

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2012.06.019

宫颈癌组织中 HPV16 型 E6/E7 序列突变分析*

张志珊, 庄建良, 李爱禄, 蒋燕成

摘要:目的 分析泉州地区宫颈癌患者 HPV16 型 E6/E7 序列突变情况,探讨其与宫颈癌发生的相关性。方法 取 35 例 HPV16 阳性的宫颈癌组织标本,采用 PCR 法扩增 E6、E7 全长基因。PCR 产物直接测序,并与野生型序列进行比对。分析 E6、E7 基因的变异情况。结果 E6、E7 基因的突变率分别为 91.4% 和 89.2%。E6 基因中有 10 个位点为错义突变,2 个位点为无义突变。氨基酸突变频率最高的是 D25E(77.1%)。E7 基因中共发现 5 个突变位点,有 2 个位点为错义突变,3 个位点为无义突变,突变频率最高是 N29S 和无义突变 T846C(均为 75.0%)。结论 HPV16 E6、E7 基因中最常见突变位点 D25E、N29S 和 T846C 可能与宫颈癌的发生密切相关,可为研究针对中国人群的 HPV 疫苗提供一定的线索。

关键词:人乳头状瘤病毒;宫颈癌;16 型;E6 基因;E7 基因

中图分类号:R373

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2012)06-0607-05

Mutations in the E6/E7 genes of human papillomavirus type 16 from cervical cancer tissue

ZHANG Zhi-shan, ZHUANG Jian-liang, LI Ai-lu, JIANG Yan-cheng

(Affiliated Quanzhou First Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China)

ABSTRACT: To investigate mutations in E6/E7 genes of human papillomavirus type 16 (HPV16) in patients with cervical cancer in Quanzhou area and explore the potential association between the mutations and cervical cancer, 35 cervical cancer tissue with HPV 16 positive were collected in this study. DNA samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR), then the products were directly sequenced and the results were compared with the prototype sequence. It was found that the prevalences of HPV 16 E6 and E7 variants were 91.4% and 89.2% respectively. Ten mis-sense variations and 2 silent variations were identified in E6. The hot spot of E6 nucleotide mutation was D25E, with a frequency of 77.1%. A total of 5 mutation spots was found in E7, including 2 mis-sense and 3 silent variations. Both N29S and T846C were the most common mutations, with the same ratio of 75.0%. It is suggested that the mutation of D25E, N29S and T846C are likely to be associated with on-togenesis of cervical cancer. This founding might provide valuable information for HPV vaccine development in China.

KEY WORDS: human papillomavirus; type 16; cervical cancer; E6 gene; E7 gene

This study was funded by the Foundation for Young Scientists of Fujian Province (No. 2008F3123), and the Special Foundation for Development of Science and Technology in Fujian Medical University (No. FZS08004).

宫颈癌与人类乳头状瘤病毒(HPV)的感染密切相关。HPV 属于性传播疾病病原体,目前已鉴定出 100 多种基因亚型,其中至少有 40 个类型的 HPV 可以感染生殖部位,根据其致癌能力的大小分为高危型、中间型和低危型两种,高危型包括 HPV16、18、31、33、35、39、43、51、52、56、58、59、68、73、82 等型,高危型 HPV 持续感染是激发宫颈上皮

恶性转化的最重要危险因素,是宫颈癌及癌前病变发生发展的必要条件^[1]。

HPV 的基因约长 8 kb,主要由早期基因(E 区)、晚期基因(L 区)和长控制区(LCR)组成,E 区有 6 个开放读框(ORF),编码 6 个早期蛋白,即 E1-E7。其中 E6、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、E7 基因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。本文对本自泉州地区的宫颈癌组

*福建省青年人才项目基金(2008F3123);福建医科大学科技发展专项基金(FZS08004)联合资助

作者单位:福建医科大学附属泉州第一医院,泉州 362000;

Email:zhishanzhang1973@yahoo.com.cn

织中 HPV16 型的 E6、E7 基因的序列进行分析,探索 HPV16 型 E6、E7 基因突变情况及其与宫颈癌发生的相关性,这对于宫颈癌的防治及指导疫苗设计具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源及 DNA 的提取 35 例宫颈癌组织来自 2009 年 1 月—2010 年 12 月本院妇产科宫颈癌术后样本(经病理检查确诊),这 35 例标本在前期实验中,通过对 HPV 亚型进行分型检测后,确定为 HPV16 型感染。全基因组 DNA 的提取采用 QIA-GEN 公司的 DNA mini kit。

1.2 PCR 引物的设计与合成 根据 GenBank 公布的 HPV16 序列(EU918764),应用 Premier 5.0 软件设计两对引物分别用于扩增 E6、E7 基因。引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物如下:

E6F 5'-CGAAACCGGTTAGTATAA-3'

E6R 5'-GTATCTCCATGCATGATT-3'

E7F 5'-ATAATATAAGGGGTCGGTGG-3'

E7R 5'-CATTTTCGTTCTCGTCATCTG-3'

1.3 PCR 扩增 引物 E6F/E6R 用于扩增 E6 基因,E7F/E7R 用于扩增 E7 基因。反应体系为:10× buffer 5 μL,dNTP 4 μL,上、下游引物(20 μmol/

L)各 1 μL,Ex Taq 酶 2.5 U,模板 1 μL,加 H₂O 至 50 μL。循环条件:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环,72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,送上海生物工程有限公司进行测序。

1.4 序列分析 测得的序列用 Sequencher 软件进行编辑、校正后,使用 ClustalX 和 BioEdit 进行基因的比对和多态性分析。

2 结果

2.1 HPV16 E6 基因变异分析 35 例样本的 E6 基因均成功扩增并测序。将测序结果与 HPV16 型的野生株(德国标准株,基因号 K02718)^[2]进行对比分析,结果发现 35 例样本中有 32 例存在基因突变,突变率为 91.4%。共涉及到 12 个位点的 14 种不同突变模式,其中 10 个位点的变异为错义突变,另外 2 个位点为无义突变(A131C 和 T241G)。突变频率最高的是 178 位点,35 例样本中有 26 例由原来的 T 突变为 G,1 例突变为 A,结果均导致氨基酸的转换 D25E(77.1%)。其它位点突变导致的氨基酸转换有 E113D, L83V, L28V, S138C, T21S, R144T, S142T, Q20P, T21I, R10G。突变频率的分布见表 1, E6 氨基酸序列比对见图 1。

表 1 HPV16 E6 基因变异分析

Tab. 1 Sequence variation of HPV 16 E6 in cervical cancer tissue

	HPV16 E6 开放读码框核苷酸位置 HPV16 E6 ORF nucleotide at position												氨基酸变化 Amino acid substitution	例数 No. case
	131	162	164	165	178	185	241	350	442	516	617	714		
野生型序列 Prototype	A	A	A	C	T	T	T	T	A	C	T	G		3
	—	—	—	—	—	—	g	—	—	—	—	—		1
	—	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—	D25E	18
	—	—	—	—	G	G	—	—	—	—	—	—	D25E, L28V	1
	—	—	—	—	G	—	—	—	—	G	—	—	D25E, S138C	1
	—	—	T	—	G	—	—	—	—	—	—	G	T21S, D25E, R144T	1
	—	—	T	—	G	—	—	—	—	—	A	—	T21S, D25E, S142T	1
	c	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—	D25E	2
	—	C	—	T	A	—	—	—	—	—	—	—	Q20P, T21I, D25E	1
	—	—	—	—	G	—	—	—	C	—	—	—	D25E, E113D	2
	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	E113D	1
	G	—	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	R10G, L83V	1
	—	—	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	L83V	1
	—	—	—	—	—	—	—	G	C	—	—	—	L83V, E113D	1
例数 No. case	2	1	2	1	27	1	1	3	4	1	1	1		35

注:横线表示与野生型核苷酸一致,大写字母表示错义突变,小写字母表示无义突变。

Note: Dashes indicate no variation; capital letters indicate variants with an amino acid change; lower-case letter represents a nucleotide change at that position without amino acid change.

	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95
prototype	MFQDPQERPR	KLPQLCTELQ	TTIHDIILEC	UYCKQQLRR	EUYDFAFNRL	GIUYRDGMPV	AVCDKCLKEV	SKISEYRHYC	VSLVSTTLQ	QYHKPLCDLL
Q210041612	G								..U	
Q209031323									..U	
Q209031031									..U	
Q209101325			E							
Q209050544			E							
Q209121133			E							
Q209110601			E							
Q209102042			E							
Q209101713			E							
Q210062549			E							
Q210070929			E							
Q210033023			E							
Q210040914			E							
Q210022624			E						..U	
Q210031207			E							
Q209012008			E							
Q210022605			E							
Q209122931			E							
Q210060417			E							
Q210072055			E							
Q210071352			E							
Q210071327			E..U							
Q210042029			E							
Q209091110			S...E							
Q209091043			S...E							
Q209122525			E							
Q209021708			E							
Q209091112			E							
Q208072304			E							
Q209042516		P	I...E							
Q209030626		P	I...E							
Q209101712										
Q210010034										
Q209090402										
Q209082525										

图 1 HPV16 E6 蛋白氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of HPV 16 E6

2.2 HPV16 E7 基因变异分析 35 例样本中,成功测序的有 28 例。通过对 E7 基因进行比对后,共发现 5 个突变位点,突变位点的数量低于 E6 基因,突变频率与 E6 基因接近(89.2%)。氨基酸比对结果显示,有 2 个位点为错义突变,3 个位点为无义突变(图 2)。28 例样本中有 21 例发生 A647G 突变,

导致氨基酸的转换(N29S),是突变频率最高的位点(75.0%)。另有 1 例发生 L28F 的氨基酸转换。在无义突变中,突变频率从高到低分别为 T846C(75.0%)、G666A(32.1%),T843C(21.4%)。突变频率分布见表 2。

表 2 HPV16 E7 基因变异分析

Tab. 2 Sequence variation of HPV 16 E7 in cervical cancer tissue

	HPV16 E7 开放读码框核苷酸位置					氨基酸变化	例数
	HPV16 E7 ORF nucleotide at positon						
	645	647	666	843	846		
野生型序列 Prototype	A	A	G	T	T		3
	C	—	—	—	—	L28F	1
	—	G	—	—	c	N29S	15
	—	G	—	c	c	N29S	6
	—	—	a	—	—		3
例数 No. case	1	21	9	6	21		28

注:横线表示与野生型核苷酸一致,大写字母表示错义突变,小写字母表示无义突变。

Note: Dashes indicate no variation; capital letters indicate variants with an amino acid change; lower-case letter represents a nucleotide change at that position without amino acid change.

3 讨论

HPV 感染是宫颈癌的首要病因,在全世界范围内,最常见的感染亚型是 HPV16 型。不同的

HPV16 变异株具有不同的生物学活性和致癌潜能,其中某些位点的变异与宫颈癌的发生密切相关^[3-4]。来自世界范围的分子流行病学资料显示,E6 基因的

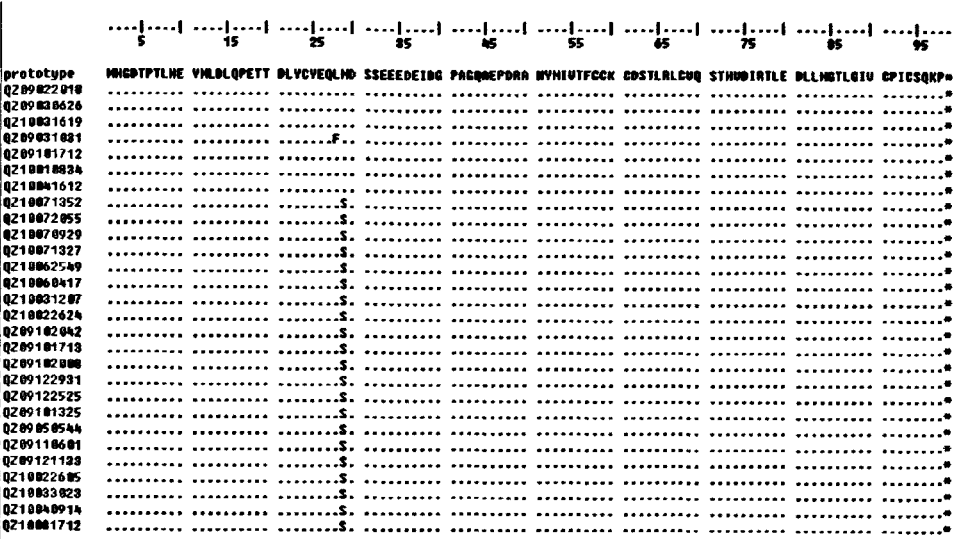


图2 HPV16 E7 蛋白氨基酸序列比对
Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of HPV 16 E7

突变增强了致癌的危险性,同时这些突变株的致癌能力具有地域性^[5],Yamada 等人曾报道在欧洲宫颈癌患者中,野生型 E6 基因(德国株)的分布频率为 34%^[6],随后 Zehbe 等人报道,在瑞士宫颈癌患者中野生型 E6 基因的分布频率仅为 6%^[3],与 Pil-lai 等人报道的印度人群中 9.1% 的流行率接近^[7]。本次研究结果显示,35 例宫颈癌患者中,有 3 例为野生型 E6 基因,仅占 7.9%。在所有的 E6 突变位点中,报道最多的突变是 T350G,不同的地域的分布频率差别较大,从 2%~93.5% 不等^[6,8-11]。此位点的变异导致 E6 蛋白 L83V 氨基酸转换,使其对鳞状上皮和腺上皮细胞生长转化能力增强^[4],与宫颈上皮内瘤样病变 I 级向 III 级转化有关^[12]。而来自德国和俄罗斯的报道则认为 L83V 变异与浸润性癌无关^[13-14]。本次研究发现,泉州地区 HPV16 E6 基因 L83V 变异仅有 3 例,占 7.9%,频率最高的突变是 D25E,占 77.1%,其次为 E113D,占 11.4%。其它变异还有 L28V, S138C, T21S, R144T, S142T, Q20P, T21I, R10G。我们发现 D25E 变异在泉州地区宫颈癌患者中最为流行,这与以往 Wu Y^[10] 等人报道的 65.5%,Kang^[15] 报道的 85.2% 接近。该变异在东亚人种的分布频率高显著高于其它地区,被认为是亚洲型尤其是东亚病毒分枝的特异性变异。此次研究还发现了一些以往没有报道过的变异,如 T21S, Q20P, T21I, R10G,其变异的频率较低,与宫颈癌的相关性有待于进一步探讨。

本研究显示泉州地区宫颈癌患者中 HPV16 E7

基因也存在高频率的突变(89.2%)。与 E6 变异位点相比,本次研究中 E7 的变异位点相对较少,仅发现 5 个位点突变。只存在 2 种类型的错义突变 N29S 和 L28F,其余 3 种均为无义突变。突变频率最高的是 A647G 突变(导致 N29S 氨基酸转换)和 T846C(无义突变),突变率均为 75.0%,与 Wu Y 报道的 70.2% 和 67.1% 相近^[10]。在以往报道中, A647G 和 T846C 是最常见的 2 种变异,但是突变的频率差别较大。对于 N29S 的突变率,泰国宫颈癌患者为 63.0%^[16],韩国为 59.5%^[17],德国仅为 0.9%^[13]。这些资料显示, N29S 突变主要存在亚洲人群,而较少发生在欧洲人群中,提示 E7 变异具有明显的地域性。研究还发现 A647G 和 T846C 这 2 种突变都是同时存在同一个样本中。这个结果和熊光武^[18] 等人的报道一致,可能提示这是中国人群中特异的突变类型,对于研究针对中国人群的 HPV 疫苗提供一定的线索。

参考文献:

[1]zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5):342-350. DOI: 10.1038/nrc798
[2]Seedorf K, Kr  mmer G, D  rst M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. Virology, 1985, 145(1):181-185. DOI: 10.1016/0042-6822(85)90214-4
[3]Zehbe I, Wilander E, Delius H, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype[J]. Cancer Res, 1998, 58(4): 829-833.
[4]Andersson S, Alemi M, Rylander E, et al. Uneven distribution

- of HPV 16 E6 prototpye and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions[J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(3): 307-310. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1247
- [5] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type16 (HPV16) variants in Japanese population[J]. *Cancer Lett*, 2000, 156(2): 159-165. DOI: 10.1016/S0304-3835(00)00457-2
- [6] 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): 2463-2472.
- [7] Radhakrishna Pillai M, Sreevidya S, Pollock BH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2002, 87(3): 268-273. DOI: 10.1006/gyno.2002.6835
- [8] Mayrand MH, Coutle F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9): 3388-3393.
- [9] Pande S, Jain N, Prusyt BK, et al. 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]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(3): 1060-1066. DOI: 10.1128/JCM.02202-07
- [10] 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(Pt5): 1181-1188. DOI: 10.1099/vir.0.81649-0
- [11] Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, et al. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia[J]. *Cancer Lett*, 2005, 229(1): 93-99. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.04.026
- [12] Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes[J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(5): 711-716. DOI: 10.1002/ijc.1520
- [13] Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, et al. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 1999, 82(2): 203-207. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19990719)82:2<203::AID-IJC9>3.0.CO;2-9
- [14] 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): 791-795. DOI:10.1054/bjoc.2000.1619
- [15] Kang S, Jeon YT, Kim J, et al. Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical tissues of Korean women[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2005, 15(1): 107-112. DOI: 10.1111/j.1048-891x.2005.15010.x
- [16] Vaeteewoottacharn K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2C): 1927-1931.
- [17] Song YS, Kee SH, Kim JW, et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women[J]. *Gynecol Oncol*, 1997, 66(2): 275-281. DOI: 10.1006/gyno.1997.4756
- [18] Xiong GW, Yuan Y, Li M, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of upstream regulatory region and E6, E7 oncogene from cervical cancer patients in Beijing[J]. *Hereditas*, 2010, 32(4): 339-347. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00339 (in Chinese)
- 熊光武,袁杨,李萌,等.北京地区宫颈癌患者 HPV16 上游调控序列、E6、E7 癌基因序列分析[J]. *遗传*, 2010, 32(4): 339-347

收稿日期:2011-11-27;修回日期:2012-02-13



作者: 张志珊, 庄建良, 李爱禄, 蒋燕成, ZHANG Zhi-shan, ZHUANG Jian-liang, LI Ai-lu, JIANG Yan-cheng
作者单位: 福建医科大学附属泉州第一医院, 泉州, 362000
刊名: 中国人兽共患病学报 ISTIC PKU
英文刊名: Chinese Journal of Zoonoses
年, 卷(期): 2012, 28(6)

参考文献(18条)

1. zur Hausen H Papillomaviruses and cancer:from basic studies to clinical application[外文期刊] 2002(05)
2. Seedorf K;Krammer G;Dürst M Human papillomavirus type 16 DNA sequence 1985(01)
3. Zehbe I;Wilander E;Delius H Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype 1998(04)
4. Andersson S;Alemi M;Rylander E Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions[外文期刊] 2000(03)
5. Matsumoto K;Yoshikawa H;Nakagawa S Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type16 (HPV16) variants in Japanese population[外文期刊] 2000(02)
6. Yamada T;Manos MM;Peto J Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers:a worldwide perspective 1997(03)
7. Radhakrishna Pillai M;Sreevidya S;Pollock BH Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer[外文期刊] 2002(03)
8. Mayrand MH;Coutl e F;Hankins C Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis 2000(09)
9. Pande S;Jain N;Prusyt BK Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6,ET,and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India[外文期刊] 2008(03)
10. Wu Y;Chen Y;Li L Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China 2006(Pt5)
11. Sathish N;Abraham P;Peedicayil A HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia[外文期刊] 2005(01)
12. Zehbe I;Tachezy R;Mytilineos J Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes 2001(05)
13. Nindl I;Rindfleisch K;Lotz B Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer[外文期刊] 1999(02)
14. Hu X;Pang T;Guo Z HPV16 E6 gene variations in invasive cervical squamous cell carcinoma and cancer in situ from Russian patients[外文期刊] 2001(06)
15. Kang S;Jeon YT;Kim J Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical

tissues of Korean women[外文期刊] 2005(01)

16. Vaeteewoottacharn K;Jearanaikoon P;Ponglikitmongkol M Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas 2003(2C)

17. Song YS;Kee SH;Kim JW Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women[外文期刊] 1997(02)

18. 熊光武;袁杨;李萌 北京地区宫颈癌患者HPV16上游调控序列、E6、E7癌基因序列分析 2010(04)

引用本文格式: 张志珊. 庄建良. 李爱禄. 蒋燕成. ZHANG Zhi-shan. ZHUANG Jian-liang. LI Ai-lu. JIANG Yan-cheng 宫颈癌组织中HPV16型E6/E7序列突变分析[期刊论文]-中国人兽共患病学报 2012(6)