

研究原著

文章编号: 1000-2790(2004)15-1403-04

荧光偏振方法快速检测 HPV16 E7 第 29 位密码子点突变

陈中灿¹, 张 菊¹, 高艳娥², 夏 琳¹, 白玉杰¹, 阎小君¹⁽¹⁾ 第四军医大学基因诊断技术研究所, 陕西 西安 710033, ⁽²⁾ 西安交通大学第二医院妇产科, 陕西 西安 710004

Rapid detection of HPV16 E7 point mutation at codon 29 with fluorescence polarization

CHEN Zhong-Can¹, ZHANG Ju¹, GAO Yan-E², XIA Lin¹,
BAI Yu-Jie¹, YAN Xiao-Jun¹Institute of Genetic Diagnosis, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Second Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

【Abstract】 AIM: To investigate the relationship between the mutation and the cervical carcinoma by detecting the nucleotide missense mutation A→G at codon 29 in E7 gene of HPV16 in the cervical carcinoma tissues and to establish a new method for detecting HPV point mutation. **METHODS:** Totally 53 cases were examined. HPV16 E7 was first amplified by Polymerase Chain Reaction and then TDFP was adopted to detect the types of the labeled ddNTP, by which the genotype was determined. The results were analyzed by statistics. **RESULTS:** The mutation rate was 43.48% (10 of 23) in invasive cervical cancer and point mutations were found in cervical tissues from 13 of the 33 case patients (39.39%), and from 2 of the 20 control subjects (10.00%). The point mutation was found statistically significantly more often in case patients than in control subjects ($P < 0.05$). The coherence with sequencing result was 100%. **CONCLUSION:** The rate of point mutation of HPV16 E7 gene in this study displays a significant geographic difference from other areas. HPV16 with the point mutation appears to be more oncogenic and may contribute to the high incidence of cervical cancer. These observations suggest that TDFP assay of HPV point mutation is an easy, fast and high throughput method for gene mutation detection.

【Keywords】 human papillomavirus; mutation; cervical carcinoma; fluorescence polarization

【摘要】 目的: 通过 TDFP 方法检测宫颈病变组织中 HPV16 E7 基因第 29 位密码子突变(A→G)并探讨其与宫颈

癌的相关性, 同时建立一种 HPV 点突变检测的新方法. 方法: 以 53 例 HPV16 阳性宫颈组织为研究对象, 首先 PCR 扩增含待检测位点的靶基因片段, 然后用 TDFP 方法检测荧光素碱基的掺入情况, 判断所研究位点的基因型. 结果: 宫颈浸润癌组织中 HPV16 E7 第 29 位密码子的突变率为 43.48% (10/23), 对照组为 10.00% (2/20), 病例组为 39.39% (13/33), 组间突变率差异有显著性 ($P < 0.05$). 该法与随机抽查标本测序结果一致率为 100%. 结论: 本研究中 HPV16 病毒发生 E7 第 29 位密码子突变的情况与其他地区相比存在差异; HPV 点突变 TDFP 检测方法是一种快速简便、高通量的基因突变检测技术.

【关键词】 人乳头瘤病毒; 突变; 宫颈癌; 荧光偏振

【中图分类号】 R752 **【文献标识码】** A

0 引言

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)属于 DNA 病毒, 其中 HPV16、18 被认为是宫颈癌的高危因子. 特别是 HPV16 型, 在宫颈癌组织中的检出率超过 50%, 在宫颈癌的发生中起着重要作用. HPV16 E7 蛋白是肿瘤细胞转化的主要癌蛋白, 通过结合并失活肿瘤抑制蛋白 Rb 而发挥转化作用. HPV DNA 有许多天然存在的变异, 自然状态下发生的 HPV16 E7 变异的生物学特性有较大差异, 其中 E7 基因第 29 位密码子(HPV16 第 647 位核苷酸)A→G 错义突变是一重要的基因变异, 对宫颈癌的诊断、预后判断可能具有重要意义^[1], 我国内地人群中此突变与宫颈病变的关系还未见报道. 目前大多数基因点突研究方法不同程度地存在方法复杂、通量低及成本高等不足. 本研究利用快速、高通量、敏感的基因突变检测新方法初步分析了宫颈病变中该突变的发生情况, 该方法的建立为深入研究 HPV DNA 的突变与宫颈癌的关系奠定了方法学基础.

1 材料和方法

1.1 材料 选取本实验室用 HPV 荧光偏振分型方法^[2]确定的 53 例 HPV16 阳性宫颈组织标本为研究对象, 由第四军医大学西京医院和西安交通大学第二医院提供, 均经病理确诊. 分为对照组 20 例(良性病变 7 例和低度鳞状上皮内病变 13 例)与病例组 33 例

收稿日期: 2004-04-08; 修回日期: 2004-07-20

作者简介: 陈中灿(1976-), 男(汉族), 河南省开封市人, 硕士生(导师阎小君). Tel (029)83374771 Email: chenzhongcan@163.com

(高度鳞状上皮内病变 10 例和浸润癌 23 例). *Taq* DNA 聚合酶购自 Promega 公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; pGEM (r)-T Easy 载体购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、X-Gal 购自华美公司; PCR 扩增仪购自美国 Elmerkin 公司; 384 微孔板 (MJ Research); 荧光偏振检测所用试剂盒 (含 PCR 产物消化液与 R110、TAMRA 荧光标记的终止子、聚合酶) 和荧光偏振检测仪 Victor2 购自美国 PerkinElmer 公司. 根据 GenBank 中 HPV 16 参考序列设计突变所在区域的上下游扩增引物和 TDI 引物, 扩增片段长 168 bp. P1: 5'-TTAGATTTGCAACCAGAGACA-3'; P2: 5'-ACTCTACGCTTCGGTTGTGC-3'; TDI 引物 5'-TGACAGCTCAGAGGAGGAG-3', 由北京赛百胜公司合成.

1.2 方法

1.2.1 TDI-FP 检测点突变 ①PCR 扩增 HPV 16 E7 基因 扩增反应总体积 25 μ L, 上下游引物 0.25 μ mol/L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ 2 mmol/L, dNTPs 分别为 150 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, 5~10 ng 基因组 DNA 作模板. 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 40 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 25 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 取 5 μ L PCR 扩增产物用浓度 15 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳, 溴化乙锭染色. 由含未突变与突变的 E7 重组质粒作对照. ②扩增产物的纯化

5 μ L PCR 产物中加入 2 μ L 10 $\times$ 消化酶 (核酸外切酶 I 和虾碱性磷酸酶), 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 消除游离的引物和剩余 dNTPs, 80 $^{\circ}$ C 加热 20 min 灭活消化酶. ③TDI 掺入反应 向消化后的 PCR 产物中加入 13 μ L 由 0.05 μ L AcycloPol 聚合酶、2 μ L 10 $\times$ reaction buffer、0.5 μ L 10 μ mol/L TDI 引物、1 μ L R110-acyCTP/TAMRA-acyTTP 终止子及 9.45 μ L 去离子水组成的混合物. 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环, 最后 15 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. ④荧光偏振检测 将反应产物加入 384 微孔板中用 wallac1420 Victor2 仪器检测样品的荧光偏振值 (FP), 测得的原始数据调入 EXCEL 由专用相关软件分析突变基因型.

1.2.2 统计学分析及测序验证 采用 χ^2 检验比较对照和病例组基因突变率的差别, $P < 0.05$ 表示差异显著, 由 SPSS 10.0 统计分析软件包处理. 随机选择突变与未突变标本各 5 例, 将其 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 将回收目的片段与克隆载体 pGEM-T Easy 连接, 构建 HPV 16 E7-pGEM-T 重组质粒, 转化 CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞. 在含有

IPTG, X-gal 的氨苄青霉素阳性 LB 平皿中蓝白筛选, 随机挑取 3 个白色单菌落扩增培养, 按 Wizard⁹ Plus Minipreps DNA 纯化试剂盒说明提取重组质粒, 并进行 PCR 鉴定. 选含有 168 bp 外源 DNA 片段阳性克隆, 送上海 Sangon 生物工程公司测序, 对测序结果用 BLAST 进行同源性分析.

2 结果

2.1 HPV16 E7 PCR 扩增结果 标本 PCR 产物电泳后可见 168 bp 的预期片段 (Fig 1).



M: DL2000 Marker; 1-5: Samples

Fig 1 PCR amplification of cervical samples

图 1 宫颈标本的 PCR 扩增

2.2 HPV 16 E7 第 29 位密码子点突变检测结果与验证 根据 TDI-FP 原理, R110-acyCTP 和 TAMRA-acyTTP 掺入时其各代表的 FP 将增高. 经检测有 15 例标本结果位于散点图右下象限, 表示 R110-acyCTP 掺入, 即 A $\rightarrow$ G 突变; 38 例标本结果位于左上象限表示有 TAMRA-acyTTP 掺入, 无突变; 重组质粒对照分别在左上和右下象限; 空白对照结果位于左下象限, 表示无终止子掺入 (Fig 2). 病例组与对照组间突变率统计学差异显著 (Tab 1). 其中各级别病变组织的突变率分别为浸润癌 43.48% (10/23), 高度鳞状上皮内病变 30.0% (3/10), 低度鳞状上皮内病变 15.38% (2/13) 及良性病变 (0/7).

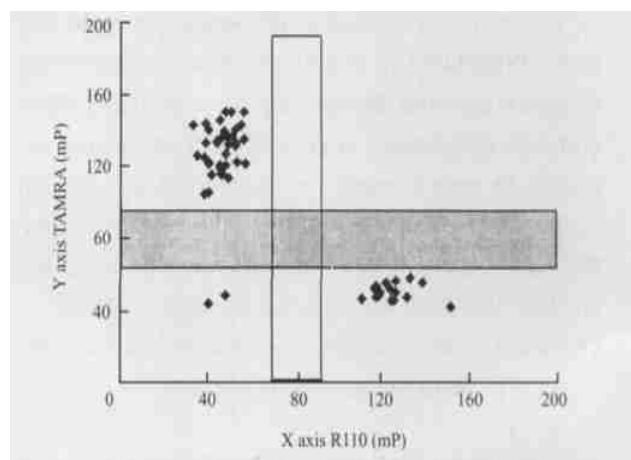


Fig 2 Scatter plot of HPV16 E7 mutation of samples

图 2 标本中 HPV 16 E7 基因突变检测的散点

表1 HPV 16 E7 基因第 29 位密码子点突变的分布

Tab 1 Distribution of HPV16 E7 Gene point mutation at codon 29

Group	Mutation	Non- mutation	Total
Case	13	20	33
Control	2	18	20

$\chi^2=5.302, P=0.021.$

随机挑选的 10 例标本的 TDI-FP 检测结果与测序结果相比较, 5 例发生突变, 5 例未突变, 结果全部一致。

3 讨论

全世界大约每年有 50 万新发宫颈癌病例, 其中 80% 发生在发展中国家。我国是 HPV 感染比较严重的地区之一, 每年新发病例约 15 万, 占世界的 1/3。我国人群宫颈癌感染也以 HPV 16 为主, 其各早晚期基因均存在不同形式的突变^{3,4}。其中 HPV 16 E7 蛋白 N 端区包括 pRb 结合位点和 CK II 磷酸化位点, 具有强抗原性, 16~37 位氨基酸含两个独立的结构域, 其中 21~29 位氨基酸介导 pRb 抑癌蛋白的结合, 是与 pRb 结合的最关键位点。E7 和 Rb 蛋白之间的相互作用是恶性转化的最重要机制。HPV 16 E7 基因第 29 位密码子突变导致氨基酸由天门冬酰胺变为丝氨酸(Asn→Ser), 丝氨酸被磷酸化, 蛋白质构象和极性可能发生改变, 从而改变生物学功能如结合 pRb 的能力, 影响 HPV 的转化作用和免疫原性等生物学特性⁵。

目前对 HPV 16 E7 基因的第 29 位密码子突变与宫颈癌相关性无统一的结论。韩国的一项研究中^[1]发现 70% 的宫颈浸润癌中存在该突变, 与对照组相比有差异, 提示 E7 癌蛋白的这种变异改变了其生物学活性。Stephen 等^[6]对四川地区的宫颈癌组织仅得到其突变率而未做进一步的对照分析。我国内地 HPV 16 此点突变与宫颈癌的关系尚无系统研究。我们利用 TDI-FP 新技术对宫颈病变中 HPV 16 E7 第 29 位密码子点突变进行了检测, 结果本研究样本浸润癌的突变率为 43.48%, 不同与其他地区; 突变率随病变程度的升高而增加, 提示该突变可能是 HPV 致癌的一个高危因素。另外如果 E7 蛋白的氨基酸改变位于免疫识别的关键区, 针对一种变异病毒型的疫苗可能对其他的变异型的效果会降低。因此还需要结合前瞻性队列研究的大规模人群检测来探讨自然发生的 E7 基因变异的生物学和临床意义。

建立在扩增基础上的基因点突变检测方法有传统的 PCR-RFLP、等位基因特异性寡核苷酸分析法

(ASO)、寡核苷酸链接检测法(OLA)及新发展的反向限制性位点突变分析(iRSM)、等位基因特异性扩增技术(ASPCR)及基因芯片等检测方法, 最直接的方法是基因测序^[4]。这些方法不同程度地存在通量低、成本高、技术操作复杂及污染等不足, 不易推广和大规模应用。本研究建立了 HPV 16 E7 基因点突变 TDI-FP^[7]检测方法, 该方法是一种通量高、实用性强的基因分析技术, 首先 PCR 扩增含有待检测位点的 HPV 基因区域, 然后对 PCR 产物进行纯化, 再用突变位点上游互补的 TDI 引物和模板反应, TDI 引物的 3'末端掺入与待检测碱基互补的荧光标记终止子: 双脱氧 R110-acyCTP 或 TAMRA-acyTTP。荧光标记的双脱氧核苷酸掺入引物后其分子旋转速度将减小, 相应波长偏振光激发后所得偏振值(单位为 mP)将明显增高, 由此可知加入碱基的种类, 并依据碱基互补原则判断突变位点的核苷酸种类。

TDI-FP 的优点是: ①不需要任何标记的引物, 试剂和设备价格低; ②单碱基掺入反应(TDI)条件容易优化; ③用荧光偏振做为检测方式, FP 值大小与荧光强度无关; ④偏振值检测直接在溶液中进行, 不需要分离未结合的标记 ddNTPs; ⑤TDI-FP 方法能够满足从小规模的实验研究到全自动高通量的大规模临床检测需要^[8]。本方法已经广泛应用于包括单核苷酸多态性(SNPs)^[9]和单倍型在内的基因变异研究, 从标本中随机选择 10 例标本用测序的方法进行对比, 符合率为 100%, 与 TDI-FP 技术在其他基因变异研究中结果相一致^[10]。该方法同样可应用于其他 HPV 位点的突变检测, 有望为今后大规模研究 HPV 基因变异和 HPV 相关肿瘤诊断试剂的开发、预防及治疗性疫苗的研制提供十分有用的技术平台。

【参考文献】

[1] 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: 275—281.

[2] 张 菊, 高艳娥, 阎小君, 等. 高通量人乳头瘤病毒分型基因诊断方法的研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2003; 26(3): 145—147.
Zhang J, Gao YE, Yan XJ, *et al.* A high throughput assay for human papillomavirus genotypes with fluorescence polarization[J]. *Chin J Lab Med*, 2003; 26(3): 145—147.

[3] Vaeteewoottacham K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co-mutation of HPV 16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas[J]. *Anticancer Res*, 2003; 23: 1927—1931.

[4] 陈 蕊, 张 菊, 阎小君, 等. 人乳头瘤病毒 16 型主要衣壳蛋白 L1 基因的克隆及序列分析[J]. *第四军医大学学报*, 2002; 23(7): 593—595.

Chen R, Zhang J, Yan XJ, *et al.* Cloning and sequence analysis of L1 major capsid protein gene of human papillomavirus type 16[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002; 23(7): 593—595.

[5] Edmonds C, Vousden KH. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein[J]. *J Virol*, 1989; 63: 2650—2656.

[6] Stephen AL, Thompson Ch, Tattersall MH, *et al.* Analysis of mutations in URR and E6/E7E oncogenes of HPV16 cervical cancer isolates from central China[J]. *Int J Cancer*, 2000; 86:695—701.

[7] Hsu TM, Chen X, Duan S, *et al.* Universal SNP genotyping assay with fluorescence polarization detection[J]. *Biotechniques*, 2001;

31; 560—570.

[8] Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2003; 5: 43—60.

[9] Freeman BD, Buchman TG, McGrath S, *et al.* Template-directed dye-terminator incorporation with fluorescence polarization detection for analysis of single nucleotide polymorphisms implicated in sepsis[J]. *J Mol Diagn*, 2002; 4: 209—215.

[10] Hsu TM, Law SM, Duan S, *et al.* Genotyping single-nucleotide polymorphisms by the invader assay with dual-color fluorescence polarization detection[J]. *Clin Chem*, 2001; 47: 1373—1377.

编辑 许昌泰

·经验交流· 文章编号: 1000-2790(2004)15-1406-01

氧气驱动雾化吸入普米克令舒及博利康尼雾化溶液治疗毛细支气管炎

邹秋萍, 侯淑萍
(中原油田总医院儿科, 河南 濮阳 457001)

【关键词】普米克; 博利康尼; 毛细支气管炎; 吸入
【中图分类号】R562.21 【文献标识码】B

0 引言 毛细支气管炎为2岁以下婴幼儿常见的呼吸道感染性疾病, 主要由呼吸道合胞病毒(RSV)引起, 既往治疗方法多为抗病毒、氧疗、短期静脉应用糖皮质激素等。但静脉应用糖皮质激素副作用大, 国外报道吸入糖皮质激素及支气管扩张剂治疗毛细支气管炎可缓解哮喘症状, 缩短疗程, 国内尚无此方面的研究报道, 我们应用普米克令舒及博利康尼雾化溶液氧气驱动吸入疗效显著, 现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 2003-02/2004-02我科收治的156例毛细支气管炎患儿, 诊断标准均符合毛细支气管炎诊断标准^[1](除外伴先天性心脏病、佝偻病、营养不良及并呼吸衰竭、心力衰竭及其他脏器衰竭的患儿)。随机分为治疗组及对照组, 治疗组及对照组各78例, 年龄3~20 mo, 平均年龄11.5 mo, 其中治疗组男42例, 女36例, 对照组男40例, 女38例。两组例数、性别、年龄、病程均无显著性差异。对照组常规抗病毒、静脉用地塞米松、吸氧、止咳、化痰、退热等对症治疗。治疗组在上述综合治疗基础上, 加用雾化吸入普米克令舒及博利康尼。普米克令舒及博利康尼雾化溶液(无锡阿斯利康公司生产), 患儿体质量 ≥ 10 kg 1 mL/次, 2次/d; < 10 kg 0.5 mL/次, 2次/d, 加生理盐水至2 mL由氧气驱动泵雾化吸入10~15 min(氧流量6~7 L/min)直至症状消失或减轻后3~5 d停药。

1.2 方法 观察两组喘憋、咳嗽、哮鸣音、肺部湿罗音等主要症状、体征消失时间及住院日数。

统计学处理: 结果采用SPSS 10.0软件包进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 u 检验。

2 结果 两组主要症状、体征消失时间及住院日数见表1, 两组在喘憋、呼吸困难的改善方面有显著差异($P < 0.05$), 对咳嗽消失两组无显著差异, 治疗组较对照组住院日数缩短两组比较有显著差异($P < 0.05$)。

表1 两组主要表现消失及住院时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	喘憋消失	咳嗽消失	哮鸣音消失	湿罗音消失	住院日数
治疗	2.89 $\pm$ 1.32 ^a	4.92 $\pm$ 1.69	2.92 $\pm$ 1.32 ^a	5.12 $\pm$ 1.89 ^a	9.98 $\pm$ 1.82 ^a
对照	4.12 $\pm$ 1.28	5.52 $\pm$ 1.92	4.12 $\pm$ 1.28	6.13 $\pm$ 1.49	11.32 $\pm$ 1.89

^a $P < 0.05$ vs 对照。

3 讨论 毛细支气管炎多由呼吸道合胞病毒感染引起, 其病理改变为毛细支气管上皮细胞坏死和周围淋巴细胞浸润, 黏膜下充血、水肿和腺样增生, 黏液分泌增多, 毛细支气管腔狭窄甚至堵塞, 导致肺气肿和肺不张, 出现换气和通气功能障碍。其临床症状以喘憋为主^[2]。近年来有关毛细支气管炎发病机制的探讨认为毛细支气管炎包含了由免疫细胞介导的气道炎症反应。对毛细支气管炎患儿予以蒸馏水激发试验阳性率明显高于健康儿, 提示毛细支气管炎患儿存在气道高反应^[3]。目前毛细支气管炎的治疗除控制感染、对症及营养支持外, 最重要是控制喘憋, 由于毛细支气管炎有免疫介导的炎症存在及气道高反应性, 故雾化吸入普米克令舒及博利康尼, 可解除气道狭窄, 缓解喘憋症状, 且吸入药物具有局部药物浓度高, 直接作用于靶器官且起效迅速等优点。普米克令舒是一种吸入性类固醇激素, 局部活性好, 无全身应用皮质激素的副作用, 博利康尼雾化溶液是支气管扩张剂, 二者雾化液通过氧气雾化泵驱动为3~6 μ m 雾化颗粒随吸气送入患儿下呼吸道, 前者与气道上皮糖皮质激素受体结合从而起到抗炎、抗过敏作用^[4]。后者特异性兴奋平滑肌上 β_2 肾上腺能受体, 使支气管平滑肌扩张, 气道阻力下降, 迅速起到扩张平滑肌、改善呼吸, 同时又发挥了吸入液局部抗炎优势, 减轻了气道黏膜水肿, 从而缓解喘憋。本组患儿应用普米克令舒及博利康尼雾化溶液吸入后, 在缓解喘憋症状及哮鸣音消失等方面优于对照组, 且能缩短毛细支气管炎的疗程及住院时间。

总之, 普米克令舒和博利康尼雾化溶液两种药物均为局部吸入, 用量小, 可减少全身用药的不良反应, 用药方便, 治疗毛细支气管炎疗效确切。本组应用78例未见明显不良反应。

【参考文献】

[1] 胡亚美, 江载芳, 诸福堂. 实用儿科学[M]. 第7版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1199.

[2] 王慕逊. 儿科学[M]. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 282.

[3] 罗运春, 陈小茅. 毛细支气管炎远气道超雾化蒸馏水激发试验: 附23例报告[J]. 临床儿科杂志, 2000; 18(2): 125.

[4] 白剑鹏, 华涛, 许白叶. 普米克令舒治疗肺炎105例[J]. 实用儿科临床杂志, 2003; 18(3): 217—218.

编辑 许昌泰

收稿日期: 2004-06-07; 修回日期: 2004-07-14
作者简介: 邹秋萍(1964-), 女(汉族), 山东省莱州市人, 学士, 副主任医师. Tel. (0393)4729358