

• 论著 •

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

陈 良, 丁显平, 朱一剑, 李付广

(四川大学生命科学学院遗传医学研究所、生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川成都 610064)

【摘要】 目的 了解成渝地区 HPV16 亚型基因的一级结构特点, 为成渝地区宫颈癌的防治及 HPV 疫苗的研制提供理论基础。**方法** 收集宫颈癌组织标本, 针对 HPV16 亚型分别设计 L1、E6 和 E7 基因特异性引物, 用 PCR 方法从宫颈癌组织中获得各基因的全长序列, 并构建克隆载体 pGEM-T, 进行序列分析, 同时分别以 L1、E6 和 E7 基因序列进行进化分析。**结果** 在 102 例宫颈癌标本中, 99 例为 HPV 阳性, 感染率为 97.1%, 其中 32 例(32.3%)为 HPV16 单重感染, 所占比例最高。通过与标准株比较, 发现成渝两地 HPV16 亚型 E6、E7 和 L1 基因都存在一定程度的变异, 变异率分别为 90.6%、78.1% 和 25.0%。**结论** 与标准序列比较, 成渝地区 HPV16 亚型 L1、E6 和 E7 基因存在一定范围的变异, 提示我们, 在预防治疗成渝地区妇女宫颈癌病人以及研制开发针对西南地区的宫颈癌疫苗时, 需要注意这些位点的变异, 特别是一些引起氨基酸变异的位点。

【关键词】 人乳头瘤病毒 16; 宫颈肿瘤; 序列分析

中图分类号: R730.43; R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2010)03-0217-03

Isolating, Cloning, and Sequence-analyzing of HPV16 L1、E6 and E7 Gene
from Cervical Carcinoma Biopsy in Southwestern China

CHEN Liang, DING Xian-ping, ZHU Yi-jian, et al.

(Institute of Medical Genetics, College of Life Science, Sichuan University/Key Laboratory of
Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, Chengdu 610064, China)

【Abstract】 Objective To know the primary structure character of HPV 16 isoforms in CHENG-YU district, providing the foundation for preventing and curing the cervical carcinoma. **Methods** E6、E7 and L1 gene were amplified from human cervical carcinoma by PCR. The products of PCR were ligated into pGEM-T vector and used to transform E. coli DH5 α . At last, the sequence of the insert was determined by an automated DNA sequencer. **Results** Of the 102 cervical carcinoma specimens, 97.1% (99/102) were positive for HPV infection, including 32.3% (32/99) HPV16 single infection. Compared with the prototype, a certain variation was found in HPV isoforms of E6, E7, L1, the variation ratio was 90.6%, 78.1%, and 25.0% respectively. **Conclusion** Compared with the prototype, the nucleotide sequence of the HPV16 E6、E7 and L1 gene from cervical carcinoma biopsy in CHENG-YU district shows a certain point mutations. We should pay attention to this mutations in preventing and curing cervical carcinoma in CHENG-YU district.

【Key words】 Human papillomavirus 16; Uterine Cervical Neoplasms; sequence analysis

人乳头瘤病毒(Human papillomaviruses, HPV)属乳头瘤多空病毒科乳头瘤病毒属, 人是其唯一宿主, 皮肤、黏膜上皮为 HPV 的易感部位。根据 HPV 基因的序列变异可将其分为多种亚型, 目前确定的 HPV 型别约有 100 余种, 其中有约 40 种可以感染人的生殖器官。研究发现, 在宫颈癌、宫颈原位癌、阴茎癌、外阴癌、肛周癌、喉乳头瘤等肿瘤组织中均可检出 HPV-DNA, 大约有 99.7% 的宫颈癌和 HPV 感染有关, 其中 HPV16 型感染率最高, 约 50% 的宫颈癌患者肿瘤组织的 DNA 为 HPV16 型^[1]。因 HPV 感染性疾病是难治性、复发性、具有潜在致癌性的疾病, 逐渐引起人们的重视。而研制有效的 HPV 疫苗, 预防 HPV 感染和进行免疫治疗已成为国内外学者研究的热点。

中国是世界上宫颈癌的高发区之一(大约每 10 万妇女中就有 27 例), 并且每年新增 132 300 例, 是世界上宫颈癌病人

最多的国家^[2]。目前, 国内, 特别是西南地区对于 HPV16 亚型的基因组变异特点还缺少较系统的研究, 本文主要探讨成渝地区宫颈癌患者中 HPV16 亚型主要基因的序列变异特点。

材料与方法

1. 材料 取自四川省肿瘤医院妇产科以及重庆第四人民医院妇科宫颈癌患者手术切除标本 102 例, 经病理确诊为浸润性宫颈癌(包括腺癌和鳞癌), 所采用标本经反向膜杂交检测确定为 HPV16 单重感染, 排除其他型别感染以及多重感染标本, 最后选取符合要求的标本 32 例。宫颈癌组织经手术切除后, 如果不能及时提取 DNA, 则于液氮中进行保存。

2. 菌株及主要试剂 DH5 α 大肠杆菌细胞株为本实验室保存, 电泳凝胶片段回收试剂盒(CONCERTTM Rapid Gel Extraction System) 购自美国 GIBCO 公司, 克隆载体连接试剂

盒(pGEM-T Easy Vector System I, 内有 T4 连接酶)和质粒提取试剂盒(Wizard Plus Minipreps DNA Purification System)购自美国 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 Hind III 及 BMH I、DNA marker (DL2 000)、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)、dNTP 混合物购自大连宝生物公司。

3. 方法 1)DNA 的提取及反向膜杂交分析:取黄豆大小新鲜临床宫颈标本,剪碎后加入 pH8.0 的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl; 0.1 mol/L EDTA; 0.5% SDS; 20 μ g/mL RNase)500 μ L,研磨至不见组织块,加入蛋白酶 K 至终浓度为 100~200 μ g/mL。于 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜,中间振荡数次。之后用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提两次,再用氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次,取上清加入 1/10 体积 3M 乙酸钠和 2.5 倍体积的-20 $^{\circ}$ C 预冷的乙醇沉淀 DNA,再用 70%乙醇洗涤沉淀,自然风干,用 100 μ L ddH₂O 溶解沉淀,稀释后-20 $^{\circ}$ C 存放备用。采用反向膜杂交法对标本感染 HPV 的型别进行分析,该方法可以一次性检测 23 种 HPV 亚型的感染,具体操作步骤参见深圳亚能公司提供的 HPV 快速检测试剂盒说明书。2)PCR 扩增:根据 Genbank 里面已经发表的 HPV16 序列,采用 Primer 5.0、Oligo 6.0 等生物信息学软件,对 HPV16 E6、E7 和 L1 开放阅读框特异引物自行设计,经 BLAST 后,由上海英骏公司合成,具体引物序列见表 1。PCR 反应体系(25 μ L)为:dNTP 2.5 mmol/L,引物各 50 μ mol/L, MgCl₂ 25 mmol/L, Taq 酶 2.5 U,加 H₂O 至 25 μ L。扩增参数设定:95 $^{\circ}$ C 5 min 变性;94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,后进行 35 个循环;末次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。3)HPV16 各基因的克隆和序列分析:将 PCR 产物经含溴化乙锭的 0.7%的琼脂糖凝胶电泳后,将含有相应片段的凝胶切下置入 1.5 mL Eppendorf 管中,分别严格参照电泳凝胶片段回收试剂盒及表达载体连接试剂盒说明回收目的片段,并将目的片段与克隆载体 pGEM-T Easy 连接,构建 HPV16 各基因 pGEM-T 重组质粒,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。琼脂平皿中通过蓝白筛选,随机挑取 3 个白色单菌落扩大培养, Wizard Plus Minipreps DNA 纯化试剂盒说明书步骤提取重组质粒,并进行 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定。含有外源 DNA(E6、E7 和 L1)片段的克隆为阳性克隆,送上海英骏生物技术有限公司进行 DNA 序,每个样品的三个阳性克隆各自进行至少一次的重

复测序。经过 DNAMAN 和 Clustal X 等生物软件对测序结果进行分析。

结 果

1. 反向膜杂交结果 在 102 例标本中,99 例为 HPV 阳性,感染率为 97.1%,其中 32 例(32.3%)为 HPV16 单重感染,所占比例最高,其次为 HPV18(9.1%)、HPV31(7.1%)、HPV56(7.1%)、HPV58(5.1%)。单重感染 65 例(65.7%),双重感染 21 例(21.2%),三重以上感染 13 例(13.1%)。结果见表 2。

2. HPV16 致癌基因 E6E7 以及衣壳蛋白决定基因 L1 的序列变异分析 32 例 HPV16 单独感染的标本中的 HPV16 致癌基因 E6、E7 以及衣壳蛋白决定基因 L1 经序列测定,每个样品的三个阳性克隆序列均高度一致,并且与标准株(Seedorf 等,1985)比较,其中与标准株不同的位点被视为变异位点。1)E6 基因:对于 E6 基因,32 例标本中共发现 5 种突变位点,没有发现缺失和插入突变,也没有终止密码子的突变。突变也不是随即的,在发现的 5 种突变位点中,有 1 种常见突变:nt178 T $\rightarrow$ G (Asp $\rightarrow$ Glu) (20/32),nt178 T $\rightarrow$ A(8/32),其他四种突变分别是:nt131 G $\rightarrow$ A (Gly $\rightarrow$ Arg),nt320 A $\rightarrow$ G (Ile $\rightarrow$ Val),nt350 T $\rightarrow$ G (Leu $\rightarrow$ Val)和 nt489 G $\rightarrow$ A。另外发现,32 例 HPV16 阳性宫颈癌标本的 HPV16 E6 基因的突变率为 90.6% (29/32)。2)E7 基因:对于 E7 基因,32 例标本中共发现 5 种突变位点,分别是:nt647 A $\rightarrow$ G (Asn $\rightarrow$ Asp)(18/32)、nt666 G $\rightarrow$ A(同义突变)(2/32)和 nt846 T $\rightarrow$ C(同义突变)(11/32)。另外一个 nt843 T $\rightarrow$ C(同义突变)(6/32)。没有发现缺失和插入突变,也没有终止密码子的突变。本实验中的 HPV16 E7 基因的突变率为 78.1%。3)L1 基因:对于 L1 基因,32 例标本中共发现 7 种点突变:nt6178A $\rightarrow$ C(Asn $\rightarrow$ Thr)(2/32)、nt6503A $\rightarrow$ G(无义突变)(5/32)、nt6542T $\rightarrow$ G(无义突变)(7/32)、nt6566T $\rightarrow$ A(无义突变)(3/32)、nt6814C $\rightarrow$ G(Ser $\rightarrow$ Cys)(5/32)、nt6992A $\rightarrow$ G(同义突变)(29/32)、nt7058G $\rightarrow$ A(无义突变)(30/32)。另外,在 32 例标本中,还发现两例标本发生一处插入突变和一处缺失突变:nt6901 与 nt6902 处插入 3 个核苷酸 CAT(Ser),nt6950-nt6952 缺失 3 个核苷酸 GAT(Asp)。

表 1 PCR 扩增引物

开放阅读框	引物名称	起始位点	引物序列	产物长度
E6	HPV16E6F	81	5'-TTATGCACCAAAAGAGAAGTCA-3'	498
	HPV16E6R	578	5'-GGTGTATCTCCATGCATGATTACAG-3'	
E7	HPV16E7F	559	5'-ATCATGCATGGAGATACACCTACATTG-3'	320
	HPV16E7R	878	5'-GCAGGATCAGCCATGGTAGATT-3'	
L1a	HPV16L11F	5500	5'-ACCAAGCTCCTTCACTTCTCT-3'	545
	HPV16L11R	6044	5'-GCATAAGCACTAGCATTTTCTGT-3'	
	HPV16L12F	5955	5'-GGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAG-3'	597
	HPV16L12R	6551	5'-TGGGCATCAGAGGTAACCATAGAAC-3'	
	HPV16L13F	6529	5'-TCTATGGTTACCTCTGATGCC-3'	660
	HPV16L13R	7188	5'-ACAAACAACACTGAGTCAACA-3'	

注:a:由于 L1 基因序列太长,为方便序列分析和引物设计,将 L1 基因分成三段进行测序。

表 2 99 例 HPV 感染阳性宫颈癌标本的 HPV 型别分布情况

型别	HPV16	HPV18	HPV31	HPV56	HPV58	HPV16/18	HPV16/31	其他*	合计
例数(n)	32	9	7	7	5	11	4	24	99
百分比(%)	32.3	9.1	7.1	7.1	5.1	11.1	4	24.2	100

注: * :其他型别还包括 5 例单重感染、6 例双重感染和 13 例多重感染。

讨 论

世界范围内,宫颈癌的发病率仅次于乳腺癌而居第 2 位,每年约有 10 万宫颈癌新发病例,其中 80% 在发展中国家,我国每年约有新发病例 13.15 万,占全世界新发病例的 28.8%。近年来宫颈癌发病年龄趋向年轻化,从原来的 40-50 岁提前到 35 岁左右。人乳头瘤病毒(HPV)感染是诱发宫颈癌的首要启动因素,99% 以上的宫颈癌组织携带高危 HPV DNA,其中 HPV 16 型占 60% 以上^[3]。

1. 在我们的研究中,在 102 例标本中,99 例为 HPV 阳性,感染率为 97.1%,其中单重感染 65 例(65.7%),双重感染 21 例(21.2%),三重以上感染 13 例(13.1%)。HPV 的多重感染是否增加或促进宫颈病变的发生一直是学者们关注的问题。多数人认为,多重感染并不增加宫颈癌的发生。但也有学者认为,多重感染促进宫颈病变的发生,且多重感染的宫颈癌患者对放疗的敏感性较差^[4]。有学者发现 HPV16 是双重感染中最常见的感染亚型。HPV16、18、33 常有双重感染,故认为 HPV 的多重感染与感染的 HPV 亚型有关。

2. HPV16E6、E7 基因是病毒的主要转化基因,其编码的 E6 蛋白及 E7 蛋白均为含“Cys-X-X-Cys”锌指结构的 DNA 结合蛋白,E6 蛋白的 N 端及 C 端各形成 2 个锌指结构,可分别结合、降解抑癌基因 p53。

本研究与国内其他一些研究也有所不同,Hu 等对重庆 1 例宫颈癌组织中的 HPV16 亚型的 E6、E7 基因进行分析,发现 E6 基因没有变异,E7 基因发现两处变异:nt691C→T(终止突变),另一处为无义突变,该研究与伍欣星等研究的湖北株一致。而我们的研究并没有发现此终止突变。

3. L1 基因为结构基因,编码病毒的衣壳蛋白 L1 蛋白,L1 蛋白分子量约 54-58kDa,其五聚体形式即为构成病毒外壳的壳粒,L1 基因序列具有保守性,同时具有型特异性特征,而且个亚型之间因地域的不同也存在一定的变异性^[6]。而本实验的 32 株 HPV16 L1 基因也发现了两株同样突变。

4. 近年来,国际病毒界又提出以病毒 L1、E6 和 E7 基因的同源性作为分型标准。如果不同毒株间上述核苷酸序列的同源性低于 90%,则被认为属于不同的型别。尽管各 HPV16 型之间同源性很接近,但是根据来自不同地方(欧洲、亚洲、非洲、南美洲和北美洲)的地方株的序列特点又分为 5 个分支:E (European),As (Asian),AA (Asian-American),Af-1 (African-1) 和 Af-2 (African-2)^[7]。本次实验结果显示,中国地区

HPV16 亚型的分布以及在癌症发生中的作用于世界其他地区存在明显的不同,甚至中国各个地区之间也有较大的差异。随着直接测序技术的发展以及对 HPV16 各个致癌基因的研究的深入,我们可以进一步揭示病毒与宿主的关系。

由于人乳头瘤病毒的巨大危害性,目前设计特异性的疫苗势在必行,而设计疫苗一般都是针对 HPV16 特异的基因序列进行的,所以对 HPV16 亚型各主要基因进行序列分析十分必要。本项目针对中国西南地区 HPV16 亚型的主要基因进行克隆和多态性分析,为其相应蛋白表达的后续工作奠定坚实基础,并为进一步应用到临床判断 HPV 感染患者预后以及开发出具有预防功能的生物制剂和疫苗都具有广阔的前景和重大意义。

参考文献

- [1] Marc S, Eliane DF. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology[J]. Gynecologic Oncology, 2007, 107:S2-S5.
- [2] Helen T, Eduardo LF. The epidemiology of genital human papillomavirus infection[J]. Vaccine, 2006, 24SI: SI/4-SI/15.
- [3] Lee K, Magalhaes I, Clavel C, et al. Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression[J]. Virus Res, 2007;1-5.
- [4] Levi JE, Kleter B, Quint WG, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40 (9) : 3341-3345.
- [5] Hu LN, Xu B, Qi HB, et al. Structure and variation of E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 from 1 case of cervical carcinoma in Chongqing[J]. Acta Academiae Med. Militaris Tertiae, 2002, 24(1):106-108.
- [6] Torres LA, Rojo HG, Torres RA, et al. Cervical cancer current view of its epidemiology and risk factors[J]. Gynecol Obstet Mex, 2004, 72:466-474.
- [7] de Villiers EM, Fauquet C. Classification of papillomaviruses[J]. Virology, 2004, 324:17-27.

(本文编辑:杨庆华 收稿日期:2010-01-25)