

14 例人乳头状瘤病毒 16 型 E7 基因结构和变异分析

王长奇,杨志华,罗娜,陈燕萍,周开良

(江西萍矿总医院检验科,江西 萍乡 337000)

摘要: **目的** 分析江西地区宫颈癌患者 HPV16 型 E7 序列突变情况,探讨其与宫颈癌发生的相关性。**方法** 用棉拭子擦去宫颈口多余分泌物,用取样刷置于宫颈口顺时针方向旋转 5~6 周以获取足量的宫颈脱落上皮细胞。提取组织 DNA,用 HPV16 E6 特异性引物进行 PCR 扩增,对扩增的基因片段进行测序分析。**结果** 在 HPV16 E7 基因核苷酸及氨基酸序列变异中鳞癌有 6 例、CIN III 6 例和 CIN II 2 例,鳞癌和 CIN III 12 例都有氨基酸错意突变,尤以 A647G A646C C790T 多见。**结论** 表明这一地区 HPV16、A647G、A646C、C790T 变异可能与宫颈癌的发生密切相关,可能提示为致癌预警信息,为 HPV 基因变异与宫颈癌的关系研究提供更完善的理论依据。

关键词: 人乳头状瘤病毒;宫颈癌;E6 基因;E7 基因

中图分类号: R446.62, R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-1129(2014)02-0132-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-1129.2014.02.009

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 为小的双链 DNA 病毒,其中高危型 HPV 是生殖道恶性肿瘤的危险因素,与宫颈癌的发生有着密切关系^[1],尤以 HPV16 型感染率最高,约 50% 的宫颈癌患者肿瘤组织的 DNA 为 HPV16 型^[2,3],而 HPV 早期基因 E6 E7 的表达在细胞癌变过程和维持细胞恶性表型方面起着重要作用。为了分析研究江西地区 HPV16 感染的基本情况,我们从宫颈组织中分离、克隆了 HPV16 E7 基因,进行序列测定,并与网上发表的毒株比较,发现江西地方株与标准株(德国)及其他地区分离株之间存在一些变异。该株的获得,将丰富我国 HPV16 感染的流行病学资料,为 HPV 疫苗的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 采用住院病人,共 14 人;年龄在 32~78 岁之间;平均年龄 55 岁。所有病例来自赣州 6 例,鹰潭 1 例,南昌市内 3 例,九江 2 例,萍乡 2 例。病理学诊断:鳞癌 6 例,CIN III 6 例,CIN II 2 例,临床病理资料于病理科获得。同时采用 5 例宫颈脱落细胞学检查形态无异常、HPV 检测阴性标本为对照。

1.2 试剂及仪器 Taq 聚合酶、限制性内切酶、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)、异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)等购自上海生物工程有限公司,T4DNA 连接系统、DNA Marker 购自大连宝生物公司,凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。质

基金项目:江西省科技厅项目资助课题(20122BBG70108)

作者简介:王长奇,男,1955 年 12 月生,主任技师,检验专业,研究方向:临床检验及分子生物学。

粒和宿主菌 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司,宿主菌 DH5a 由比较医学中心保存。DNA 提取试剂盒,人乳头瘤病毒核酸扩增分型检测试剂盒及核酸分子杂交仪由潮州凯普生物化学有限公司提供,PCR 仪采用 ABI 公司 9700 型号。

1.3 标本采集及处理 暴露宫颈,用棉拭子擦去宫颈口多余分泌物,用取样刷置于宫颈口顺时针方向旋转 5~6 周以获取足量的宫颈脱落上皮细胞。将取样后的宫颈刷放入含有细胞脱洗保存液的加盖微量离心管(1.5ml)中,-22℃冷冻保存,保存时间不超过 3 个月。标本处理时充分洗脱宫颈刷上样本,留取含脱落宫颈细胞的洗脱液。

1.4 HPV 16 亚型的鉴定 按试剂盒说明书进行 HPV DNA 提取,PCR 扩增,核酸分子快速导流杂交,结果判读,按芯片上 HPV 亚型分布的相应着色点判读,统计出含有 16 亚型的样本。

1.5 HPV16 E7 基因扩增

1.5.1 E7 特异性引物的设计 根据已发表的 HPV16 标准株 DNA 全序列设计,跨 HPV16 E7 整个阅读框(562~858),并包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA。HPV16 E7 特异引物序列(5'-3'):上游引物:GAATTCAGAACAGCAATACAA-CAAACC 下游引物:CAAGCTTGCAGCCTCTA-CATAAAACCATC 在上下游引物 5' 端分别设计了 EcoR I 和 Hind III 酶切位点。

1.5.2 E7 基因的扩增 用 E7 特异性引物 PCR 扩增含有 16 亚型的样本 DNA,反应参数:95℃ 9min 预变性,95℃ 20s, 55℃ 30s, 72℃, 30s, 40 个循环,

72℃,延伸 5 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 HPV16 E7 基因的克隆 将 PCR 扩增的 DNA 片段经 1%琼脂糖凝胶电泳后用凝胶回收试剂盒回收,与 pGEM-Teasy 载体按常规方法连接、转化宿主菌 DH5a,通过蓝白斑和 EcoRI、HindIII 双酶切筛选阳性克隆。

1.7 HPV16 E7 基因的序列测定 HPV16 E7 基因的序列测定由上海生物工程公司完成。运用 DNA-MAN 软件对测序的 E7 基因序列进行分析。

2 结果

2.1 HPV16 E7 基因 PCR 结果 以宫颈癌组织提取

的 DNA 为模板,PCR 法扩增目的片段,经 1%琼脂糖凝胶电泳后,在约 600 bp 处可见一清晰条带,与预计片段大小一致。

2.2 HPV16 E7 基因的序列分析 运用 DNASTar 软件,将获得的地方株 HPV16 E7 核苷酸序列与网上公布的德国标准株^[9]、E7 基因序列进行比较,结果显示地方株在核苷酸水平上与德国标准株有 99.7%的同源性。

2.3 测序比对 HPV16 E7 变异核苷酸水平上一些位点的变异引起了三联密码子的改变,进而引起氨基酸的变化,另一位点突变虽然改变了三联密码子,并未导致氨基酸水平上的变化。见表 1。

表 1 E7 基因核苷酸及氨基酸序列变异表

核苷酸位置	突变碱基	密码子改变	氨基酸位置	氨基酸改变	突变株	突变率%
646	A→C	AAT→CAT	29	Asn→His	2	14.3%
647	A→G	AAT→AGT	29	Asn→Ser	7	50.0%
760	T→C	TTG→CTG	67	Leu→Leu	1	7.14%
790	C→T	CGT→TGT	77	Arg→Cys	2	14.3%
843	T→C	TGT→TGC	94	Cys→Cys	1	14.3%
846	T→C	TCT→TCC	95	Ser→Ser	1	14.3%

2.4 在 HPV16 E7 基因核苷酸及氨基酸序列变异中鳞癌有 6 例 (A647G 4 例、A646C 1 例、C790T 1 例), CIN III 6 例 (A647G 2 例、A646C 1 例、C790T 1 例、T760C 1 例、T843C 1 例), CIN II 2 例 (A647G 1 例、T846C 1 例)。在鳞癌和 CIN III 中 12 例都有氨基酸错义突变,以 A647G、A646C、C790T 多见,5 例阴性对照均未见异常。

3 讨论

大量研究表明,高危型 HPV 感染是宫颈癌发生的重要原因,特别是 HPV16,约占 HPV 阳性宫颈癌的 50%,HPV 早期基因 E6、E7 的过量表达是诱发宫颈癌的关键所在。E7 的 C 端 60 个氨基酸中存在 2 个“Cys—X—X—Cys”锌指结构,N 端 37 个氨基酸与腺病毒 E1A 和 SV40T 抗原相似,能与 pRb 结合使之失去抑癌活性,导致细胞癌变,在肿瘤组织中 HPV DNA 常整合于细胞基因组不稳定区和转录活跃区,影响这些区域的功能,如 HPV DNA 整合在 13q14,恰好是抑癌基因 Rb 所在位点^[5]。

世界不同国家和地区的学者在对本地区 HPV16E7 基因进行克隆和序列分析过程中发现,HPV16 E7 基因较为保守,但各地 HPV16 E7 基因之间仍存在一些变异。我国伍欣星报道了湖北地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 变异株^[6]有两处碱基发

生了 C→T 突变,氨基酸序列 N 端是完整的,c 端则由于基因的突变,使所编码的蛋白多肽提前终止;熊金虎报道的湖北不同地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 变异株^[7],显示武汉地区变异株只有一处碱基突变,氨基酸序列未发生改变,湖北高发区(武峰县)变异株有三处碱基突变,氨基酸序列发生了改变,但湖北地区仍以野生型为主;许雪梅报道^[8]的山东地区 HPV16 E6、E7 变异株中未发现 E7 基因突变;马正海报道的新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 E7 碱基序列和氨基酸序列与德国标准株均完全一致^[9]。从我们研究来看,HPV16 E7 碱基序列和氨基酸序列尤以 A647G 多见,占 50%,错义突变有 3 处,同义突变有 3 处,与上述作者报告基本相似。

通过对 HPV16 E7 基因序列分析、比较,可以发现 HPV16 E7 基因相对保守,但各国各地区流行株之间仍存在差异,本地区 HPV16 E7 流行株,有 6 个碱基突变,鳞癌有 6 例 (4 例 A647G、1 例 A646C、1 例 C790T), CIN III 6 例 (2 例 A647G、1 例 A646C、1 例 C790T、1 例 T760C、1 例 T843C) CIN II 2 例 (1 例 A647G、1 例 T846C), 6 例鳞癌和 6 例 CIN III 都有氨基酸错义突变,尤以 A647G 多见。本文氨基酸序列只有 2 例与标准株序列完全一致。提示 HPV16 E7 基因片段内氨基端变异相对频繁;而

A646C C790T 突变尚未见大量报道。

HPV16 E7 在核苷酸水平上均存在变异, 与国外文献报道一致^[10]。而与国内相关文献报道的 HPV16 E7“未发现变异”结论不同。这可能与样本的大小、样本的代表性、病人选择标准、实验设计、检测方法等因素存在差异有关, 此外, 亦不能除外与这一地区 E7 基因序列存在多态性有关。地区 HPV16 E7 还存在尚未见报道的突变位点, 提示这一地区 HPV16 变异具有多样性; 变异可能会增强其致癌性, 提示为致癌预警信息; 建议加强 PVI6 型 E7 内变异株检查, 做好宫颈癌患者致癌预警工作, 将为我国 HPV 基因变异与宫颈癌的关系提供更完善的理论依据。

参考文献

- [1] Das BC, Sharma JK, Gopalkrishna V, et al. A Frequency of human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinomas of Indian women as revealed by southern blot hybridization and polymerase chain reaction[J]. *J Med Virol* 1992,36(4):239.
- [2] 张志勇, 施桥发. 人乳头瘤病毒与宫颈癌关系的研究进展[J]. *实验与检验医学*, 2012,30(3):252-256.
- [3] 王长奇, 王康, 陈燕萍, 等. HPV 多重感染与宫颈病变关系的分析[J]. *实验与检验医学*, 2012,30(2):166-168.
- [4] 左亚刚, 王家璧, 许雪梅, 等. 北京地区人乳头瘤病毒 HPV16 E7 基因变异和序列分析[J]. *中华皮肤科杂志*, 2003;36:650.
- [5] Mark HF. Integration of human papillomavirus sequences in cervical tumor cell lines[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 1996,26:147.
- [6] 伍欣星, 赵文先, 丁晓华, 等. 湖北地区宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型 E7 基因的分离、克隆和序列分析[J]. *中国病毒学*, 1996,11:220.
- [7] 熊金虎, 伍欣星, 谭云. 不同地区 HPV16E7 基因的克隆及序列差异分析[J]. *中国病毒学*, 2002,17:211.
- [8] 许雪梅, 司静懿, 刘世德, 等. PRIVATE 中国山东地区妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16E6E7 基因的分离、克隆和序列分析. *中国医学科学院学报* 1999;21:185.
- [9] 高慧, 韩秋萍, 黄正芳, 等. 扬州地方株 HPV16E7 基因的克隆及序列分析. *中国麻风皮肤病杂志*, 2005,21:(6)445.
- [10] Paul KSC, Ching WL, Tak HC, et al. Human papillomavirus type 16 Variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China [J]. *Infet Dis*, 2002,186(5):696-700.

(收稿日期 2013-09-13; 收回日期 2014-02-12)

(上接第 118 页)

- Qingdao, China[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(3):545-550.
- [13] Alqahtani N, Khan WA, Alhumaidi MH, et al. Use of glycosylated hemoglobin in the diagnosis of diabetes mellitus and pre-diabetes and role of fasting plasma glucose, oral glucose tolerance Test[J]. *Int J Prev Med*, 2013, 4(9):1025-1029.
- [14] 朱小艳, 姚全良, 黄淑英. HbA_{1c} 6.5% 与 FPG 和 2hPG 诊断糖尿病性能比较[J]. *实验与检验医学*, 2013,31(2):128-130.
- [15] 李光伟, 王金平, 陈川, 等. 成人糖尿病发生模式的探讨[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(15):914-917.
- [16] Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of β -cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose [J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(5):1130-1139.
- [17] 张静漪, 刘树琴. 葡萄糖调节受损的研究现状[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2010,30(3):195-198.
- [18] Sjaarda LA, Michaliszyn SF, Lee S, et al. HbA_{1c} diagnostic categories and β -cell function relative to insulin sensitivity in overweight/obese adolescents [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35 (12):2559-2563.
- [19] Nathan DM, Kuenen J, Borg R, et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values [J]. *Diabetes Care*, 2008, 31 (8):1473-1478.
- [20] Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, et al. Defining the relationship between plasma glucose and HbA_{1c}: analysis of glucose profiles and HbA_{1c} in the Diabetes Control and Complications Trial[J]. *Diabetes Care*, 2002, 25(2):275-278.

(收稿日期 2013-12-23; 收回日期 2014-01-06)

14例人乳头状瘤病毒16型E7基因结构和变异分析

作者: [王长奇](#), [杨志华](#), [罗娜](#), [陈燕萍](#), [周开良](#)
作者单位: [江西萍矿总医院检验科, 江西 萍乡, 337000](#)
刊名: [实验与检验医学](#)
英文刊名: [Experimental and Laboratory Medicine](#)
年, 卷(期): 2014(2)

参考文献(10条)

1. [Das BC;Sharma JK;Gopalkrishna V;et al A Frequency of human papillomavirus DNA sequences incervical carcinomas of Indian women as revealed by southern blot hybridization and polymerase chain reaction](#) 1992(04)
2. [张志勇;施桥发 人乳头瘤病毒与宫颈癌关系的研究进展](#) 2012(03)
3. [王长奇;王康;陈燕萍 HPV多重感染与宫颈病变关系的分析](#) 2012(02)
4. [左亚刚;王家璧;许雪梅 北京地区人乳头瘤病毒 HPV16E7基因变异和序列分析](#) 2003
5. [Mark HF Integration of human papillomavirus sequences in cervi-caltumor cell lines](#) 1996
6. [伍欣星;赵文先;丁晓华 湖北地区宫颈组织中人乳头瘤病毒16型E7基因的分离、克隆和序列分析](#) 1996
7. [熊金虎;伍欣星;谭云 不同地区HPV16E7基因的克隆及序列差异分析](#) 2002
8. [许雪梅;司静懿;刘世德 PRIVATE中国山东地区妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒16E7基因的分离、克隆和序列分析](#) 1999
9. [高慧;韩秋萍;黄正芳 扬州地方株 HPV16E7基因的克隆及序列分析](#) 2005(06)
10. [Paul KSC;Ching WL;Tak HC Human papillomavirus type 16 Variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China](#) 2002(05)

引用本文格式: [王长奇](#). [杨志华](#). [罗娜](#). [陈燕萍](#). [周开良](#). 14例人乳头状瘤病毒16型E7基因结构和变异分析[期刊论文]-[实验与检验医学](#) 2014(2)