HPV-16 *URR*突变对病毒早期启动子活性影响的研究

宋　丹[1]，史　茜[1]，侯向前[1]，玛依努尔·尼亚孜[2]，马正海[1]

1. 新疆大学生命科学与技术学院，新疆 乌鲁木齐 830046；
2. 新疆维吾尔自治区人民医院妇产科，新疆 乌鲁木齐 830001

［摘要］ **背景与目的：**新疆是宫颈癌高发区，该地区宫颈癌高发与人乳头瘤病毒16型(human papillomavirus type 16，HPV-16)感染密切相关。该研究旨在分析新疆地区妇女宫颈病样组织中HPV-16上游调控区(upstream regulatory region，*URR*)的突变及其功能。**方法：**以新疆妇女子宫颈上皮非典型增生(cervical intraepithelial neoplasia，CIN)和宫颈癌病样组织标本DNA为模板，PCR扩增HPV-16 *URR*片段，PCR产物经测序比对，筛选代表性的*URR*突变体构建至pGL3-Basic载体，将其转染Vero细胞，48 h后检测荧光素酶活性，分析*URR*突变体启动子活性。**结果：**采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction，PCR)获得了55个HPV-16 *URR* DNA片段，测序及序列分析发现44个突变位点，其中nt7192(G→T)、nt7433(-→T)、nt7435(C→G)和nt7863(A→-)4个位点的突变为所有序列共有，nt7520(G→A)位点的突变存在于54个样品中，剩余39个位点的突变存在于不同样品中。根据突变的位置、频率和程度，筛选出9个*URR*突变体分别克隆至pGL3-Basic中荧光素酶基因前并转染Vero细胞。荧光素酶活性分析表明，不同*URR*突变体的启动子活性差异较大，来源于宫颈癌的*URR*突变体启动子活性显著高于来源于CIN的*URR*突变体($P<0.01$)，部分宫颈癌*URR*突变体的启动子活性显著高于SiHa和Caski细胞来源的*URR*参照序列的启动子活性。**结论：**新疆地区分离的HPV-16 *URR*发生多位点突变，其中部分突变增强了*URR*内部启动子的活性，导致HPV-16致癌活性增强。

［关键词］ 人乳头瘤病毒16型；上游调控区；突变；启动子

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.02.005

中图分类号：R737.33　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-3639(2017)02-0109-06

The effect of mutations in the upstream regulatory region of HPV-16 on the activity of virus early promoter

SONG Dan[1], SHI Qian[1], HOU Xiangqian[1], MAYINEUR·Niyazi[2], MA Zhenghai[1] (1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China; 2. Gynecology and obstetrics Xinjiang Uyghur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Correspondence to: MA Zhenghai E-mail: mzhxju@126.com

［**Abstract**］ **Background and purpose:** The incidence of cervical cancer is rather high in Xinjiang, which is closely associated with the infection of human papilloma virus type 16 (HPV-16). The purpose of this study was to analyze the variants and function of HPV-16 upstream regulatory region (*URR*) in the tissues of cervical cancer biopsies from Xinjiang. **Methods:** The DNAs were extracted from the tissues of cervical epithelial atypical hyperplasia (CIN) and cervical cancer biopsies. HPV-16 *URR* segments were amplified by PCR. Based on the sequence analysis of the *URR*, the representative *URR* variants were selected and cloned into pGL3-Basic. The recombinant plasmids were transfected into Vero cell lines respetively. Luciferase activity of transfected cells was detected 48 h after transfection. **Results:** Fifty-five HPV-16 *URR* DNA fragments were obtained through PCR, and 44 mutations were found from the *URR* fragments. 4 of these mutations, including nt7192(G→T) , nt7433(- →T), nt7435 (C→G) and nt7863 (A→-) occurred in all sequences. The mutation at nt7520 (G→A) occurred in 54 *URR* sequences, and the 39 other mutations were present in different samples. Based on the location and frequency of the mutations in the *URR* fragments, 9 *URR*

基金项目：国家自然科学基金项目(31060025)。
通信作者：马正海　E-mail：mzhxju@126.com

variants were selected and cloned into pGL3-Basic. Then the luciferase activity of the cells transfected with pGL3-*URR* plasmids was detected respectively. Promoter activity of *URR* mutants from cervical cancer are significantly higher than that of *URR* mutants from CIN (P<0.01). Promoter activity of *URR* fragments from some cervical cancer was significantly higher than that of the *URR* fragments from SiHa and Caski cells. **Conclusion:** Multiple mutations occurred in HPV-16 *URR* of cervical cancer patients from Xinjiang. The promoter activity and carcinogenicity of some *URR* mutants have been enhanced.

［**Key words**］ Human papillomavirus type 16; Upstream regulatory region; Mutation; Promoter

人乳头瘤病毒16型(human papillomavirus type 16，HPV-16)为无囊膜的小型双链环状DNA病毒，可引起皮肤和黏膜的良性或恶性肿瘤。HPV的基因组全长约7 900 bp，分为早期区(*E*区)、晚期区(*L*区)和上游调控区(upstream regulatory region，*URR*)，*E*区编码具有转化活性的E6、E7蛋白以及调控病毒复制和基因表达的E1和E2蛋白，*L*区编码病毒衣壳蛋白，*URR*区包含病毒DNA复制起点(origin of replication，Ori)、*E*区启动子P97和调控病毒基因转录的多个顺式作用元件。

新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区，在前期研究中发现新疆妇女宫颈癌活检组织标本中分离的*HPV*-16 *E6*[1]、*L1*[2]、*L2*[3]基因以及*URR*[4]均发生突变，其中*URR*的突变最为频繁。本研究扩大宫颈癌病样数进一步分析新疆地区*HPV*-16 *URR*突变，并分析*URR*突变体内的启动子活性，以探讨新疆地区*HPV*-16 *URR*突变与宫颈癌高发间的内在联系。

1 材料和方法

1.1 宫颈病变组织

收集宫颈上皮内瘤样病变Ⅰ(cervical intraepithelial neoplasiaⅠ，CINⅠ)10例、宫颈上皮内瘤样病变Ⅱ(cervical intraepithelial neoplasiaⅡ，CINⅡ)10例、宫颈上皮内瘤样病变Ⅲ(cervical intraepithelial neoplasia Ⅲ，CIN Ⅲ)27例和宫颈癌(cervical cancer，CC)组织标本51例。组织样本都来自新疆维吾尔自治区人民医院妇产科，均经病理学诊断。

1.2 质粒及细胞

非洲绿猴肾细胞Vero为永生化细胞，大肠杆菌DH5α和载体pGL3-Basic均为本实验室保存；SiHa和Caski均为整合了*HPV*-16基因组的宫颈癌细胞系，其*URR*作为阳性对照。

1.3 主要试剂

Ex Taq DNA聚合酶、DNA marker、T_4 DNA连接酶和限制性内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司；DNA切胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司；细胞转染试剂盒Lipofectamine™2000 Reagent购自美国 Invitrogen公司；引物合成与测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.4 *HPV*-16 *URR*基因扩增

分别以新疆妇女宫颈病样组织基因组以及SiHa和Caski细胞基因组为模板，用*HPV*-16 *URR*特异性引物扩增*URR*片段，上游引物序列为：5'-GCTTGTGTAACTATTGTGTCA-3'，下游引物序列为：5'-GTCCTGAAACATTGCAGTTCTCT-3'，聚合酶链反应(polymerase chain reaction，PCR)扩增参数为：95 ℃ 5 min；94 ℃ 45 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35个循环；72 ℃ 7 min；4 ℃终止。PCR产物回收后测序。

1.5 递归式PCR扩增*W12 URR*基因

永生化上皮细胞W12源自人类宫颈CINⅠ病变组织，*W12 URR*序列*P97*启动子活性较弱[5]，因此作为阴性对照组。根据GenBank报道的*W12*序列(GenBank accession no.AF125673)设计引物，递归式PCR扩增得到*W12 URR*片段。

1.6 *HPV*-16 *URR*基因筛选及构建重组质粒

测序后对*HPV*-16 *URR*序列进行分析，根据突变位点及频率筛选出具有代表性的突变株，将其构建至pMD18-T，同时将*W12 URR*片段构建至pMD18-T，重组质粒经*Hin*d Ⅲ与*Kpn* Ⅰ双酶切获得*URR*片段和*W12 URR*片段，与同样酶

切的pGL3-basic载体在T_4连接酶作用下于16 ℃过夜连接，连接产物转化至大肠杆菌DH5α菌株中，在含Amp+琼脂平板上挑选单菌落，增菌培养后以碱裂解法小量提取重组质粒，经*Hin*d Ⅲ与*Kpn* Ⅰ双酶切鉴定重组质粒，并对酶切鉴定正确的质粒进行DNA测序鉴定。

1.7 荧光素酶检测分析

Vero细胞铺入12孔板，细胞长至约80%时，pGL3-URR转染Vero细胞，pGL3-basic空载体作为空白对照，SiHa和Caski *URR*重组质粒为阳性对照，*W*12 *URR*重组质粒为阴性对照，每组6个复孔，转染48 h后收集细胞，检测荧光素酶的活性。

1.8 统计学处理

采用SPSS 19.0软件对数据进行处理。求每组平均值和方差，对实验组与对照组进行两组数据的成组*t*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 宫颈病样*URR*突变基因分析

以宫颈病样DNA为模板进行PCR扩增，共得到55个大小约为750 bp的*URR*片段，其中CIN来源的*URR*片段13个，宫颈癌来源的*URR*片段42个，测序后与公布的德国标准株*URR*序列(GI：333031)进行比对，发现44个位点发生突变，其中nt7192(G→T)、nt7433(-→T)、nt7435(C→G)和nt7863(A→-)4个位点的突变为所有序列共有，nt7520(G→A)位点的突变存在于54份样品中，这5个位点的突变在新疆地区趋于恒定；其余39个位点的突变在部分样品中存在，分析结果见表1。

2.2 筛选*URR*突变体并构建pGL3-URR重组质粒

根据上述*URR*序列突变的位置、频率和程度，筛选出9个*URR*突变体并克隆入pGL3-Basic载体，获得重组质粒pGL3-URR-CIN Ⅰ、pGL3-URR-CIN Ⅱ、pGL3-URR-CIN Ⅲ、pGL3-URR-CC1、pGL3-URR-CC2、pGL3-URR-CC3、pGL3-URR-CC4、pGL3-URR-CC5和pGL3-URR-CC6，筛选的9个*URR*片段突变情况见表2。上述重组质粒经*Kpn* Ⅰ和*Hin*d Ⅲ酶切产生约5 400 bp的质粒片段和约750 bp的*URR*片段，与预期结果相符，说明重组质粒pGL3-URR构建正确(图1)。

表 1　宫颈癌和子宫上皮非典型增生组织中*HPV*-16 *URR*基因序列的变异

Tab. 1　Variation of *HPV*-16 *URR* from cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia

Position	Ref.	Mutant	Mutation frequency		
			CIN	CC	Total
7116	T	C	0/13	1/42	1/55
7122	T	C	0/13	1/42	1/55
7128	T	C	0/13	1/42	1/55
7139	A	G	0/13	1/42	1/55
7167	A	G	0/13	1/42	1/55
7173	A	C	0/13	1/42	1/55
7174	A	C	0/13	2/42	2/55
7176	T	C	0/13	1/42	1/55
7192	C	T	13/13	42/42	55/55
7200	T	C	0/13	1/42	1/55
7203	T	C	0/13	3/42	3/55
7247	T	C	0/13	1/42	1/55
7269	C	T	0/13	1/42	1/55
7286	A	C	0/13	1/42	1/55
7288	A	C	0/13	1/42	1/55
7295	T	C	0/13	1/42	1/55
7332	-	G	0/13	2/42	2/55
7337	A	G	0/13	1/42	1/55
7418	A	G	0/13	1/42	1/55
7428	G	A	0/13	1/42	1/55
7433	-	C	13/13	42/42	55/55
7435	C	G	13/13	42/42	55/55
7449	T	C	2/13	13/42	15/55
7493	T	G	0/13	1/42	1/55
7520	G	A	12/13	42/42	54/55
7560	A	G	0/13	1/42	1/55
7661	A	G	0/13	1/42	1/55
7713	T	G	2/13	14/42	16/55
7729	A	C	1/13	3/42	4/55
7780	T	C	0/13	1/42	1/55
7791	C	G	0/13	1/42	1/55
7792	A	G	0/13	1/42	1/55
7820-7868	48 bp	-	0/13	1/42	1/55
7826	T	C	1/13	4/42	5/55
7841	G	A/T	0/13	4/42	4/55
7843	A	C	0/13	1/42	1/55
7855	G	A	0/13	1/42	1/55
7863	A	-	13/13	42/42	55/55
7867	G	A	0/13	1/42	1/55
7868	G	A	0/13	1/42	1/55
7874	C	G	0/13	1/42	1/55
14	C	T	0/13	1/42	1/55
24	C	T	1/13	6/42	7/55
94	G	A	0/13	1/42	1/55

-: This site had no base or missing pieces; Ref: *URR* standard steain (GI: 333031); Mutant: Mutation in the base; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; CC: Cervical cancer

表 2 代表性*URR*突变体的变异

Tab. 2 The variation of the typical *URR* mutants

Position	Ref	CIN Ⅰ	CIN Ⅱ	CIN Ⅲ	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	CC6
7167	A							G		
7173	A							C		
7192	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
7332	T	G								
7337	-				G					
7418	A						G			
7428	A				A					
7433	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C
7435	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G
7449	C	C								
7520	T	A	A		A	A	A	A	A	A
7729	A			C	C		C		C	
7820-7868	48 bp					-				
7826	T			C						
7841	G				A		A		A	
7855	G									A
7863	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7874	C				G					
24	C				T		T			

-: This site had no base or missing pieces; Ref: *URR* standard steain (GI: 333031); CIN Ⅰ: Cervical intraepithelial neoplasia Ⅰ; CIN Ⅱ: Cervical intraepithelial neoplasia Ⅱ; CIN Ⅲ: Cervical intraepithelial neoplasia Ⅲ; CC1-6: Cervical cancer 1-6

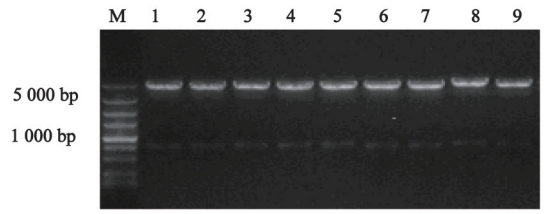

图 1 重组质粒pGL3-URR的酶切分析

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pGL3-URR

M: 5 kb DNA marker; 1-9: pGL3-URR-(CIN Ⅰ, CIN Ⅱ, CIN Ⅲ, CC1, CC2, CC3, CC4, CC5 and CC6) plasmids digested by *Kpn* Ⅰ and *Hind* Ⅲ respectively

2.3 荧光素酶活性分析

将不同*URR*突变体的pGL3-basic/*URR*重组质粒转染到Vero细胞，荧光素酶检测结果表明，不同*URR*突变体启动子活性存在较大差异，来源于宫颈癌的*URR*突变体启动子活性显著高于来源于CIN的*URR*突变体(P<0.01)。CIN(CIN Ⅰ、CIN Ⅱ、CIN Ⅲ)*URR*序列平均启动子活性是*W*12 *URR*启动子活性2.75倍，宫颈癌(CC1、CC2、CC3、CC4、CC5和CC6)*URR*序列平均启动子活性是*W*12 *URR*启动子活性12.62倍，其中*CC*2 *URR*启动子活性是*W*12 *URR*启动子活性的26倍，差异有统计学意义(P<0.01)，是对照细胞SiHa和Caski *URR*启动子活性的1.26和1.9倍，差异有统计学意义(P<0.01，图2)。

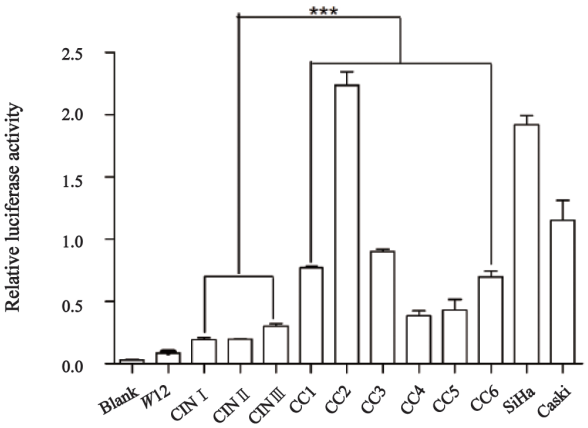

图 2 CIN和CC中*HPV*-16 *URR*片段启动子活性

Fig. 2 The promoters activity of *HPV*-16 *URR* fragments from CIN and CC

Blank: Blank control; *W*12: Control; CIN Ⅰ: Cervical intraepithelial neoplasia Ⅰ; CIN Ⅱ: Cervical intraepithelial neoplasia Ⅱ; CIN Ⅲ: Cervical intraepithelial neoplasia Ⅲ; CC1-6: Cervical cancer1-6; SiHa and Caski: Positive control

3 讨 论

HPV-16早期基因的表达由*URR*上的*P*97早期启动子启动，启动子的活性受病毒早期蛋白和转录因子等调控，*URR*的突变可增强或减弱*URR*内部启动子的活性。*HPV*-16 *URR*以两个E2蛋白结合位点为界分成3个区域：5'区、3'区和中央区。

5'区包含晚期转录产物的转录终止位点、多聚腺苷酸化位点[6]和转录调控蛋白E2结合位点[7]。3'区包含病毒的Ori，该元件在病毒DNA的复制过程中发挥重要作用，Ori长度约100 bp，是一个相对保守的区域，含E1和E2蛋白结合位点，以及其他复制必需元件。E1蛋白和E2蛋白与Ori结合形成前起始复合物并起始病毒DNA的复制[8-9]。中央区为增强子区域，全长约400 bp，两端分别是E2蛋白的结合位点，包含了多种转录因子结合位点，如特异蛋白1(specificity protein 1，SP1)[10]、细胞核因子1(nuclaer factor-1，NF-1)[11]及阴阳因子1(yin-yang factor 1，YY1)等[12]，这些转录因子通过与*URR*结合调节*P*97启动子的活性，从而影响致癌基因*E*6、*E*7的表达。

核酸杂交和*HPV*-16核苷酸序列分析表明，不同地区、不同种族及不同人群*HPV*-16阳性标本中的*HPV*-16核苷酸序列存在大量变异，且变异谱系分布有着明显的地域性[13-16]。前期研究表明新疆地区*HPV*-16的各基因均有突变，其中*URR*也发生多位点的突变，本研究扩大样本后对*HPV*-16 *URR*突变进行分析，结果表明，nt7192(G→T)、nt7433(-→T)、nt7435(C→G)和nt7863(A→-)4个位点的突变为所有*URR*序列共有，除了CIN Ⅲ样品外，nt7520(G→A)位点的突变存在于其他54份样品中。本研究发现的一些突变现已报道，7192位(C→T)和7729(A→C)在亚裔美洲型(AA)中普遍存在[4,17]，nt7449(T→C)[4]、nt7843(A→G)[17]及nt7792(A→G)[18]的突变可显著提高*URR*启动子活性，其余的突变位点尚未见报道。

*W*12为来自人类宫颈CIN Ⅰ病变组织的永生化上皮细胞，*W*12 *URR*序列*P*97启动子活性较弱[10]，SiHa和Caski均为整合了*HPV*-16基因组的宫颈癌细胞系，其*URR*启动子活性较高，可作为*URR*启动子活性研究的阳性对照[19]。有研究发现，来源于宫颈癌的*URR*突变体启动子活性显著高于来源于CIN的*URR*突变体，其中CC2的*URR*启动子活性明显高于SiHa、Caski和其他病样的*URR*启动子活性，该*URR*突变体除普遍存在的5个位点的突变外，还存在nt7820-7868间的48个碱基缺失，且缺失片段中包括E2蛋白结合位点E2BS2，nt7820-7868间一些碱基的突变能增强*URR*启动子活性[18-21]。本研究中CC2的*URR*启动子活性是*W*12 *URR*启动子活性的26倍，推测nt7820-7868间的48个碱基的缺失也会增强*URR*启动子活性。

CC1、CC3和CC5样品除普遍存在的5个位点的突变外，还存在nt7841(G→A)位点的突变，Dong等[21-22]报道，HPV-16 *URR*序列中YY1蛋白结合位点(nt7840-nt7848)和SP1结合位点(nt7842-nt7847)重叠，SP1与YY1竞争性结合该位点，本研究中CC1、CC3和CC5样品*URR*启动子活性较*W*12 *URR*启动子活性提高了7、12和8倍，推测与nt7841(G→A)突变有关，该位点的突变可能改变了YY1、SP1转录因子的结合位点，从而使得*URR*启动子活性提高。有研究报道，位于3'-*URR*末端的nt7660-nt7890片段的突变是使亚裔美洲型(AA)*URR*序列启动子活性增强的主要原因[21]。本研究发现，所有*URR*序列在nt7660-nt7890位点都存在突变，如nt7729(A→C)、nt7841(G→A)和nt7863(A→-)等，且宫颈癌*URR*序列的突变位点多于CIN *URR*序列。

本研究中除了CINⅢ样品外，nt7520(G→A)位点的突变存在于其他54份样品中，该位点的突变在亚裔美洲型(AA)中普遍存在，其启动子活性较*W*12 *URR*启动子活性提高了3.3倍[23-24]，Schmidt等[25]也发现，该位点的突变改变了YY1、SP1和AP-1等转录因子的结合位点，从而增强了HPV-16的致癌活性。另有一些突变位点已被证实可增强*URR*启动子活性，如nt7792(C→T)位的YY1结合位点突变可显著提高启动子的转录活性[18]。此外，还有一些转录因子结合位点的突变尚未见报道，如nt7729(A→C)和nt7826(T→C)，据文献报道，这两个位点分别位于NF-1和1-Oct结合位点[19]，其突变也可能影响*URR*启动子活性。

上述结果表明，新疆妇女宫颈病变组织中分离的*URR*存在多个位点突变，其中一些突变增强了*URR*内部启动子活性，从而可能促进病毒致癌基因的复制，并最终促进其致癌活性。

[参 考 文 献]

[1] 马正海, 钱 东, 马 纪, 等. 中国新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒16型*E*6基因的克隆和序列分析

［J］. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(3): 400-404.

［2］ 马正海, 张富春, 梅新娣, 等. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头状瘤病毒16型L1基因突变谱分析［J］. 中华医学杂志, 2004, 84(12): 987-991.

［3］ 马正海, 梅新娣, 张富春. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPV-16型L2基因多态性突变谱分析［J］. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12): 968-972.

［4］ 余 猛, 马正海, 王艳萍, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头状瘤16型上游调控区DNA多态性分析［J］. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(11): 1000-1004.

［5］ SCARPINI C G, GROVES I J, PETT M R, et al. Virus transcript levels and cell growth rates after naturally occurring HPV-16 integration events in basal cervical keratinocytes［J］. J Pathol, 2014, 233(3): 281-293.

［6］ ARANY I, GRATTENDICK K G, TYRING S K. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV-16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR)［J］. Antiviral Res, 2002, 55(2): 331-340.

［7］ GENTHER S M, STERLING S, DUENSING S, et al. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 *E5* gene during the productive stage of the viral life cycle［J］. J Virol, 2003, 77(5): 2832-2842.

［8］ CARSON A, KHAN S A. Characterization of transcription factor binding to human papillomavirus type 16 DNA during cellular differentiation［J］. J Virol, 2006, 80(9): 4356-4362.

［9］ SIDDIPA A, LEON K C, JAMES C D, et al. The human papillomavirus type 16 L1 protein directly interacts with E2 and enhances E2-dependent replicationand transcription activation［J］. J Gen Virol, 2015, 96(8): 2274-2285.

［10］ SHIRATSUCHI I, AKAGI Y, KAWAHARA A, et al. Expression of IGF-1 and IGF-1R and their relation to clinicopathological factors in colorectal cancer［J］. Anticancer Res, 2011, 31(7): 2541-2545.

［11］ LUCIANA B F, CHEN Z G , ELAINE F M, et al. Human papillomavirus 16 non-european variants are pereferentially associated with high-grade cervical lesions［J］. PLoS One, 2014, 9(7): e100746.

［12］ LACE M J, ISACSON C, ANSON J R, et al. Upstream regulatory region alterations found in human papillomavirus type16 (HPV-16) isolates from cervical carcinomas increase transcription, ori function, and HPV immortalization capacity in culture［J］. J Virol, 2009, 83(15): 7457-7466.

［13］ XI L F, KOUTSKY L A, HILDESHEIM A, et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18［J］. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(1): 4-10.

［14］ PIENTONG C, WONGWARISSARA P, EKALAKSANANAN T, et al. Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer［J］. Virol J, 2013, 10(1): 491-500.

［15］ KAHLA S, KOCHBATI L, HAMMAMI S, et al. Sequence variation in the E2-binding domain of HPV-16 and biological function evaluation in Tunisian cervical cancers［J］. Biomed Res Int, 2013, 2014(6): 751-759.

［16］ XI L F, KIVAT N B, HILDESHEIM A, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence［J］. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(15): 1045-1052.

［17］ KAMMER C, WARTHORST U, TORREZ M N, et al. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity［J］. J Gen Virol, 2000, 81(8): 1975-1981.

［18］ WATTS K J, THOMPSON C H, COSSART Y E, et al. Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia［J］. J Clin Microbiol, 2001, 39(5): 2009-2014.

［19］ DIPANJANA M, RATNESH K S, SRABONI M, et al. Genetic and epigenetic changes of HPV-16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and associate with disease progression［J］. Gynecol Oncol, 2011, 123(3): 597-604.

［20］ SUN Z R, LU Z T, LIU J H, et al. Genetic variations of E6 and long control region of human papillomavirus type 16 from patients with cervical lesion in Liaoning China［J］. BMC Cancer, 2013, 13(41): 4989-4994.

［21］ DONG X P, PFISTER H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16［J］. J Gen Virol, 1999, 80(8): 2097-2101.

［22］ LACE M J, YAMAKAWA Y, USHIKAI M, et al. Cellular factor YY1 downregulates the human papillomavirus 16 E6/E7 promoter, P97, *in vivo* and *in vitro* from a negative element overlapping the transcription-initiation site［J］. J Gen Virol, 2009, 90(10): 2402-2012.

［23］ PICCONI M A, ALONIO L V, SICHERO L, et al. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina［J］. J Med Virol, 2003, 69(4): 546-552.

［24］ LUIGI M, ANNA G, JOHN V, et al. Human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants stratified by cervical disease stage［J］. Infect Genet Evol, 2014, 26(100): 8-13.

［25］ SCHMIDT M, KEDZIA W, GOZDZICKA J A. Intratype HPV-16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers［J］. J Clin Virol, 2001, 23(1-2): 65-77.

（收稿日期：2016-03-15 修回日期：2016-09-10）