

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00339

北京地区宫颈癌 HPV16 上游调控序列、E6、E7 癌基因序列初步分析

熊光武, 袁杨, 李萌, 郭红燕, 张小为

北京大学第三医院妇产科, 北京 100191

摘要: 为检测 HPV16 上游调控序列(Upstream regulatory region, URR)、E6、E7 癌基因变异在北京地区宫颈癌患者癌组织中的分布特征, 探讨该地区宫颈癌发生同 HPV16 变异株间的相关性, 文章以提取的 31 例 HPV16 检测阳性宫颈癌组织 DNA 为模板, 设计针对性引物扩增 URR、E6、E7 3 个目的片段, PCR 产物直接测序并通过 GenBank 对比分析变异和分支鉴定情况。在所分析的宫颈癌组织中, URR 是突变频率最高的片段, 其次为 E7, 最保守的序列为 E6。共发现热突变位点 8 个, 分别为 URR 序列上 G7521A(100%)、C7435G(96.77%)、C24T(45.16%)、A7729C(45.16%)、G7839A(45.16%); E6 序列上 T178G(41.94%); E7 序列上 A647G(45.16%)、T846C(45.16%)。HPV16 分支分布频率最广的是 As 型(54.84%), 其次为 E 型(45.16%)。研究结果提示, HPV16 URR 序列上 G7521A、A7729C、G7839A, E6 序列上 T178G、T350G, E7 序列上 A647G、G658A 等位点的变异可能与病毒致癌潜能及宫颈癌的发生相关。北京地区宫颈癌患者中 As 和 E 型可能是两种最主要的 HPV16 分支, 这有可能会为 HPV 疫苗的研制和感染治疗提供有价值的信息。As 型和 E 型病毒在不同年龄组和不同肿瘤分期组的患者中分布频率有差异, 这可能会为揭示宫颈癌年轻化趋势提供新的线索。

关键词: 宫颈癌; 人乳头状瘤病毒; 上游调控序列; E6 癌基因; E7 癌基因

Human papillomavirus type 16 variant analysis of upstream regulatory region and E6, E7 oncogene from cervical cancer patients in Beijing

XIONG Guang-Wu, YUAN Yang, LI Meng, GUO Hong-Yan, ZHANG Xiao-Wei

Department of Obstetric and Gynecology, Beijing University Third Hospital, Beijing 100191, China

Abstract: To investigate distributional characteristics of mutations of HPV16 upstream regulatory region (URR) and E6 and E7 oncogene in the patients with cervical cancer in Beijing and to explore the potential association between oncogenesis of cervical cancer and HPV variants in this region, cervical cancer tissue from 31 cases with positive HPV16 were subjected to regular DNA extraction procedure. The corresponding primers were then designed to amplify the target sequence of URR, E6 and E7. The PCR products were sequenced and blast analysis against GenBank was carried out to evaluate the gene mutation and identify the phylogenetic branches. Among all the cases studied, URR was found to be the most frequent mutation fragments, followed by E7, and E6 was the most conservative sequence. A total of 8 hot mutation spot was identified, which were URR G7521A (100%), C7435G (96.77%), C24T (45.16%), A7729C (45.16%), G7839A (45.16%), E6 T178G (41.94%), E7 A647G (45.16%), and T846C (45.16%). The most frequent HPV 16 branch was type As (54.84%), followed by type E (45.16%). Our results suggested that the mutations of G7521A, A7729C, G7839A, T178G, T350G,

收稿日期: 2009-11-17; 修回日期: 2010-01-17

作者简介: 熊光武(1966-), 男, 副主任医师, 博士, 副教授, 研究方向: 妇科肿瘤学。Tel: 010-82267512; E-mail: xiong-gw@163.com

通讯作者: 张小为(1959-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 妇科肿瘤学。E-mail: zhangxw010@sohu.com

A647G, and G658A were likely to be associated with the enhanced oncogenic potential of HPV16 and oncogenesis of cervical cancer. In Beijing area, two major branches of HPV16 were type As and E. This finding provides valuable information for HPV vaccine development and infection treatment. Type As and E variants had different distributions among various ages and clinic stage groups. It might lead to a new explanation for the getting younger trend of cervical cancer.

Keywords: cervical cancer; human papillomavirus; upstream regulatory region; *E6* oncogene; *E7* oncogene

高危型人乳头瘤病毒(Human papilloma virus, HPV), 尤其是 HPV16 和 HPV18 型的持续感染是宫颈癌发生和发展过程中最主要的病因。在所有的高危型病毒中, HPV16 是流行程度最广的一种亚型。据文献报道, 相比其他病毒亚型, HPV16 更有可能长期在宫颈上皮内复制生存^[1]和更易导致宫颈上皮内瘤变(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN)^[2, 3]。通过对 HPV16 型病毒全基因组测序后发现, 与野生型病毒相比, 感染宫颈的 HPV16 病毒存在多种突变模式, 其中 2%的突变位点位于编码区, 5%的突变位点位于非编码区^[4]。根据这些突变位点的差异, HPV16 能进一步细分为 6 个分支: ① 欧洲型(E); ② 亚洲型(As); ③ 亚美型(AA); ④ 非洲 1 型(Af1); ⑤ 非洲 2 型(Af2); ⑥ 北美型(NA)。流行病学研究显示, 不同的 HPV16 分支具有不同的致癌潜能, 可能会对临床结局产生不同的影响^[5~7]。目前认为, 这种不同的致癌能力可能与某些重要序列突变有关, 如上游调控序列(Upstream regulatory region, URR)的突变, 癌基因 *E6*、*E7* 的突变, 这些突变的最终作用体现为 *E6*、*E7* 蛋白转化活性的增强或宿主免疫机制对不同病毒抗原决定簇的反应间的差异^[8, 9]。

本研究通过宫颈癌样本的 HPV16 病毒的 3 段关键序列(URR、*E6* 和 *E7*)测序比对, 分析这些位点的突变在北京地区患者的分布情况, 探讨 HPV16 病毒基因突变的发生规律及宫颈癌发生之间存在的潜在相关性。

1 材料和方法

1.1 宫颈癌组织与 DNA 提取

经知情同意和北京大学第三医院伦理委员会通过, 2000~2007 年间共收集在北京大学第三医院妇产科住院 57 例宫颈癌组织术后样本(经病理检查确诊)。在前期实验中, 通过对 HPV 亚型进行分型检测后, 将其中 31 例 HPV16 阳性的样本纳入本部分研究中。全基因组 DNA 的提取应用常规的蛋白酶 K 裂解、酚氯仿抽提法。提取的 DNA 通过紫外分光光度计检测浓度和纯度, -20℃冰箱保存。

1.2 引物的设计与合成

根据 Seedorf 等^[4]1985 年发表的 HPV16 型基因组全序列, 应用 Premier 公司引物设计软件 Primer Premier 5.0 分别设计了针对 HPV16 上游调控序列(URR)、癌基因 *E6*、*E7* 的 3 对引物。引物由北京奥科生物有限公司合成, 序列详见表 1。

1.3 PCR 扩增

3 个目的片段的扩增条件相同。PCR 扩增体系包括: 100~200 ng DNA 模板, 40~80 ng 引物, 10 mmol/L Tris-HCl(pH 为 8.4), 1.5~2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.25 U *Taq* 酶(Promega), ddH₂O 补足至 25 μL。反应条件: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 55℃复性 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后产物冷却至 4℃保存。

表 1 URR、*E6*、*E7* 引物序列

引物名称	序列(5'→3')	定位	产物大小 (bp)
URR	F: GTCCTGAAACATTGCAGTTCTCT	nt115	730
	R: GCTTGTGTAACATATTGTGTCA	nt7289	
<i>E6</i>	F: GAAACCGGTTAGTATAAAAGCAGAC	nt83	476
	R: AGCTGGGTTTCTCTACGTGTTCT	nt559	
<i>E7</i>	F: CCATAATATAAGGGGTCGGTGGA	nt562	296
	R: TTTTCCACTAACAGCCTCTACAT	nt858	

1.4 HPV16 URR、E6、E7 序列突变株的测定与分析

用 PCR 产物回收试剂盒回收琼脂糖凝胶中的目的片段, 并由北京诺赛基因组有限公司测序。应用 PubMed 的 Blast 软件系列进行病毒 DNA 的测序比对工作。

1.5 分组和统计

根据目前公认的宫颈癌年龄分组方法, 以 35 岁为界分为年轻宫颈癌组(≤ 35 岁)和中老年宫颈癌组(> 35 岁)。其中, 年轻宫颈癌组 12 例, 平均年龄 32.50 ± 4.40 岁, 中老年宫颈癌组 19 例, 平均年龄 43.57 ± 7.83 岁。采用 χ^2 检验分析两组间 HPV16 *As* 和 *E* 型分布频率的差异, 以 $P < 0.05$ 为显著性界限。

2 结果与分析

2.1 URR 测序结果

将测序后的结果同 GenBank 中德国标准株^[4](登录号: K02718)序列进行对比分析, 部分序列对比结果见图 1。与绝大多数文献报道一致, 同 *E6*、*E7* 基因相比, 我们在 HPV16 病毒的上游调控序列中发现了最多的突变位点^[10-14]。所有的 31 例(100%)样本均存在涉及 15 个位点的不同变异模式(12 个为转换、3 个为颠换)。这其中, 8 个位点的变异位于已知的可与多种转录因子结合的区域(表 2)。G7521A、G7826A、G7839A 位点的变异位于 YY1 结合区域; A7660G、A7729C 位点变异位于转录调控的增强子区域; T7714G 和 T7775C 位点的突变位于转录因子 NF1 结合区域; G7869A 位点的突变则位于病毒复制因子 *E2* 同 URR 结合的区域。在病毒的上游调控序列中, 我们共发现了 5 个热突变位点, 分别是: G7521A (100%)、C7435G(96.77%)、C24T(45.16%)、A7729C (45.16%)、G7839A(45.16%)。此外, 比较常见的突变位点为 T7714G, 位于转录因子 NF1 结合区域, 但突变频率仅占总数的 16.13%。

2.2 E6 测序结果

对 *E6* 基因进行序列比较后发现, 共发现在 26 例样本中(83.87%)存在 9 个位点突变, 其余 5 例样本(16.13%)未发现突变, 为 *E6* 野生型。在所有的突变位点中, 7 个位点的变异为错义突变, 2 个位点突变为

无义突变。所有涉及的氨基酸转换按突变频次排序(表 3)为: D25E (41.94%), L83V (19.35%), K121E (16.13%),

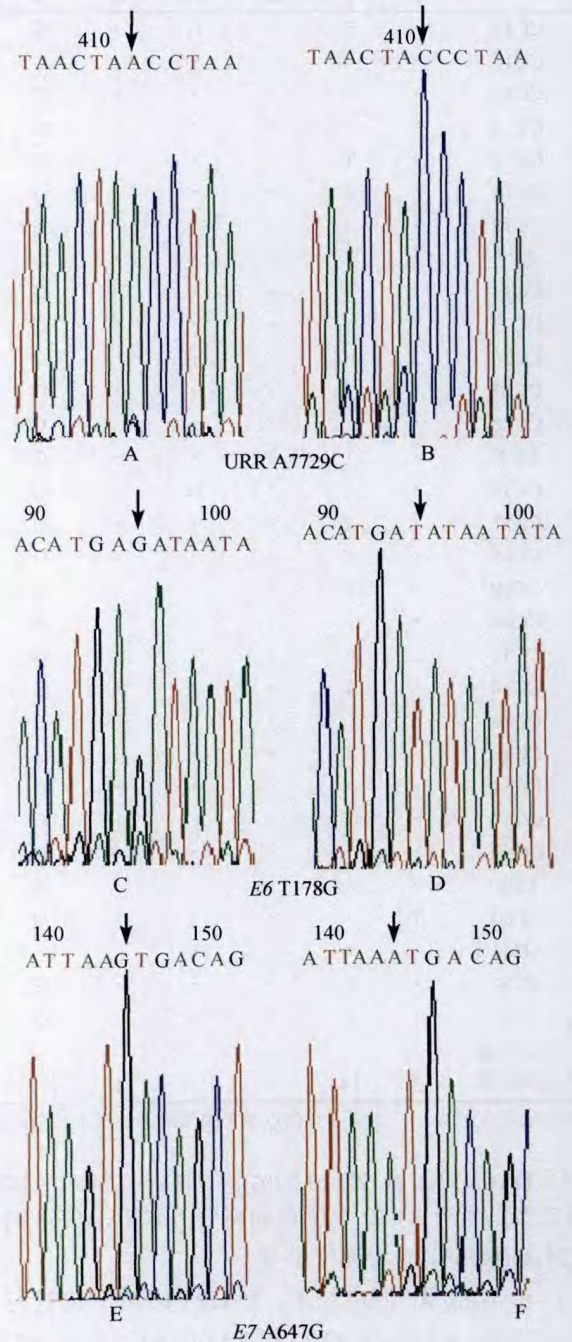


图1 HPV16 病毒 URR、E6、E7 片段野生株与变异株点突变对比图

A、C、E 小图分别代表上游调控序列(URR)、E6、E7 基因野生型, B、D、F 小图分别代表 3 个片段的突变型。A、B 为 URR 7729 位点 A→C 突变, C、D 为 E6 基因 178 位点 T→G 突变, E、F 为 E7 基因 647 位点 A→G 突变。箭头所指位置即变异位点。

表 2 URR 序列突变分析

野生株序列	URR															
	13	24'	7393	7417	7427	7435	7521	7660	7714	7729	7764	7775	7826	7839	7869	
	C	C	C	A	G	C	G	A	T	A	C	T	G	G	G	
CC10	•	T	•	G	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC11	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC12	•	•	•	•	•	G	A	•	G	•	•	•	•	•	•	
CC14	•	•	•	•	•	G	A	•	G	•	•	•	•	•	•	
CC15	•	T	•	•	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC16	•	T	•	•	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC18	•	T	•	•	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC2	•	T	•	•	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC23	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	A	
CC25	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC26	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC27	•	•	•	•	•	G	A	•	G	•	•	•	•	•	•	
CC28	•	•	•	•	•	G	A	•	G	•	•	•	•	•	•	
CC3	•	•	T	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC30	T	T	•	G	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC32	•	T	•	•	•	G	A	•	•	C	•	•	A	A	•	
CC35	•	T	•	•	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC38	•	T	•	•	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC40	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC42	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC44	•	T	•	•	A	G	A	•	•	C	T	C	•	A	•	
CC46	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC48	•	T	•	•	•	G	A	G	•	C	•	•	•	A	•	
CC54	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC57	•	T	•	•	•	G	A	G	•	C	•	•	•	A	•	
CC59	•	•	•	•	•	G	A	•	G	•	•	•	•	•	•	
CC6	•	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC60	T	•	•	•	•	G	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC61	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	
CC8	•	T	•	•	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
CC9	•	T	•	G	•	G	A	•	•	C	•	•	•	A	•	
结合位点	—	—	—	—	—	—	YY1	增强子	NF1	增强子	—	NF1	YY1	YY1	E2	
变异例数	2	14	1	3	1	30	31	2	5	14	1	1	1	14	1	

注：• 表示无变异，— 表示变异位点位于未知的细胞因子结合位点。

E113D (6.45%), N32D (3.22%), E71D (3.22%), K148R (3.22%)。余下的 2 个位点的突变 T178A (9.68%)和 T241G(6.45%)均为无义突变。

根据 E6/E7 测序结果, 对 HPV16 的分支进行分析后发现, 17 例(54.83%)为亚洲型(As), 余下 14 例 (45.16%)为欧洲型(E)(表 3)。在≤35 岁的年轻宫颈癌组中 As 型占 66.7%(8/12), E 型占 33.3%(4/12); 在>35 岁中老年宫颈癌组中 As 型占 47.4%(9/19), E 型占 52.6%(10/19)。在年轻宫颈癌组中 As 的分布频率要高于中老年宫颈癌组, 而 E 型的分布频率则要低于

中老年宫颈癌组, 但两组间无显著性差异($\chi^2 = 1.106$, $P = 0.249 > 0.05$)。在原位癌和 I 期宫颈癌患者组中, As 型占 65%(13/20), E 型占 35%(7/20); 在 II 期宫颈癌患者组中, As 型占 36.4%(4/11), 而 E 型占 63.6% (7/11); 两组间亦无统计学差异($\chi^2 = 2.350$, $P = 10.124 > 0.05$)。

值得一提的是, 通过对 HPV16 病毒分支进行分析后我们进一步发现了几种已被报道过的特殊类型 (表 3), 如 E-350G、E-241G 和 As-178A 等, 其中 E-350G 已被证实能增强病毒 E6、E7 癌基因的转录能力因而具有较高致癌潜能。

表 3 E6 基因序列分析及 HPV16 分支鉴定

野生株序列	E6								鉴定分支
	176	178	241	296	350	442	443	525	
	G	T	T	T	T	A	G	G	
CC10	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC11	•	•	•	•	G	•	•	•	E-350G
CC12	•	•	•	•	•	•	A	•	E
CC14	•	•	•	•	•	•	A	•	E
CC15	•	G	•	•	•	•	A	•	As
CC16	•	G	•	•	•	•	A	A	As
CC18	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC2	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC23	•	•	G	•	•	•	•	•	E-241G
CC25	•	•	G	•	•	•	•	•	E-241G
CC26	A	•	•	•	•	•	•	•	As
CC27	•	•	•	•	•	•	•	•	E
CC28	•	•	•	•	•	•	•	•	E
CC3	•	A	•	•	•	•	•	•	As-178A
CC30	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC32	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC35	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC38	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC40	•	•	•	•	G	C	•	•	E-350G
CC42	•	•	•	•	G	C	•	•	E-350G
CC44	•	A	•	•	G	•	A	•	As-178A
CC46	•	•	•	•	•	•	•	•	E
CC48	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC54	•	•	•	•	•	•	•	•	E
CC57	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC59	•	•	•	•	•	•	•	•	E
CC6	•	•	•	•	G	•	•	•	E-350G
CC60	•	•	•	G	G	•	•	•	E-350G
CC61	•	A	•	•	•	•	•	•	As-178A
CC8	•	G	•	•	•	•	•	•	As
CC9	•	G	•	•	•	•	•	•	As
氨基酸变化	N32D	D25E/无	无	E71D	L83V	E113D	K121E	K148R	
变异例数	1	13/3	2	1	6	2	5	1	

注: • 表示无变异。

2.3 E7 测序结果

E7 基因测序结果显示, 在 28 例(90.32%)样本中共涉及 12 个位点的不同突变模式, 突变位点的数量和频率要稍高于 E6。余下的 3 例样本(CC11、CC6、CC60)未发现任何 E7 基因位点突变(表 4)。在所有的突变位点中共发现错义突变 7 个, 无义突变 5 个。在 7 例涉及氨基酸序列转换的错义突变模式中, 按突变频率排序为: S29N (45.16%), K33E (35.48%), N75D (9.68%), H29N (6.45%), K46E (6.45%), K18E

(3.22%), N39D (3.22%)。在 5 例无义突变中, 按突变频率排序为(点突变模式): T846C (45.16%), G666A (25.80%), T843C (16.13%), T760C (12.90%), G897C (3.22%)。表 4 中 HPV16 分支鉴定结果同表 3 一致。

3 讨论

研究 HPV 变异情况对病毒感染的诊断、治疗、以及疫苗的研制均具有重要的意义^[14]。目前认为, 不同类型的 HPV16 变异株具有不同的生物学活性和致癌潜能^[6, 15, 16]。有研究认为, 病毒的致癌能力不仅

表 4 E7 基因序列分析及 HPV16 分支鉴定

野生株序列	E7												鉴定分支
	582	647	646	658	666	676	697	760	843	846	849	897	
	A	A	A	G	G	G	G	T	T	T	G	G	
CC10	•	G	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	As
CC11	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	E-350G
CC12	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	E
CC14	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	E
CC15	•	G	•	A	•	•	A	•	•	C	•	•	As
CC16	•	G	•	A	•	•	A	•	•	C	•	•	As
CC18	•	G	•	A	•	•	•	•	•	C	•	•	As
CC2	•	G	•	A	•	•	•	•	•	C	•	•	As
CC23	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	A	•	E-241G
CC25	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	C	E-241G
CC26	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	A	•	As
CC27	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	E
CC28	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	E
CC3	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	•	•	As-178A
CC30	•	G	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	As
CC32	•	G	•	•	•	•	•	•	C	C	•	•	As
CC35	•	G	•	•	•	•	•	•	C	C	•	•	As
CC38	•	G	•	•	•	•	•	•	C	C	•	•	As
CC40	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	E-350G
CC42	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	E-350G
CC44	•	G	•	A	•	•	•	•	•	C	•	•	As-178A
CC46	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	A	•	E
CC48	•	G	•	•	•	•	•	•	C	C	•	•	As
CC54	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	E
CC57	•	G	•	•	•	•	•	•	C	C	•	•	As
CC59	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	E
CC6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	E-350G
CC60	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	E-350G
CC61	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	As-178A
CC8	•	G	•	A	•	•	•	•	•	C	•	•	As
CC9	T	G	•	A	•	A	•	•	•	C	•	•	As
氨基酸变化	K18E	S29N	H29N	K33E	无	N39D	K46E	无	无	无	N75D	无	
变异例数	1	14	2	11	8	1	2	4	5	14	3	1	

注: • 表示无变异。

与病毒的类型和变异相关, 而且与宿主的 HLA 多态性相关。因此这些变异株的致癌能力可能会随着地区不同而发生改变^[17]。

HPV16 的上游调控序列(URR)位于多种能与启动子 p97 的细胞因子和转录因子结合的区域, 而 p97 目前被认为是参与病毒癌基因 E6、E7 表达水平最重要的调控序列。同时在几项不同种族的宫颈癌研究

中, HPV16 的 URR 序列是突变概率最高的序列^[10~14]。在本研究中, 我们也发现了同样的趋势, 即在所有的 31 例(100%)样本中均发现了总共涉及 15 个位点的变异。其中, A7417G(9.68%)是一种新型的突变模式, 未在其他文献中报道过。在所有的 15 个位点变异中, 多数位点的突变位于已知的转录调控因子如 YY1、NF1、E2 等结合区域。

在 URR 序列中我们观察到了突变频率最高的位点是 G7521A(100%), 位于 YY1 结合区域。并且已有多篇文献报道, G7521A 突变在宫颈癌患者中具有分布的特异性^[11~13, 18]。YY1 结合位点序列的突变不仅能提高 p97 启动子的转录活性 3~6 倍, 而且还能使 AP1(一种转录调控因子)失活, 进而导致 HPV16 病毒癌基因 E6、E7 转录能力的下降^[19, 20]。因为在多数的癌前病变患者和无症状携带者中很难检测到该位点的变异, 因此检测该位点的突变对预测宫颈病情的发展是非常有意义的^[4]。我们还发现了 G7839A(45.16%)、G7826A(3.22%)位点的变异也位于 YY1 结合区域。这些位点的突变可能同样地、甚至协同作用, 能更有效地增强 p97 的转录活性从而提高癌基因 E6、E7 的表达, 最终导致细胞异常增殖和肿瘤发生。

本研究中, URR 序列突变频率排列第二的是 C7435G(96.77%), 目前关于这个位点的变异是否会影响其他转录因子同调控序列的结合依然尚不清楚。A7729C(45.16%)变异常常出现在具有更强致癌能力的亚美型(AA)和北美型(NA)中^[10], 目前已有研究证实该位点的突变能提高 p97 转录活性 2.8~3.3 倍, 而将该位点突变逆转后, 细胞内病毒 E6 和 E7 的表达水平会有明显的降低^[10]。因此, 检测该位点的变异情况可能也会对预测宫颈病变的发展和辅助疫苗的研制具有一定的指导作用。

Yamada 等^[13]曾报道在野生型 E6 基因(德国株)在欧洲宫颈癌患者中分布的频率约为 34%, 随后 Zehbe 等^[6]报道在瑞士宫颈癌患者中野生型分布频率仅为 6%, 这同另一项印度人群宫颈癌研究的结果是基本一致的^[14]。本研究中, 我们共在 31 例宫颈癌患者中发现了 5 例样本为野生型 E6, 占 16.13%。这个比例要高于瑞士、印度和墨西哥等国家^[13]。就世界范围而言, 最有特征性的 E6 突变为 T350G。该位点的变异在不同的地域有着不同分布频率, 约占 3.8%~78%^[14, 15, 21, 22]。本研究中, 我们观察到 5 例存在 T350G 位点的变异, 占 16.13%。目前认为, 该变异株会导致 E6 蛋白 L83V 氨基酸替换, 使其对鳞状上皮和腺上皮细胞生长转化能力增强, 因此, 这种变异株被认为具有更强的致癌潜能。已经有文献报道了 T350G 位点的变异导致 E6 蛋白 L83V 氨基酸

的替换, 同野生型 E6 相比更容易导致 HSIL 的发生, 因而是宫颈病变进一步发展的危险因素^[6, 12, 23]。本研究中, 我们发现北京地区宫颈癌患者 E6 序列变异频率最高的位点位于 T178G(氨基酸替换: D25E), 占 41.94%。该变异株在东亚人种中分布频率要显著高于其他地区人种, 所以该位点的突变被认为是亚洲型尤其是东亚型病毒分支的特异性变异。我们还发现, 在这 31 例宫颈癌患者中 As 型(54.8%)和 E 型(45.2%)的分布占了绝对的主导地位(100%)。由此我们认为, 与世界其他地域 HPV16 的流行情况不同, 在中国 As 型是流行程度最广的一种分支, 其次是 E 型。这对于指导控制 HPV 感染和治疗是很有帮助的。同时我们还发现如果按 35 岁分组, 年轻宫颈癌组中 As 型的分布频率(66.7%)要高于中老年宫颈癌组(47.4%); 相应地 E 型的分布频率(33.3%)则要低于中老年宫颈癌组(52.7%)。鉴于样本数量的限制, 是否因为 As 型和 E 型分布频率的差异导致了宫颈癌年轻化的趋势依然是不确定的, 但这方面的疑问值得进一步探讨和研究。

在多数涉及不同的种族和地域的研究中, HPV16 E7 基因的突变一直被认为是较少发生的事件^[24, 25]。但在某些报道中, 尤其是日本、韩国、印尼等国家^[26, 27], E7 变异频率却很高, 约占 65%~75%。而这些国家 HPV16 的流行情况与中国相似, 往往也是以亚洲型特别是东亚型为主。在本研究中, 我们发现了 E7 发生突变的频率为 90.32%, 仅有 3 例样本为野生型, 上述的资料提示在东亚人群中, 特别是中国人, E7 发生突变的频率要高于其他地域的人群, 这可能与 As 型流行程度更广有关。在中国, E6 基因可能比 E7 基因更加保守, 针对 E6 基因设计治疗性疫苗或在 RNA 水平干扰转录的进行可能是更合理的选择。我们在 E7 基因序列上发现了 3 个比较常见的突变位点: A647G(45.16%)、G658A(35.48%)、T846C(45.16%), 其中前两个突变为错义突变, 分别导致 S29N、K33E 氨基酸的替换, 后一种突变是无义突变, 且该变异同 A647G 位点的突变在所有样本中均是同时存在的, 表明这两种突变具有分型的特异性。

总之, 宫颈癌组织中 HPV16 上游调控序列、E6、E7 癌基因存在多种序列变异, 其可能与病毒致癌潜

能和宫颈癌的发生相关; 北京地区宫颈癌患者中 *As* 和 *E* 型可能是两种最主要的 HPV16 分支。随着研究的不断深入, 将会为阐明 HPV16 感染同宫颈癌发生和进展在病因学方面相关性研究中提供新的线索, 也会为更有针对性的研制 HPV 疫苗和指导宫颈癌诊断或治疗积累更多有用的信息。

参考文献(References):

- [1] Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, 2005, 337(1): 76–84.
- [2] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(14): 1072–1079.
- [3] Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(14): 1066–1071.
- [4] Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 1985, 145(1): 181–185.
- [5] Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JM, Stukart MJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stevens FR, Dyer PA, Sinnott P, Stern PL. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer*, 1998, 78(2): 166–171.
- [6] Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 1998, 58(4): 829–833.
- [7] Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Durst M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer*, 1999, 82(2): 203–207.
- [8] Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, Voglino G, Mikyskova I, Delius H, Marongiu A, Gissmann L, Wilander E, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer*, 2001, 94(5): 711–716.
- [9] Zehbe I, Mytilineos J, Wikstrom I, Henriksen R, Edler L, Tommasino M. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. *Hum Immunol*, 2003, 64(5): 538–542.
- [10] Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 8): 1975–1981.
- [11] Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer*, 2000, 36(11): 1402–1410.
- [12] Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt12): 2959–2968.
- [13] Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*, 1997, 71(3): 2463–2472.
- [14] Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R, Batra S, Das BC. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(3): 1060–1066.
- [15] Andersson S, Alemi M, Rylander E, Strand A, Larsson B, Sallstrom J, Wilander E. Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer*, 2000, 83(3): 307–310.
- [16] Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol*, 1996, 70(10): 6987–6993.
- [17] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, Tang X, Yasugi T, Kawana K, Sekiya S, Hirai Y, Kukimoto I, Kanda T, Taketani Y. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett*, 2000, 156(2): 159–165.
- [18] Schmidt M, Kedzia W, Gozdzicka-Jozefiak A. Intratype

- HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol*, 2001, 23(1-2): 65-77.
- [19] Dong XP, Pfister H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 1999, 80 (Pt 8): 2097-2101.
- [20] May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J*, 1994, 13(6): 1460-1466.
- [21] Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, He Y, Zhang Y. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt5): 1181-1188.
- [22] Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, Chandy G. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia. *Cancer Lett*, 2005, 229(1): 93-99.
- [23] Kammer C, Tommasino M, Syrjanen S, Delius H, Hebling U, Warthorst U, Pfister H, Zehbe I. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer*, 2002, 86(2): 269-273.
- [24] Eschle D, Durst M, ter Meulen J, Luande J, Eberhardt HC, Pawlita M, Gissmann L. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 1992, 73(Pt 7): 1829-1832.
- [25] Radhakrishna Pillai M, Sreevidya S, Pollock BH, Jayaprakash PG, Herman B. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2002, 87(3): 268-273.
- [26] de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Kolkman-Uljee S, Fleuren GJ. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and the Netherlands. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(2): 488-494.
- [27] Song YS, Kee SH, Kim JW, Park NH, Kang SB, Chang WH, Lee HP. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol*, 1997, 66(2): 275-281.

•综合信息•

李汝祺优秀动物遗传学论文奖基金说明

为推动当时国内比较薄弱的动物遗传学研究的开展,李汝祺教授于1984年捐款一万元,设立了“李汝祺优秀动物遗传学论文奖”基金,旨在鼓励年轻学者为发展我国遗传学发展贡献力量。该奖由中国遗传学会组织评审,自1984年开始至今已颁奖11次,共有21人获奖。其中施立明、吴常信、张亚平、李宁等已当选为院士,大部分获奖人都已成为本学科的骨干力量。

该基金在中国遗传学会和北京大学生科院等单位 and 个人的支持下虽已扩增为叁万元,但本金仍显单薄。为了实现李汝祺教授的心愿,我们拟借纪念李汝祺教授诞辰115周年之际进一步扩充本金,希望大家慷慨解囊,继续鼓励年轻学者积极投身于动物遗传学的研究领域。有意捐款者请汇款至:中国遗传学会。

付款方式(请在附言注明李汝祺奖及汇款单位)

1、通过银行转账,请汇至:

户名:中国遗传学会

开户银行:中国工商银行北京大屯路支行

账号:0200244509200016507

2、通过邮局汇款,请汇至:

北京市朝阳区北辰西路1号院2号中国科学院遗传与发育生物学研究所 中国遗传学会 收; 邮政编码:100101

中国遗传学会
2010年3月17日