

宫颈癌组织中 HPV16E6 序列 多态性及同源性分析

刘国炳¹, 刘欣¹, 庞战军¹, 邢福祺¹, 郭遂群¹, 马文丽², 张宝²

1. 南方医科大学南方医院妇产科, 广东 广州 510515

2. 第一军医大学分子生物学教研室, 广东 广州 510515

Gene mutation and origination analysis of human papillomavirus type16E6 in cervical cancer

LIU Guo-bing¹, LIU Xin¹, PANG Zhan-jun¹, XING Fu-qi¹, GUO Sui-qun¹, MA Wen-li², ZHANG Bao²

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China

2. Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China

【摘要】 目的: 探讨广东地区宫颈癌组织中 HPV16 肿瘤相关性抗原 E6 基因序列的多态性及同源性。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 HPV16E6, 经 DNA 序列测定法检测其基因变异, 进而分析其同源性。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。含有 HPV16 型的标本 34 例中扩增出 HPV16E6 25 例。其中 178 位核苷酸变异较大, 变异率为 72%, 其相应氨基酸均由天冬氨酸变为谷氨酸。结论: HPV16E6 DNA 序列发生碱基替换的区域主要在氨基酸端 94~241 位, 羧基端相对保守, 未见变异。广东地区宫颈癌组织中 HPV16E6 的热点突变为 Nt178。

肿瘤防治杂志, 2005, 12(13): 985-988

【ABSTRACT】 **OBJECTIVE:** To explore the intratypic nucleotide and amino acid sequence variations in the E6 open reading frame of human papillomavirus type16 in cervical cancer tissue. **METHODS:** The types of HPV was identified by PCR product sequencing. HPV 16E1 gene fragment in cervical cancer tissue was amplified by HPV-specific PCR. **RESULTS:** The detection rate of high-risk HPV types in 50 cases of cervical cancers was 78%. The mixed infection of HPV16 and HPV18 was found in 18 cases. The infection of HPV16 alone was seen in 16 cases. HPV16E6 was amplified 25 cases of HPV16E6 among the total 34 cases. **CONCLUSIONS:** By sequencing and phylogenetic analysis, the most frequently observed substitution in HPV16E6 ORF are distributed in the discrete regions, 94-241. Some substitutions result in non-silent mutation. The hot-spot mutation of HPV16E6 in cervical cancer from Guangdong is found at nucleotide 178 in the DNA sequence.

Chin J Cancer Prev Treat, 2005, 12(13): 985-988

【关键词】 宫颈肿瘤; 乳头状瘤病毒; 人/遗传学; DNA; 病毒/分析

【KEYWORDS】 cervix neoplasms; papillomavirus; human/genetics; DNA; viral/analysis

【中图分类号】 R737.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1009-4571(2005)13-0985-04

早期宫颈癌的发生, 特别是年轻化趋势十分明显, 这与 HPV 感染有明显关系^[1]。迄今为止, 至少发现了 100 余种 HPV, 其中 20 余种已证实与人类的宫颈肿瘤相关联^[2], 最常见的 HPV 类型为 16、18、31 和 45 型^[3]。流行病学分析表明, HPV16 感染广泛分布于四大洲, 通过对世界不同地域 HPV16 基因组变异分析,

发现 HPV16 型变异株具有地域特征、种族人群特异性^[4]。我们拟对广东地区大样本宫颈癌组织进行 HPV 型别鉴定, 并通过对 HPV16E6 基因的克隆及一级结构序列分析, 鉴定出广东地区人群中的型内变异株的序列特点, 以便设计出特异的寡核苷酸探针用于流行病学调查及诊断, 同时为 HPV 型特异性疫苗的研究策略提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

50 例宫颈癌组织均取自 2002 年 7 月~2004 年 7

【通讯作者简介】 刘国炳, 男, 安徽肥东人, 副教授, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤临床研究的工作。

Tel: 86-20-61641888-87290 E-mail: lgb@fimmu.com

月南方医院妇科住院手术患者。50 例患者,年龄 24~58 岁,平均年龄 37.2 岁,中位年龄 35 岁。患者均为广东籍,出生并长期生活在广东,无外地长期居住史。病理学诊断: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。

1.2 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、 $10\times$ PCR Buffer、dNTP Mixture、 $5\times$ Loading Buffer 和 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[3]中的 GP5、GP6 序列以扩增出 HPV L1 基因组片段。参照 HPV16E6 基因序列及引物设计原则,采用引物设计软件自行设计 HPV16E6 基因巢式 PCR 引物。E6 外侧引物:OS: 5'-TCAAGTATAAACTAAGGGCGT 3', OIS: 5'-TTG-TAATGGGCTCTGTCCGGTTC -3'; E6 内侧引物:IS: 5'-TAAGGGCGTAACCGAAAT -3', IIS: 5'-GTTGTCT-CTGGTTGCAATCT -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 测序由第一军医大学分子生物学研究所完成。

1.3 方法

1.3.1 PCR 直接测序法对宫颈癌组织中 HPV-DNA 分型 取 300 mg 的宫颈组织,根据动物基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取总 DNA。以各例宫颈癌组织 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,其中含样品宫颈癌组织 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。进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。挑选出在 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,购自美国的 ABI 公司)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 90% 以上,可确定为该型 HPV。

1.3.2 巢式 PCR 扩增 HPV16E6 基因序列及 DNA 序列测定 选取含有 HPV16 的各例宫颈癌组织 DNA 为模板,用上述 E6 外侧引物 OS 和 OIS 进行 HPV-DNA E6 区基因序列的第 1 次 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L,其中含样品宫颈癌组织 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 OS 和 OIS 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。进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。挑选出在 540 bp 处出现 DNA 带者,分别用 E6 内侧引物 IS、IIS 两引物进行第 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 IS 和 IIS 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。进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。在 520 bp 处出现 DNA 带者为扩增出的 HPV16E6 基因序列。将 PCR 产物纯化后,分别用引物 IS、OIS 两引物,通过正反 2 个方向对目的基因的正链及负链进行测序。

1.3.3 HPV16E6 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 HPV16E6 区的基因多态性和氨基酸变异。通过文献[4]报道的 Antigenicity ValueX10 方法进行抗原性分析。

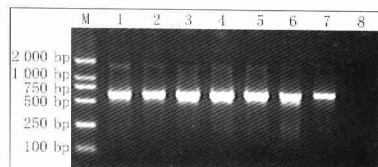
2 结果

2.1 宫颈癌组织中各型别 HPV-DNA 的检出率

在 50 例宫颈癌组织中,检测出 HPV16 和 HPV18 型混合感染最多 18 例(36%);单纯 HPV16 型感染 15 例(30%);单纯 HPV18 型感染 5 例(10%);检出 HPV58 型感染 1 例(2%)。

2.2 宫颈癌组织经巢式 PCR 扩增 HPV16 E6 基因序列

宫颈癌组织经巢式 PCR 扩增的产物进行凝胶电泳在 520 bp 处出现 DNA 带(图 1, Fig. 1),扩增出的 HPV16E6 基因序列部分核苷酸序列图(反意链)如图 2(Fig. 2)。



M: LD2000 DNA 标准; 1~7: 宫颈癌组织 DNA 样品; 8: 阴性对照。

图 1 HPV-DNA 巢式 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳图

M: LD2000 DNA marker; 1~7: DNA samples of cervical cancer; 8: Negative control.

Fig. 1 Electrophoretic analysis of PCR products of HPV-DNA subtracted from cervical cancer tissues on 2% agarose

2.3 HPV16 E6 基因多态性分析

HPV16E6 基因序列和蛋白序列与基因库中的 HPV16(德国标准株)基因序列比对,变异如表 1 (Tab. 1)。各临床病例与 HPV16(德国标准株)的核苷酸及蛋白质系统发生比较分别见图 3(Fig. 3)和图 4 (Fig. 4)。临床病例 n17 与 HPV16(德国标准株)的 Antigenicity ValueX10 抗原指数对比见图 5(Fig. 5)。

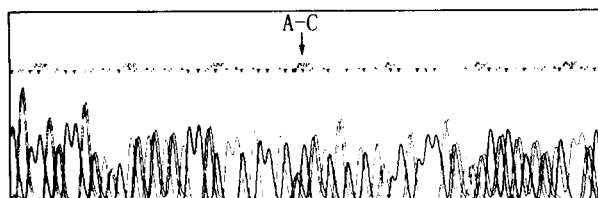


图 2 HPV16 E6 部分核苷酸序列图(反义链)

Fig. 2 Partial nucleotide sequence of HPV16 E6 gene (antisense chain)

表 1 HPV16 E6 基因和蛋白序列的变异

核苷酸位置	病例序号	密码子	蛋白位置	蛋白质
Nt94, Nt 95	36, 50	TC-CT	Nt 5	Arg-Gly
Nt 131	27, 29	T-G	Nt 17	Arg-Arg
Nt 173	14, 21, 44	G-A	Nt 31	His-Tyr
Nt 178	1, 6, 10, 17, 18, 19, 20, 22, 27, 29, 32, 39, 40, 42, 47, 49	A-C	Nt 32	Asp-Glu
Nt 385	7, 8, 9, 12	A-C	Nt 101	Lys-Asn

Fig. 1 Mutation of HPV16 E6 gene and protein sequence

Nucleotide site	Case number	Codon	Amino acid site	Protein
Nt94, Nt 95	36, 50	TC-CT	Nt 5	Arg-Gly
Nt 131	27, 29	T-G	Nt 17	Arg-Arg
Nt 173	14, 21, 44	G-A	Nt 31	His-Tyr
Nt 178	1, 6, 10, 17, 18, 19, 20, 22, 27, 29, 32, 39, 40, 42, 47, 49	A-C	Nt 32	Asp-Glu
Nt 385	7, 8, 9, 12	A-C	Nt 101	Lys-Asn

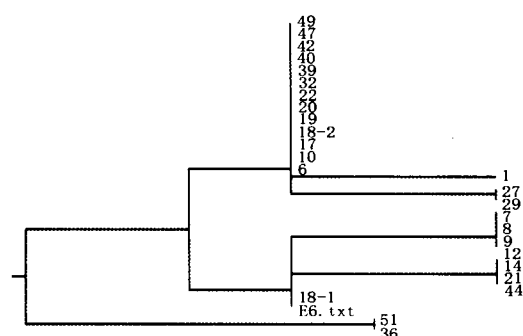


图 3 比较 25 例临床分离株与 HPV16 德国标准株的核苷酸系统发生树桩结构图

Fig. 3 Tree analysis of nucleotide sequences of 25 clinically isolated HPV DNA samples compared with the standard German HPV16

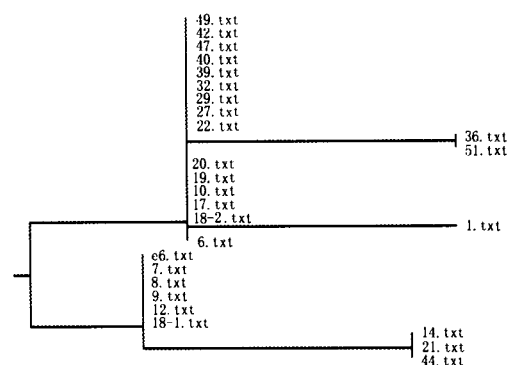


图 4 比较 25 例临床分离株与 HPV16 德国标准株的蛋白质系统发生树桩结构图

Fig. 4 Tree analysis of amino acid sequences of 25 clinically isolated HPV samples compared with the standard German HPV16

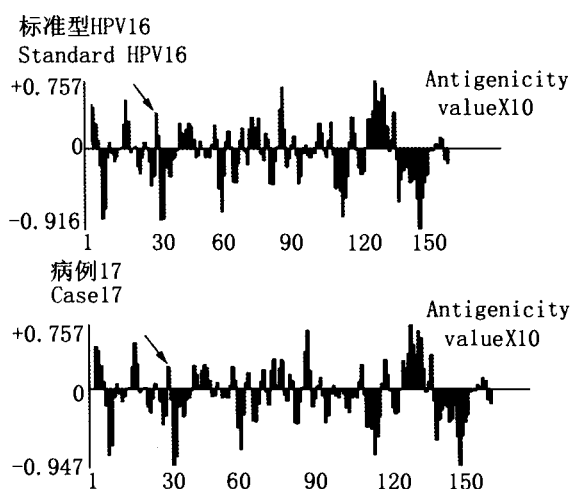


图 5 标本 17 与 HPV16 德国标准株的 Antigenicity ValueX10 抗原指数对比图

Fig. 5 Antigenicity value X10 analysis of case 17 compared with the standard German HPV16

3 讨论

HPV 按功能分为 E 区、L 区和非编码区 (non-coding region, NCR)。E 区含 E1~E8 8 个开放读框 (open reading frame, ORF), 其中早期基因 E6 和 E7 是导致细胞转化和恶性表型维持所必需的主要转化基因。HPV 诱发宫颈癌的主要机制是其 E6 和 E7 基因在宫颈细胞中的表达增加, 产生的 E6 和 E7 2 个癌蛋白分别与抑癌蛋白 p53 和 pRb(磷酸化的 Rb 蛋白)结合而诱导后两者降解, p53 和 pRb 的失活可能是细胞永生化的重要原因。

HPV 致癌力的差别主要是由 E6 和 E7 控制, 而 E6 和 E7 基因常发生型内变异, 在单核苷酸水平上的 E6 基因变异将影响 HPV 株的危险性^[6]。我们的研究显示, HPV16E6 的碱基变异主要集中在氨基端, 羧基端未发现变异。这与文献报道的 HPV16E6 羧基端

变异率低,氨基端相对变异相吻合^[7]。赵蔚明等^[8]关于 HPV16E6C 基因变异的研究也未发现变异。C 端变异可丧失与 p53 结合的能力,说明 C 端是 p53 蛋白的结合位点^[9],E6 与 p53 结合后通过泛蛋白途径引起 p53 的降解。HPV16 氨基端相对变异,通过 E6 突变体的功能研究发现,E6 氨基端突变体降解 p53 的活性丧失殆尽,说明氨基端对 p53 的降解是必须的^[6]。因此,我们从中得到启示,可以设计 HPV16E6C 端 PCR 引物,得到 N 端缺失的 E6C 端基因片段,以此作为疫苗的抗原基因,期望在消灭完整 E6 蛋白潜在致癌性的前提下,研究其激活肿瘤特异性免疫反应的作用。此设计方案对于进一步研制安全有效的 HPV 疫苗是有益的尝试。

近年来,HPV 感染率急剧上升,抗病毒药物应用十分频繁,大大增加了 HPV 耐药性和变异发生的机会。目前国内尚缺乏对我国宫颈癌 HPV 主要类型鉴定的研究报道,对 HPV 型内变种及早期基因变异的研究也仅见于对山东、新疆及湖北省的零星报道^[10],报道例数均较少(10~20 例),远不能反映我国各省市宫颈癌 HPV 的主要类型分布情况。

另外,在 PCR 过程中,由于 Taq 酶误配而致扩增序列发生碱基替换是出现假阳性的最主要的原因。一般经过 30 个循环的 PCR 扩增,在每 400~4 000 bp 的序列中会出现 1 个碱基的误配^[11]。我们采用高保真 TaKaRa Taq DNA 聚合酶经巢式 PCR 扩增出的 HPV16E6 基因序列,通过正反 2 个方向对目的基因的正链及负链进行测序,可排除不足 800 bp 长待测基因内的核苷酸错配的可能。我们对较大样本的测序,由于 PCR 酶的错配率是平均分布在整个过程中,而我们发现的碱基替换主要位于几个较集中的区域内,所以我们的所测序列具有可靠性,基本代表了临床分离株原始的序列。

我们的研究发现,HPV16E6 的碱基变异主要位于几个较集中的位点,核苷酸反义链中 nt178 位“A”变为“C”变异率为 72%;nt385 位“A”变为“C”变异率为 16%;nt173 位“G”变为“A”变异率为 12%;nt131 位“T”变为“G”变异率为 8%。另外,同时有两例临床分离株在 nt94 和 nt95 位出现“TC”倒位成“CT”的现象。其中 nt131 位的变异导致无意义突变,其余位点均导致错义突变。Yamada 等^[7]曾在他们的研究中发现,宫颈癌组织中的 HPV16E6 的碱基变异热点位点为 nt109 和 nt145,变异率分别为 83%和 91%。我国一些其他的文献也曾报道过一些 HPV16E6 的碱基变异的位点^[10]。我们的研究通过较大样本的检测发现了广东地区宫颈癌组织中的 HPV16E6 的碱基变异热点为 nt178 位,变异率为 72%,导致错义突变,相应蛋白质由天冬氨酸变为谷氨酸,其脂肪族氨基酸的基本

化学结构未发生改变,但由于其 R 基改变,由不带电荷的极性氨基酸变为带有负电荷的酸性氨基酸。根据 Antigenicity ValueX10 抗原性分析,该处变异导致相应分离株与 HPV16(德国标准株)的抗原指数稍增强。

肿瘤内普遍表达的 HPVE6 及 E7 癌基因产物,已被认为是肿瘤特异性杀伤(T 淋巴)细胞(cancer-specific T lymphocyte,CTL)介导的免疫治疗的有吸引力的靶分子。然而,HPV 病毒疫苗具有型特异性,基因变异株可通过不同机制逃避机体体液和细胞免疫的攻击,这给相应于 E6 蛋白的宫颈癌疫苗的研究带来了困难。我们的研究通过各临床病例与 HPV16(德国标准株)的核苷酸及蛋白质系统发生比较发现各临床分离株的系统起源,希望从这方面找寻到不同地区的流行株的来源,为设计特异性强的肿瘤疫苗提供指导。

【参考文献】

- [1] Bosch F X, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002,55(4):244-265.
- [2] Lehtinen M, Dillner J. Preventive human papillomavirus vaccination[J]. Sex Transm Infect, 2002, 78(1):4-6.
- [3] Bosch F X, Rohan T, Schneider A, et al. Papillomavirus research update: Highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference[J]. J Clin Pathol, 2001, 54(3):163-175.
- [4] Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, et al. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer[J]. Vaccine, 2001, 19(17-19):2549.
- [5] Welling G W, Weijer W J, van der Zee R, et al. Prediction of sequential antigenic regions in proteins[J]. FEBS Lett, 1985, 188(2):215-218.
- [6] Nakagawa S, Watanabe S, Yoshikawa H, et al. Mutation analysis of human papillomavirus type16E6 protein; transforming function for human cells and degradation of p53 in vitro[J]. Virology, 1995, 212(2):535-542.
- [7] Yamada T, Manos M M, Peto J, et al. Human papillomavirus type16 sequence variation in cervical cancers; a worldwide perspective[J]. Virol, 1997, 71(3):2463-2472.
- [8] 赵蔚明,周亚滨,权衡,等. 宫颈癌组织中 HPV16E6C 基因变异的研究[J]. 山东医科大学学报, 1999, 37(4):280-282.
- [9] Gao L, Walter J, Travers P, et al. Tumor-associated E6 protein of Human Papillomavirus type16 contains an unusual H-2Kb-restricted cytotoxic T cell epitope[J]. J Immunol, 1995, 155(12):5519-5526.
- [10] 许雪梅,司静懿,刘世德. 中国山东地区妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16E6E7 基因的分离、克隆和序列分析[J]. 中国医学科学院学报, 1999, 21(3):185-191.
- [11] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffels, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable polymerase[J]. Science, 1988, 239(4839):487-491.

收稿日期:2005-03-07 修回日期:2005-04-27

(编辑:李庆水)