

青岛地区子宫颈病变组织中人乳头瘤病毒 16 型 L1 基因多态性分析

孙欣 王言奎 刘佳

【摘要】 目的 分析青岛地区不同宫颈病变组织中人乳头瘤病毒 (HPV) 16 型 L1 基因序列的多态性, 探讨其序列变异与宫颈癌的相关性。**方法** 提取 2008 年 6 月至 2010 年 5 月青岛大学医学院附属医院妇产科 61 例宫颈癌组织和 181 例宫颈脱落细胞 DNA, 采用 PCR 技术筛选 HPV16 阳性标本, 进而对其 L1 基因全长进行扩增、测序, 应用 DNASTAR 软件进行序列比对, 分析核苷酸和氨基酸的变异。**结果** 慢性宫颈炎组、宫颈上皮内瘤变 (CIN) 组和宫颈癌组 HPV16 的感染率分别为 30.0% (12/40)、41.1% (58/141) 和 65.6% (40/61), 3 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。共有 96 例成功扩增出 HPV16 L1 基因, 慢性宫颈炎、CIN 和宫颈癌组扩增率分别为 25.0% (10/40)、37.6% (53/141) 和 54.1% (33/61)。HPV16 型 L1 基因共发现 13 处变异, 宫颈癌组织均发生 C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT 及 G7061A (无义) 5 处突变, 另一突变热点为 A6178C, 但其在慢性宫颈炎、CIN、宫颈癌组的频率分布比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 青岛地区 HPV16 L1 基因的多态性具有地域性, 可能导致病毒地方株的免疫原性和抗原性改变, 但与宫颈癌的发生发展无明显关系。

【关键词】 宫颈上皮内瘤变; 宫颈癌; 人乳头瘤病毒 16 型; L1 基因; 突变

Analysis of HPV16 L1 gene variants of different cervical lesions in Qingdao

SUN Xin, WANG Yankui, LIU Jia.

(Department of obstetrics and gynecology, Affiliate Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China)

【Abstract】 Objective To analyze sequence variants of the HPV16 late gene L1 derived from Qingdao women with different cervical lesions, and to detect the relationship between the sequence variant and the cervical cancer. **Methods** DNA was extracted from 61 cervical cancer biopsies and 181 cervical - scraping cell lysate. The full length of L1 gene was amplified and sequenced, and the DNASTAR software was used to analyze the variants of nucleotide and acid amino. **Results** The positive rate of HPV16 was 30.0% (12/40), 41.1% (58/141) and 65.6% (40/61) in cervicitis, CIN and cervical cancer. The distribution showed statistical difference ($P < 0.05$). A total of 96 samples were amplified successfully in all samples. The rate were 25.0% (10/40), 37.6% (53/141) and 54.1% (33/61) in cervicitis, CIN and cervical cancer. A total of 13 variants were found in the full length of L1 gene. Five mutations, including C6240G, A6432G, 6902insATC, 6954delGAT and G7061A (nonsense), were found in all of the positive samples. Mutation of A6178C was another hot spot, whose distribution showed no significant difference among cervicitis, CIN and cervical cancer ($P > 0.05$). **Conclusion** There are unique feature of the HPV16 L1 gene variation, which may cause certain changes concerning immunogenicity and antigenicity of the virus, nevertheless has no apparent connection to the development of cervical lesions.

【Key words】 cervical intraepithelial neoplasia; human papillomavirus 16; L1 gene; mutation

Chin J Clin Obstet Gynecol, 2012, 13; 274 - 277

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁

妇女的健康。人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 被证实为宫颈癌主要发病原因之一, 尤其是高危型 HPV 持续感染与宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 的发生发

doi: 10.3969/j.issn.1672-1861.2012.04.010

基金项目: 青岛市公共领域科技支撑计划项目 (11-2-3-1-8-nsh)

作者单位: 266003 青岛 青岛大学医学院附属医院妇产科

通信作者: 王言奎 Email: qdwangyk@yahoo.com.cn

展密切相关,且超过 50% 的宫颈癌可检测到高危型 HPV16 感染^[1]。但研究表明,HPV 的病毒基因存在变异,且具有种族和地域特异性,这些变异可导致病毒生物学行为和致癌潜能改变,影响疾病的预防和治疗^[2]。本研究通过对不同宫颈病变组织中 HPV16 型 L1 基因的检测和序列对比,分析青岛地区不同宫颈病变患者 HPV16 型 L1 基因结构特点和变异规律,探讨基因变异与宫颈癌的相关性,为高特异性疫苗的研制提供实验基础。

资料与方法

一、研究对象

选取 2008 年 6 月至 2010 年 5 月青岛大学医学院附属医院妇产科收治的 61 例宫颈鳞状上皮细胞癌患者的手术标本,患者中位年龄 45.2 岁(34~80 岁)。FIGO 临床分期:IA1 期 40 例,IA2 期 15 例,IIA 期 6 例;分化程度:低分化 21 例,中分化 30 例,高分化 10 例。所有标本均经病理诊断证实。术前均未行放化疗。选择 2010 年 5 月至 2011 年 5 月本院门诊自愿接受检查妇女的正常宫颈液基细胞学(LCT)标本 181 例,患者中位年龄 41.5

岁(20~65 岁),其中病理诊断慢性宫颈炎 40 例,CIN1 32 例,CIN2 47 例,CIN3 62 例。两组患者均为青岛籍,出生并长期居住于青岛。标本采集之前均获得患者知情同意。

二、主要试剂

Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、dNTP 和 DNA 分子标志物 DL2000 等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

三、方法

1. 酚-氯仿-异戊醇法提取 DNA:常规采集 LCT 标本后立即-70℃保存。组织细胞标本经蛋白酶 K 消化,提取细胞 DNA,无酶水溶解,紫外分光光度计检测 DNA 样品的浓度和纯度,-20℃冰箱保存备用。

2. 软件设计引物并合成:采用通用引物 MY09/MY11 筛选 HPV 阳性标本,HPV16 型特异性引物筛选出 HPV16 阳性标本。将 L1 基因分为 3 段。采用 Primer Premier 5.0 引物设计软件分别设计特异性引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物序列及扩增产物大小见表 1,并对 HPV16 L1 基因进行全序列扩增及测序。

表 1 引物序列及扩增产物大小

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
通用引物	MY09: CGTCCAAAAGGAAACTGATC MY11: GCACAGGGACATAACATGG	450
HPV16 特异性引物	F:AGGGCGTAACCGAAATCGGT R:GTTTGCAGCTCTGTGCATA	140
HPV16 L1-1	F:TCCTTTTGGTGGTGCATAC R: ATCACCTGGATTACTGCAAC	755
HPV16 L1-2	F: AGGTGTTGAGGTAGGTCTGTG R: TGACATATTGTACTGCGTGTAG	721
HPV16 L1-3	F: TATACATTAAAGGCTCTGGGTC R: TACAAGCACATACAAGCACATAC	764

3. PCR 法扩增 HPV16 L1 基因:以提取的 DNA 样本为模板,采用 PCR 法扩增 HPV16 L1 基因。反应体系 50 μl,包括 Taq 酶 0.5 μl (2 U/μl),10×PCR Buffer 5 μl, dNTP 4 μl (2.5 mmol/L),上下引物各 2 μl (10 μmol/L),模板 5 μl (100ng/μl),加无酶水至 50 μl。PCR 反应条件为 95℃预变性 5 min;然后 95℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 1 min,共 39 个循环;热循环结束后 72℃延伸 10 min。取 5 μl PCR 产物于浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像系统观察记录结果。

4. 测定 HPV16 L1 基因序列并分析多态性:PCR 产物送北京华大基因研究中心纯化后进行双向测序,测序结果与 Seedorf 等^[3]1985 年发表的 HPV16 L1 基因序列比对。采用 DNASTar 软件分析基因突变位点,分析序列多态性。

四、统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,计数资料样本率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、不同宫颈病变组织中高危型 HPV 感染率

慢性宫颈炎组、CIN 组、宫颈癌组 HPV 感染率分别为 75.0% (30/40)、89.4% (126/141) 和 93.4% (57/61)，三者比较，差异有统计学意义 ($\chi^2=8.370$, $P<0.05$)。其中 HPV16 感染率分别为 30.0% (12/40)、41.1% (58/141) 和 65.6% (40/61)，三者比较，差异有统计学意义 ($\chi^2=14.874$, $P<0.01$)。

二、HPV16 L1 基因多态性分析

共有 96 例标本成功扩增 HPV16 L1 基因，其

中慢性宫颈炎 10 例、CIN 53 例、宫颈癌 33 例，其扩增率分别为 25.0% (10/40)、37.6% (53/141) 和 54.1% (33/61)。经双向测序后比对基因序列，发现 13 处变异，其中 7 处为无义突变，4 处错义突变，1 处插入突变，1 处缺失突变，变异位点分布见表 2。在不同宫颈病变组织中 C6240G、A6432G、6902insATC、6954delGAT、G7061A (无义) 5 处突变率均为 100%。另一处突变热点为 A6178C，突变率为 18.8%。其在慢性宫颈炎组、CIN 组和宫颈癌组的突变率比较，差异无统计学意义 ($\chi^2=1.265$, $P>0.05$)。

表 2 不同宫颈病变组织中 HPV16 L1 基因突变位点及氨基酸改变的比较

基因变异位点	氨基酸	慢性宫颈炎(n=10)		CIN(n=53)		宫颈癌(n=33)		合计(n=96)	
		例数	百分率(%)	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)
A6178C	N207P	1	10.0	9	17.0	8	24.2	18	18.8
C6240G	H228D	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0
A6432G	T292A	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0
A6503G	-	1	10.0	8	15.1	12	36.4	21	21.9
A6551G	-	2	20.0	2	3.8	2	6.1	6	6.3
A6656T	-	0	0.0	3	5.7	0	0	3	3.1
A6665C	-	1	10.0	13	24.5	5	15.2	19	19.8
T6687G	S377A	0	0.0	4	7.5	2	6.1	6	6.3
C6824T	-	1	10.0	9	17.0	10	30.3	20	20.8
6902insATC	449insS	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0
A6947G	-	0	0.0	2	3.8	0	0	2	2.1
6954delGAT	467delD	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0
G7061A	-	10	100.0	53	100.0	33	100.0	96	100.0

注：“-”表示未发生氨基酸的改变，该位点突变为无义突变。

讨 论

人乳头瘤病毒为一组嗜上皮组织的小双链 DNA 病毒，高危型 HPV16 型可影响细胞内抑癌基因的功能，干扰细胞周期的负调控作用，导致细胞的永生性，是 CIN 及宫颈癌的主要病因之一。流行病学资料显示，同型 HPV 存在基因多态性，这种多态性可导致病毒生物学行为上的差别，表现出不同的致癌潜能^[2]。HPV 多态性研究大多集中在病毒早期基因，而对于 L1 基因的研究较少。L1 基因为 HPV16 晚期基因之一，编码病毒主要衣壳蛋白，分子量为 $(54\sim58)\times10^3$ u，其五聚体形式即构成大部分的病毒外壳。L1 基因比 HPV 早期基因 E6、E2 等相对保守，本研究发现的 HPV16 L1 基因 13 处变异中，7 处均为无义突变，说明 L1 在氨基酸序列上相对保守。

L1 蛋白具有自我组装成病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 的特性，后者易激活体内免疫系统，刺激机体产生高滴度的中和抗体。L1 蛋白氨基酸的改变可以影响其自我组装为 VLPs 的效率，从而影响后者的含量。本研究发现所有样本均发生 C6240G 突变，导致 228 位氨基酸由组氨酸变为天冬氨酸，这个结果与印度、加拿大等地研究一致^[4-5]。国内新疆、兰州、扬州等地的研究也得出相似结果^[6]。Kirnbauer 等^[7]研究发现 C6240G 位点突变可导致变异株产生 VLPs 的含量是原型株的 3 倍，使得变异株的免疫原性增加。

本研究中，所有样本中均出现了另两处变异，即 6902 位点插入 ATC 及 6954 位点缺失 GAT，分别导致 L1 蛋白 C 端氨基酸序列 449 处插入丝氨酸及 467 处缺失天门冬氨酸。并有 18.8% 的样本发现有 6178 位点突变，氨基酸由天冬酰胺变为脯氨

酸。此 3 处变异位点可导致 B 淋巴细胞抗原表位发生改变,影响抗体的识别。研究表明,针对 L1 主要衣壳蛋白的天然抗体直接识别构象表位。变异引起表位构象改变从而影响中和抗体的结合力及变异株的抗原性^[8]。目前,在宫颈脱落细胞学检查与诊断中,检测 L1 蛋白结合抗体作为 HPV16 检测的方法,如果因为突变的存在,使得抗体无法识别抗原表位,将会导致 HPV16 检测的假阴性,造成漏诊。不仅如此,目前针对 HPV 的预防性疫苗是利用 VLPs 可以刺激免疫系统产生高滴度抗体的特性,加快抗体转换,增强记忆 B 淋巴细胞功能,提高体液免疫能力。因此,预防性疫苗发挥作用的程度与抗原抗体的结合力密切相关。

另一突变热点为 A6432G,导致 292 处氨基酸由苏氨酸变为丙氨酸,此位点编码的氨基酸位于 HPV16 衣壳蛋白五聚体中 L1-L1 界面处。但陈俊等^[9]研究认为,虽然变异株氨基酸有相应改变,但所构成的蛋白在亲水性、表面可及性及抗原性上与标准株无明显差异。

总之,本研究青岛地区宫颈病变组织中 HPV16 L1 基因的突变热点为 C6240G、A6432G、6902insATC 和 6954delGAT,突变率均为 100%。其与印度^[4]、加拿大^[5]的研究结果一致,但不同于巴西、印度北部地区^[10]、希腊^[11]、西班牙^[12]等,后者的高突变位点为 A6695C、A6803T 等。国内其他研究中 6902insATC 和 6954delGAT 两处突变也存在于扬州、温州^[9]及成渝两地^[13]的地方株,但未能在珠海、南昌和黑龙江等^[13]地的研究中检出。相反,Shang 等^[14]在中国北部地区发现的突变热点(A5883C、G6085A、A6164G 等)均未在本研究中检测到。由此可见,HPV16L1 基因多态性具有地区和种族差异性,同时也提示种系起源相关性。

本研究还显示,慢性宫颈炎、CIN、宫颈癌 HPV16 感染率不同,且随着病变程度加重而明显升高。而 HPV16 L1 基因各个变异位点的变异频率在不同宫颈病变中分布无差异,提示 HPV16 L1 基因多态性可能与宫颈病变的发展无关系,与 Tonon 等^[15]的研究一致。

综上所述,青岛地区宫颈病变组织中 HPV16 L1 基因存在多处变异,导致 HPV 的免疫原性和抗原性发生改变,可能影响预防性疫苗的功效。目前,对于 HPV16 癌基因与宫颈癌的关系无统一

论,还需要大样本及对变异株功能的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*, 2007, 107 (2 Suppl 1): S2-S5.
- [2] Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST, et al. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, 2006, 118: 1071-1076.
- [3] Seedorf K, Krammer G, Durst M. Human papillomavirus type16 DNA sequence. *Virology*, 1985, 145: 181-185.
- [4] Lee K, Magalhaes I, Clavel C. Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res*, 2008, 131: 106-110.
- [5] Pillai MR, Hariharan R, Janki MB. Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population. *Int J Cancer*, 2009, 125: 91-103.
- [6] 安静,余黎,席亮,等.人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白的克隆及表达. *微生物免疫学进展*, 2007, 35: 26-29.
- [7] Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*, 1993, 67: 6929-6936.
- [8] Varsani A, Williamson AL, Jaffer MA. A deletion and point mutation study of the human papillomavirus type 16 major capsid gene. *Virus Res*, 2006, 122: 154-163.
- [9] 陈俊,董海艳,朱珊丽,等.温州地方株 HPV16 型 L1 基因多态性及蛋白特性分析. *温州医学院学报*, 2009, 39: 538-545.
- [10] Pande S, Jain N, Prusty BK. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 1060-1066.
- [11] Chara KN, Christine K, Aikaterini C. Genetic variability and phylogeny of high risk HPV Type 16, 18, 31, 33 and 45 L1 gene in Greek women. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 1-17.
- [12] Ortiz M, Torres M, Fernández-García E, et al. Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two spanish population groups with different levels of HPV infection risk. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 1428-1434.
- [13] 陈良,丁显平,朱一剑,等.成渝两地宫颈癌患者中人乳头瘤病毒 16 亚型 L1、E6 和 E7 基因的分离克隆和序列分析. *国际检验医学杂志*, 2010, 31: 217-219.
- [14] Shang QL, Wang Y, Fang Y. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in identification of cervical carcinomas in patients in northeast China. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: 2656-2663.
- [15] Tonon SA, Basiletti J, Badano I. Human papillomavirus type 16 molecular variants in Guaraní Indian women from Misiones, Argentina. *Int J Infect Dis*, 2007, 11: 76-81.

(收稿日期:2012-01-07)