作用

细胞周期的进行依赖不同的细胞周期素依赖性激酶(Cyclin-dependent kinase,CDK) 及细胞周期素依赖性激酶抑制剂(CDK inhibitor)。CDK2 使细胞进入并完成 S 期（DNA 合成期）。CDK2 的功能通过与 CyclinE 和 CyclinA 的结合而被激活，通过与 CDK 抑制剂 p21、p27、p57 结合而被抑制[8]。

病毒的复制和增殖与宫颈上皮细胞的分化状态紧密相关[7]，E7 蛋白是含有约 100 个氨基酸偏酸性的多肽，它能使终分化了的上皮细胞再次进入增殖分裂期，HPV-DNA 得以完成复制，具体过程如下。

E7 蛋白通过与抑癌基因 RB 蛋白结合，使 pRB 释放转录因子 E2F，E2F 通过增强 CyclinE 和 CyclinA 的转录，上调 CDK2 的活性[9]；E7 蛋白还可以消除 p21、p27 对细胞周期的抑制功能[18]。CDK2 的激活及 p21、p27 的抑制，最终使已分化了的宫颈上皮细胞重新进入 S 期。CDK2/CyclinE 复合体也可以使 E1 蛋白磷酸化，磷酸化的 E1 蛋白在复制起始时完成核定位[10]。宿主细胞进入 S 期后，病毒 DNA 随着这宿主细胞的复制而复制，并在最表层的细胞中完成 L1、L2 的表达及组装。

E7 蛋白诱导宿主细胞进入 S 期的同时，也通过激活 CDK2 使着丝粒非常态下复制，导致染色体结构不稳定[11]。E7 蛋白还能延迟染色质及胞核分裂后期的状态，可使染色体融合，同时可能为双链 DNA 断裂提供的机会[12]。由此我们推测，若 E7 蛋白持续高表达，除了会诱导 HPV DNA 复制外，还会导致宫颈上皮细胞的染色体不稳定，最终导致宫颈癌。这为宫颈癌的发病机制提供新研究思路。

已有研究发现，在宫颈病变组织中 HPV 以不同的物理状态存在，可为完全游离态，可为完全整合态，也可以是包含游离态和整合态的混合状态。HPV 主要通过 E2 基因断裂与宿主细胞整合，HPV E2 基因断裂，解除对 E7 基因的抑制作用，E7 蛋白的高表达引起 HPV DNA 的大量复制，同时也使细胞核持续处于增殖、分裂状态，增加细胞癌变的风险。

近年来学者 Cheung、Chan、Cricca 等[13,14,15]发现：E2 基因破坏是由 HPV 整合引起的导致宫颈病变进行性进展的一个重要事件，并且 E2 基因的破坏程度与宫颈病变的进展呈正相关性，整合导致的 E2 基因大片段破坏的致癌风险明显高于小片段破坏者。

2007 年，Cricca 等[16]通过 RT-PCR 等方法研究意大利患者发现：E2/E6 比值可以反映宫颈病变的进展情况，且宫颈病变程度与 E2/ E6 比值呈负相关关系，E2/ E6 比值越小，宫颈病变恶性程度就越高。

2008 年，Saunier 等[17]进一步研究认为当 HPV16 的病毒载量高于 22 000 copies/ 103cells 和 E2/ E6 比值低于 0. 50(被认为是截止值)时可认为患者罹患 HSI L，甚至更恶级别的病变。

因 HPV-DNA 在复制时 E6、E7 均不断裂，故 E2/E7 和 E2/E6 用来检测断裂比率的临床价值相似。

4 结 语

当 HPV-DNA 完整时，E7 只有微量的表达，当 HPV-DNA E2 基因断裂后，E7 蛋白高表达，E7 蛋白使细胞核处于不稳定状态是一个累积效应，这可能是宫颈癌发生前一般会经历不同病变程度的原因，故癌前病变中 E2、E7 的研究，为宫颈癌前病变的评估及预后提供理论依据，同时也为抗 HPV 药物的开发提供了新的思路，有望为治疗性疫苗的研究成功提供科学依据。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献(References)

[1] Heilman, C.A., Engle, L., Lowy, E.D.R., and Howly, P.M. (1982). Virus-specific transcription in bovine papillomavirus-transformed mouse cell[J].Virulogy,119, 22:34

[2] Amin AA, Titolo S, Pelletier A, et al. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro[J]. Virology, 2000, 272(1): 137-150

[3] 吕涛,马正海. 人乳头状瘤病毒复制机制的研究进展[J].生命科学, 2010,22(8): 743-747
Tao Lv, Zhenghai Ma, Progress in human papillomavirus replication [J].life Science, 2010, 22(8): 743-747

[4] Meyer, C., Frattini, M.G., Hudson, J.B., and Laimins, L.A.(1992).Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation[J]. Science, 257(5072): 971-973

[5] Steger,G.,,and Corbach,S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type18 by the virus E2 protein[J]. J.Cancer,1997, 43: 672-676

[6] Cheng,S.,Schmidt-Grimminger,D.C.,Murant,T.,Broker,T.R.,andChow, L.T. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes[J]. Genes Dev, 1995, 9: 235-239

[7] Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(2): 362-372

[8] Massague.J. (2004).G1 cell-cycle control and cancer [J].Nature,2004, 432:298-306

[9] Martin,L.G.,Demers,G.W.,and Galloway,D.A.,(1998).Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E [J].J. Virol,1998,72:975-985

[10] Lin,B.Y., Ma,T., Liu, J.S., Kuo, S.R., Jin, G., Broker, T.R., Harper, J. W., and Chow, L.T.(2000). Hela cellls are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA Replic ation [J]. J.Biol.Chem, 2000, 275: 6167-6174

[11] Duensing,S., and Munger, K.(2004).Mechanisms of genomic instability in human canser:insights from studies with human papillomavirus oncoproteins[J].Int.J.Cancer, 2000, 109:157-162

[12] Duensing,S.,and Munger,K. (2002).The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability[J].Cancer Res,2002,62:7075-7082

[13] Cheung J L, Lo K W, Cheung T H, et al . Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 in fection in cervical neoplasia [J]. J In fect Dis, 2006, 194 (12):1706-1712

[14] Chan P K, Cheung J L, Cheung T H, et al. Profile of viral load, integration, and E2 gene disruption of HPV58 in normal cervix and cervical neo2 plasia[J]. J In fect Dis, 2007, 196 (6): 8682875

[15] Cricca M,Venturoli S, Leo E, et al. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions [J] . J Virol Methods,2009,158 (122):180-183

[16] Cricca M,Morselli2 Labate AM,Venturoli S, et al. Viral DNA load , physical status and E2/ E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high2grade cervical lesions [J].G ynecol Oncol,2007,106 (3): 549-557

[17] Saunier M, Monnier2Benoit S, Mauny F, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV162in fected women with high2grade lesions or cervical carcinoma[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46 (11): 3678-368

[18] Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D.A.(1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein[J].Genes Dev,1997, 11: 2090-2100

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net