

青岛地区不同宫颈病变组织中 HPV16 E2 基因突变分析*

刘 佳,王言奎**,孙 欣,王玉婷,赵成琳

(青岛大学医学院附属医院妇产科,青岛 266003)

【摘要】 目的:探讨山东省青岛地区不同宫颈病变组织中人乳头瘤病毒 16 型 (HPV16) E2 基因序列多态性,以及序列变异与不同宫颈病变的关系。**方法:**提取 257 例宫颈脱落细胞及宫颈癌组织 DNA,PCR 进行 HPV 分型,其中 HPV16 阳性标本扩增 E2 基因,测定 PCR 产物序列。通过 DNASTar 生物软件进行核苷酸和氨基酸序列分析。**结果:**共检测出 11 个碱基突变位点,其中 10 个导致氨基酸的改变,突变热点为 nt3410 (63.2%), nt3159 (55.9%), nt3249 (55.9%)。统计学分析显示,各个位点的突变与不同级别宫颈病变之间均无相关性 ($P>0.05$)。宫颈癌标本中基因整合率为 [65% (14/40)], 远高于 CINⅢ 的整合率 [14% (6/43)] ($P<0.001$)。**结论:**青岛地区 HPV16 E2 基因存在多个位点的突变,且发现 G2828A, T3274G, T3384C, T3524C 为青岛地区特异性突变,这些位点的突变可能与高度上皮内瘤变和浸润性宫颈癌的发生和发展有关。

【关键词】 宫颈病变;人乳头瘤病毒 16 型;E2 基因;突变

中图分类号:R711.32 文献标志码:A 文章编号:1004-7379(2012)05-0361-04

Analysis of the mutations of HPV16 E2 gene among patients with different grades of cervical lesions in Qingdao. Liu Jia, Wang Yankui, Sun Xin, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003

【Abstract】 Objectives: To investigate the specific nucleotide variations in the human papillomavirus (HPV) 16 E2 DNA sequence in Qingdao of Shandong Province. The association between the sequence variant and different cervical lesions was also assessed. **Methods:** The HPV16 E2 gene was amplified by PCR from fresh-frozen tissue as well as cervical-scraping cell lysates and sequenced it and then were compared with the standard strain. **Results:** A total of 11 nucleotide mutations were identified, while 10 of which resulted in amino acid changes. The hot spots of mutation were nt, 3410 (63.2%), 3159 (55.9%), 3249 (55.9%). The analysis revealed that there was no relation between the E2 mutation and degree of dysplasia ($P>0.05$). The integration ratio was 65% (14 of 40) in the cervical cancer specimens, significantly more frequent than in CINⅢ lesions (6 of 43) ($P<0.001$). **Conclusion:** In this study, there are several E2 sequence variations in HPV16 isolates in Qingdao of China, G2828A, T3274G, T3384C, T3524C are found for the first time. These variants may be associated with the developing of cervical cancer.

【Key words】 Cervical diseases; HPV16; E2 gene; Variations

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一种双链无包膜的环状 DNA 病毒, 基因全长 7900bp, 由早期 (E) 区、晚期 (L) 区和上游调控区 (URR) 3 部分组成。E 区主要有 E1、E2、E4、E5、E6

* 青岛市公共领域科技支撑计划项目 [No:11-2-3-1-(8)-nsh]

** 通讯作者 Email: qdwangyk@yahoo.com.cn

和 E7 六个基因,具有维持病毒复制、编码病毒蛋白及维持细胞内病毒高拷贝的功能^[1]。E6 和 E7 转录亚单位为病毒癌基因,其编码产物 E6、E7 蛋白对病毒的复制起关键性作用。E6、E7 蛋白分别通过与抑癌基因 p53 和 pRb 结合,导致 p53 蛋白和 pRb 蛋白失活,最终导致感染高危型 HPV 的细胞持续增殖^[2]。E2 是在病毒整合入宿主细胞过程中环状结构打开的部位,其开放读码框通常受到破坏,E2 蛋白是一种序列特异性 DNA 结合蛋白,可调节 DNA 复制和转录,在 HPV 感染及感染后病毒生活周期的正常维持中具有关键作用。在 HPV 感染细胞中,E2 蛋白通过与 E6、E7 启动子上特异的 DNA 识别序列相结合,下调病毒 E6、E7 癌基因的转录,诱导细胞凋亡^[3]。

本文通过 PCR 方法分析山东省青岛地区不同宫颈病变组织中 HPV16 E2 基因序列的多态性,以及序列变异与不同宫颈病变的关系,为研制能够诱发较高特异性免疫水平、针对中国青岛地区地方株的 HPV16 治疗性疫苗奠定基础。

1 资料与方法

1.1 病例收集 收集青岛大学医学院附属医院 2008 至 2010 年门诊及住院患者的宫颈病变标本共 257 例,年龄 20~67 岁。其中 196 例为门诊患者,接受液基细胞学检查(LCT)且结果为异常者,其中非典型鳞状上皮细胞(ASCUS)57 例,低度鳞状上皮内病变(LSIL)88 例,高度鳞状上皮内病变(HSIL)51 例。61 例取自本院妇产科住院患者手术切除的宫颈癌标本,其中 9 例高分化鳞状细胞癌,36 例中分化鳞状细胞癌,8 例低分化鳞状细胞癌,8 例中分化黏液腺癌。所有标本收集前均未行任何放化疗,收集后立即存放于-70℃冰箱。患者均为青岛籍,出生并长期居住于青岛。

1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、dNTP Mixture、6×Loading Buffer、DNA 分子标志物 DL2000、琼脂糖等(大连宝生物工程)。蛋白酶 K(德国 Merck)。

1.3 引物设计 用通用引物 MY09、MY11 扩增 HPV L1 基因组片段筛选 HPV 阳性标本。HPV16 型特异性引物进一步鉴定 HPV16 阳性标本。根据 Seedorf 等^[4] 1985 年发表的 HPV16 基因组全序列,应用 Premier 公司引物设计软件 5.0 设计本研究所需引物,由上海生物工程合成,序列见表 1。

表 1 实验所用引物序列及扩增产物大小

引物名称	序列(5'→3')	产物大小(bp)
HPV 通用引物	F:CGTCCAAAAGGAACTGCATC R:GCACAGGGACATAACATGG	450
HPV16 特异性引物	F:AGGGCGTAACCGAAATCGGT R:GTTTGCAGCTCTGTGCATA	140
HPV16 E2	F:ACGGAATCCAGTGTATGAC R:AAAGCAGCCACTAATGTTG	1241

1.4 PCR 检测

1.4.1 组织 DNA 提取 用眼科剪将新鲜组织剪成小组织块,采用蛋白酶 K 消化、酚-氯仿-异戊醇法常规提取组织 DNA。细胞悬液直接蛋白酶 K 消化、酚-氯仿-异戊醇法提取细胞 DNA,-20℃冰箱保存备用。

1.4.2 PCR 反应 以提取的 DNA 为模板,首先用 MY09/MY11 通用引物筛选出 HPV 阳性标本,进而用 HPV16 型特异性引物筛选出 HPV16 阳性标本,最后对 HPV16 阳性标本进行 E2 基因全序列 PCR 扩增。PCR 扩增体系 50μl:宫颈组织或细胞悬液提取的 DNA 3μl,dNTP 200μmol/L,上、下游引物各 2μl(10pmol/μl),TaqDNA 聚合酶 0.3μl,10×PCR 扩增缓冲液 2.5μl,加无酶水至 50μl。PCR 反应条件:95℃预变性 5min;95℃变性 30s,55℃复性 30s,72℃延伸 1min,共 35 个循环;热循环结束后 72℃延伸 10min。取 4μl 反应产物于 1.6% 琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像系统中观察并分析结果。

1.5 核苷酸序列分析 PCR 产物纯化后进行双向测序,纯化和测序服务由北京华大基因研究中心提供,用 DNASTar 软件分析测序结果,寻找热点突变位点,分析序列多态性。

1.6 统计学处理 用 SPSS 16.0 统计软件处理数据,计数资料样本率的比较采用 χ^2 检验及精确概率法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV DNA 检测结果 257 例标本中 HPV 阳性者为 213 例(82.9%),HPV16 阳性为 110 例(51.6%),其中浸润性宫颈癌 40 例,宫颈上皮内瘤变 58 例(CIN I 2 例,CIN II 13 例,CIN III 43 例),炎症 12 例。所选异常 LCT 标本都行活检得到病理结果。

2.2 E2 基因扩增结果 110 例 HPV16 阳性标本中有 68 例 E2 基因扩增成功,见表 2。宫颈癌组 E2 基因阳性率明显低于 CIN III 组($P<0.001$),CIN III 组、CIN II 组或 CIN I 组中 E2 扩增率的差异无统计学意义(CIN III vs CIN II, $P=0.072$;CIN III vs CIN I/炎症, $P=0.214$,CIN I vs CIN II, $P=0.887$)。宫颈癌中 HPV 的整合率为 65%,而 CIN III 中 HPV 的整合率为 14%,两者差异有统计学意义($P<0.0001$)。

表 2 E2 扩增结果[n(%)]

	HPV16+	E2 扩增率
CIN I/炎症	14	9(64.3)
CIN II	13	8(61.5)
CIN III	43	37(86.1)
宫颈癌	40	14(35.0)
总计	110	68(61.8)

2.3 E2 基因序列分析 与德国 HPV16 标准株 E2 基因进行比对,在 HPV16 E2 序列中检测到 11 个碱

基突变位点,其中 10 个导致氨基酸变化。见表 3。

表 3 宫颈癌组织中 E2 基因突变位点分析(n)

	n	2828	2926	3159	3249	3274	3384 *	3410	3449	3524	3684	3787
		G-A	A-G	C-A	G-A	T-G	T-C	C-T/A	G-A	T-C	C-A	C-A
炎症/CIN I	9	1	9	2	2	1	2	4 (C-T)	2	2	4	2
CIN II	8	4	8	4	4	2	2	3 (C-T)	2	2	3	2
CIN III	37	23	37	23	23	5	12	18 (C-T)/5 (C-A)	12	12	16	12
宫颈癌	14	7	14	9	9	4	8	13 (C-T)	8	8	11	7
合计	68	35	68	38	38	12	24	43	24	24	34	23

* 此位点无氨基酸改变,为无义突变;对每个突变位点进行突变率分析,结果发现 E2 各个位点突变率与不同程度的病变均无相关性(P>0.05)

3 讨论

目前,宫颈癌在我国的发生率已居女性恶性肿瘤的首位,是导致妇女死亡的主要原因。全世界每年至少有 20 万人死于宫颈癌^[5]。

1995 年 HPV 被国际癌症研究中心(international agency for research on cancer, IARC)定为致宫颈癌及其相关病变的关键因素。99.7%的宫颈癌中可检出 HPV 病毒,在宫颈上皮内高度病变中,HPV 检出率也高达 90%。其中 HPV16 是最常见的致病亚型,约 60%的宫颈癌由其引起。由于 HPV 感染率不断上升,宫颈癌被认为是世界上最广泛流行的性传播性病原体引起的疾病之一^[5]。

病毒 E2 基因的破坏可造成 E2 对 E6 和 E7 抑制作用的丧失,最终导致 E6 和 E7 病毒基因的大量表达^[6]。在感染初期和宫颈上皮内瘤变发生的早期,其表达被 E2 蛋白所抑制,E6、E7 低表达,在晚期病变组织中高表达;相反,E2 蛋白作为病毒 DNA 复制和基因表达的主要调控蛋白,在感染初期和 CIN 早期稳定表达,且表达率较高^[7]。研究表明,在 HPV18 感染的宫颈癌细胞中,重新引入 E2 基因可以抑制 E6、E7 的表达,使细胞周期终止于 G₁ 期^[7]。Parish 等^[8]进一步研究显示,高危型 HPV E2 蛋白还通过另外两条途径诱导细胞凋亡:一条为 p53 依赖途径,可以诱导 HPV 转化及非转化细胞凋亡;另一条为非 p53 依赖途径,需要 E2 结合到病毒基因组,仅诱导 HPV 转化细胞凋亡。目前 E2 蛋白的抑癌作用已得到了肯定,已有将 E2 基因用于治疗^[9],但 E2 蛋白对细胞增殖的作用机制尚未十分清楚。

在高级别上皮病变中完整的 E2 基因和病毒致癌基因的并存表达表明单纯 E2 基因的破坏并不是宫颈癌发展的先决条件,还存在能增加病毒致癌基因表达的其他机制。其中之一就是由于 E2 基因突变引起其功能的改变。因为 E2 蛋白在病毒复制和

病毒致癌基因表达的调节中至关重要,因此 E2 核苷酸和氨基酸的突变能彻底改变生物功能以及 HPV16 相关感染的结局。

本实验通过 PCR 技术分析了青岛地区特异的 HPV16 E2 序列突变,并研究各个突变与各级别癌前病变及宫颈癌之间的关系。本实验对 E2 基因的扩增采取了一对上下游引物避免出现早期其他研究中应用多段引物分段进行测序的不足^[10]。普遍认为 HPV 病毒整合到宿主 DNA 上是发生于 E1/E2 开放阅读框上,这导致了 E1/E2 阅读框的缺失或破坏^[11,12]。本实验中宫颈癌中 E2 的扩增率为 35%,因此 HPV 的整合率为 65%,而 CIN III 中 HPV 的整合率为 14%,两者差异具有统计学意义(P<0.0001)。所有 68 例标本在 2926 位点均发生 A→G 突变,目前已确定为所用标准 HPV16 测序的错误。另一个最常见的突变位于 3410 位点,68 例标本中 38 例出现了 C-T 的改变,导致 219 位点氨基酸由脯氨酸变为丝氨酸,这与 Gyorgy 的报道是一致的^[13]。Graham 等^[14]也曾报道此位点的突变,提出该突变会进一步改变蛋白二级和三级结构,并且该突变的发生可能与高度上皮内瘤变和浸润性宫颈癌的发生和发展有关。本实验发现虽然此位点突变率较高,但与病情的进展没有相关性,与 Giannoudis 等^[15]的发现一致。此位点除 C-T 的改变外在 CIN III 组中又出现了新的突变即 C-A,导致脯氨酸变为组氨酸。

3684C-A (T310K) 突变(导致苏氨酸转变为赖氨酸)的重要性在以前的研究中已经阐述^[15]。这个突变位于 E2 蛋白 DNA 结合螺旋附近,改变该螺旋构象可使 E2 蛋白的构象也发生改变。虽然一项采用 T310K 突变的功能性的研究发现它的转活特性与原型比较没有发生改变,但后来的一个研究显示此突变在体内与转活性质有生物相关性^[15]。3159C-A 突变也具有功能性的意义,因为该位点是 E2 蛋白的一个重要的抗原表位。在许多研究中都

已经发现该位点的突变可改变蛋白的免疫功能^[16]。一些新的突变(G2828A, T3274G, T3384C, T3524C)都是在青岛地区第一次发现的,除 3384 位点没有发生氨基酸的改变,其他位点都发生了氨基酸的变化,虽然这些突变的功能性意义尚无法评估,但上述突变发生的频率(分别为 51.5%, 17.6%, 35.3%, 35.3%)提示应进一步深入研究。

虽然每个 E2 突变位点与宫颈上皮内瘤变和宫颈癌的病程进展之间均无相关性,但不能排除 E2 基因突变在 HPV16 感染的自然病史中所起的重要作用。

本研究首次分析了青岛地区 HPV16 E2 基因突变,提示 E2 基因突变可能是改变 E6 和 E7 癌基因表达的机制之一。本研究反映出青岛地区不同宫颈病变组织中 HPV16 E2 基因存在多种序列变异,这可能与病毒致癌潜能和宫颈癌的发生相关,为进一步研究宫颈癌发生发展的机制提供了基础。且这些突变具有青岛地域性,可为研制针对青岛地区的 HPV 疫苗、指导宫颈病变临床诊治积累更多有价值的信息。

参 考 文 献

- [1] Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality[J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003, 31: 3-13
- [2] Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 protein with p53[J]. Science, 1990, 248(4951): 76-79
- [3] 彭俊, 万艳平. 人乳头瘤病毒 E2 蛋白对细胞增殖作用的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2007, 35(2): 56-59
- [4] Seedorf K, Krammer G, Durst M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. Virol, 1985, 145(1): 181-185
- [5] Woodman CB, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: longitudinal cohorts study[J]. Lancet, 2001, 357(9271): 1831-1836
- [6] Mattson MP, Cheng B, Burke RE, et al. Growth factor protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis[J]. Stroke, 1993, 24(12): 136-138
- [7] Demeret C, Gareia-Carranca A, Thierry F, et al. Transcription independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein[J]. Oncogene, 2003, 22(2): 168-175
- [8] Parish JL, Kowalczyk A, Chen HT, et al. E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death[J]. J Virol, 2006, 80(6): 4580-4590
- [9] Green KL, Southgate TD, Mulryan K, et al. Diffusible HPV22-E2 protein kills bystander cells and offers a route for cervical cancer gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(2): 147-157
- [10] Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, et al. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas[J]. Int J Cancer, 1999, 83(4): 449-455
- [11] Awady MK, Kaplan JB, O'Brien SJ, et al. Molecular analysis of integrated papillomaviruses 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa[J]. Virol, 1987, 159: 389-398
- [12] Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, et al. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis[J]. Int J Gynaecol Pathol, 1998, 17(2): 146-153
- [13] Veress G, Szarka K, Xiao PD. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16[J]. J General Virol, 1999, 80(4): 1035-1043
- [14] Graham DA, Herrington CS. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities[J]. Mol Pathol, 2000, 53: 201-206
- [15] Giannoudis A, van Duin M, Snijders PJF, et al. Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix[J]. Br J Cancer, 2001, 84(8): 1058-1063
- [16] Dillner J. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames[J]. Int J Cancer, 1990, 46(4): 703-711

(收稿日期 2011-09-21)

第一作者简介: 刘佳(1987-), 女, 青岛大学医学院附属医院妇产科硕士。主要研究方向: 妇科肿瘤。