

Analysis of Ovarian Epithelial Tumors for Presence of Human Papillomavirus

Seyedeh Maryam Seyed Ali Roteh¹,
Zahra Tahmasebi Fard²,
Afshin Abdirad³,
Zahra Moeini¹

¹ Young Researchers Club, Roudehen Islamic Azad University, Roudehen, Iran

² Department of Biology, Roudehen Islamic Azad University, Roudehen, Iran

³ Department of Pathology, Tehran University, Tehran, Iran

(Received January 7, 2012 ; Accepted March 3, 2012)

Abstract

Background and purpose: Ovarian tumor is a common neoplasm of the female genital tract and one of the most lethal gynecologic malignancies. The etiology of ovarian cancer remains unclear. Oncogenic viruses can contribute in different stages of the carcinogenic process. Papilloma viruses are Oncogenic viruses that could induce proliferation of epithelial cells.

Materials and methods: In this study samples were 50 Paraffin-embedded blocks of ovarian carcinoma tissue and 58 normal Paraffin-embedded blocks (without malignancy) as control group. After DNA extraction, all samples were analyzed to detect beta-globin gene and suitable samples were screened for presence of L1 HPV-Common. The data was analyzed using one-way ANOVA in SPSS 15.

Results: All positive samples for beta-globin gene were amplified by HPV-common primers. Among the samples seven of 44 (15.90%) ovarian carcinoma and five of 50 (10%) normal ovarian tissue were found positive for the common marker of HPV. Overall, 12 of 94 samples were positive (12.76%). The correlation between HPV infection and ovarian cancer was not statistically significant ($p=0.397$).

Conclusion: No significant correlation was found between HPV infection and ovarian cancer. Therefore, the results of this study do not confirm the role of HPV in ovarian cancer.

Key words: Ovarian cancer, human Papillomavirus, Polymerase chain reaction

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(87): 22-28 (Persian).

ارتباط ویروس پاپیلوماهای انسانی با تومورهای اپی‌تلیال تخمدان

سیده مریم سید علی روته^۱زهرا طهماسبی فرد^۲افشین عبدی راد^۳زهرا معینی^۱

چکیده

سابقه و هدف: سرطان تخمدان یکی از تئوپلاسم‌های شایع دستگاه تناسلی در زنان و یکی از مهم‌ترین بدخیمی‌های منجر به مرگ در بین سرطان‌های دستگاه تناسلی می‌باشد. عوامل ایجادکننده سرطان تخمدان ناشناخته است. ویروس‌های انکوژنیک می‌توانند در مراحل مختلف فرآیند سرطان‌زایی شرکت کنند. پاپیلوما ویروس‌ها، از ویروس‌های انکوژنیک می‌باشد که تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال را القاء می‌کند. لذا این مطالعه با هدف تعیین ارتباط ویروس پاپیلوماهای انسانی با تومورهای اپی‌تلیال تخمدان انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی ۵۰ بلوک پارافینی از بافت سرطان تخمدان و ۵۸ بلوک پارافینی بافت کاملاً طبیعی تخمدان (بدون ضایعه بدخیم) به‌عنوان کنترل انتخاب شدند. پس از استخراج DNA، همه نمونه‌ها برای حضور ژن بتاگلوین بررسی شدند و نمونه‌های مناسب برای حضور ژن HPV-Common L1 ارزیابی شدند. داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و نرم افزار آماری SPSS.15 تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: همه نمونه‌ها که با ژن بتاگلوین مثبت بودند با پرایمرهای HPV-Common تکثیر شدند. ۷ مورد از ۴۴ (۱۵/۹) درصد) نمونه سرطان تخمدان و ۵ مورد از ۵۰ (۱۰) درصد) نمونه بافت طبیعی تخمدان با مارکر عمومی HPV مثبت شدند. در مجموع ۱۲ نمونه از ۹۴ (۱۲/۷) درصد) نمونه مورد بررسی مثبت شدند. از لحاظ آماری بین عفونت HPV و سرطان تخمدان ($p=0/397$) ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد.

استنتاج: هیچ ارتباط معنی‌داری بین عفونت HPV و سرطان تخمدان یافت نشد که نقش HPV در سرطان تخمدان را تأیید نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: سرطان تخمدان، پاپیلوما ویروس انسانی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

مقدمه

بالینی، هنوز منشأ سلولی و مکانیسم‌های مولکولی شروع کننده و پیشرفت‌دهنده سرطان اپی‌تلیال تخمدان ناشناخته باقی مانده است (۱).

پاپیلوماویروس‌ها، اولین ویروس‌های یافت شده برای انتقال سرطان هستند که اولین بار از دستگاه تناسلی

سرطان اپی‌تلیال تخمدان چهار یا پنج‌مین عامل مرگ و میر زنان در دنیا به حساب می‌آید. فقدان آزمون‌های غربالگری برای تشخیص اولیه بیماری، پیشرفت سریع بیماری و مقاومت به شیمی درمانی سبب کاهش بقای بیماران می‌شود. علی‌رغم پیشرفت‌های

E mail: Ztahnasebi@riau.ac.ir

مؤلف مسئول: زهرا طهماسبی فرد - روده: بلوار امام، دانشگاه آزاد اسلامی واحد روده، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

۱. باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد روده

۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد روده

۳. گروه آسیب شناسی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱۱/۸ تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۱۳

آلوده خرگوش جدا شدند. همچنین تخمین زده می شود که عفونت های ویروسی در ۱۵ تا ۲۰ درصد از همه سرطان های انسانی حضور دارند. این عوامل اجباری درون سلولی، پروتئین های خاصی را کد می کنند که می توانند مسیرهای پیام رسانی سلولی نظیر کنترل تکثیر، تمایز، مرگ سلولیرا تحت تأثیر قرار دهند (۲،۳).

الگوی سرطان زایی به واسطه پاپیلوما ویروس های انسانی از مطالعات انجام شده بر روی HPV و سرطان رحم پدید آمده است. زیرا ژنوم های ویروسی در همه موارد سرطان رحم و در بیشتر ضایعات اولیه رحمی مانند بدخیمی درون اپی تلیال رحمی شناسایی شده اند (۴). ژنوم های HPV نظیر انواع ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳ و ۴۵ توانایی بالا در تغییر شکل دادن سلول های انسان دارند (۵). به همین دلیل آن ها به نام انواع با خطر بالا در نظر گرفته می شوند. آن ها دو انکو پروتئین E6 و E7 را تولید می کنند که به ترتیب برای غیر فعال کردن دو پروتئین سلولی مهار کننده تومور به نام P53 و Rb ضروری هستند. بنابراین اختلال در چرخه سلولی و ایجاد ژنوم ناپایدار در افراد آلوده منتهی به گسترش سرطان می شود (۶). این ویروس ها، DNA ویروس های کوچکی هستند که تمایل به گونه ها و بافت های خاصی دارند و تفاوت چشم گیری در توانایی تغییر شکل دهندگی سلول دارند. گرچه بیش از ۲۰۰ نوع متفاوت از آن ها شناخته شده است (۷). ولی برخی از انواع HPV، در تغییر شکل دادن سلول سنگ فرشی نظیر سرطان رحم و حفره دهان شرکت دارند. HPV-16 و HPV-18 با ضایعات بدخیمی و پیش بدخیمی مرتبط هستند (۲، ۸) در حالی که HPV-6 و HPV-11 از لحاظ ساختاری مشابه HPV-16 و HPV-18 هستند و مرتبط با رشد خوش خیم بافت نظیر زگیل ها می باشند (۸).

مطالعات انجام شده برای شناسایی این ویروس در اپی تلیال تخمدان، نتایج ضد و نقیضی را به دنبال دارد (۹، ۱۰) در مطالعات انجام شده توسط Leake و Anttila و همکارانشان عدم حضور ویروس گزارش شده (۱۱، ۱۲) و در مطالعات دیگر که توسط Kaufman

همکارانش صورت گرفت در ۱۰ مورد از ۱۲ نمونه بدخیم تخمدان، این ویروس شناسایی شد (۱۳) و در تحقیق IP و همکارانش، ۱۰ درصد نمونه های سرطانی از نظر این ویروس مثبت بودند (۱۴) همچنین، در بررسی Manditsas و همکارانش بر روی یک بیمار دارای سرطان رحم و تخمدان، HPV-16 علاوه بر ضایعات رحمی در هر دو تخمدان شناسایی شد (۱۵). در این مطالعه با روش PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی ویروس، وجود DNA پاپیلوما ویروس انسانی در بافت های طبیعی و بدخیم اپی تلیال تخمدان، مورد ارزیابی قرار گرفت تا در صورت یافتن رابطه بین آن ها، بتوان از آن برای تشخیص و درمان بیماری استفاده نمود.

مواد و روش ها

این مطالعه به صورت مورد-شاهدی انجام شد. در مطالعه حاضر از بخش سرطان بیمارستان امام خمینی، ۵۰ بلوک پارافینی با تشخیص سرطان تخمدان و ۵۸ بلوک پارافینی مربوط به بافت کاملاً طبیعی تخمدان (مربوط به سال های ۱۳۸۵ الی ۱۳۸۹)، پس از بررسی لام های آزمایشگاهی آن ها توسط پاتولوژیست محترم، انتخاب و جمع آوری شدند.

تهیه برش و استخراج DNA:

با استفاده از دستگاه میکروتوم برش های بسیار نازک ۱۰ میکرونی به تعداد ۴ عدد از بلوک های پارافینی تهیه شد و در میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری اپندورف فاقد DNase/RNase ریخته شد. برای هر نمونه از دستکش یکبار مصرف، تیغ و اپلیکاتور نو استفاده گردید. پس از دپارافینه کردن با Xylene و اتانول مطلق، بافت ها با 200 mg/ml پروتئیناز K کاملاً هضم شدند و در انتها برای غیر فعال کردن پروتئیناز K نیز از گرما استفاده شد. سپس با روش استخراج فنل-کلروفرم (۱۶) DNA نمونه ها استخراج گردید. حجم نمونه های استخراج شده تا ۵۰ میکرولیتر متغیر بود.

ارزیابی خلوص و کیفیت DNA/استخراج شده:

در این مرحله مقدار و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از فتونانومتر (IMPLEN GmbH, Germany) تعیین شد. نسبت جذب نوری^۱ در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد و نمونه‌هایی که این نسبت را در حدود ۱/۷ تا ۲ داشتند برای انجام PCR استفاده شدند. از طرف دیگر حدود ۲ میکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد برده شد تا آلودگی‌های احتمالی مشاهده شود.

طراحی آغازگرها:

در این مطالعه هدف تکثیر ژن‌های بتاگلوبین و بخش L1 از ویروس‌های عمومی پاپیلوماهای انسانی^۲ بود. به این منظور توالی ژن‌ها از سایت NCBI (۱۷) گرفته شد و با نرم‌افزار (Applied Biosystems, 3/0 Version Primer Express) پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. سپس برای اطمینان از صحت توالی‌های انتخاب شده و عدم اتصال پرایمرها به توالی‌های غیر اختصاصی ژنوم، BLAST (۱۸) انجام شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

Primer	Sequence 5'→3'	Description	PCR Product
B-globin Forward	5' GCT CGG TGC CTT TAG TGA TGG 3'		250bp
B-globin Reverse	5' CGA TCC TGA GAC TTC CAC ACT G 3'		
HPV-Common Forward	5' CgTCCMARRggAWACTgATC 3'	g=G/C R=A/C W=A/T M=A/T	450bp
HPV-Common Reverse	5' gCMCAggWCATAAAYATgg 3'	g=G/C M=A/C W=A/T Y=C/T	

انجام واکنش PCR:

برای هر نمونه، در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری حاوی Master mix لیوفلیزه (شرکت تکاپوزیست)،

1. Optical Density: OD
2. HPV-Common

۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت و یک μg از DNA استخراج شده ریخته شد. سپس با آب مقطر حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و پس از اطمینان از محکم بسته شدن درب تیوب‌ها، آن‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند.

چرخه‌های تکثیر با پرایمرهای عمومی HPV شامل یک چرخه، مرحله تخریب اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای سه دقیقه، تا جدا شدن کامل DNA هدف بود در ادامه ۴۵ سیکل وجود داشت که شامل تخریب دو زنجیره در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، چسبیدن پرایمرها در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه بود و در انتها نمونه‌ها مجدداً در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه باقی می‌مانند تا اطمینان حاصل شود که کاملاً محصول طویل شده است.

الکتروفورز در ژل آگارز (Agarose Gel Electrophoresis)

پس از تهیه ژل آگارز ۱/۵ درصد (مخلوط پودر آگارز با بافر TBE (Tris-Borate-EDTA) به آن رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) افزوده شد. سپس ۲ میکرولیتر از محصولات PCR در درون چاهک‌ها بارگذاری و الکتروفورز شدند.

نتایج به‌دست آمده با نرم افزار SPSS ویرایش ۱۵ و با آزمون تحلیل واریانس یک طرفه بررسی شد.

یافته‌ها

افراد انتخاب شده به‌عنوان شاهد میانگین سنی ۴۶/۸ ± ۱۱/۳ سال و افراد بیمار میانگین ۵۰/۲ ± ۱۳ سال داشتند (جدول شماره ۲).

پس از استخراج DNA، تمامی نمونه‌ها با پرایمرهای ژن بتاگلوبین PCR شدند. نتایج نشان می‌داد که از ۵۰ نمونه حاوی بافت سرطان تخمدان ۴۴ نمونه و از

بحث

سرطان تخمدان یکی از عوامل منتهی به مرگ و میر در میان سرطان‌های دستگاه تناسلی است. از آن‌جا که بیماری و درمان آن اثرات قابل توجهی بر کیفیت زندگی بیماران دارد بنابراین شناسایی عوامل دخیل در بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۹). علت این سرطان هنوز به خوبی شناخته نشده است اما عواملی وجود دارند که احتمال بروز آن را افزایش داده و باعث مرگ و میر زیادی می‌شوند. از دلایل آن، مبهم و غیرمشخص بودن علائم سرطان تخمدان، سرایت سلول سرطانی بر روی رحم، مثانه، روده و دیواره روده و تشخیص بیماری در مراحل پیشرفته می‌باشد (۲۰). سرطان تخمدان در مراحل اولیه خود هیچ علامتی ندارد و حتی وقتی که توده سرطانی خیلی بزرگ شود، به جز احساس چاقی شکمی و پری آن و گاهی سوءهاضمه، تهوع و بی‌اشتهایی و تنگی نفس خفیف، شکم درد، مشکلات ادراری، خونریزی‌های غیرعادی و ژینال علائم مهم دیگری وجود ندارد و بعد از گسترش وسیع آن به سختی درمان می‌شود (۲۱). از آن‌جا که تقریباً ۱۰ تا ۱۵ درصد از تومورهای اپی‌تلیال تخمدان در درجه تومورهای بالقوه با بدخیمی پایین دسته‌بندی می‌شوند و منتهی به تغییر تخمدان در مدت زمان طولانی می‌گردند، بنابراین تشخیص اولیه، شناسایی علائم و نشانه‌ها در کنترل کردن بیماری می‌تواند بسیار مهم باشد (۲۲).

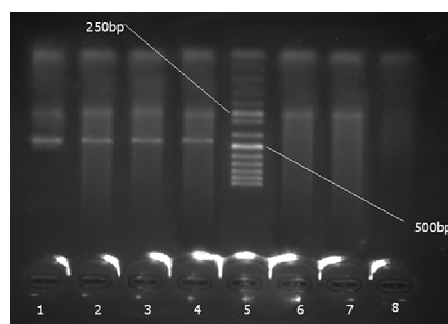
یکی از ابزارهای مهم بررسی در تحقیقات سرطان، کشت سلول‌های طبیعی اپی‌تلیال انسان است که از آن‌ها برای مطالعات مقایسه‌ای تغییرات بیان ژن‌ها و کنترل تقسیم سلولی مرتبط با تغییر شکل‌های بدخیم استفاده می‌شود (۲۳). تحقیقات زیادی که بر روی سلول‌های کشت شده تخمدان به‌عنوان مدلی برای مطالعه پیشرفت تومور اپی‌تلیالی تخمدان انجام گرفته شد، نشان می‌دهد که سلول‌های سطحی اپی‌تلیوم تخمدان^۱ انسان مدت زمان بسیار محدودی در محیط کشت رشد می‌کنند اما با تلقیح E6/E7 ویروس HPV-16 و T آنتی ژن SV40

۵۸ نمونه بافت طبیعی تخمدان ۵۰ نمونه از لحاظ کیفی جهت تست PCR مناسب بودند. در صورتی که حجم DNA استخراج شده مربوط به نمونه‌ای کمتر از ۱۰ میکرولیتر بود، آن کنار گذاشته شد. نمونه‌های مناسب با پرایمرهای عمومی HPV (که مختص ژن L1 بود) تکثیر شدند. نتایج بیانگر این بود که از ۴۴ نمونه بافت سرطان تخمدان ۷ مورد (۱۵/۹ درصد) و از ۵۰ نمونه بافت طبیعی تخمدان ۵ مورد (۱۰ درصد) مثبت شدند. در مجموع از ۹۴ نمونه مورد بررسی ۱۲ مورد (۱۲/۷ درصد) مثبت مشاهده شد و باند ۴۵۰ bp حاصل تکثیر HPV-Common بر روی ژل ظاهر گردید. در تصویر شماره ۱ قطعات تکثیر شده ژن بتاگلوبین به طول ۲۵۰ جفت باز و HPV-Common به طول ۴۵۰ جفت باز نشان داده شده است.

از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین عفونت HPV و سرطان تخمدان ($p=0/397$) وجود نداشت.

جدول شماره ۲: تعداد نمونه‌های قرار گرفته در گروه‌های سنی مختلف

تشخیص	گروه سنی (سال)					
	۷۱-۸۰	۶۱-۷۰	۵۱-۶۰	۴۱-۵۰	۳۱-۴۰	۲۰-۳۰
تعداد نمونه‌های سرطانی	۱	۳	۱۴	۲۰	۱۱	۱
تعداد نمونه‌های غیر سرطانی	-	۴	۱۵	۲۴	۱۵	-



تصویر شماره ۱: نشان‌دهنده تکثیر ژن بتاگلوبین (۲۵۰bp) و HPV DNA (۴۵۰bp) در تعدادی از نمونه‌های سرطانی و شاهد کنار کنترل مثبت و منفی: چاهک شماره ۱: کنترل مثبت، چاهک ۲: نمونه شاهد مثبت، چاهک ۳ و ۴: نمونه سرطانی مثبت، چاهک ۵: ساینز مارکر، چاهک ۶: نمونه شاهد منفی و چاهک ۷: نمونه سرطانی منفی و چاهک ۸: کنترل منفی

این سلول‌ها نامیرا می‌شوند (۲۶-۲۴). انکوژن‌های ویروسی ژنتیک این رده‌های سلولی را ناپایدار می‌کنند. اما هنوز نقش این ویروس‌ها در گسترش تومورهای اپیتلیال تخمدان روشن نشده است (۲۷).

اولین گزارش عفونت HPV در سرطان تخمدان از مطالعات Kaufman و همکارانش با استفاده از روش هیبریداسیون درجا به دست آمد که حضور HPV-6 DNA را در ۱۰ مورد از ۱۲ بیمار با بدخیمی پیشرفته اپیتلیال تخمدان نشان داده بودند (۲۸). پس از آن lahl و همکارانش DNA HPV را در سرطان‌های تخمدان با استفاده از تکنیک‌های حساس نظیر PCR و ساترن بلات گزارش کردند (۹). اما تحقیقات دیگری نیز وجود دارد که با وجود استفاده از تکنیک‌های حساس، DNA این ویروس شناسایی نشده است (۲۹).

از سویی دیگر مطالعاتی نشان دادند که سلول‌های اسپرم توانایی جذب DNA پاپیلوماویروس را دارند و DNA ویروسی را به سلول‌های بالایی ناحیه تناسلی منتقل می‌کنند (۳۰). همچنین شیوع بالای DNA HPV درون اسپرم گزارش شد و تصور بر این است که برخی اسپرم‌ها، پاپیلوماویروس‌ها را به سطح اپیتلیوم تخمدان می‌رسانند و در آنجا درون کیسه‌هایی به دام افتاده و موجب پدیدار شدن سرطان تخمدان می‌شوند (۳۱).

با توجه به نتایج حاصل از کشت سلول‌های اپیتلیال تخمدان، بررسی حضور ویروس در نمونه‌های سرطانی و تحقیقات انجام شده در زمینه نحوه رسانده شدن ویروس به تخمدان، به نظر می‌رسد که آلودگی با این ویروس شرط لازم ولی نه کافی برای ایجاد تغییرات بدخیمی باشد. زیرا این ویروس با تداخل در چرخه سلولی و تحریک چند فرآیند مولکولی، منجر به تغییر شکل بدخیمی سلول آلوده شده می‌شود. در مطالعه حاضر ۱۵/۹ درصد از نمونه‌های سرطانی و ۱۰ درصد از بافت‌های طبیعی تخمدان حاوی DNA HPV بود ولی از

لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار مشخصی بین HPV و نمونه‌های شاهد و سرطانی مشاهده نشد ($p=0/397$). نتایج ما مشابه سایر گزارشات ارائه شده توسط Kuscus (۳۲)، Wu (۳۳) و Quirk (۳۴) بود که از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین ویروس و سرطان تخمدان پیدا نکردند. ولی محققینی نظیر Kaufman (۱۳) و IP (۱۴) و نقش احتمالی ویروس در ایجاد تغییرات نوپلاستیکی در سطح اپیتلیوم تخمدان را گزارش نمودند. دلایل متعددی برای این نتایج متغیر وجود دارد که از جمله آن‌ها، تنوع ژنتیکی میزبان و ویروس، تفاوت در روش‌های تشخیصی به کار رفته، استفاده از بلوک‌های پارافینه (به‌خاطر قطعه قطعه شدن DNA در هنگام استخراج)، دخول ژنوم ویروسی به درون ژنوم میزبان که در این صورت تنها ژن‌های E6 و E7 باقی می‌مانند (این موضوع در سرطان رحم مشاهده شده است) و همچنین از دست رفتن یا بیان نشدن ژن L1 که در بیشتر تحقیقات از آن استفاده می‌شود از موارد مهمی هستند که می‌توان به آن‌ها اشاره کرد (۳۳). انجام مطالعات بیشتر اپیدمیولوژیکی، بیولوژیکی و مولکولی مورد نیاز است تا در صورت اثبات نقش مستقیم ویروس در ایجاد بدخیمی، بتوان با استفاده از داروهای ضد ویروسی مناسب در برنامه بهداشتی جوامع در خطر از شیوع این نوع سرطان جلوگیری کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن و حمایت‌های ریاست محترم آن واحد جناب آقای دکتر حیدری انجام گرفته است. در ضمن از معاونت محترم پژوهشی بیمارستان امام خمینی که در تهیه نمونه‌های آزمایشگاهی کمال همکاری داشتند و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, Katabuchi H, et al.

Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular

- oncogenes. *Carcinogenesis* 2009; 30(3): 423-431.
2. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782(3): 127-150.
 3. Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med* 1935; 62(4): 523-548.
 4. Goldhaber-Fiebert JD, Stout NK, Salomon JA, Kuntz KM, Goldie SJ. Cost-effectiveness of cervical cancer screening with human papillomavirus DNA testing and HPV-16, 18 vaccination. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(5): 308-320.
 5. Salem A. Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients. *Ann Oncol* 2010; 21(1): 13-17.
 6. Gillison ML, Shah KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; (31): 57-65.
 7. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1): 17-27.
 8. Rorke EA. Antisense human papillomavirus (HPV) E6/E7 expression, reduced stability of epidermal growth factor, and diminished growth of HPV-positive tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(17): 1243-1246.
 9. Chen TR, Chan PJ, Seraj IM, King A. Absence of human papillomavirus E6-E7 transforming genes from HPV 16 and 18 in malignant ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999; 72(2): 180-182.
 10. Lai CH, Wang CY, Lin CY, Pao CC. Detection of human papillomavirus RNA in ovarian and endometrial carcinomas by reverse transcription/polymerase chain reaction. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 38(4): 276-280.
 11. Leake JF, Woodruff JD, Searle C, Daniel R, Shah KV, Currie JL. Human papillomavirus and epithelial ovarian neoplasia. *Gynecol Oncol* 1989; 34(3): 268-273.
 12. Anttila M, Syrjänen S, Ji H, Saarikoski S, Syrjänen K. Failure to demonstrate human papillomavirus DNA in epithelial ovarian cancer by general primer PCR. *Gynecol Oncol* 1999; 72(3): 337-341.
 13. Kaufman RH, Bornstein J, Gordon AN, Adam E, Kaplan AL, Adler-Storthz K. Detection of human papillomavirus DNA in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1987; 27(3): 340-349.
 14. Ip SM, Wong LC, Xu CM, Cheung AN, Tsang PC, Ngan HY. Detection of human papillomavirus DNA in malignant lesions from Chinese women with carcinomas of the upper genital tract. *Gynecol Oncol* 2002; 87(1): 104-111.
 15. Manolitsas TP, Lanham SA, Hitchcock A, Watson RH. Synchronous ovarian and cervical squamous intraepithelial neoplasia: an analysis of HPV status. *Gynecol Oncol* 1998; 70(3): 428-431.
 16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
 17. Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J, et al. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 1996; 70(5): 3127-3136.
 18. Efstratiadis A, Posakony JW, Maniatis T, Lawn RM, O'Connell C, Spritz RA, et al. The structure and evolution of the human beta-globin gene family. *Cell* 1980; 21(3): 653-668.
 19. Montazeri A, McEwen J, Gillis CR. Quality of life in patients with ovarian cancer: current

- state of research. *Support Care Cancer* 1996; 4(3): 169-179.
20. Nguyen HN, Averette HE, Janicek M. Ovarian carcinoma. A review of the significance of familial risk factors and the role of prophylactic oophorectomy in cancer prevention. *Cancer* 1994; 74(2): 545-555.
 21. Ghayouri Azar E, Behtash N, Fakhr Jahani F. Symptoms of ovarian cancer in young patients: a case control study in Iran, 1998-2005. *J Med Counc I.R. Iran* 2006; 24(3): 250-256.
 22. Ghaem Maghami F, Modares Gilani M. A case-control study of risk factors for epithelial ovarian cancer. *Tehran Univ Med J* 2001; 59(4): 57-62.
 23. Wan TS, Chan LC, Ngan HY, Tsao SW. t(High) frequency of telomeric associations in human ovarian surface epithelial cells transformed by human papilloma viral oncogenes. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 95(2): 166-172.
 24. Maines-Bandiera SL, Kruk PA, Auersperg N. Simian virus 40-transformed human ovarian surface epithelial cells escape normal growth controls but retain morphogenetic responses to extracellular matrix. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167(3): 729-735.
 25. Nitta M, Katabuchi H, Ohtake H, Tashiro H, Yamaizumi M, Okamura H. Characterization and tumorigenicity of human ovarian surface epithelial cells immortalized by SV40 large T antigen. *Gynecol Oncol* 2001; 81(1): 10-17.
 26. Tsao SW, Mok SC, Fey EG, Fletcher JA, Wan TS, Chew EC, et al. Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs). *Exp Cell Res* 1995; 218(2): 499-507.
 27. Maeda T, Tashiro H, Katabuchi H, Begum M, Ohtake H, Kiyono T, Okamura H. Establishment of an immortalised human ovarian surface epithelial cell line without chromosomal instability. *Br J Cancer* 2005; 93(1): 116-123.
 28. Kaufman RH, Bornstein J, Gordon AN, Adam E, Kaplan AL, Adler-Storthz K. Detection of human papillomavirus DNA in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1987; 27(3): 340-349.
 29. Idahl A, Lundin E, Elgh F, Jurstrand M, Møller JK, Marklund I, et al. Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Neisseria gonorrhoeae, human papillomavirus, and polyomavirus are not detectable in human tissue with epithelial ovarian cancer, borderline tumor, or benign conditions. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202(1): 71.e1-6.
 30. Chan PJ, Seraj IM, Kalugdan TH, King A. Evidence for ease of transmission of human papillomavirus DNA from sperm to cells of the uterus and embryo. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13(6): 516-519.
 31. Chan PJ, Su BC, Kalugdan T, Seraj IM, Tredway DR, King A. Human papillomavirus gene sequences in washed human sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 1994; 61(5): 982-985.
 32. Kuscu E, Ozdemir BH, Erkanli S, Haberal A. HPV and p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26(6): 642-645.
 33. Wu QJ, Guo M, Lu ZM, Li T, Qiao HZ, Ke Y. Detection of human papillomavirus-16 in ovarian malignancy. *Br J Cancer* 2003; 89(4): 672-675.
 34. Quirk JT, Kupinski JM, DiCioccio RA. Analysis of ovarian tumors for the presence of human papillomavirus DNA. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32(2): 202-205.