

文章编号: 1000-3711(2006)03-0017-04

35例维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16型 E7致癌基因突变分析^{*}

余 勳¹, 马正海^{1**}, 热西旦·尼格买提¹, 刘开江², 张富春¹

(1. 新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 乌鲁木齐 830046

2. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 本研究旨在检测 HPV 16E7基因在新疆南部维吾尔族妇女宫颈癌组织中的突变。方法 从 35份新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织标本中提取组织 DNA, 作为模板, PCR扩增 HPV16 E7全长基因, PCR产物直接测序或克隆后测序, 分析新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16E7基因的突变。结果 PCR检测结果宫颈癌组织中 HPV16E7阳性率为 82.86% (29/35); 27个 E7分离片段的测序和序列分析表明, 26个分离株 E7基因与原型相同, 1个分离株 E7基因核苷酸发生 2处突变, 即 647位(在 HPV 16基因组中的位置)的 A→G, 氨基酸由 Asn 变异为 Ser, 845位的 T→C, 氨基酸不变。结论 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌患者感染的 HPV 16中存在 E7基因的变异株, 该变异株可能是由人口流动传入。

关键词: 人乳头状瘤病毒 16型; 宫颈癌; E7 基因突变

中图分类号: R 737.33 Q 754

文献标识码: A

Human Papillomavirus 16 E7 Oncogene Variants in Xinjiang Uygur Women with Cervical Carcinoma

YU Meng¹, MA Zheng-hai¹, Rexidan NIGMAT¹, LIU Kai-jiang², ZHANG Fu-chun¹

(1 Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology,

Urumqi, Xinjiang 830046 China; 2 The Affiliated Hospital of Cancer,

Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract Objective This study was designed to investigate the variant of HPV 16 E7 from cervical carcinoma biopsies in Xinjiang Uygur Women. **Methods** The tissue DNA was extracted from 35 cervical carcinoma biopsies in Xinjiang Uygur Women. HPV 16E7 genes were amplified by PCR from the cervical carcinoma tissue DNA. Nucleotide sequences of the HPV 16 E7 genes were determined with direct or cloning sequencing methods to analyze the mutations of HPV 16 type E7 gene. **Results** The result of PCR showed that the positive rate of HPV 16 E7 was 82.86% (29/35). The DNA was sequenced. By analyzing the mutations of 27 E7 gene from 29 cases, we found 26 HPV 16 E7 among the 27 cases were maintained to be prototype. Two mutations were detected in one E7 gene among the 27 cases: one was 647 (A→G), resulting in amino acid Ser substituted for Asn; the other was 845 (T→C), without variation of amino acids. **Conclusions** There is a variant strain of HPV 16 E7 gene from cervical carcinoma biopsies in the Uygur Women from southern Xinjiang. The variant strain might be introduced into the region by population floating.

Key words Human Papillomavirus Type 16; Cervical cancer; E7; Gene mutation

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 是一类具有严格宿主范围和嗜组织特异性的小 DNA 病毒, 可引起人生殖道和肛门皮肤、粘膜产生良性和恶性肿瘤

瘤, 约 80% 的宫颈癌发生与高危型 HPV 的感染密切相关, 其中以 HPV 16 为主^[1]。HPV 16 基因组主要由早期基因区 (E 区)、晚期基因区 (L 区) 和长控制区

* 收稿日期: 2006-04-19 修回日期: 2006-05-08

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (200221103)

作者简介: 余勳 (1976-), 硕士, 研究方向: 分子生物学。

** 通讯作者: 马正海 E-mail: mzhxj@sohu.com 0991-8583259

(Long control region LCR)组成, E区有 6个开放读码框架(Open reading - frame ORF), 即 E1、E2、E4、E5、E6、E7, 其中与转化有关的为 E6和 E7癌基因。E7基因作为 HPV 16的主要转化基因之一, 能与 Ras基因协同作用, 并可灭活抑癌蛋白 Rb, 从而促使 HPV 16感染细胞发生转化、癌变^[2]。

目前, 将世界范围不同种族、不同人群中分离的 HPV 16区分为 5种主要的种系发生群^[3], Icenogle等的研究表明^[4], 世界不同地区的宫颈癌组织中普遍存在 HPV 16E7变异株。新疆南部维吾尔族聚居区是我国宫颈癌高发区, 患病率高达 459 ~ 590 /10万, 已有的调查表明, 新疆南部维吾尔族妇女高发宫颈癌与 HPV 16感染密切相关, 其宫颈癌组织中 HPV 16检出率达 77.6% ~ 82.6%^[5]。我们已报道了新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV 16E6基因、L1基因及 L2基因^[6]的变异情况。为了解我国宫颈癌患者组织中 HPV 16E7基因结构特点, 本研究通过对新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织中 HPV 16E7基因的克隆及一级结构序列分析, 检测该地区 HPV 16E7基因的突变, 为该地区宫颈癌组织中感染 HPV 16基因突变积累分子流行病学资料。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌组织: 采取 2000年 2月 ~ 2003年 10月新疆医科大学附属肿瘤医院 35例宫颈癌手术或活检标本(经病理检查确诊为宫颈癌), 患者年龄在 36.0 ~ 65.5岁, 中位年龄 48.5岁, 术前未进行放、化疗。标本 -80℃保存。

1.2 主要试剂及材料: 克隆质粒 pUCm - T购自上海生工生物工程公司, 菌种 *E. coli* DH5α 为本室保存。核酸内切酶、DNA marker Taq多聚酶、T₄DNA 连接酶及 PCR片段回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物的设计与合成: 根据 K Seedorf等 1985年发表的 HPV 16型 DNA 全序列^[7], 利用 Perkin Elmer (PE)公司 primer express软件设计跨 HPV 16 E7整个阅读框的一对引物。引物 1的序列为: 5' CACG-TAGAGAAACCCAGCTGTAA 3'; 引物 2的序列: 5' GCAGGATCAGCCATGGTAGATT 3'。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 宫颈癌组织 DNA 的提取: 按 TaKaRa MiniBEST Animal Tissue Genomic DNA Extraction Kit Ver 2.0说明书进行。

1.5 PCR 扩增: 以宫颈癌组织 DNA 为模板, 加 HPV 16 E7引物, 按常规方法扩增 HPV 16 E7基因片段。扩增

参数: 95℃ 5min; 94℃ 30sec; 55℃ 30sec; 72℃ 1min 35个循环; 72℃ 7min。

1.6 HPV 16 E7基因序列测定及分析: 用 PCR片段回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收 PCR 产物, 分别用 HPV 16 E7P1、P2进行正反向 DNA 测序, 正反向测序结果互相校正。用 DNAMAN version 5.2.2软件对序列进行分析。

1.7 pUCm - T HPV 16 E7重组质粒的构建: 将一 HPV 16E7PCR回收片段与克隆载体 pUCm - T 用 T₄DNA连接酶 16℃连接过夜, 连接产物转化至 *E. coli* DH - 5α 中, 经蓝白斑筛选、增菌培养后提取质粒, 酶切鉴定其正确性, 测序验证 PCR回收片段直接测序的可信度。

2 结果

2.1 宫颈癌组织中 HPV 16 E7 DNA 片段的扩增结果: 以宫颈癌组织 DNA 为模板, 用 HPV 16 E7引物进行 PCR扩增, 35份标本中有 29份标本为 HPV 16E7阳性(阳性率 82.86%), 图 1所示为 8份样品 PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果, 可见一清晰扩增条带, 大小约为 297bp。

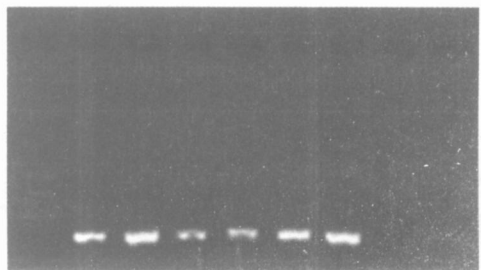


图 1 PCR扩增 HPV 16 E7基因

Fig 1 Amplification of HPV 16 E7 Gene

1. DL2000 DNA 量分子标志; 2 ~ 9. HPV 16 E7基因的 PCR 产物

1 DL2000 Marker 2 ~ 9 Amplification of HPV 16 E7 PCR

2.2 pUCm - T HPV 16E7重组质粒的构建: 将一 HPV 16 E7PCR回收片段与克隆载体 pUCm - T 连接, 重组质粒用 EcoRI 和 HindIII酶切, 切出约 300bp 的 DNA 片段(图 2), 该重组质粒用 pUCm - T 通用引物进行测序, 测序结果与该 PCR回收片段直接测序的结果一致, 说明 PCR回收片段直接测序的结果是可信的。

2.3 HPV 16E7基因序列测定及一级结构分析: 29份标本 PCR 扩增产物测序结果表明扩增产物均为 HPV 16E7基因, 其中 2个 E7 PCR回收片段测序结果较差, 不进行突变分析, 其余 27个 E7 PCR回收片段测序结果与德国标准株进行比较, 结果显示, 测序结果

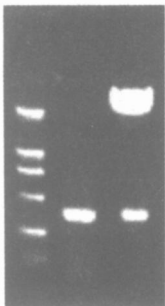


图 2 重组质粒 pUCm - T HPV 16E7 酶切鉴定

Fig 2 RE Analysis of Recombinant Plasmid

pUCm - T HPV 16 E 7

1. DL2000 DNA 分子量标志; 2 HPV 16E7 基因的 PCR 产物; 3 EcoRI /HindIII 酶切 pUCm - T HPV 16E7 的产物

1. DL2000 Marker 2 Amplification of HPV 16 E7 gene 3 pUCm - T HPV 16E7 by EcoRI /HindIII

表明 PCR 扩增得到的均为 HPV 16E7 基因, E7PCR 回收片段测序结果与德国标准株进行比较, 结果显示, 26 个分离株 E7 基因与原型相同, 1 个分离株 E7 基因核苷酸发生两处突变, 既 647 位 (在 HPV 16 基因组中的位置) 的 A→G, 核苷酸三联密码由 AAT 变为 AGT, 氨基酸由 Asn 变异为 Ser; 845 位的 T→C, 核苷酸三联密码由 TCT 变为 TCC, 氨基酸不变 (图 3. 4)。

3 讨论

新疆是宫颈癌高发的地区之一, 为了解新疆宫颈癌患者组织中 HPV 16E7 基因的结构特点, 本研究对新疆地区宫颈癌活检组织中 HPV 16 E7 基因进行了克隆及一级结构序列分析。应用 PCR 技术从 29 例宫颈癌组织中扩增出 HPV 16(新疆株) E7 基因。对克隆到的

REF	ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAAC	60
XJ	-----g-----	60
REF	GATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGT	120
XJ	-----g-----	120
REF	CCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAG	180
XJ	-----	180
REF	TGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTTCGTACTTTGGAA	240
XJ	-----	240
REF	GACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA	297
XJ	-----C-----	297

图 3 HPV16 新疆株 E7 基因核酸序列与参考株的同源性比较

Fig 3 Comparison of the Nucleotide Acid Sequence of HPV16E7 Gene Between Xinjiang Strain and REF

REF	MHGDPTPLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCK	60
XJ	-----S-----	60
REF	CDSTLRLCVQSTHVDIRLTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP	98
XJ	-----	98

图 4 HPV16 新疆株 E7 蛋白氨基酸序列与参考株的同源性比较

Fig 4 Comparison of the Amino Acid Sequence of HPV16E7 Protein Between Xinjiang Strain and REF

29 例 HPV 16E7 基因经过正反向测序分析, 结果表明, 26 个分离株 E7 基因与原型相同, 1 个分离株 E7 基因核苷酸发生 2 处突变, 即 647 位 (在 HPV 16 基因组中的位置) 的 A→G, 氨基酸由 Asn 变异为 Ser; 845 位的 T→C, 氨基酸不变。该突变与湖北^[8]、北京^[9]等地的报道均不相同。

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之

一。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^[10]。在韩国妇女中 E7 N29S 变异会提高 E7 的致癌性^[11]。

以上两个位点的突变在 HPV 16 亚洲型中普遍存在, 突变率高达 94.6%^[12], 提示该变异株属亚洲型, 且该突变序列与 Fujinuma 等在 GenBank (注册号: AF534061) 中登陆的东亚型 E7 基因一致。据文献报道, 以上两个位点的突变在一些国家和地区妇女宫颈

癌患者感染的 HPV 16中也不同程度地存在,日本妇女宫颈癌患者感染的 HPV 16中,647位 A→G 的突变率为 60.0% (9/15),846位 T→C 的突变率为 46.7% (7/15)^[13];在香港妇女宫颈癌患者感染的 HPV 16中,两个位点的突变率分别为 58.0%和 52.9%^[12]。另外,647位 A→G 的置换突变在不同人群中分布各异^[12]:中国中部(四川)占 14.3%,韩国占 59.5%,在德国仅发现 0.9%,坦桑尼亚 36.4%,而在瑞典未发现该突变,但在以上人群感染的 HPV 16中,没有发生 846位 T→C 的置换突变,说明该亚洲分离株在以上人群中不流行。基于以上分析,我们推测该变异可能是由人口流动传入新疆地区。

参考文献:

- [1] Stöler MH. Human Papillomavirus and Cervical Neoplasia: A Model for Carcinogenesis [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2000, 19(1): 16 - 28
- [2] De Geest K, Bergman CA, Turyk ME, *et al*. Differential Response of Cervical Intraepithelial and Cervical Carcinoma Cell Line to Transforming Growth Factor- β 1 [J]. *Gynecol Oncology*, 1994, 55: 376 - 385
- [3] 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
- [4] Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, *et al*. Nucleotide and Amino Acid Sequence Variations in the L1 and E7 Open Reading Frames of Human Papillomavirus Type 6 and Type 16 [J]. *Virology*, 1991, 184: 101 - 107
- [5] 拉莱·苏祖克,古丽娜·库尔班, Amy EN 等. 维吾尔妇女子宫颈癌中 p53 基因的表达和 HPV DNA 检测研究 [J]. *新疆医学院学报*, 1997, 20(2): 77 - 81
- [6] 马正海,梅新娣,张富春. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV 16 型 L2 基因多态性分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(12): 968 - 972
- [7] Seedorf K, Kraemmer G, Duerst M, *et al*. Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequence [J]. *Virology*, 1985, 145(1): 181 - 185
- [8] 伍欣星,赵文先,丁晓华,等. 人乳头瘤病毒(地方株) 16 型 E7 基因一级结构及其变异 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1996, 16(6): 395 - 398
- [9] 左亚刚,王家璧,许雪梅,等. 北京地区人乳头瘤病毒 16E6/E7 基因变异和序列分析 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2003, 36(11): 650 - 652
- [10] Edmonds G, Vousden KH. A Point Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein [J]. *J Virol*, 1989, 63(6): 2650 - 2656
- [11] 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
- [12] Paul KS, Chan Ching Wan, Lam Tak Hong, Cheung *et al*. Human Papillomavirus Type 16 Intratype Variant Infection and Risk for Cervical Neoplasia in Southern China [J]. *J Infect Dis*, 2002, 186(5): 696 - 700
- [13] Kuroda T, Yoshinari M, Okamura K, *et al*. Sequence Variation of Human Papillomavirus Type 16 E7 in Preinvasive and Invasive Cervical Neoplasias [J]. *Virus Genes*, 1994, 9(1): 85 - 92 (本文编辑:温娟)

(上接第 13 页)

合格 78 份,合格率 50%。精制细盐 113 份,合格 104 份,不合格 9 份,合格率 92%,精制细盐合格率 (92%) 大于粗粒盐合格率 (50%),269 份碘盐总合格 182 份,总合格率 67.7%

2.2 非碘盐情况:156 份粗粒盐中未检出碘 63 份, <20 mg/kg 有 7 份, >50 mg/kg 有 8 份;113 件精制细盐中未检出碘含量 2 份, <20 mg/kg 有 1 份, >50 mg/kg 有 6 份,269 份碘盐中未检出碘 65 份, <20 mg/kg 有 8 份, >50 mg/kg 有 14 份。

3 讨论

(1)通过调查,269 份居民用户碘盐合格率比较低,其主要原因:①居民用户主要分布于本市周围,均为少数民族农民,文化程度比较低。②通过调查发现,多数居民对加碘盐的正确存放及食用,缺乏一定的了解,直接将碘盐放在阳光下曝晒,不是在密闭避光的容器中存放。碘酸钾见光分解成碘分子,碘分子在常温下易升华。据有关资料显示:碘在阳光下放 8h 粗粒盐中的

碘损失 15.5%,细碘盐损失碘 10.6%。存放的容器无封口,一般存放 5 个月,盐碘损失 10.6%。

(2)居民用户食用未加碘的粗粒盐比较多。这说明居民用户本身购买不合格加碘盐,甚至部分居民食用粗盐。碘盐中碘含量 >50 mg/kg 也较多,GB5461-2000 标准规定,食盐中碘含量为 20~50 mg/kg 所以含量 >50 mg/kg 均属于加碘过量。这主要是生产厂家没有按规定加碘或工艺技术不规范忽高忽低。值得注意的是:食用过量无机碘可引起高碘甲状腺肿,严重者引起粘液水肿,还可引起胎儿甲状腺肿大,造成新生儿窒息死亡。这种情况临床上已有报道。加碘过多易造成浪费,增加成本;加入碘量过少达不到预防目的。

伊宁市碘盐还存在一定的质量问题,属于低碘地质带,建议执法部门应加强碘盐监督工作,大力宣传食用碘盐对人体的重要性及正确食用、存放的方法,杜绝不合格的碘盐上市。

(本文编辑:阮红)