

四川地区宫颈癌组织 HPV18 和 HPV45 E6 基因突变分析

乌恩奇¹, 任 源², 邱爱东¹, 张国楠², 姜春来¹, 樊 英²,
于湘晖¹, 吴永革¹, 查 晓², 孔 维¹

(1. 吉林大学生命科学学院疫苗研究中心, 长春 130023; 2. 四川省肿瘤医院, 成都 610041)

摘要 采用聚合酶链反应技术对四川地区 2003~2004 年收集的 60 例宫颈癌患者的癌组织 DNA 进行人乳头瘤病毒(HPV) E6 基因扩增, 获得 HPV18 和 45 型 E6 基因。序列分析发现, 18 型三例 E6 基因有同样的两处同义突变; 45 型两例 E6 基因发生突变, 一例有两处碱基突变, 另一例发生六处碱基突变, 其中两处涉及氨基酸变化, 均位于 E6 抗原决定簇区。HPV45 型 E6 基因中 134 位 c→t, 157 位 c→t, 259 位 g→t 和 341 位 t→c 的碱基点突变未见报道。另外, 该地区 HPV18 和 45 型突变株之间存在碱基互变, 它们之间的最小差异比野生型 HPV18 和 HPV45 之间的差异小 4.05%, 该数值比在非洲发现的突变株的要小很多, 该结果支持 HPV18 和 HPV45 可能起源于非洲的观点。

关键词 HPV-18; HPV-45; E6 突变; 宫颈癌

中图分类号 R373; R181.2

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)02-0263-05

某些特定型乳头瘤病毒(HPV)的感染是引发宫颈癌的主要因素^[1], 目前已经发现至少 40 个类型的 HPV 可以感染生殖部位^[2]。根据其致癌性的高低, HPV 可分为高危型和低危型。公认的高危型有 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 和 58 型等^[3~6], 各地区主要流行型 HPV 随地理位置有所差异^[7]。HPV 基因组为总长 8 000 bp 左右的环状双链 DNA, 由早期基因区(E 区)、晚期基因区(L 区)和长调控区(LCR)组成。E 区含有 6 个开放阅读框(ORF), 其中早期编码蛋白的 E6 和 E7 基因在细胞癌变中起重要作用。在持续感染高危型 HPV 病毒后, 病毒基因组会整合到宿主染色体中, E6 和 E7 基因的表达调控也受到干扰。E6 蛋白与肿瘤抑制基因产物 p53 蛋白结合形成复合物, 抑制 p53 蛋白对细胞周期的负调节功能, 诱导细胞发生转化和永生化^[8]。对高危型 HPV 病毒 E6 基因突变的研究结果表明, 特定位点的突变会使病毒更易诱导细胞产生癌变, 增大再次感染或从宿主免疫系统逃逸的机会。HPV16 型 E6 蛋白 83 位的亮氨酸残基变为缬氨酸(碱基突变 T350G)的突变株在瑞典妇女宫颈癌组织中出现比例远大于野生型, 该突变被认为与组织癌变进程相关^[9]。E6 蛋白氨基酸点突变与 p53 蛋白结合实验结果表明, E6 蛋白 N 端 2~12 及 78~82, 111~115, 118~132 等区域为 p53 结合区域, 这些位置的氨基酸突变能引起 E6 蛋白与 p53 蛋白的结合能力的改变^[10,11]。利用重组载体表达 E6 蛋白残基进行的免疫研究结果发现, E6 蛋白 86~95, 96~100, 111~120, 136~140, 141~146 及 146~150 等区域为 E6 蛋白抗原决定簇区域^[12]。Matlashewski 等^[13]发现 *E. coli* 表达的 HPV18 E6 蛋白 N 端 23 个残基也具有 E6 蛋白免疫原性, 这些位点的突变可能引起病毒免疫原性的改变。长期以来, HPV 不能在体外有效培养。21 世纪以来, 灵长类动物 HPV 抗体检验方法的建立, 以及利用分子生物学方法在酵母中表达的 HPV16, 18 型病毒样颗粒(VLP)成功地诱导动物机体产生抗 HPV 病毒的免疫反应^[14,15], 都为基因工程亚单位疫苗的研制提供了科学依据, 使 HPV 疫苗的研究有了突破性进展。明确 HPV 的主要型别及其基因结构和突变情况, 特别是 E6, E7 和 L1 基因的突变等流行病学资料, 对加深 HPV 的基础研究和指导疫苗设计都具有重要意义。为了解我国四川地区宫颈癌患者组织中 HPV E6 基

收稿日期: 2005-03-09。

联系人简介: 孔 维(1965 年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: weikong@mail.jlu.edu.cn; 查 晓(1953 年出生), 男, 博士, 教授, 研究员, 从事化学与分子生物学研究。E-mail: zha530909@sina.com

因的结构特点, 本文对来自四川省宫颈癌组织 E6 基因进行序列分析, 以调查该地区妇女感染 HPV 的类型及突变情况, 这一研究将为我国 HPV 预防及治疗性疫苗的研制奠定了基础.

1 实验部分

1.1 试剂、标本采集和 DNA 提取

动物组织全基因组提取试剂盒 (DNeasy Tissue Kit, QIAGEN 公司), 高保真 TAQ 酶及相关试剂 (Platinum Taq DNA Polymerase, dNTP, Invitrogen 公司), 分子量 Marker (DL2000, TAKARA 公司).

宫颈癌组织标本采自 2003 年 10 月至 2004 年 5 月间四川省肿瘤医院收治并诊断为宫颈癌的患者. 所有组织经手术切除后立即保存于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中.

按说明书用 DNeasy Tissue Kit 提取基因组 DNA. 提取的 DNA 基因组经 β -Globin 球蛋白引物 (上游 $5'$ -GAAGAGCCAAGGACAGGTAC; 下游 $5'$ -CAACTTCATCCACGTTACAC) PCR 扩增验证其质量.

1.2 引物设计

引物根据 Genbank 提供的 HPV-18 (AY262282) 和 45 (X74479) 全基因组序列为达到既能扩增出 E6 基因全序列, 又能确保型间的特异性的要求, 由本实验室自行设计, 上海 Sangon 生物工程公司合成.

HPV18 型 E6 基因上游引物: $5'$ -GCGCGCTTTGAGGATCCAACACGG; HPV18 型 E6 基因下游引物: $5'$ -TACTTGTGTTTCTCTGCGTCG; HPV45 型 E6 基因上游引物: $5'$ -GGCGCGCTTTGACGATCCAAAG; HPV45 型 E6 基因上游引物: $5'$ -TTGTGTTTCCCTACGTCTGC.

1.3 PCR 扩增和核酸序列测定

$50\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系, 包含 $1\text{ }\mu\text{L}$ 模板 DNA, 反应条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 预热 3 min 后进入循环, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s , $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s , 共循环 30 次, 最后于 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min . 取 $3\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应产物, 经质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色检测.

对 PCR 产物进行双向测序, 以获得可靠的序列信息. 所获得突变样品经过 PCR 重新扩增并再次测序以排除 PCR 过程中碱基错配而产生的误差. 测序工作由上海 Sangon 生物工程公司完成.

1.4 HPV 病毒 E6 基因同源性分析

用 MEGA3 软件分析所获得突变株与 HPV18 型和 HPV45 型野生株的同源关系.

2 结果与讨论

HPV18 型和 HPV45 型为高危型 HPV, 是引发宫颈癌的诱因之一, 18 型在许多地区是仅次于 16 型的主要流行 HPV 型别, 是感染和诱发宫颈癌的重要因素^[16]. HPV45 型与 HPV18 型的同源性很强 (图 1), 两者系统进化距离很近 (表 1 和表 2). 我们从宫颈癌标本提取的基因组中用 PCR 方法筛出 18 型和 45 型 HPV, 对其 E6 基因测序并与野生型序列进行比对, 发现数处突变.

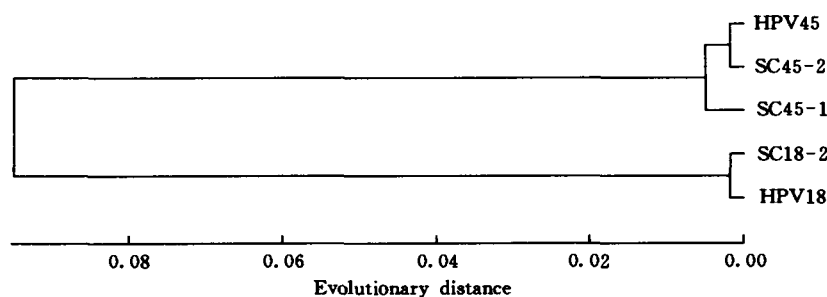


Fig. 1 Phylogenetic tree of the variants and the prototype in HPV18 and 45 E6 gene

Table 1 Percentage nucleotides similarity of HPV18 E6 OFR with other HPV types

HPV type	HPV18	HPV45	HPV39	HPV59	HPV26	HPV35	HPV16	HPV53	HPV31	HPV66	HPV51	HPV56	HPV73	HPV58	HPV33	HPV34	HPV52
First ATG	105	102	107	55	97	110	83	102	108	102	97	102	102	110	109	102	102
Bases	477	477	477	483	453	450	477	465	450	468	456	468	447	450	450	447	447
Nucleotides similarity (%)	100.0	83.4	72.1	69.2	63.1	62.1	61.0	58.8	58.0	57.8	57.6	57.3	57.3	57.1	56.4	56.7	54.1

Table 2 Homologous distance of nucleotides for high risk HPV types E6 gene*

Virus	HPV18	HPV45	HPV56	HPV66	HPV34	HPV73	HPV39	HPV68	HPV59	HPV16	HPV35	HPV31	HPV33	HPV58	HPV52	HPV51
HPV18																
HPV45	0.178															
HPV56	0.625	0.622														
HPV66	0.653	0.660	0.160													
HPV34	0.547	0.550	0.539	0.566												
HPV73	0.529	0.523	0.479	0.510	0.160											
HPV39	0.338	0.388	0.567	0.668	0.513	0.497										
HPV68	0.385	0.389	0.563	0.592	0.540	0.530	0.140									
HPV59	0.399	0.433	0.637	0.650	0.601	0.527	0.431	0.444								
HPV16	0.521	0.497	0.537	0.591	0.457	0.445	0.492	0.552	0.583							
HPV35	0.486	0.494	0.521	0.553	0.450	0.411	0.489	0.534	0.472	0.288						
HPV31	0.542	0.583	0.495	0.526	0.529	0.494	0.485	0.521	0.500	0.396	0.329					
HPV33	0.597	0.612	0.516	0.566	0.483	0.476	0.559	0.567	0.625	0.372	0.431	0.449				
HPV58	0.588	0.608	0.535	0.598	0.499	0.492	0.567	0.575	0.588	0.392	0.419	0.437	0.172			
HPV52	0.629	0.665	0.539	0.546	0.545	0.515	0.669	0.672	0.595	0.442	0.449	0.442	0.361	0.308		
HPV51	0.595	0.604	0.491	0.555	0.525	0.460	0.633	0.613	0.600	0.473	0.517	0.507	0.445	0.472	0.514	

* Homogenous distance was constructed by transforming the sequence data into a distance matrix via the Kimura's two parameter model using MEGA3 program.

2.1 核酸序列测定和分析

以宫颈癌组织 DNA 为模板，分别用 HPV18 型 E6 和 HPV45 型 E6 引物进行扩增。观察 PCR 产物电泳，可见一条位于 470 bp 附近的带，为 HPV E6 基因阳性产物(图 2)。通过 PCR 结果鉴定，在 60 例样品中获得 18 型 E6 基因 7 例(SC18-1 ~ SC18-7)和 45 型 E6 基因 2 例(SC45-1, SC45-2)。经过测序，与 Genbank 提供的标准全序列 HPV-18 (AY262282)和 HPV-45 (X74479)进行比对发现：18 型中有 4 例(SC18-1, 3, 5, 6)为野生型，另 3 例(SC18-2, 4, 7)发生 2 处同样的点突变，分别为 HPV 总基因组第 485 位 t 变为 c, 549 位 c 变为 a, 两处皆为同义突变(表 3)。同样的变化已见文献^[17]报道，提示这两点的变化可能在世界各地较为普遍。45 型样品中 SC45-2 E6 基因有 2 处碱基突变，第 482 位 t 变为 c, 497 位 a 变为 g, 两处皆为同义突变。样品 SC45-1 E6 基因有 6 处碱基突变，即 134 位 c 变为 t, 157 位 c 变为 t, 259 位 g 变为 t, 341 位 t

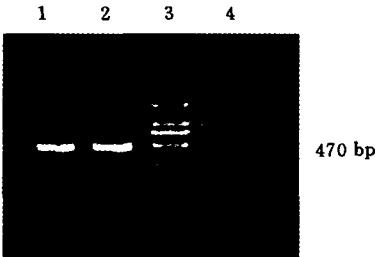


Fig. 2 Electrophoretic analysis of PCR product of HPV18 and 45 E6 gene

1. PCR amplified HPV18 E6 gene; 2. PCR amplified HPV45 E6 gene; 3. DNA marker DL2000; 4. negative control.

Table 3 Variants in HPV 18 and 45 E6 gene

HPV-18			HPV-45								
Base of point mutations	4	5	Base of point mutations	1	1	1	1	2	3	4	4
	8	4		2	3	5	5	5	4	8	9
	5	9		4	4	0	7	9	1	2	7
HPV-18 ^a	T	C	HPV-45 ^a	A	C	T	C	G	T	T	A
SC18-1	-	-	SC45 -1	-	T	-	T	T	C	C	G
SC18-2	C	A	SC45 -2	-	-	-	-	-	-	C	G
SC18-3	-	-	HPV -45(Y13218) ^b	C	-	C	-	T	-	C	-
SC18-4	C	A					*	*			
SC18-5	-	-									
SC18-6	-	-									
SC18-7	C	A									
HPV-18(U89349) ^b	C	A									

a. HPV-18 and HPV-45 are the prototype sequence; b. HPV18(UU89349) and HPV45(Y13218) are the variant reference sequence of Genbank; “*” position at which amino acid changed.

变为 c, 482 位 t 变为 c, 497 位 a 变为 g. 在氨基酸水平上, 157 位的突变由苏氨酸变为异亮氨酸 (T19I), 259 位的突变由半胱氨酸变为苯丙氨酸 (C53F) (表 3). 482 位和 259 位的两点突变已见报道^[18]. 另外 4 处突变点 134 位 c 变为 t, 157 位 c 变为 t (T19I), 259 位 g 变为 t (C53F) 和 341 位 t 变为 c, 这些突变尚未见报道.

2.2 亲缘关系分析

HPV45 型与 HPV18 型的系统进化距离很近, 两者有相当高的同源性(表 2). 对 HPV18 和 HPV45 突变株交叉比对中发现(图 3), HPV18 型 485 位(E6 基因内第 381 位碱基)的突变与 HPV45 型 482 位(E6 基因内第 381 位碱基)的突变非常相似, 这两点在从 E6 基因起始密码子数起都是第 381 位, 系 HPV18 和 HPV45 型同源的区域中共同的突变. 而 HPV18 型 549(E6 基因内第 445 位碱基)位的变化和 HPV45 型 259 位(E6 基因内 158 位碱基)、497 位(E6 基因内第 396 位碱基)的变化则恰恰是两型同源区域内向对方型的转变.



Fig. 3 Nucleotide sequence alignment of the HPV18 and HPV45 prototype sequence and SC18-2, SC45-1 detection sequence respectively

The base position number on the alignment is numbered from the first ATG in E6 gene.

在野生型 HPV18、HPV18 突变株 SC18-2、HPV45 突变株 SC45-1 和野生型 HPV45 E6 基因长度为 432 bp(去掉引物位置)的 E6 序列中, 野生型 HPV18 与 HPV45 间有 74 个碱基的差别, 而突变株 SC18-2 与 SC45-1 之间有 73 处差异, 与 SC45-2 之间有 71 处差异. 即 18 型突变株和 45 型突变株之间的最小差异比野生型 HPV18 和 HPV45 之间的差异小 4.05%. Ong 等^[19]在对从非洲获得的 1 例 45 型和 1 例 HPV18 型及野生型 18 和 45 型 LCR 区内 185 bp 长度的比对中发现, 突变株之间差异比野生型少 31%, 进而推断他们所获得的 45 型突变株很可能是 18 型与 45 型间的中间体. 四川地区发现的这几例 HPV18 和 HPV45 之间的差异虽然比野生型小, 但却远大于非洲这两株之间的差异, 提示非洲发现的突变株更接近 HPV45 同 HPV18 的中间型, HPV18 和 HPV45 可能起源于非洲.

2.3 氨基酸序列分析

各型 HPV E6 氨基酸序列比对显示 HPV45 型 19 位的氨基酸位于 E6 蛋白保守区域(图 4). 有资料指出 HPV 病毒 E6 蛋白 19 位氨基酸位于 B 细胞抗原决定簇和 T 细胞抗原决定簇区域^[20-22], 提示 SC45-1 的突变 T19I 很可能对病毒 E6 蛋白的免疫原性产生影响. 另一处涉及氨基酸变化的突变: 碱基

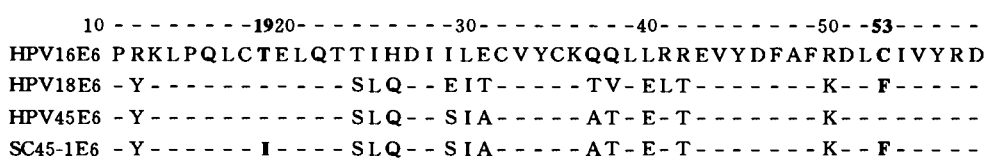


Fig. 4 The amino acid sequence alignment of the HPV-16, 18 and 45 E6 protein

水平上由 HPV45 型变为 HPV18 型的 259 位突变在氨基酸水平(C53F)上也转变为 18 型。该位点位于 T 细胞抗原决定簇区域^[20], 其突变意义有待进一步研究。

本研究报道的 HPV18 型和 HPV45 型变异株, 为了解我国宫颈癌组织中 HPV 病毒的型、亚型及突变特点积累了流行病学资料, 与之相关的研究工作仍在进行中。

参 考 文 献

- [1] Muñoz N., Bosch F. X., de Sanjosé S. *et al.*. *Int. J. Cancer*[J], 1992, **52**: 743—749
- [2] de Villiers E. M. Papillomavirus Rep. [J], 2001, **12**: 57—63
- [3] Jacobs M. V., de Roda Husman A. M., van den Brule A. J. C. *et al.*. *J. Clin. Microbiol.* [J], 1995, **33**: 901—905
- [4] Van den Brule A. J., Pol R., Fransen-Daalmeijer N. *et al.*. *J. Clin. Microbiol.* [J], 2002, **40**: 779—787
- [5] Davies P., Kornegay J., Iftner T. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* [J], 2001, **15**: 677—700
- [6] Gravitt P. E., Peyton C. L., Apple R. J. *et al.*. *J. Clin. Microbiol.* [J], 1998, **36**: 3020—3027
- [7] Li Jie(李 洁), Liu Bao-Yin(刘宝印), Zur Hausen *et al.*. *Chinese J. Exp. Clin. Virol.* (中华实验和临床病毒学杂志)[J], 1996, **10**(1): 50—55
- [8] Chang C. H., Chen T. H., Hsu R. C. *et al.*. *J. Clin. Virol.* [J], 2005, **32**: 33—37
- [9] Zehbe I., Wilander E., Delius H. *et al.*. *Cancer Res.* [J], 1998, **58**: 829—833
- [10] Crook T., Tidy J. A., Vousden K. H. *Cell*[J], 1991, **67**: 547—556
- [11] Foster S. A., Demers G. W., Etscheid B. G. *et al.*. *J. Virol.* [J], 1994, **68**: 5698—5705
- [12] Gao B., Chain B., Sinclair C. *et al.*. *J. Gen. Virol.* [J], 1994, **75**: 157—164
- [13] Matlashewski G., Banks L., Wu-Liao J. *et al.*. *J. Gen. Virol.* [J], 1986, **67**: 1909—1916
- [14] Palker T. J., Monteiro J. M., Martin M. M. *et al.*. *Vaccine*[J], 2001, **19**: 3733—3743
- [15] Koutsky L. A., Ault K. A., Wheeler C. M. *et al.*. *N. Engl. J. Med.* [J], 2002, **347**(21): 1645—1651
- [16] Bosch F. X., Lorincz A., Munoz N. *et al.*. *J. Clin. Pathol.* [J], 2002, **55**: 244—265
- [17] Cole S. T., Danos O. *J. Mol. Biol.* [J], 1987, **193**(4): 599—608
- [18] Saxtre-Garau X., Favre M., Couturier J. *et al.*. *J Gen Virol.* [J], 2000, **81**(8): 1983—1993
- [19] Ong C. K., Chan S. Y., Campo M. S. *et al.*. *J. Virol.* [J], 1993, **67**: 6424—6431
- [20] Scheffner M., Romanczuk H., Munge K. *et al.*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* [J], 1994, **186**: 83—99
- [21] Bartholomew J. S., Stacey S. N., Coles B. *et al.*. *Eur. J. Immunol.* [J], 1994, **24**: 3175—3179
- [22] Muller M., Viscidi R. P., Sun Y. *et al.*. *Virology*[J], 1992, **187**: 508—514

Analysis of E6 Variants of Human Papillomavirus Type 18, 45 Isolated from Cervical Cancer Patients in Sichuan Province

WU En-Qi¹, REN Yuan², QIU Ai-Dong¹, ZHANG Guo-Nan², JIANG Chun-Lai¹,
FAN Ying², YU Xiang-Hui¹, WU Yong-Ge¹, ZHA Xiao², KONG Wei^{1*}

(1. *Research Center of Vaccine, College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China;*

2. *Sichuan Cancer Hospital, Chengdu 610041, China*)

Abstract The E6 genes of human papillomavirus(HPV) 18 and 45 variants were isolated and amplified by PCR from the tumor tissues of patients with cervical cancer in Sichuan Province of China, and the E6 genes were sequenced for investigating their structural characteristics and variability. The same two point silence mutations were found in three samples of HPV18, and six point mutations were found in one sample of HPV45, resulting in changes of the translated amino acids at two points(T19I and C53F) which are located in the HPV E6 epitope regions. Some point mutations of the HPV45 are identical to those nucleotides found specifically in the HPV18 from these samples, the diversity between HPV18 and HPV45 of Sichuan variants is less by 4.05% than between HPV18 and HPV45 of wild types, this value is lower than that of variants isolated from Africa, which support the hypothesis that the phylogenetic root of HPV18 and 45 is in Africa.

Keywords Human papillomavirus (HPV) 18; Human papillomavirus (HPV) 45; E6 mutation; Cervical cancer

(Ed.: V, X)