

宫颈癌组织中 HPV16 E7 序列多态性分析

刘欣, 刘国炳, 庞战军, 邢福祺(南方医科大学南方医院妇产科, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 探讨广东地区宫颈癌组织中 HPV16 肿瘤相关性抗原 E7 基因序列的多态性。方法 采用通用引物 PCR 直接测序法对宫颈癌标本中的 HPV 分型, 从含有 HPV16 型的标本中采用自行设计的多重引物通过巢式 PCR 扩增出 HPV16 E7, 经 DNA 序列测定法检测其基因变异, 进而寻找其热点突变。结果 50 例宫颈癌组织 HPV-DNA 的检出率为 78%, 其中 HPV16 和 HPV18 型混合感染 18 例, 单纯 HPV16 型感染 15 例。33 例含有 HPV16 型的标本中扩增出 25 例 HPV16 E7, 其中 17 例 647 位核苷酸“T”变异“C”, 导致相应的蛋白质由天冬氨酸变异为丝氨酸。结论 广东地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 DNA 序列发生碱基替换的区域主要在 647 位至 846 位, 热点突变点为 Nt647 和 Nt846。

关键词: 乳头状瘤病毒, 人; E7 基因; 多态现象; 宫颈肿瘤; 聚合酶链反应

中图分类号: R392.2; R394; R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2588(2005)10-1272-04

Sequence polymorphism of human papillomavirus type 16 E7 in cervical cancer

LIU Xin, LIU Guo-bing, PANG Zhan-jun, XING Fu-qi

Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the genetic polymorphism of E7 open-reading frame of human papillomavirus (HPV) type 16 in cervical cancer. **Methods** The types of HPV was identified by sequence analysis of the PCR product of HPV in cervical cancer tissues. HPV 16 gene fragment in the cervical cancer tissue was amplified by HPV-specific PCR with general consensus primers. **Results** The positivity rate of high-risk HPV types in 50 cases of cervical cancers was 78%. Mixed infection of HPV16 and HPV18 was found in 18 cases, and the infection with HPV16 alone occurred in 15 cases. HPV16 E7 was amplified from 25 out of the 34 cases positive for HPV16. A T-to-C change occurred in the 647th nucleotide in the viral nucleotide sequence, causing conversion of the Asn codon of E7 gene into a Ser codon. **Conclusions** The most frequently observed substitution in HPV16 E7 open reading frame occurs in the discrete regions of 647-846, and some substitutions result in the same-sense mutation. The hot-spot mutation of HPV16 E7 in cervical cancers in Guangdong Province occurs at the nucleotide 647 and 846 in the DNA sequence.

Key words: papillomavirus, human; E7 gene; polymerase chain reaction; polymorphism; cervix neoplasms

人乳头瘤病毒(HPV)是一种高度螺旋化的环状双链 DNA 病毒。HPV 感染是宫颈癌及癌前病变的明确病因^[1], 此外, HPV 还与人类多种恶性疾病密切相关, 如乳腺癌、食管癌等。流行病学资料显示: 约 93% 的宫颈癌组织中可以检测到 HPV DNA, 其中 HPV16 型占 65%^[2]。研究发现 HPV16 早期基因 E6 及 E7 在宫颈癌组织中持续表达, 并为癌组织恶性表现型维持所必需, 阻断其表达后可使瘤细胞的恶性型逆转^[3]。E6/E7 具有免疫原性, 可以诱导机体产生特异性体液免疫和细胞免疫^[4], 因此可以作为宫颈癌及其癌前期病变的治疗性疫苗的靶抗原^[5]。但是, HPV16 存在许多具有地域特征的地方变异株, 研究表明这些变异株可以引起包括免疫源性在内的生物学活性的差异^[6], 这给 HPV16 治疗性疫苗的研制带来了一定的困难。

本研究探讨广东地区宫颈癌组织中 HPV16E7 序列多态性及同源性, 旨在为获得能诱发较高特异性免疫水平的针对中国广东地区地方株的 HPV16 治疗性疫苗打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本 50 例宫颈癌组织均取自南方医院住院手术病人, 患者均为广东籍, 出生并长期生活在广东, 无在外地的长期居住史。病理学诊断其中 45 例为宫颈鳞状上皮癌, 5 例为宫颈腺癌。留取手术切除的病变组织, 投入液氮速冻。

1.1.2 试剂和引物 动物基因组 DNA 提取试剂盒购于北京鼎国生物技术发展中心。TaKaRa Taq DNA 聚合酶、10 × PCR Buffer、dNTP Mixture、6 × Loading Buffer、marker DL2000 均购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 产物纯化试剂盒购自申能博彩生物科技有限公司。

HPV PCR 通用引物参考文献[7]中的 GP5、GP6

收稿日期: 2005-04-02

基金项目: 南方医院 2002 年新技术新业务院长基金

Supported by grants for New Technology and Health Service Development of Nanfang Hospital (2002)

作者简介: 刘欣(1975-), 女, 硕士, E-mail: liuxin23@fimmu.com

序列用以扩增出 HPV L1 基因组片段。参照 HPV16E7 基因序列及引物设计原则,采用引物设计软件自行设计 HPV16 E7 基因巢式 PCR 引物。E7 外侧引物 OX: 5'-CATAAATATAAGGGGTCGGTGGGA-3', OIX: 5'-CTGCATCTCTCGATGTTTGG-3'; E7 内侧引物 IX: 5'-GCAGATCATCAAGAACACG-3', IIX: 5'-CAAATCTTACCTGTATCACTG-3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR 扩增产物的 DNA 测序由南方医科大学分子生物学研究所完成。

1.2 方法

1.2.1 PCR 直接测序法对宫颈癌组织中 HPV-DNA 分型

取 300 mg 宫颈组织根据动物基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取总 DNA,以各例宫颈组织 DNA 为模板,用上述通用引物 GP5、GP6 进行 HPV-DNA L1 区基因序列的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μ l,其中含样品宫颈组织 DNA 3 μ l(约 3 ng),浓度为 1 U/ml 的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶 10 μ l, dNTP 5 pmol,引物 GP5、GP6 各 20 pmol,双蒸水 5 μ l,以 2 ng 的 HPV18(德国标准株)质粒为阳性对照。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,33 个循环后再延伸 7 min。2%琼脂糖凝胶电泳。挑选出 140 bp 处出现 DNA 带者,将 PCR 产物纯化。分别用 GP5、GP6 两引物,将 PCR 产物在 DNA 序列自动分析仪(3730 型)上测序。用 BLAST 软件将测出的碱基序列与基因库中的各种 HPV 碱基序列进行比对,与某种已知 HPV 序列符合率达 90%以上者可确定为该型 HPV。

1.2.2 巢式 PCR 扩增 HPV16E6 基因序列及 DNA 序列测定

选取含有 HPV16 的各例宫颈组织 DNA 为模板,用上述 E7 外侧引物 OX、OIX 进行 HPV DNA E7 区基因序列的第 1 次 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ l,其中含样品宫颈组织 DNA 3 μ l(约 3 ng),浓度为 1 U/ml 的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶 25 μ l, dNTP 5 pmol,引物 OX、OIX 各 20 pmol(2 μ l),双蒸水 20 μ l,以 2 ng 的 HPV16(德国标准株)质粒为阳性对照。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环后再延伸 7 min。2%琼脂糖凝胶电泳。挑选出 540 bp 处出现 DNA 带者,分别用 E7 内侧引物 IX、IIX 进行第 2 次 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ l,其中第 1 次 PCR 产物 0.5 μ l,浓度为 1 U/ml 的 TaKaRa Taq DNA 聚合酶 25 μ l, dNTP 5 pmol,引物 IX、IIX 各 20 pmol(2 μ l),双蒸水 23 μ l,以 2 ng 的 HPV16(德国标准株)质粒为阳性对照。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环后再延伸 7 min。2%琼脂糖凝胶电泳。在 300 bp 处出现 DNA 带者为扩增出的

HPV16 E7 基因序列。将 PCR 产物纯化后,分别用引物 IX、IIX 通过正反两个方向对目的基因的正链及负链进行测序。

1.2.3 HPV16 E6 多态性分析

比较基因库中的 HPV16 德国标准株碱基序列与测出的各临床病例的基因序列和蛋白序列,通过 DNAsis 分析临床病例分离株 HPV16E7 区的基因多态性和氨基酸变异。按文献[8]报道的 Antigenicity ValueX10 方法进行抗原性分析。

2 结果

2.1 宫颈癌组织中各型 HPV-DNA 的检出率

在所有 50 例宫颈组织中,检测出 HPV-DNA 情况如下:HPV16 和 HPV18 型混合感染 18 例,单纯 HPV16 型感染 15 例,单纯 HPV18 型感染 5 例,检出 HPV58 型感染 1 例。

2.2 宫颈癌组织中 HPV16 E7 基因序列的检出情况

宫颈组织经巢式 PCR 扩增出 HPV16 E7 基因序列,PCR 扩增的产物进行凝胶电泳,在 450 bp 处出现 DNA 带(图 1)。扩增出的 HPV16 E7 基因序列部分核苷酸序列图(反义链)见图 2。

2.3 HPV16 E7 基因多态性分析

HPV16 E7 核苷酸和氨基酸序列与基因库中的 HPV16 德国标准株基因序列比对,变异情况见表 1。某例临床病例与 HPV16 德国标准株的 Antigenicity ValueX10 抗原指数对比见图 3。

3 讨论

HPV16 E7 基因序列为 544-855 位,编码 98 个氨基酸组成的蛋白,其分子两端为保守区,羧基端有 2 个锌指结构,氨基端保守区为 37 个氨基酸残基,与 Ad E1 A 和 S V40 T 抗原蛋白相似,可以与抑癌蛋白



图 1 HPV16 E7 基因 PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳图
Fig.1 2% agarose gel electrophoresis of the PCR products of HPV16 E7 gene

M: DNA marker LD-2000; Lanes 1-6: HPV16 DNA samples from cervical cancer tissue; Lane 7: HPV16 E7 positive control; Lane 8: Negative control

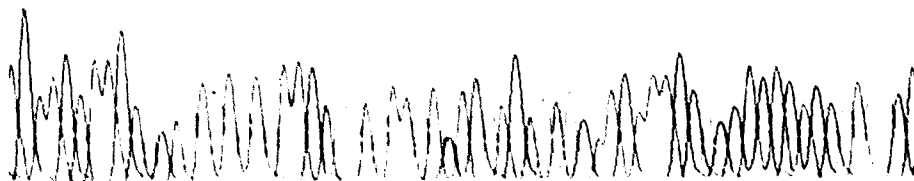


图 2 HPV16 E7 部分核苷酸序列图

Fig.2 Sequence analysis of the PCR product of type HPV16 E7

表 1 HPV16 E7 核苷酸和氨基酸序列的变异

Tab.1 Nucleotide and amino acid sequence variations in HPV16 E7

Nucleotide spot	Case No.	Nucleotide	Codon position	Codon change
Nt 647	17	T-C	Nt 212	Asn-Ser
Nt 666	8	C-T	Nt 218	same-sense mutation
Nt 823	1	G-A	Nt 271	same-sense mutation
Nt 844	1	A-C	Nt 278	same-sense mutation
Nt 846	17	A-G	Nt 279	same-sense mutation

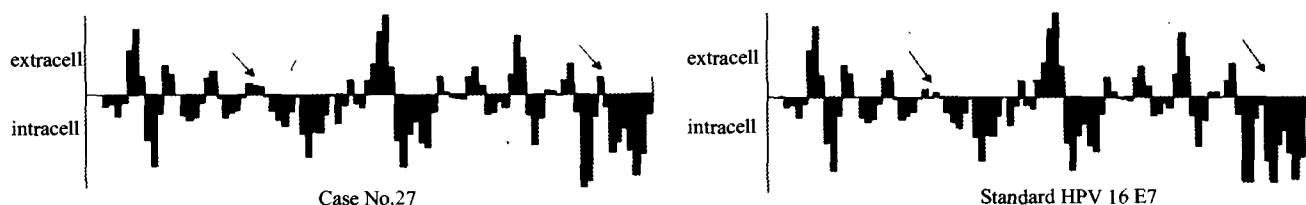


图 3 标本 27 与 HPV16 德国标准株的 Antigenicity ValueX10 抗原指数对比图

Fig.3 Comparison of the antigenic index between the isolate in case No.27 and standard HPV 16 E7 strain

Rb 结合^[9]。这些结构的完整性对 E7 蛋白的转化和反式激活功能十分重要。E7 基因是 HPV16 的主要转化基因,是 HPV16 型相关性宫颈癌恶性表现型维持所必需,承受的选择性环境压力较强。变异的 E7 基因可能在两个方面发挥作用;E7 基因的错义突变造成其蛋白水平的作用发生改变而影响其转化活性;E7 基因某些位点无义突变、起始突变、终止突变可能影响 E7 基因的转录与表达^[10]。

在以往的研究中比较各地区 E7 基因序列及氨基酸序列同源性都在 99% 以上,可见 HPV16 E7 基因较为保守,特别是 5' 端具有重要功能的 PRb 结合区域,这与 E7 蛋白的重要作用是一致的。但国内外学者均发现 HPV16 E7 基因存在一些微小变异;Fuinage 等^[11]通过 PCR 法测序分析发现大多数侵袭性宫颈癌及癌前病变都检出了 HPV16 E7 序列变异株;Icenogle 等^[12]研究表明,世界不同地区,如美国乔治亚州、亚拉巴马州、密苏里州及巴拿马地区的宫颈癌组织都普遍存在 HPV16 E7 变异株;Esche 等^[13]研究也证实存在 HPV16 E7 变异株,通过进一步与对照组

德国患者宫颈癌组织中病毒序列的比较分析,认为坦桑尼亚变异株具有地域特点。本研究发现广东地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 基因序列 nt647、666、823、844、846 五个位点存在变异,其中 nt647 和 nt846 两个位点变异率高。但 nt666、823、844、846 四个位点均为同义突变,只有 nt647 由“T”变为“C”,导致相应的蛋白质由天冬氨酸(Asn)变异为丝氨酸(Ser),其脂肪族氨基酸的基本化学结构未发生改变,而且由于其 R 基的极性性质未发生改变,其为不带电荷的极性氨基酸的化学性质也未发生改变。根据 Antigenicity ValueX10 抗原性分析,该处变异导致相应分离株较 HPV16 德国标准株的抗原指数稍增强。但该处变异是否影响 E7 编码蛋白二聚体、多聚体的形成,是否增加蛋白质的稳定性及其金属结合能力、细胞转化能力,与其他宫颈癌高发地区 HPV 的感染率和致癌能力的差异是否有关,应作进一步研究。

实验方法上,首先,本研究采用巢式 PCR 方法对临床病例样品进行检测,通过外侧及内侧引物两次扩增出 HPV16 E7 基因序列,提高了检测的灵敏度,一

一定程度上克服了假阴性的问题,同时也增加了 PCR 反应的特异性及严格性,降低了假阳性。其次,为排除 DNA 聚合酶可能造成的各种碱基错配,本实验在测序时通过在正反两个方向对目的基因的正链及负链进行测序,最大限度地减少了测序中可能存在的模板错配,且双向测序具有一定的校对功能,变异处 G 峰(反义链)清晰,单一背景无杂峰,因此消除了由实验造成的核苷酸序列改变的可能性,表明本研究发现的病毒核苷酸序列的变异是由广东地区 HPV16 E7 基因与德国标准株病毒基因之间本身存在差异引起的。

参考文献:

- [1] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(4): 244-7.
- [2] Bosch FX, Manos M, Munoz N. Provalence of human papillomavirus in cervical cancer. A world prospective [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(6): 796-862.
- [3] zur Hausen H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1996, 1288(1): 55-78.
- [4] Chen L, Thomas EK, Hu SL, *et al.* Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991,88(1): 110-3.
- [5] Chen L, Mizuno MT, Singhal MC, *et al.* Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a syngeneic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16[J]. *J Immunol*, 1992, 148(8): 2617-21.
- [6] Chen L, Ashe S, Brady WA, *et al.* Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter-receptor for the lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4[J]. *Cell*, 1992, 71(7): 1093-102.
- [7] Juan C, Feoli-Fonseca JC, Luc L, *et al.* Human papillomavirus study of 691 pathological specimens from quebec by PCR-direct sequencing approach[J]. *J Med Virol*, 2001, 63(4): 284-92.
- [8] Welling GW, Weijer WJ, van Eler Z, *et al.* Prediction of sequential antigenic regions in proteins[J]. *FEBS Lett*, 1985, 188(2): 215-8.
- [9] Vousden KH, Doniger J, Dipaolo JA. The E7 ORF of HPV16 encode a transforming gene[J]. *Oncogene Res*, 1988, 67(2): 167-75.
- [10] Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papilloma virus polypeptides E6 E7 are zinc-binding proteins[J]. *J Virol*, 1988, 63(3): 1404-7.
- [11] Fuinage Y, Kazawa K, Nishikawa A, *et al.* Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias[J]. *Virus Genes*, 1994, 9(1): 85-92.
- [12] Icenogle J, Sathya P, Miller D, *et al.* Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and 16[J]. *Virology*, 1991, 184(1): 101-7.
- [13] Eschl D, Durst M, Meulen J, *et al.* Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus 16[J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(Part 7): 1829-32.

(上接 1271 页)

将有助于对热应激、热损伤研究提高到分子生物学水平,进一步阐明热应激与热损伤的分子机理,指导在实践中开发出诱导 HSP 的高表达,加快热适应、对抗热损伤的药物,将有助于提高高温高湿火器伤的救治水平。

参考文献:

- [1] Raghupathi R, Welsh FA, Lowenstein DH, *et al.* Regional induction of c-fos and heat shock protein-70 mRNA following fluid percussion brain injury in the rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995, 15(3): 467-3.
- [2] Allen GV, Chase T. Induction of heat shock proteins and motor function deficits after focal cerebellar injury [J]. *Neuroscience*, 2001, 102(4): 603-41.
- [3] Carey ME, Saran GS, Farrell JB, *et al.* Experimental missile wound to the brain[J]. *J Neurosurg*, 1989, 71(7): 754-64.
- [4] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(2): 248-54.
- [5] Mielke K, Brecht S, Dorst A, *et al.* Activation and expression of JNK1, p38 and ERK kinase, c-Jun N-terminal phosphorylation and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures[J]. *Neuroscience*, 1999, 91(2): 471-83.
- [6] Lindquist S. The heat-shock response[J]. *Annu Rev Biochem*, 1986, 55(8): 1151-9.
- [7] Planas AM, Soriano MA, Estrada A, *et al.* The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein and protein synthesis inhibition[J]. *Prog Neurobiol*, 1997, 51(6): 607-36.
- [8] Morimoto RL, Tissieres A. Stress proteins in biology and medicine [M]. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1990. 1-36.
- [9] Hart FU. The role of molecular chaperones in protein folding [J]. *FASEB J*, 1996, 9(10): 1559-69.
- [10] Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding[J]. *Nature*, 1996, 381(6583): 571-9.
- [11] Cao Y, Ohwatari N, Mastumoto T, *et al.* TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts[J]. *Pflugers Arch*, 1999, 438(3): 239-47.