

宫颈癌标本中 HPV16 的早期基因 E6、E7 和 LCR 的测定分析

张明彩 王慧玲^① 新乡医学院第一附属医院病理科 (河南 新乡) 453100

中国图书分类号 R737.33 文献标识码 A 文章编号 1001-4411(2013)22-3619-03;doi:10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2013.28.26

【摘要】 目的: 分析宫颈癌标本中 HPV16 的 E6、E7 和 LCR (long control region, LCR) 的变异。方法: 对 125 份 HPV16 阳性的宫颈癌标本利用 PCR 扩增 HPV16 E6、E7 和 LCR 片段, 并对 PCR 扩增产物进行 DNA 序列测定。结果: 在 E6 最常见的变异为 T350G (100.0%), 在 E7 区最常见的变异为 T789C (87.5%), 而在 LCR 最常见的变异为 G7521A (91.1%)。此外, 在 E6 发现一个新变异 T527A, 在 LCR 区发现 4 个新变异 C13T, A7636C, C7678T 和 G7799A, 而 E7 区高度保守, LCR 变异的位点集中于 YY1 转录因子结合位点。结论: 宫颈癌中 HPV16 存在 E6、E7 和 LCR 变异, 对高危型 HPV 变异的分析有助于 HPV 的诊断和疫苗的设计。

【关键词】 乳头瘤病毒 分子遗传 宫颈癌

Analysis on HIV16 early genes E6, E7 and LCR detection in cervical cancer specimens

ZHANG Ming - Cai, WANG Hui - Ling. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, He'nan, China

【Abstract】 **Objective:** To analyze the variations of HPV16 E6, E7 and long control region (LCR) in cervical cancer specimens. **Methods:** HPV16 E6, E7 and LCR segments in 125 positive HPV16 cervical cancer specimens were amplified, and the amplification products were detected by DNA sequencing. **Results:** The most common variation of E6 was T350G (100.0%), the most common variation of E7 was T789C (87.5%), and the most common variation of LCR was G7521A (91.1%). In addition, one new variation of E6 - T527A was found, four new variations of LCR - C13T, A7636C, C7678T and G7799A were found, the locations of LCR variations focused in binding sites of YY1 transcription factor. **Conclusion:** HPV16 E6, E7 and LCR variations exist in cervical cancer, analyzing high risk HPV variations is helpful to diagnosis of HPV and design of vaccine.

【Key words】 Human papillomavirus; Molecular genetics; Cervical cancer

宫颈癌 (cervical cancer) 是危害全球妇女健康的恶性肿瘤, 其死亡率仅次于乳腺癌。我国宫颈癌每年新增病例超过 13 万, 占世界新发病例的 28.8%^[1], 每年死于宫颈癌的妇女 20 000 例, 且发病呈年轻化倾向^[2]。近二十多年来大量研究表明, 高危型 HPV 在宫颈癌的发生发展中起着十分关键的作用^[3]。HPV 为无包膜的环状双链 DNA 病毒, 基因组在人和动物中比较保守, 基因组大小约为 7 400 ~ 8 200 bp, 包括早期基因区 (E)、晚期基因区 (L) 和上游调节区 (LCR, 或称非编码区 UCR) 3 个功能区, E 区编码 E1 - E7 蛋白, L 区编码衣壳蛋白, LCR 区为非编码区, 包含许多细胞转录结合位点, 如 YY1、Oct - 1、Ap - 1 等^[4]。

对 HPV - 16 变异体发现存在 6 个不同遗传分支, 即 E (European), AA (Asian - American), Af1 (African 1), Af2 (African 2), As (Asian) 和 NA (North American)。这些变异显示不同的地理分布, 并可能具有不同的致癌潜能, 研究发现特异的型内变异可能影响 HPV 感染的持续性和从感染引起的损伤到癌的进展^[5]。HPV 的变异体也影响病毒组装、免疫反应、

病原性、p53 的降解、永生化活性和转录调节^[6]。HPV 序列的变异影响基于 PCR 诊断方法的敏感性和特异性。该研究宫颈癌标本中的 HPV16 的 E6、E7 和 LCR PCR 扩增后直接 DNA 测序, 并研究其与宫颈癌的病理分级之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 标本收集 用标准的 HPV 分型的方法对 230 份新乡医学院第一附属医院肿瘤科宫颈癌标本中的 HPV 进行分型, 其中 125 份为 HPV16 阳性。新鲜肿瘤标本用 PBS 收集, -70℃ 保存。所有患者签署知情同意书, 该研究得到了新乡医学院第一附属医院道德委员会的同意和批准。

1.2 DNA 提取和 HPV 分型 采用酚 - 氯仿抽提方法分离宫颈癌标本中高分子量的基因组 DNA。HPV 的检测和高危型 HPV - 16 和 HPV - 18 的分型用通用引物和型特异性引物进行鉴定。β - 球蛋白基因的扩增作为内部的对照。反应条件: 100 ng DNA, 10 mM Tris - Cl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, 和 dTTP 各 12.5 μM, 5 pmol 引物, 总体积为 25 μl, 0.5U Taq DNA 聚合酶 (TakaRa 公司)。反应程序: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环。引物序列

^①新乡医学院第一附属医院妇产科

见表 1。

1.3 E6、E7 和 LCR 的变异分析 PCR 扩增后用 DNA 测序仪直接测序分析。原始数据用 ABIPrism310

收集软件，用测序分析软件（Version 3.4.1）分析，并与 Genebank 的序列 No. U89348 进行比对。所有 PCR 产物都进行反向测序进一步证明结果的可靠性。

表 1 E6、E7 和 LCR 特异 PCR 的引物序列

基因	正义链	反义链	位置	长度
E6	5'-GAA ACC GGT TAG TAT AAA AGC AGA C-3'	5'-AGC TGG GTT TCT CTA CGT GTT CT-3'	83~559	476 bp
E7	5'-CCA TAA TAT AAG GGG TCG GTG GA-3'	5'-TTT TTC CAC TAA CAG CCT CTA CAT-3'	562~858	296 bp
LCR	5'-CCA TTT TGT AGC TTC AAC CCG-3'	5'-AAG TGT GGT AAC TTT CTG GGT CGC TCC TG-3'	7 437~7 456, 119~147	617 bp

1.4 变异体的鉴定 用原型序列（HPV-16R）鉴定变异体，属于欧洲亚型，作为比较的标准和核苷酸位置，变异体分成 6 个主要分支：European（E），Asian-American（AA），Asian（As），African 1（Af1），African 2（Af2），和 North American（NA）。

2 结果

2.1 HPV 分型 用 HPV 通用引物分析发现，230 份宫颈癌的标本均能检测到 HPV，其中 125 份标本感染 HPV16，占 54.3%，HPV58 占 22.4%，HPV52 占 18.5%。

2.2 HPV16 变异的鉴定 HPV16 阳性标本中，63.87% 属于 E 谱系，而 36.13% 属于 A 谱系。没有检测到 AA，Af-1，Af-2 和 NA 谱系。HPV16E 谱系含 E 原型 57.52%，和 E 变异体 42.48%。

2.3 E6 基因序列的变异 HPV-16 阳性标本中，HPV16 E6 核苷酸变异率为 61.25%，而氨基酸变异为 53.61%。E6 核苷酸变异的位点为 3 个沉默突变，即 G94A，A131C 和 T241G，6 个错义突变：G176A，T178G/T178A，A276G，T341G，T350G 和 A442C，这导致氨基酸变异为 D25N，D25E，N58S，C80G，L83V，和 E113D。最频繁的序列变异位点为第 178 核苷酸，含 T178G 和 T178A，其他的常见突变为 G94A 和 T350G。见表 2。

2.4 E7 基因序列变异 78.35% 患者 E7 基因显示 6 个突变，其中两个位点 A645C 和 A647G 是错义突变，氨基酸为 N29S 和 L28F。其余的 4 个为 G666A，T760C，T843C，T846C，导致沉默突变。氨基酸变异率为 36.54%。最常见的变异为 T789C（87.5%），G666A（35.6%），A647G（31.45%）和 T846C，而最常见的氨基酸变异为 N29S（31.57%）。

表 2 E6 基因的突变

突变类型	突变位点
沉默突变	G94A, A131C, T241G
错义	G176A, T178G/T178A, A276G, T341G, T350G, A442C

2.5 LCR 序列变异 在 LCR 发现了 32 个核苷酸变异，最常见的变异 G7521A（98.08%）。另外，首次发现了 12 个其他新变异，宫颈癌标本中 LCR 中核苷酸变异率为 100.00%。

3 讨论

HPV16 变异体导致不同的生物学、生物化学效应和致癌潜能^[7]。不同 HPV 变异体的致癌性在不同的地区之间可能有统计学差异，这可能因为人群中 HLA 等位基因的分布存在统计学差异。

HPV16E6、E7 和 L1 基因和 LCR 核苷酸序列的变异表明，E6350G 高发（原型为 350T）。这与以前的报道高度一致^[7]，这证明了宫颈癌中 350G E6 变异频率的增加，导致在 L83V 位亮氨酸变成了缬氨酸，这与宫颈损伤相关。但是，也有研究发现该变异在宫颈癌中没有重要作用^[8]。最近对印度南部宫颈癌患者的调查发现 E6 基因的 350G 的发生率为 20.00%，与本研究形成了鲜明的对比。

此次研究发现，78% 的患者有 350G 变异体，在 HPV16 E6 中核苷酸 83-144，146-25 和 351-526 高度保守，用 siRNA 或核酶治疗使 E6 表达沉默似乎非常重要。位于这些区域的氨基酸具有重要免疫原性，影响疫苗的设计。在研究中也见到氨基酸替代，如 Q14H，H78Y 和 L83V，Stoppler 等也发现这些替代。所有来源不同地理分布的 HPV16 的 E6 中均检出了 350G 变异体，单独或含其他额外的 E6 基因突变体为 81%。在 AA、NA、Af1 和 Af2 中检出 E6 存在 G145T 和 C335T 变异。在不同地区和人种中 HPV16 E7 变异稀少，这表明 HPV16 E7 较为保守，使 HPV E7 成为宫颈癌治疗的理想靶标。但是，日本、韩国、印度尼西亚报道宫颈癌患者 E7 基因的突变频率很高，为 65%~75%^[9]。

最近我国报道表明，所有宫颈癌中的 HPV16 E7 存在核苷酸变异^[10]。相比较而言，E7 也存在较高的变异，高达 78.35%。因为 E7 是保守的，在 RNA 或蛋白水平靶向 E7 更容易使其沉默，最常见的 E7 变异是 A647G。这些研究表明，癌基因 E6 和 E7 的任何变化可能导致编码的蛋白生物学功能和致癌性发生

改变,可能影响 HPV 感染的自然进程^[11]。

LCR 是不同细胞和病毒转录因子的结合位点,激活或抑制 p97 启动子活性,调节 HPV 基因的转录,特别是 E6 和 E7 原癌基因的表达。据报道,在不同的人群中 LCR 是 HPV16 变异最多的区域^[12],75% 患者存在 17 个不同的 LCR 变异体,其中 4 个是新变异: C13T, A7636C, C7678T 和 G7799A, A7636C 位于 API 结合位点。既然 LCR 是病毒转录调控的主要位点,那么观察到的变异与疾病的生物学/生物化学特征和不同的临床病理特征相关。LCR 核苷酸变异的数目最高,然后是 E6 和 E7,这与以前的报道一致^[12]。在 LCR 中最常见的变异为 G7521A,位于 YY1 结合位点,91% 病例发现,该变异抑制 HPV 转录。该突变在全球多数宫颈癌患者中发现,而在携带者中没有发现。位于 YY1 结合位点的突变能提高 p97 启动子活性 3~6 倍。LCR 中的一些突变能减弱 API 的结合活性,抑制 HPV-16 转录。由于 Oct-1 是基础转录的一个重要部分,LCR 中 Oct-1 结合位点的突变下调 HPV 的表达,所以 HPV16 LCR 中 Oct-1 结合位点突变的频率较低^[13]。

综上所述,该研究证明了 HPV16 存在型内变异,具有重要的生物学意义,对这些变异的分析有助于 HPV 诊断的开发和疫苗的设计。

4 参考文献

- 邵佳,陈曾艳,王洁,等.实时荧光定量 PCR 检测宫颈癌患者血浆 HPV 的临床意义[J].中国肿瘤外科杂志,2010,2(5):288.
- 乔友林,章文华,李凌,等.子宫颈癌基因筛查方法的横断面比较研究[J].中国医学科学院学报,2002,24(1):1.
- Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis [J]. Cancer, 1995, 76 (10 suppl): 1888.
- Phelps WC, Alexander KA. Antiviral therapy for human papillomaviruses: rational and prospects [J]. Ann Intern Med, 1995, 123 (5): 368.
- Londesborough P, Ho L, Terry G, et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities [J]. Int J Cancer, 1996, 69 (5): 364.
- Ellis JR, Keating PJ, Baird J, et al. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B*57:01 has implications for vaccine design in cervical cancer [J]. Nat Med, 1995, 1 (5): 464.
- Andersson S, Alemi M, Rylander E, et al. Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions [J]. Br J Cancer, 2000, 83 (3): 307.
- Hu X, Pang T, Guo Z, et al. HPV16 E6 gene variations in invasive cervical squamous cell carcinoma and cancer in situ from Russian patients [J]. Br J Cancer, 2001, 84 (6): 791.
- de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, et al. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and the Netherlands [J]. Gynecol Oncol, 2004, 94 (2): 488.
- Wu Y, Chen Y, Li L, et al. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China [J]. J Gen Virol, 2006, 87 (pt 5): 1181.
- Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability [J]. Cancer Res, 2002, 62 (23): 7075.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective [J]. J Virol, 1997, 71 (3): 2463.
- Sibbet GJ, Cuthill S, Campo MS. The enhancer in the long control region of human papillomavirus type 16 is up-regulated by PEF-1 and down-regulated by Oct-1 [J]. J Virol, 1995, 69 (7): 4006.

(2013-04-02 收稿)

(编校 邹庆红)

《中国妇幼保健》杂志简介

《中国妇幼保健》杂志是由中华人民共和国卫生部主管、中华预防医学会和吉林省医学期刊社共同主办的中国科技论文统计源期刊、中国生物医学核心期刊、预防医学·卫生类中文核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊(A)。本刊国内外公开发行人,国际标准连续出版物编号:ISSN1001-4411,国内统一刊号:CN22-4127/R,大16开本。辟有改革管理、健康教育、妇女保健、儿童保健、生殖健康、调查研究、更年期保健、综述、实验与基础研究、适宜技术、基层园地等栏目。

地址:吉林省长春市建设路971号, zgfybj@jl.gov.cn

邮编:130061

电话:0431-88929639 88923066