

人 67kD 层粘连蛋白受体在毕赤酵母中的表达及活性分析 Expression and Activity Analysis of Human 67kD Laminin Receptor in *Pichia pastoris*

连继勤¹ 戴旭芳² 甘立霞¹ 何凤田^{1*}

LIAN Ji-Qin¹ ,DAI Xu-Fang² ,GAN Li-Xia¹ and HE Feng-Tian^{1*}

1 第三军医大学生物化学与分子生物学教研室 重庆 400038

2 重庆师范大学特殊教育学院 重庆 400047

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology ,Third Military Medical University ,Chongqing 400038 ,China

2 Special Education College of Chongqing Normal University ,Chongqing 400047 ,China

摘 要 为实现人 67kD 层粘连蛋白受体(Human 67kD Laminin Receptor ,67LR)蛋白的分泌表达 ,采用 DNA 重组技术将 67LR cDNA 片段插入分泌型酵母表达载体 pPIC9K 中 ,构建了相应的重组表达质粒 pPIC9K-67LR 并在 GS115 毕赤酵母菌株中表达 ,每升培养基亲和层析可纯化目的蛋白 12.56mg。纯化的目标蛋白能够与肺癌 A549 细胞竞争性结合其配体分子 LN-1 ,具有相应的生物学活性 ,从而为深入研究人 67LR 的结构与功能奠定了基础。

关键词 67LR 毕赤酵母 蛋白质表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0602-05

Abstract To carry out the secretive expression of human 67kD laminin receptor (67LR) ,recombinant expression plasmid pPIC9K-67LR was constructed by inserting of 67LR cDNA into yeast expression vector pPIC9K. The 67LR protein was expressed in *Pichia pastoris* after induced by methanol ,and about 12.56mg electrophoresis purity 67LR could be obtained after the purification of 1L culture using affinity chromatograph column. *In vitro* competitive binding assay showed that target protein has an excellent biological activity. The successful expression of 67LR has placed a solid foundation for the research on structure and functions of 67LR.

Key words 67LR ,*Pichia pastoris* ,protein expression

肿瘤的浸润转移是导致宿主死亡的主要原因 ,是癌细胞与宿主细胞及细胞外基质之间相互作用的结果。癌细胞表面的 67kD 层粘连蛋白受体(67kD laminin receptor ,67LR)在这一过程中表达上调 ,且通过与其配体的作用而介导并参与了这一过程的发生。67LR 是层粘连蛋白(Laminin ,LN)的一种高亲和性非整合素受体 ,1983 年首次报道该受体的表达

与原发性乳腺癌腋下淋巴结转移的数量相关 ,2000 年 Hipfel 等用消减杂交技术对恶性黑色素瘤及良性黑痣组织标本中基因表达的差异进行检测 ,发现 67LR 基因的表达与肿瘤的进程有关^[1]。到 2005 年为止已有超过 12000 例对来自不同器官、不同类型的肿瘤用免疫组化方法证实了 67LR 在浸润、转移甚至肿瘤生长中的作用^[2]。因此 ,弄清 67LR 与其配

Received : December 1 ,2006 ; Accepted : March 12 ,2007.

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China(No.30400559).

* Corresponding author. Tel : + 86-23-68752262 ; E-mail : hefengtian66@tom.com

国家自然科学基金项目(No. 30400559)资助。

体的作用关系并设法抑制其活性对于肿瘤的转移抑制治疗具有重要的理论和实际意义。

67LR 是表达于细胞膜上的一种受体蛋白,从细胞中直接分离存在成本高、产率低的缺点,而原核表达产物又不具有相应的生物学活性,因此本研究将编码 67LR 的 cDNA 序列插入酵母表达载体 pPIC9K 中,转化毕赤酵母菌 GS115,获得可分泌表达 67LR 的菌株。表达菌株受甲醇诱导后,培养基上清经 SDS-PAGE 电泳可看到分子质量约为 67kD 的目的蛋白带,而空载体对照没有相应的条带。亲和纯化后 67LR 能够与肺癌 A549 细胞竞争性结合其配体分子 LN-1,具有相应的生物学活性。67LR 的表达为探索其结构与层粘连蛋白结合的分子机制并针对性制备相应的生物制剂打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

重组克隆载体 pUCm-T/67LR 由第四军医大学西京医院消化研究所樊代明院士馈赠,酵母穿梭表达载体(*Pichia-E. coli*) pPIC9K 和 *Pichia pastoris* 菌株(GS115 His⁺ Mut^s)为 Invitrogen 公司产品;LN-1、层粘连蛋白肽段(laminin fragment 929-933, YIGSR)为 Sigma 公司产品;Sephadex G-75、CNBr 活化的 Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Taq DNA 聚合酶均购自 Promega 公司;酵母培养基 Peptone、YNB(W/O)为 Difco 公司产品;生物素、羊抗驴 IgG、AP 均为 Gibco 公司产品;67LR 多抗驴血清购自 Santa 公司。

1.2 酵母表达质粒的构建

采用亚克隆策略,将 67LR cDNA 片段从 pUCm-T/67LR 克隆质粒切下并定向克隆到 pPIC9K 酵母表达质粒,酶切鉴定后进行序列测定。

1.3 酵母菌的转化与鉴定

根据 Invitrogen 公司 *Pichia* Expression Kit 制备酵母菌 GS115 感受态细胞,将线性化的酵母表达质粒 pPIC9K-67LR 在 1500V/25 μ F/200 Ω 条件下电转化。筛选在 MM 平板上生长缓慢而在 MD 平板上生长良好的菌株,玻璃珠法提取酵母总 DNA,用酵母载体通用引物(5'-GACTGGTCCAATTGA CAAGC-3'和 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3')进行 PCR 反应(反应条件为 94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 90s, 72 $^{\circ}$ C 120s),检测目的基因在酵母基因组中的整合情况。

1.4 67LR 的表达及鉴定

挑取酵母菌单克隆接种于 5mL YPD 液体培养基中,28~30 $^{\circ}$ C 培养 16~20h,离心收集菌体并重悬于 100mL BMGY 扩增培养基中,28~30 $^{\circ}$ C 培养至 A₆₀₀

= 2.0~6.0,离心收集菌体,用 200mL BMMY 诱导培养基重悬,0.5% 甲醇浓度下培养 48h,以诱导目的蛋白的表达。离心,取上清,用斑点杂交、SDS-PAGE 及 Western blot 法检测目的蛋白分泌表达情况。简要步骤如下:诱导上清直接点于硝酸纤维素膜(NC 膜)或经 SDS-PAGE 分离后以半干法电转移到 NC 膜上,将 NC 膜短暂漂洗后依次经 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,与 67LR 多抗驴血清孵育 1h,与 HRP 标记的山羊抗驴 IgG 孵育 1h,每步完成后均严格洗膜,最后加 DAB 避光显色。

1.5 67LR 的亲纯化

1.5.1 层粘连蛋白肽段与载体的偶联:按照 Pharmacia 公司的说明书,称取 1g CNBr 活化的 Sepharose 4B 凝胶,加入 2 μ g 溶于偶联缓冲液(含 0.5mol/L NaCl 的 0.1mol/L NaHCO₃ 缓冲液, pH8.3)的层粘连蛋白肽段(YIGSR)及 2mL 偶联缓冲液,温和地振动,室温下偶联 1h,用偶联缓冲液洗去未偶联的配基,测定偶联前后溶液的 A₂₈₀,计算出偶联的效率可达到 90.02%。封闭未偶联的活化位点,装柱,充分洗涤后,加入亲和柱平衡液(0.1mol/L Tris-HCl pH7.4,含 0.2mol/L NaCl,0.1% Triton X-100),4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5.2 表达上清的收集:将含重组质粒 pPIC9K-67LR 的酵母表达菌在 0.5L/1L 的 BMGY/BMMY 培养基中扩大培养并按 1.4 条件进行甲醇诱导。诱导结束后离心收集上清,过 Sephadex G-75 柱进行浓缩、脱盐和粗分离。

1.5.3 亲和层析:用亲和柱平衡缓冲液平衡透析浓缩脱盐后收集的表达上清。上样,充分混匀,结合过夜。用 20 倍柱体积的亲和柱平衡缓冲液洗脱未结合的杂蛋白,换成亲和柱洗脱缓冲液(25mmol/L Gly-HCl pH3.5 含 0.1% Triton X-100),充分解离 20min 后继续洗脱,每管收集 2mL 并加入 500 μ L 1mol/L Tris-HCl(pH7.4)缓冲液中和,测定每管的 A₂₈₀,收集第二个洗脱峰吸光度大于 0 的各管,透析浓缩后冷冻抽干保存。纯化蛋白采用毛细管电泳法测定纯度,Lowry 法测定蛋白含量。

1.6 67LR 蛋白生物活性检测

1.6.1 肺癌 A549 细胞与 LN-1 的结合分析:采用氯胺 T(chloramines T)法^[3]对 LN-1 进行放射性碘标。根据 Ghosh 的方法^[4]略做修改测定细胞与 LN-1 的结合能力。取处于对数生长期的肺癌 A549 细胞,胰蛋白酶消化后 500g 离心 5min,用 PBS 重悬并稀释成 10⁶ 个细胞/mL,每管加 100 μ L 细胞悬液,并分别加入 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 μ g ¹²⁵I 标记的 LN-1,各管体积以 PBS 补齐,相应的非特

异结合管以 PBS 代替细胞悬液进行,各组均作平行管。各管置于 4℃ 摇床结合 1h,在预先用封闭液浸泡的玻璃纤维滤膜上抽滤,用 PBS 洗涤 3 次,除去未结合的¹²⁵I-LN-1,取滤膜在 F80 放射免疫 γ 计数器上读出每管的 cpm,计算出结合量,做出结合曲线。

1.6.2 竞争结合实验:取处于对数生长期的肺癌 A549 细胞,消化后 500g 离心 5min,用 PBS 重悬并稀释成 10⁶ 个细胞/mL,每管加 100μL 细胞悬液,根据肺癌 A549 细胞与 LN-1 的结合曲线,每管加入 1.5μg¹²⁵I-LN-1(标记方法同上),各管分别加入 0、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0μg 纯化的 67LR 蛋白,各管体积以 PBS 补齐,以纯化的人可溶性增殖诱导配体 sAPRIL 作为无关受体设置对照组,相应的非特异结合管以 PBS 代替细胞悬液进行,各组均作平行管。各管置于 4℃ 摇床结合 1h,在预先用封闭液浸泡的玻璃纤维滤膜上抽滤,用 PBS 洗涤 3 次,除去未结合的¹²⁵I-LN-1,取滤膜在 F80 放射免疫 γ 计数器上读出每管 cpm,做出竞争结合曲线,求出抑制率。

2 结果

2.1 重组质粒 pPIC9K-67LR 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Not* I 将 67LR cDNA 片段从质粒 pUCm-T/67LR 上切下回收,将该片段克隆到表达载体 pPIC9K 上,然后转化大肠杆菌。重组质粒 pPIC9K-67LR 经 *Eco*R I / *Not* I 双酶切可见大小为 888bp 目的条带(如图 1),测序结果也表明 67LR cDNA 序列已成功插入 pPIC9K 质粒,且具有正确的阅读框架和编码序列。

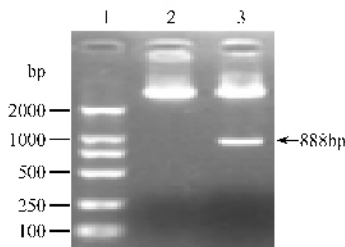


图 1 重组质粒 pPIC9K-67LR 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pPIC9K-67LR

1: DNA marker DL2000; 2: pPIC9K/*Eco*R I + *Not* I; 3: pPIC9K-67LR/*Eco*R I + *Not* I.

2.2 转化子 His⁺ Mut^s 阳性克隆的鉴定

挑取 His⁺ Mut^s 表型的转化菌株,以其基因组 DNA 为模板,用酵母 5' AOX1 和 3' AOX1 通用引物 PCR 验证目的 DNA 与酵母基因组整合状况,部分结果如图 2。由于酵母基因组 DNA 中含有与引物同源的序列,片段大小约为 2.2kb,而对空载体的扩增大小应为 492bp,因此阴性对照转化菌的扩增片段应为 2.2kb 和 492bp 两条带,而阳性转化菌扩增条带

大小应为 2.2kb 和 1.4kb(目的基因片段 888bp 加空载体片段 492bp),从图 2 中可看到与理论分子量大小相符电泳条带,表明目的基因已在酵母基因组中得到整合。

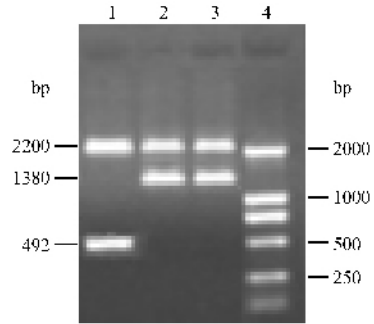


图 2 酵母转化子 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of yeast recombinants

1: pPIC9K transformant; 2, 3: pPIC9K-67LR transformants; 4: DL2000 DNA marker.

2.3 目的基因的表达检测

2.3.1 斑点杂交分析:对 A、B、C、D 四株转化菌在诱导后不同时间取样进行斑点杂交分析,结果见图 3。

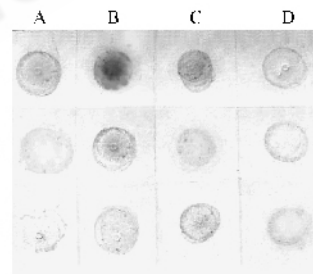


图 3 斑点杂交分析结果

Fig. 3 Dot-blot analysis of 67LR protein

A, B, C, D: A clone, B clone, C clone and D clone; 1, 2, 3: 48h, 60h and 72h after was induced respectively.

从图 3 可看出, B1(B 克隆诱导后 48h) 斑点显色最明显,说明该菌株在诱导后 48h 分泌在上清中的 67LR 蛋白浓度最大。

2.3.2 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析:挑取上述阳性克隆,并以 pPIC9K 重组酵母菌作对照进行诱导表达。甲醇诱导 48h 后取上清进行 SDS-PAGE 电泳和 Western 印迹分析。考马斯亮蓝染色表明 pPIC9K-67LR 菌株分别在 67kD 和 37kD 处出现了两条特异的蛋白带(图 4),pPIC9K 载体对照菌则没有相应条带。进一步用 Western blot 鉴定表明,杂交后可看到特异性蛋白带而对照菌则无此反应(图 5),说明此两条蛋白带为重组菌株特异表达的蛋白带,分别对应于 67LR 及其前体 37LRP。

2.4 67LR 蛋白的纯化及活性分析

收集表达上清,过 Sephadex G-75 凝胶柱后收集

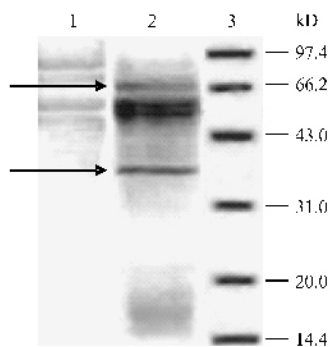


图 4 GS115/pPIC98-67LR 表达上清 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE of expressed 67LR from cultural supernatant of GS115/ pPIC9K-67LR

1 :GS115/ pPIC9K ; 2 :GS115/ pPIC9K-67LR ; 3 :protein marker.



图 5 GS115/pPIC9K-67LR 表达上清 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of cultural supernatant containing 67LR protein

1 :GS115/ pPIC9K ; 2 :GS115/ pPIC9K-67LR.

前 3 个吸收峰对应流出液进行亲和纯化, 纯化蛋白经毛细管电泳分析证实纯度达 95.3%, 每升培养基纯化蛋白量为 12.56mg, SDS-PAGE 电泳如图 6。蛋白冻干后用于配体-受体竞争结合实验。

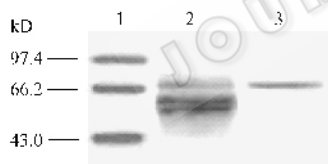


图 6 67LR 蛋白的纯化

Fig.6 Purification of 67LR from cultural supernatant

1 :protein marker 2 :elute of Sephadex G-75 3 : purified 67LR by affinity chromatography.

2.4.1 肺癌 A549 细胞与 LN-1 的结合能力: 为了观察肺癌 A549 细胞是否具有层粘连蛋白受体, 我们测定了其 与 LN-1 的结合能力。LN-1 经氯胺 T 法标记、凝胶通透层析洗脱, 标记率为 65.3%, 每 μg LN-1 的 cpm 值(比活性)为 0.91×10^6 。用 ^{125}I -LN-1 与肺癌 A549 细胞进行结合实验, 结果如图 7 所示, 呈现出与普通配体-受体结合相一致的饱和现象, 在 ^{125}I -LN-1 的加样量为 $1.5\mu\text{g}$ 处有明显的拐点, 肺癌 A549 细胞与 LN-1 的特异性结合量为 $(16.26 \pm 0.81)\text{ng}/10^5$ 细胞, 而非特异结合的剂量反应曲线呈线性和不饱和性, 占总结合量的 15% 以下。

2.4.2 纯化蛋白的竞争结合能力: 以 $1.5\mu\text{g}$ ^{125}I -LN-1 作为竞争性结合实验配体用量检测纯化样品的受

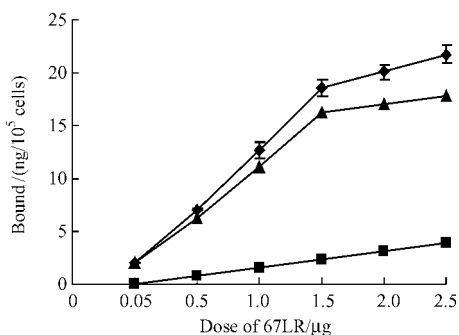


图 7 层粘连蛋白与 A549 细胞的结合曲线

Fig.7 Radiolabelled laminin binding to A549 cell

—◆— :total binding ; —▲— : specific binding ; —■— : non-specific binding.

体-配体亲和性, 从各管特异性结合 ^{125}I -LN-1 的量和抑制率曲线(图 8)可以看出, 与对照组相比, 纯化的 67LR 蛋白与 LN-1 具有较强的亲和性。当加样量为 $5\mu\text{g}$ 时, 纯化的 67LR 蛋白对肺癌 A549 细胞的竞争性抑制率可以达到 $(96.92 \pm 1.19)\%$ 。

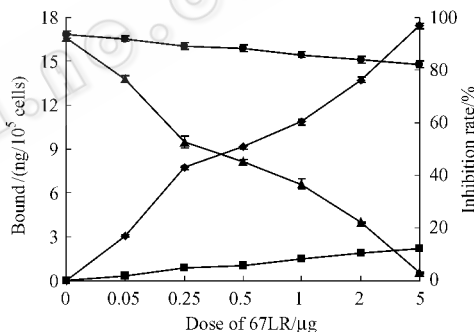


图 8 67LR 对层粘连蛋白的竞争性结合

Fig.8 Competitive binding assay

The symbols —▲— and —■— show the amount of radiolabelled laminin bound to A549 cells specifically when increasing amount of purified 67LR and sAPRIL respectively ; —◆— and —●— show the inhibition rate of 67LR and sAPRIL. Data represent duplicate determinations in two separate experiments.

3 讨论

67LR 是一种具有多种功能的蛋白质, 既可以介导细胞与细胞外基质的粘附作用, 并在多种肿瘤细胞中过表达, 促进肿瘤的浸润转移与多药耐药^[5], 又可以与导致海绵状脑病的朊蛋白结合^[6], 同时其前体蛋白还作为核糖体的一种组成成分, 参与核糖体的组装、成熟过程^[7], 而且该蛋白在生物进化过程中具有严格的保守性, 提示该蛋白可能具有更为重要的生物学功能^[8]。研究发现, 67LR 是由其 37kD 的前体(37kD laminin receptor precursor, 37LRP)蛋白通过翻译后加工依靠分子内疏水作用形成的同源或异源二聚体^[9]。37LRP 位于细胞浆内, 与核糖体结合

蛋白 p40 具有共同的序列,所以也称为 37LRP/p40,而 67LR 位于细胞膜表面,主要作为 LN 的受体介导细胞与细胞外基质的粘附,故两者在大小、分布及功能上均有一定差异。因此获得一定量的 67LR 蛋白对于研究其结构及结构与功能的关系十分必要。由于编码 67LR 与 37LRP 的 cDNA 为同一序列,利用原核表达系统得到的产物为 37LRP 而不是 67LR,从真核细胞中直接纯化往往又具有成本高而产率低的缺点。酵母细胞因兼具了原核生物繁殖快、成本低、易培养和真核生物翻译后加工的优点而成为表达外源真核基因的理想宿主细胞,甲醇营养型酵母表达系统的研究近年来更得到迅速发展。同时有研究表明,在酿酒酵母和白色假丝酵母细胞表面均有 67LR 同源物的表达且保守性极高^[10]。基于此,本研究利用 Invitrogen 公司近年来开发的多拷贝毕赤酵母表达系统对 67LR 进行了表达研究。67LR cDNA 受甲醇诱导型启动子 AOX1 调控,由 α -因子信号肽引导分泌于表达上清中,避免了胞内蛋白酶的降解并有利于产物的纯化。研究中发现,表达在上清中的目的蛋白有 67LR 和 37LRP 两种形式,且两种蛋白均可与 67LR 多抗驴血清发生特异性反应,表明诱导后细胞内表达的产物应为 37LRP,部分 37LRP 在分泌过程中二聚化形成 67LR。有关 67LR 二聚体的形式,由于目前尚未在 67LR 中鉴定到其他蛋白成分,故倾向于 67LR 是由 37LRP 经酰基化后形成的同源二聚体,本研究结果尚不能就此做出判断。利用 Sephadex G-75 凝胶柱可以将 67LR 和 37LRP 两种蛋白分开,并能够对表达上清进行浓缩和脱盐,然后利用 CNBr 活化的 Sepharose 4B 凝胶柱可以特异性地纯化到 67LR 蛋白,纯度达到 95.3%,完全能满足活性测定的要求。在小量(1L BMMY 培养基)诱导的情况下,每升培养基可纯化目的蛋白 12.56mg,可满足常规实验操作的要求。

67LR 在多种癌细胞的细胞膜表面过表达,尤其是肺癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌细胞,这种过表达与肿瘤细胞的浸润转移密切相关^[11-13]。本研究所用的肺癌 A549 细胞为高转移性癌细胞,细胞表面的 67LR 受体蛋白过表达,因此该细胞可与 67LR 的配体分子 LN-1 特异性结合,结合特征符合一般的配体与受体结合特征,具有饱和性,细胞结合实验也证明了这一点。纯化的 67LR 可与肺癌 A549 细胞膜上的 67LR 受体竞争性结合¹²⁵I-LN-1,从而使细胞所结合的¹²⁵I-LN-1 数量下降,达到抑制细胞与¹²⁵I-LN-1 结合的目的。当 67LR 用量为 5 μ g 时抑制率可以达到

(96.92 \pm 1.19)%。说明纯化的 67LR 蛋白与其配体 LN-1 具有高亲和性,具备了相应的生物学活性。

总之,本研究提供了一种获得人 67LR 蛋白的简单易行的方法,获得的蛋白能够满足进一步实验操作如结构测定、功能分析的要求,为研究 67LR 在相关疾病发生发展中的作用机理、与其配体的相互作用位点及设计针对性的生物制剂打下基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hipfel R, Schitteck B, Bodingbauer Y, et al. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2000 **82**(6): 1149-1157.
- [2] Berno V, Porrini D, Castiglioni F, et al. The 67 kD laminin receptor increases tumor aggressiveness by remodeling laminin-1. *Endocr Relat Cancer* 2005 **12**(2): 393-406.
- [3] Liu CZ(刘长征), Wang HD(王活丹), Hu YE(胡雅儿). *Experimental Nuclear Medicine and Nuclear Pharmacology*. Beijing: People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 1999. pp. 78-82.
- [4] Ghosh A, Bandyopadhyay K, Kole L, et al. Isolation of a laminin-binding protein from the protozoan parasite *Leishmania donovani* that may mediate cell adhesion. *Biochem J*, 1999 **337**(3): 551-558.
- [5] Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett* 2005 **222**(1): 1-10.
- [6] Vana K, Weiss S. A trans-dominant negative 37kD/67kD laminin receptor mutant impairs PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *J Mol Biol* 2006 **358**(1): 57-66.
- [7] Jaseja M, Mergen L, Gillette K, et al. Structure-function studies of the functional and binding epitope of the human 37 kD laminin receptor precursor protein. *J Pept Res* 2005 **66**(1): 9-18.
- [8] Jang W, Kim KP, Schwob JE. Nonintegrin laminin receptor precursor protein is expressed on olfactory stem and progenitor cells. *J Comp Neurol* 2007 **502**(3): 367-381.
- [9] Buto S, Tagliabue E, Ardini E, et al. Formation of the 67kD laminin receptor by acylation of the precursor. *J Cell Biochem*, 1998 **69**(3): 244-251.
- [10] Rieger R, Lasmezas CI, Weiss S. Role of the 37 kD laminin receptor precursor in the life cycle of prions. *Transfus Clin Biol*, 1999 **6**(1): 7-16.
- [11] Morais Freitas V, Nogueira da Gama de Souza L, Cyreno Oliveira E, et al. Malignancy-related 67kD laminin receptor in adenoid cystic carcinoma. Effect on migration and beta-catenin expression. *Oral Oncol* 2007, in press
- [12] Davidson B, Risberg B, Berner A, et al. The biological differences between ovarian serous carcinoma and diffuse peritoneal malignant mesothelioma. *Semin Diagn Pathol* 2006 **23**(1): 35-43.
- [13] Branca M, Giorgi C, Ciotti M, et al. Relationship of up-regulation of 67kD laminin receptor to grade of cervical intraepithelial neoplasia and to high-risk HPV types and prognosis in cervical cancer. *Acta Cytol* 2006 **50**(1): 6-15.