

局部细胞中 HPV16 基因表达量及突变与其宫颈持续感染的关系

唐荣荣,瞿全新,刘佳佳,李 敏

(天津医科大学第一临床学院,天津 300000)

摘要:目的 探讨宫颈脱落细胞中人乳头瘤病毒(HPV) 16 基因的表达量及突变与其宫颈持续感染的关系。方法 选取 96 例 HPV16 感染患者,其中 33 例宫颈脱落细胞 HPV16 持续阳性(持续感染组),63 例 6 个月后复查转为阴性(非持续感染组)。采用半定量 PCR 技术检测两组(宫颈脱落细胞中) HPV16 E5、E6、E7 及长控制区(LCR) 基因表达量,基因测序法检测 HPV16 E5、E6、E7 及 LCR 基因突变。结果 持续感染组 HPV16 E5、E6、E7、LCR 基因表达量分别为 0.20 ± 0.02 、 0.30 ± 0.02 、 0.19 ± 0.01 、 0.53 ± 0.02 ,非持续感染组分别为 0.17 ± 0.02 、 0.27 ± 0.03 、 0.16 ± 0.06 、 0.50 ± 0.04 ,两组比较 P 均 >0.05 。持续感染组与非持续感染组 3978A→C(I44L) 位点突变例数分别为 33、63 例,4041A→G(I65V) 位点突变例数分别为 33、63 例,4076A→T(同义突变) 位点突变例数分别为 28、31 例;两组 4076A→T 突变例数比较, $P < 0.01$ 。持续感染组与非持续感染组 E6 基因 178T→G(D25E) 位点突变例数分别为 10、4 例,两组比较, $P < 0.05$;持续感染组与非持续感染组 E7 基因 647A→G(N29S) 与 846T→C(同义突变) 联合突变例数分别为 9、8 例,两组比较, $P > 0.05$;持续感染组与非持续感染组 7761C→T 位点突变例数分别为 33、63 例, $P > 0.05$;7727A→C 位点突变例数分别为 14、4 例,两组比较, $P < 0.01$ 。结论 宫颈脱落细胞中 HPV16 基因表达量与持续性感染无密切关系,HPV16 E5、E6、LCR 基因突变与宫颈持续性感染有关,其中 HPV16 E5 4076A→T(同义突变)、E6 178T→G(D25E) 与 LCR 7727A→C 突变点可能是导致 HPV16 持续感染的关键突变位点。

关键词:人类乳头瘤病毒 16;人类乳头瘤病毒 16 基因;宫颈上皮内瘤变;宫颈癌

doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2014.03.004

中图分类号:R711.74 文献标志码:A 文章编号:1002-266X(2014)03-0011-03

Correlations of HPV16 gene expression and mutation in local cells with cervical virus persistent infection

TANG Rong-rong, QU Quan-xin, LIU Jia-jia, LI Min

(The First Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300000, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between the HPV16 gene in cervical exfoliated cells and cervical HPV16 persistent infection. **Methods** A total of 96 patients with cervical exfoliated cells were collected. After 6 months observation, among them, 33 cases were detected HPV16 persistent positive (persistent infection group), and the other 63 cases turned to be negative (non-persistent infection group). The expression and mutation of DNA in HPV16 E5, E6, E7 and long centralization control region (LCR) were detected by semi-quantitative PCR technology and gene sequencing respectively. **Results** DNA expression of HPV16 E5, E6, E7, LCR were 0.20 ± 0.02 , 0.30 ± 0.02 , 0.19 ± 0.01 , and 0.53 ± 0.02 in the persistent infection group; and 0.17 ± 0.02 , 0.27 ± 0.03 , 0.16 ± 0.06 , 0.50 ± 0.04 in the non-persistent infection group (all $P > 0.05$). For E5 gene, in the two groups, 33 and 63 were detected with mutation of 3978A→C(I44L); 33 and 63 with mutation of 4041A→G(I65V); 28 and 31 with mutation of 4076A→T ($P < 0.01$). For E6 gene, 10 and 4 were detected with mutation of 178T→G(D25E) ($P < 0.05$). For E7 gene, 9 and 8 were detected with mutation of 647A→G(N29S) and 846T→C ($P > 0.05$); 33 and 63 were detected with mutation of 7761C→T ($P > 0.05$); 14 and 4 were detected with mutation of 7727A→C ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of HPV16 DNA in cervical exfoliated cells may not be relevant to HPV16 persistent infection, but the internal genetic mutations of HPV16 E5, E6 and LCR may contributed to it. The following mutations, HPV16 E5 4076A→T (synonymous mutations), E6 178T→G(D25E) and LCR 7727A→C may be the key factors that lead to HPV16 persistent infection.

Key words: human papillomavirus 16; human papillomavirus 16 gene; cervical intraepithelial neoplasia; cervical carcinoma

基金项目:天津市卫生局科技基金资助项目(11KG101)。

作者简介:唐荣荣(1988-),女,硕士研究生,研究方向为妇科肿瘤。E-mail:971084066@qq.com

通信作者:瞿全新(1966-),女,博士研究生,主任医师,研究方向为妇科肿瘤。E-mail:cqjx@sina.com

高危亚型人乳头瘤病毒(HPV)持续感染是引起宫颈癌前病变及宫颈癌的主要原因,其中 HPV16、HPV18 是导致宫颈病变的主要亚型^[1,2]。目前,导致 HPV 持续感染的机制尚不明确,可能与病毒变异及致病能力增强、女性生殖道黏膜抗病毒免疫功能异常等多种因素有关。2013 年 7~11 月,我们采用半定量 PCR 技术检测了 HPV16 感染患者基因表达量,基因测序法检测了 HPV16 E5、E6、E7 及长控制区(LCR)基因突变,旨在探讨 HPV16 基因的表达量及突变与其宫颈持续性感染的关系,为研制有效清除 HPV16 感染的方法奠定实验基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2009 年 3 月~2013 年 7 月在天津市第一中心医院行宫颈 HPV 分型检测为 HPV16 阳性且液基薄层细胞学检查正常者 96 例,年龄 27~69 岁,未予治疗,收集其宫颈脱落细胞行 HPV 检测。随访观察 6 个月后复查,其中 33 例 HPV16 仍为阳性者(持续感染组)定义为 HPV16 持续感染,63 例转为阴性者(非持续感染组)定义为 HPV16 非持续感染。

1.2 两组 HPV16 E5、E6、E7、LCR 基因表达量及基因突变检测 采用半定量 PCR 技术检测两组 HPV16 基因表达量。提取两组宫颈脱落细胞中 HPV DNA,按照试剂盒要求进行操作。PCR 反应体系为 Goldstar Best Mix 12.5 μ L; DNase/RNase-Free H₂O 8.5 μ L;上游引物 1 μ L;下游引物 1 μ L;DNA 模板 2 μ L,共 25 μ L。扩增条件为预变性 95 $^{\circ}$ C 10 min;变性 94 $^{\circ}$ C 30s;退火 59 $^{\circ}$ C (β -actin, HPV16 E6)、54 $^{\circ}$ C (HPV16 E5)、51 $^{\circ}$ C (HPV16 E7)、50 $^{\circ}$ C (HPV16 LCR) 1min;延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min;循环 35 次,终延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min。制备浓度为 1.5%的琼脂糖凝胶,将 PCR 产物 5 μ L 依次加入上样孔进行电泳,经凝胶成像分析系统扫描成像,用 Bio-Rad 成像分析软件 Quantity One 分析结果,目的 DNA 的相对表达量=目的条带灰度值/ β -actin 条带灰度值,实验重复 3 次。将 PCR 产物切胶回收后送上海生物工程有限公司进行双侧测序,测序结果经在线 BLAST 与德国标准株(登录号 NC001526)比对,分析 HPV16 E5、E6、E7、LCR 基因突变情况。

1.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用单因素方差分析,组间差异行 LSD 检验。计数资料以率表示,组间比较用 χ^2 检。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 HPV16 E5 基因的表达量及突变比较

持续感染组与非持续感染组 HPV16 E5 基因相对表达量分别为 0.20 ± 0.02 、 0.17 ± 0.02 ,两组比较, $P > 0.05$ ($F = 0.691$);3978A $\rightarrow$ C(I44L)位点突变例数分别为 33、63 例,4041A $\rightarrow$ G(I65V)位点突变例数分别为 33、63 例,4076A $\rightarrow$ T(同义突变)位点突变例数分别为 28、31 例,两组 4076A $\rightarrow$ T 突变例数比较, $P < 0.01$ ($\chi^2 = 11.61$)。

2.2 两组 HPV16 E6 基因表达量及突变比较 持续感染组与非持续感染组 HPV16 E6 基因相对表达量分别为 0.30 ± 0.02 、 0.27 ± 0.03 ,两组比较, $P > 0.05$ ($F = 0.132$)。持续感染组与非持续感染组 E6 基因 178T $\rightarrow$ G(D25E)位点突变例数分别为 10、4 例,两组比较, $P < 0.05$ ($\chi^2 = 9.975$)。

2.3 两组 HPV16 E7 基因表达量及突变比较 持续感染组与非持续感染组 HPV16 E7 基因相对表达量分别为 0.19 ± 0.01 、 0.16 ± 0.06 ,两组比较, $P > 0.05$ ($F = 0.164$);E7 基因 647A $\rightarrow$ G(N29S)与 846T $\rightarrow$ C(同义突变)联合突变例数分别为 9、8 例,两组比较, $P > 0.05$ ($\chi^2 = 3.157$)。

2.4 两组 HPV16 LCR 基因表达量及突变比较 持续感染组与非持续感染组 HPV16 LCR 基因相对表达量分别为 0.53 ± 0.02 、 0.50 ± 0.04 ,两组比较, $P > 0.05$ ($F = 0.658$)。持续感染组与非持续感染组 7761C $\rightarrow$ T 位点突变例数分别为 33、66 例,7727A $\rightarrow$ C 位点突变例数分别为 14、4 例,两组 7727A $\rightarrow$ C 位点突变例数比较, $P < 0.01$ ($\chi^2 = 18.50$)。

3 讨论

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,我国每年新发病例占全球数量的 1/3,大量流行病学观察显示,宫颈癌与高危型 HPV 持续性感染,尤其是 HPV16 感染密切相关。虽然宫颈 HPV 病毒感染率甚高,但多数患者可在感染后 1~2 a 清除病毒,仅 4% 病毒持续感染者最终发展为宫颈癌^[3,4]。54% 宫颈癌患者可检测出 HPV16^[5],提示 HPV16 病毒致病力强,易发生感染持续状态,本研究结果显示病毒负电荷与病毒是否持续感染关系并不密切,提示病毒基因变异可能是导致其致病力改变的重要原因。因此了解 HPV16 病毒基因型内变异在宫颈 HPV16 持续感染中的特点,有助于筛选 HPV16 持续感染及宫颈高级别病变的高危患者,从而有效降低宫颈癌的发生。

HPV 为双链环状 DNA 病毒,基因长度为 7 904 bp,其中包括早期开放阅读框(E区)、晚期开放阅读框(L区)及 LCR 三部分。研究证实,E5、E6、E7、LCR 基因对 HPV 致病活性均发挥重要作用。E5 基因能与多种细胞生长因子受体结合,以促进细胞增殖^[6],

E6、E7 基因产物可分别结合 p53 与 pRb 基因产物,使其降解,从而影响细胞周期与凋亡,导致细胞癌变^[7,8],LCR 主要通过阻遏子结合位点的缺失和(或)激活因子结合能力的增强两方面增强其转录启动活性^[9]。因此检测 HPV16 E5、E6、E7、LCR 在病毒持续感染中 DNA 表达量及其基因突变显得尤为重要。本实验结果显示,两组中 E5、E6、E7、LCR DNA 相对含量相比无统计学差异,提示病毒负荷量可能与 HPV16 持续感染无关。

本研究在持续感染组与非持续感染组中均检测到 HPV16 E5、E6、E7、LCR 不同位点的基因突变。HPV16 E5 基因发现三个突变位点,即 3978A→C、4041A→G 及 4076A→T,但前两个突变位点在两组中无显著差异,而 4076A→T 突变率在 HPV16 持续感染组明显增高。E6 基因仅发现 178T→G 位点突变,而且持续感染组突变率明显高于非持续感染组。LCR 基因检测到两个突变位点,前者在两组中无显著差异,而 7727A→C 突变在持续感染组中增高。表明 HPV16 E5 基因 4076A→T、E6 基因 178T→G 及 LCR 基因 7727A→C 位点突变可能导致病毒致病力增强。Maufort 等^[10]报道 HPV16 E5 基因高表达可导致宫颈上皮细胞异常。本研究结果发现,持续感染组 HPV16 E5 基因 4076A→T 突变率增高,推测可能基因突变后与某些生长因子受体如表皮生长因子受体(EGFR)结合能力增强,调节多条信号转导通路,从而破坏细胞内在稳态性,促进细胞增殖^[11]。HPV16 E6 基因多态性与宫颈癌前病变及宫颈癌有关。Bernard 等^[12]报道,欧洲 HPV16 E6 基因 T350G (L83V)位点突变与病毒持续性感染、高级别宫颈病变及宫颈鳞癌有关。本研究结果发现,持续感染组 HPV16 E6 基因 178T→G 突变率增高,推测可能与基因突变后导致结合并降解 p53 蛋白的能力发生改变,从而影响细胞周期与细胞凋亡有关。HPV16 LCR 多态性与病毒持续性感染、高级别宫颈病变及宫颈癌关系密切^[13],LCR 基因 7727A→C 位点突变可能影响顺式作用元件内某些位点的转录与调控。Kämmer 等^[14]报道,LCR 在 HPV 第 7729 位发生 A→C 突变后,其转录活性是标准株的 2~4 倍,从而使病毒不能及时清除而导致持续感染。因此,这些位点突变可作为判断 HPV16 持续感染的高危客观指标,用以指导患者个体化检查与治疗。本研究结果发现,HPV16 E7 基因 647A→G 位点突变,但持续感染组突变率与非持续感染组差异无统计学意义,提示 E7 基因可能并不促成早期病毒的持续感染。

综上所述,宫颈脱落细胞中 HPV16 基因表达量

与持续性感染无密切关系,HPV16 E5、E6、LCR 基因突变与宫颈持续性感染有关,其中 HPV16 E5 4076A→T(同义突变)、E6 178T→G(D25E)与 LCR 7727A→C 突变点可能是导致 HPV16 持续感染的关键突变位点。了解 HPV16 基因突变特点及其生物学意义,将为宫颈癌前病变及宫颈癌的筛查、诊断及治疗以及 HPV 疫苗的研发起到关键作用。

参考文献:

[1] Jansen KU. Toward vaccines against cervical cancer [J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2004,7(2):228-232.

[2] Bo Xu, Chotewutmontri S, Wolf S, et al. Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinoma[J]. PLoS One, 2013,8(6):e66693.

[3] Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology[J]. Nature, 2010,10(12):878-889.

[4] Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, et al. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004,101(12):4030-4035.

[5] Heard I, Tondeur L, Arowas L, et al. Human papillomavirus types distribution in organised cervical cancer screening in france [J]. PLoS One, 2013,8(11):e79372.

[6] Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, et al. High-Risk Human Papillomaviruses E5 Oncoprotein Displays Channel Forming Activity Sensitive to Small Molecule Inhibitors[J]. J Virol, 2012,86(9):5341-5351.

[7] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation[J]. Nat REV Cancer, 2010,10(8):550-560.

[8] Ajiro M, Jia R, Zhang L, et al. Intron Definition and a Branch Site Adenosine at nt 385 Control RNA Splicing of HPV16 E6 * I and E7 Expression[J]. PLoS One, 2012,7(10):e46412.

[9] Xu Y, Zhang H, Xu X. Enhancement of vaccine potency by fusing modified LTK63 into human papillomavirus type 16 chimeric virus-like particles [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008,52(1):99-109.

[10] Maufort JP, Shai A, Pitot HC, et al. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2010,70(7):2924-2931.

[11] Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, et al. High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors [J]. J Virol, 2012,86(9):5341-5351.

[12] Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications [J]. Int J Cancer, 2006,118(5):1071-1076.

[13] Chen Z, Schiffman M, Herrero R, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67 [J]. PLoS One, 2011,6(5):e20183.

[14] Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez 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, 2009,81(8):1975-1981. (收稿日期:2013-12-17)

作者：唐荣荣， 瞿全新， 刘佳佳， 李敏， TANG Rong-rong， QU Quan-xin， LIU Jia-jia， LI Min
作者单位：天津医科大学第一临床学院, 天津, 300000
刊名：山东医药 ISTIC PKU
英文刊名：Shandong Medical Journal
年， 卷(期)：2014, 54(3)

参考文献(14条)

1. Jansen KU Toward vaccines against cervical cancer 2004(2)

2. Bo Xu;Chotewutmontri S;Wolf S Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinoma 2013(6)

3. Moore PS;Chang Y Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology 2010(12)

4. Van Tine BA;Dao LD;Wu SY Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning[外文期刊] 2004(12)

5. Heard I;Tondeur L;Arowas L Human papillomavirus types distribution in organised cervical cancer screening in france 2013(11)

6. Wetherill LF;Holmes KK;Verow M High-Risk Human Papillomaviurs E5Oncoprotein Displays Channel Forming Activity Sensitive to Small Molecule Inhibitors 2012(9)

7. Moody CA;Laimins LA Human papillomavirus oncoproteins:pathways to transformation 2010(8)

8. Ajiro M;Jia R;Zhang L Intron Definition and a Branch Site Adenosine at nt 385 Control RNA Splicing of HPV16 E6 * I and E7 Expression 2012(10)

9. Xu Y;Zhang H;Xu X Enhancement of vaccine potency by fusing modified LTK63 into human papillomavirus type 16 chimeric viruslike particles 2008(1)

10. Maufort JP;Shai A;Pitot HC A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis 2010(7)

11. Wetherill LF;Holmes KK;Verow M High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors 2012(9)

12. Bernard HU;Calleja-Macias IE;Dunn ST Genome variation of human papillomavirus types:phylogenetic and medical implications 2006(5)

13. Chen Z;Schiffman M;Herrero R Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes:HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67 2011(5)

14. Kammer C;Warthorst U;Torrez-Martinez N Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity 2009(8)

引用本文格式：唐荣荣. 瞿全新. 刘佳佳. 李敏. TANG Rong-rong. QU Quan-xin. LIU Jia-jia. LI Min 局部细胞中HPV16基因表达量及突变与其宫颈持续感染的关系[期刊论文]-山东医药 2014(3)