

HPV16E7, E5 序列多态性与新疆地区维汉妇女宫颈癌及癌前病变的相关性研究

杨丹¹, 玛依努尔·尼亚孜², 朱开春³, 赵宗峰³

1.新疆石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000; 2.新疆维吾尔自治区人民医院妇科, 新疆 乌鲁木齐 830001;

3.新疆维吾尔自治区人民医院妇产科研究室, 新疆 乌鲁木齐 830001

摘要: 目的 分析新疆地区宫颈病变组织中 HPV16E7, E5 基因序列变异及该变异与宫颈病变的相关性, 探讨该变异率在新疆地区维、汉妇女不同宫颈病变中的差异。方法 对 HPV16E7, E5DNA 阳性的 119 例宫颈炎、70 例 CIN I、91 例 CIN II-CIN III 和 105 例宫颈癌的基因片段进行 PCR 扩增测序, 分析突变情况。结果 除了 HPV16E7, E5 的原型序列以外, HPV16E7 最常见的变异为 A647G 和 T846C, 主要以 A647G 突变为主, A647G 变异株频率在宫颈炎、CIN I、CIN II-CIN III 和宫颈癌分别为 22.2%、60.0%、57.8%、55.3%; 汉 24.6%、55.0%、60.9%、66.7%。HPV16E5 最常见的变异为 A4042G 和 A3978C, 主要以 A4042G 突变为主, A4042G 变异株频率在宫颈炎、CIN I、CIN II-CIN III 和宫颈癌分别为 18.5%、53.3%、53.3%、55.0%; 汉 21.5%、45.0%、56.5%、68.9%。HPV16E7A647G 变异株和 HPV16E5A4042G 变异株在新疆地区维、汉妇女各个宫颈病变阶段中的分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 比较该变异株在维、汉妇女宫颈病变各个阶段中的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 HPV16E7A647G 变异株和 HPV16E5A4042G 变异株是新疆地区宫颈病变中流行的变异株, 此变异株与宫颈病变的程度有相关性, 在新疆地区宫颈病变中无民族差异性。

关键词: HPV16E7 和 E5; 序列多态性; 宫颈癌;

中图分类号: R17 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2014)13-2365-04

Study on correlation of HPV16E7, E5 sequence polymorphism and the Xinjiang Uygur and Han cervical cancer and precancerous lesions

YANG Dan*, Mayinuer.Niyazi, ZHU Kai-chun, ZHAO Zong-feng

* School of Medicine, Xinjiang Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China

Abstract: **Objective** To analyze the correlation of HPV16E7, E5 gene sequence variation and cervical lesions in Xinjiang region, to investigate the differences in mutation rate in the Xinjiang Uygur, Han women with different cervical lesions. **Methods** The gene fragments from positive HPV16E7 and E5DNA of 119 cases of cervicitis, 70 cases of CIN I, 91 cases CIN II-CIN III and 105 cases of cervical cancer were amplified by PCR sequencing, and analyzed mutation. **Results** In addition to the prototype sequence of HPV16E7, E5, the most common variants of HPV16E7 were A647G and T846C, main mutation in A647G. The A647G mutant frequency in cervicitis, CIN I, CIN II-CIN III and cervical cancer were 22.2% and 60.0%, 57.8%, 55.3% in Uighurs; 24.6%, 55.0%, 60.9%, 66.7% in Han. Most common mutations of HPV16E5 were A4042G and A3978C, based mainly mutation was A4042G. A4042G mutant frequency in cervicitis, CIN I, CIN II-CIN III and cervical cancer were 18.5%, 53.3%, 53.3%, 55.0% in Uighurs; 21.5%, 45.0%, 56.5%, 68.9% in Han. The distribution difference of HPV16E7A647G and HPV16E5A4042G mutants in various stages of cervical lesions of women in Uygur, Han in Xinjiang was statistically significant ($P < 0.05$). Comparing the difference in the distribution of variants in various stages of Uygur and Han women with cervical lesions, there was no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** HPV16E7A647G and HPV16E5A4042G are popular variants in cervical lesions in Xinjiang region, mutants are correlated with the degrees of cervical lesions, without racial difference in cervical lesions in Xinjiang region.

Keywords: HPV16E7 and E5; Polymorphism; Cervical cancer

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 在全球妇女恶性肿瘤中居第二位^[1]。有报道显示, 新疆地区

维、汉妇女高发宫颈鳞癌与 HPV16 感染密切相关, 宫颈癌组织中的 HPV16 检出率高达 91.7%^[2]。E7 和 E5 早期基因是 HPV16 的主要致癌基因, E7 蛋白最基本的性质是与 Rb 的结合, E7 蛋白与 pRb 结合激发细胞分裂增殖的作用^[3]。E5 对周期蛋白和周期蛋白激酶及生长因子受体有干扰, 使病毒癌基因的转

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81160317)

作者简介: 杨丹 (1984-), 女, 硕士, 住院医师, 研究方向: 妇科肿瘤及内镜

通讯作者: 玛依努尔, E-mail: MYNR68@126.com

换功能增强,影响抑癌基因的正常表达^[4]。

有大量研究报道显示,HPV16E7 和 E5 在宫颈癌及癌前病变中存在变异,并且此种变异与地域和种系有一定的特点相关性,还与宫颈病变程度正相关。例如王华等于 2011 年研究发现在湖北地区 HPV16E7 A647G/T846C 和 HPV16E5 A4042G/A3979C 联合变异株在当地宫颈病变中流行,此变异株与宫颈病变程度呈正相关^[5]。本研究通过对新疆南部地区维、汉妇女宫颈癌及癌前病变中 HPV16E7, E5 基因序列分析,检测该地区 HPV16E7, E5 基因的突变,分析 HPV16E7, E5 基因变异率在新疆地区维、汉妇不同宫颈病变中的相关性,为该地区宫颈病变组织中感染 HPV16 基因突变研究积累分子流行病学资料,为宫颈癌防治及疫苗的研制打下基础。

1 材料与方法

1.1 样本 收集新疆维吾尔自治区人民医院妇科 2012 年 10 月-2013 年 6 月的 HC2 HPV DNA 阳性的宫颈分泌物标本(宫颈刷旋转刷取维、汉妇女宫颈分泌物,并保存在 HC2(第二代杂交捕获技术检测 HPV DNA)专用细胞液中)。以宫颈病变活检组织病理学诊断分组:宫颈炎 200 例(维 88, 汉 112)、CINI142 例(维 60, 汉 82)、CINII-CINIII168 例(维 90, 汉 78)、宫颈癌 180 例(维 105, 汉 75)。所有标本采集和诊治过程均经患者知情同意,宫颈病变以病理学诊断为金标准。标本收集后放于-20℃冰箱。

1.2 主要试剂及工具酶 HPV DNA 提取试剂和 PCR 试剂均购自上海生工生物工程有限公司。HPV 分型试剂购自潮州凯普生物化学有限公司。

1.3 引物的设计与合成 根据 GENABANK 的 HPV16E7, E5 基因序列及引物设计原则,引物序列如下: HPV16E7 上游引物: 5'-ATGTCTTGTGCA-GATCATC-3', 下游引物 5'-ATTGCTACCTGCAGGA TCA-3'; HPV16E5 上游引物: 5'-ATATGATAGT-GAATGGCAACGTG-3', 下游引物: 5'-GGTATACAA CAATTATATGTAAC-3'。

1.4 提取 DNA 采用碱裂解法手工提取,按异丙醇/碘化钾/氯化钠/氯仿-异戊醇/无水乙醇步骤提取,PCR 扩增验证所提取的 DNA 质量。

1.5 HPV 分型检测 采用凯普 HPV-DNA 导流杂交基因芯片技术,进行 HPV21 种亚型的检测,严格按照说明书操作。

1.6 PCR 扩增 PCR 反应体系:总体系 35 μl,包括 1 μl TaqDNA 聚合酶,1 μl dNTP,3.5 μl 10 × Buffer,2 μl MgCl₂;上游引物和下游引物各 1 μl,模板 DNA 1 μl,ddH₂O 24.5 μl。HPV16E7PCR 反应

条件:95℃ 5 min,94℃ 45 s,55℃ 60 s,72℃ 45 s,35 个循环,72℃ 10 min。HPV16E5PCR 反应条件:95℃ 5 min,94℃ 45 s,46℃ 60 s,72℃ 45 s,35 个循环,72℃ 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖电泳,GenGreen 染色,紫外灯下观察。

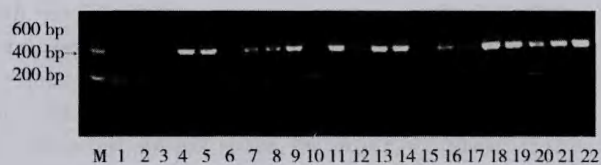
1.7 HPV16E7 和 E5 基因序列测定及分析 将扩增 HPV16E7 和 E5 的 DNA 阳性基因片段送往上海生工生物工程有限公司,分别进行纯化并双向测序。测序结果使用 DNAMAN Version 5.2.2. 软件分析,以 GenBank 德国标准株为原型进行对比,分析 HPV16E7 和 E5 基因序列的改变。

1.8 统计学方法 用 SPSS17.0 软件行 χ^2 检验进行统计分析,对维、汉妇女不同宫颈病变程度 HPV16 E7 和 E5 基因突变的差异进行分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV 分型结果 HPV16 阳性标本在维、汉妇女宫颈炎,宫颈癌前病变及宫颈癌的分布率如下:宫颈炎 59.5% (119/200),其中,维 61.4% (54/88),汉 58.0% (65/112)、CINI49.3% (70/142),其中维 50.0% (30/60),汉 48.8% (40/82)、CINII-CINIII-154.2% (91/168),其中维 50.0% (45/90),汉 59.0% (46/78)、宫颈癌 58.3% (105/180),其中维 62.0% (60/105),汉 60.0% (45/75)。

2.2 HPV16E7 扩增结果 以 HPV16 阳性 HC2 宫颈分泌物标本提取好的 DNA 为模板,分别用 HPV16E7, E5 引物进行 PCR 扩增,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 400 bp (图 1, 图 2; E7 或 E5 基因的长度加上引物的长度大约为 400 bp, marker 是 600 bp)。



注: M 表示 marker, 1~22 表示标本号。

图 1 HPV16E7 基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图



注: M 表示 marker, 1~10 表示标本号。

图 2 HPV16E5 基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图

2.3 HPV16E7 基因突变性分析 在 HPV16E7 基因测序结果中, HPV16E7 最常见的变异为 A647G 和 T846C, 主要以 A647G 突变为主 (图 3)。A647G 变异株率在宫颈炎、CINI、CINII-CINIII 和宫颈癌组中为维 22.2% (12/54)、60.0% (18/30)、57.8% (26/45) 及 53.3% (32/60); 汉 24.6% (16/65)、55.0% (22/40)、60.9% (28/46) 及 66.7% (30/45)。A647G 突变率在新疆地区维, 汉妇女各个宫颈病变阶段的分布差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 1), 比较维, 汉妇女宫颈癌及癌前病变中的 A647G 突变率的分布差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 2)。

2.4 HPV16E5 基因突变性分析 在 HPV16E5 基因测序结果中, HPV16E5 最常见的变异为 A4042G 和 A3978C, 主要以 A4042G 突变为主。A4042G 变异株率在宫颈炎、CINI、CINII-CINIII 和宫颈癌组中为维 18.5% (10/54)、53.3% (16/30)、53.3% (24/45) 及 55.0% (33/60); 汉 21.5% (14/65)、45.0% (18/40)、56.5% (26/46) 及 68.9% (31/45)。A4042G 突变率

在新疆地区维, 汉妇女各个宫颈病变阶段的分布差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 3), 比较维, 汉妇女宫颈癌及癌前病变中的 A4042G 突变率的分布差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 4)。



注: REF 表示 E7 原有基因序列, XJ 表示 E7 基因突变序列, 647 位的 A 突变为 G。

图 3 HPV16E7 基因核苷酸序列与参考株的同源性比较

表 1 HPV16E7 基因 A647G 突变率在新疆地区维, 汉妇女各个宫颈病变阶段中的分布

A647G	宫颈炎 (n=119)	CINI (n=70)	CINII-CINIII (n=91)	宫颈癌 (n=105)	χ^2 值	P 值
维族	12 (22.2%)	18 (60.0%)	26 (57.8%)	32 (55.3%)	18.415	0.00
汉族	16 (24.6%)	22 (55.0%)	28 (60.9%)	30 (66.7%)	26.821	0.00

表 2 HPV16E7 基因 A647G 突变率在新疆地区维, 汉妇女宫颈癌及癌前病变中的分布比较

A647G	宫颈炎 (n=119)	CINI (n=70)	CINII-CINIII (n=91)	宫颈癌 (n=105)
维族	12 (22.2%)	18 (60.0%)	26 (57.8%)	32 (55.3%)
汉族	16 (24.6%)	22 (55.0%)	28 (60.9%)	30 (66.7%)
χ^2 值	0.094	0.175	0.729	1.890
P 值	0.759	0.676	0.393	0.169

表 3 HPV16E5 基因 A4042G 突变率在新疆地区维, 汉妇女各个宫颈病变阶段中的分布

A4042G	宫颈炎 (n=119)	CINI (n=70)	CINII-CINIII (n=91)	宫颈癌 (n=105)	χ^2 值	P 值
维族	10 (18.5%)	16 (53.3%)	24 (53.3%)	33 (55.0%)	19.836	0.00
汉族	14 (21.5%)	18 (45.0%)	26 (56.5%)	31 (68.9%)	27.243	0.00

表 4 HPV16E5 基因 A4042G 突变率在新疆地区维, 汉妇女宫颈癌及癌前病变中的分布比较

A4042G	宫颈炎 (n=119)	CINI (n=70)	CINII-CINIII (n=91)	宫颈癌 (n=105)
维族	10 (18.5%)	16 (53.3%)	24 (53.3%)	33 (55.0%)
汉族	14 (21.5%)	18 (45.0%)	26 (56.5%)	31 (68.9%)
χ^2 值	0.167	0.477	0.093	2.084
P 值	0.683	0.490	0.760	0.149

3 讨论

新疆是宫颈癌的高发地区, 维族妇女宫颈癌组织中 HPV16 的感染率最高为 69.6%^[6]。E7 基因是 HPV16 的主要转化基因, 变异的 E7 基因可能影响转录和表达。刘欣等^[7]于 2003 年发现中国广东地区

宫颈癌组织中 E7 基因突变导致相应的蛋白质由天冬氨酸转变为丝氨酸。A647G 和 T846C 两个突变位点在 HPV16 亚洲型中普遍存在, 突变率高达 94.6%^[8]。杨英捷研究发现^[9], A647G 变异株的致瘤性较其他变异株强, 与宫颈病变程度成正相关。本研究中,

新疆地区维、汉妇女宫颈病变中 HPV16E7 基因突变主要以 A647G 变异株为主,提示该变异株属亚洲型。并且研究显示, A647G 突变率在新疆地区维、汉妇女各个宫颈病变阶段的分布有差异 ($P<0.05$),提示该变异株对宫颈癌的发病可能有影响,值得我们在 CIN 发展到宫颈癌的防治策略中考虑。比较维、汉妇女宫颈病变中的 A647G 突变率的分布无差异 ($P>0.05$),说明该变异株在新疆地区宫颈病变中无民族差异。

HPV16E5 基因具有特殊的生物学活性,虽然在细胞中表达比较低,但在宫颈癌形成的早期具有十分重要的作用^[10]。Hu 等在瑞典研究中发现, HPV16E5 的热点突变为欧洲型变异株 A4042G 和 A3978C^[11]。国内王玉婷等^[12]研究了青岛地区不同阶段宫颈上皮病变组织中 HPV16E7, E5 序列多态性与宫颈病变的相关性,发现 A3979C (144L)、A4042G (I65V) 和 A4077T (无义突变) 联合突变出现频率最高,表明 HPV16E5 基因核苷酸位点 3979, 4042 和 4077 是区分亚洲株和欧洲株的重要位点。我们研究发现 HPV16E5 基因突变在维、汉妇女宫颈病变中主要以 A4042G 突变为主,使氨基酸由异亮氨酸变异为缬氨酸 (I65V)。并且研究显示, A4042G 突变率在新疆地区维、汉妇女各个宫颈病变阶段的分布有差异 ($P<0.05$),说明该变异株可作为宫颈病变发展过程中的预警因子。比较维、汉妇女宫颈病变中的 A4042G 突变率的分布无差异 ($P>0.05$),说明该变异株在新疆地区宫颈病变中无民族差异。

对 HPV16E7, E5 基因突变研究发现, A647G 和 A4042G 变异株是新疆地区宫颈病变中流行的变异株,并且该变异株与宫颈病变的程度有相关性。但该变异株在新疆地区维、汉妇女各个宫颈病变阶段中的分布比较无差异性,提示该变异株在新疆地区宫颈病变中无民族差异性。要想获得这一变异株与宫颈癌发生发展的全面信息,有待于增加研究对

象并且对其进行长期的追踪研究。虽然对 HPV16 变异株的研究还在初步阶段,但目前的研究结果为对新疆地区 HPV16 变异株更广泛深入的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 永灵兰, 张丽君, 比丽克孜, 等. 乌鲁木齐地区汉族和维吾尔族个体因素与宫颈癌发病的对比分析 [J]. 中国优生优育, 2008, 14 (4): 190-192.
- [2] 刘伟, 周瑾, 余良宽, 等. 维、汉族妇女宫颈鳞癌组织中人乳头瘤病毒基因分型研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18 (8): 1488-1491.
- [3] 张茂祥, 张富春. 人乳头瘤病毒 16 型 E7 疫苗的研究进展 [J]. 地方病通报, 2003, 18 (2): 92-95.
- [4] 蒙雅萍, 李倪. 人乳头瘤病毒 E5 的研究进展 [J]. 中国妇幼健康研究, 2006, 17 (3): 236-239.
- [5] 王华, 蔡红兵, 丁晓华. 湖北地区 HPV16E7 和 E5 基因突变与宫颈病变的相关性 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38 (3): 337-340.
- [6] 韩莉莉, 玛依努尔·尼亚孜, 夏小艳, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌 HPV 感染型别分布研究 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2011, 38 (3): 237-240.
- [7] 刘欣, 刘国炳, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16E7 序列多态性分析 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25 (10): 1272-1275.
- [8] Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China [J]. J Infect Dis, 2002, 186 (5): 696-700.
- [9] 杨英捷, 赵健, 廖秦平. 北京地区人乳头瘤病毒 16 型感染及其 E6/E7 基因变异与宫颈病变的相关性研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21 (1): 32-34.
- [10] 李薇, 万艳平. 人乳头瘤病毒 16 型 E5 蛋白功能研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2010, 38 (1): 63-65.
- [11] Hu Xinrong, Pang Tianyu, Guo Zhongmin, et al. Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma [J]. J Pathol, 2001, 195 (3): 307-311.
- [12] 王玉婷. 不同阶段宫颈上皮病变组织中乳头瘤病毒 16 型转化基因 E7 和 E5 序列多态性分析 [D]. 青岛: 青岛大学, 2011: 22-25.

收稿日期: 2013-11-30

(上接第 2364 页)

- [5] Golombek SG, Navarro M, Negre S, et al. Administration of intravenous immunoglobulin is not free of risk in the neonatal period [J]. Arch Pediatr, 2010, 17 (3): 298.
- [6] 李薇, 陈自励. 新生儿黄疸治疗中的矛盾和对策 [J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27 (14): 1064-1066.
- [7] 张彦玲. 新生儿高胆红素血症光照疗法的观察与护理 [J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7 (17): 4102-4103.
- [8] 靳玉英. 吸入性损伤 20 例呼吸道护理 [J]. 齐鲁护理杂志, 2011, 17 (30): 53-54.
- [9] 高艳霞. 全程监测干预管理模式应用于新生儿黄疸治疗的效果

评价 [J]. 中国实用护理杂志, 2012, 28 (19): 47-48.

- [10] 《中华儿科杂志》编辑委员会, 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿黄疸诊疗原则的专家共识 [J]. 中华儿科杂志, 2010, 48 (9): 685-686.
- [11] 张莉, 金润铭. 新生儿黄疸的影响因素分析 [J]. 临床儿科杂志, 2010, 28 (8): 795, 800.
- [12] 尉伟芬, 何英. 新生儿中重度烫伤 15 例急救对策 [J]. 中国儿童保健杂志, 2010, 18 (5): 433-434.
- [13] 刘博. 妈咪爱、茵栀黄联合应用治疗迟发性母乳性黄疸 [J]. 现代预防医学, 2010, 37 (5): 封 3.

收稿日期: 2013-09-12