

宫颈癌组织 HPV16 URR 及 E7 基因突变和序列多态性分析

赵雪珍¹, 王言奎¹, 彭丽娜¹, 张红²

(1 青岛大学医学院附属医院妇产科, 山东 青岛 266003; 2 莱西市人民医院妇产科)

[摘要] 目的 分析山东省青岛地区妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型(HPV16)上游调控区(URR)和 E7 开放读码框(ORF)基因突变和基因序列多态性。方法 收集山东省青岛地区妇女宫颈癌标本共 111 例,提取 DNA 作为模板,应用通用引物和型特异引物经聚合酶链反应(PCR)筛选 HPV16 阳性标本,PCR 结合测序检测 HPV16 阳性标本 URR 和 E7 基因全序列,经 DNASTar 100 软件和在线 BLAST 分析其变异情况。结果 宫颈癌组织中 HPV 和 HPV16 感染率分别为 99.10%(110/111)和 73.63%(81/110);核苷酸水平上 HPV16 URR 形成 24 种变异模式,同源性在 98.02%~99.26%之间,nt7518 G→A 和 nt7861 A 缺失变异率均为 100%(26/26)。HPV16 E7 形成 12 种变异模式,同源性在 99.23%~100%之间;nt647 A→G 突变率 58.54%(24/41),氨基酸由 Asn→Ser (N29S)、nt666 G→A 突变率 24.39%(10/41),为同义突变。结论 山东省青岛地区妇女宫颈癌组织中 HPV16 URR 和 E7 基因均存在变异;HPV16 URR 突变热点为 nt7518 和 nt7861,HPV16 E7 突变热点为 nt647,且二者尚存在未见报道的变异位点。

[关键词] 宫颈肿瘤;人乳头瘤病毒 16;调控序列;核酸;聚合酶链反应

[中图分类号] R737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-4488(2010)03-0215-04

MUTATION AND POLYMORPHISM OF HPV16 URR AND E7 GENE IN CERVICAL CANCER TISSUE ZHAO XUE-ZHEN, WANG YAN-KUI, PENG LI-NA, et al (Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliate Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the mutation and polymorphism of HPV16 URR and E7 gene in cervical cancer samples in Qingdao of Shandong province. **Methods** A total of 111 cancer samples were collected in Qingdao. The DNA was extracted and used as a template. The detection of HPV and the typing of HPV16 carried out using consensus and type-specific primers. The amplifications of HPV16 URR and E7 gene complete sequences were performed by PCR with the HPV16 positive ones. The variation information was analyzed by DNASTar 100 and BLAST online. **Results** The positive rate of HPV and HPV16 was 99.10% (110/111) and 73.63% (81/110), respectively. HPV16 URR fragments formed 24 patterns at nucleotide level, their homology was 98.02% to 99.26%. nt7518 G→A and nt7861 A absence were 100% (26/26); HPV16 E7 fragments formed 12 patterns mutation at amino acid level, their homology was 99.23% to 100%; HPV16 E7 nt647 A→G was 58.54% (24/41), resulting in amino acid Ser substituted for Asn. nt666 G→A was 24.39% (10/41), without variation of amino acid. **Conclusion** There are variations in both HPV16 URR and E7 genes at nucleotide level in Qingdao. The mutational hot spots of HPV16 URR are nt7518 and nt7861 and HPV16 E7 is nt647, both of them still have mutational spots that have not yet been reported.

[KEY WORDS] uterine cervix neoplasms; human papillomavirus 16; regulatory sequence, nucleic acid; polymerase chain reaction

人乳头瘤病毒(HPV)是乳头瘤病毒家族中最具多样性的一组病毒,具有严格的宿主范围和嗜组织特异性,为闭环共价小双链 DNA 病毒,主要感染人皮肤或黏膜上皮组织,引起良、恶性疾病并由此分为高危型和低危型。高危型人乳头瘤病毒持续感染是宫颈癌发病的主要病因,其中以 HPV16 最为常见。有关 HPV16 基因组单个基因片段变异研究结

果的报道,多集中于 E6 或 E7,而联合检测宫颈癌组织中 HPV16 上游调控区(URR)和 E7 的报道相对较少且多为国外的报道。另外,山东地区尚无宫颈癌组织 HPV16 URR 基因变异的研究报道,而这一地区有关 HPV16 E7 基因变异的分析也未发现其变异^[1]。本文联合检测山东省青岛地区妇女宫颈癌组织中 HPV16 URR 和 E7 基因片段变异情况,并分析其基因序列多态性。

[收稿日期] 2010-01-27; **[修订日期]** 2010-04-06

[作者简介] 赵雪珍(1970-),女,在读硕士研究生,副主任医师。

[通讯作者] 王言奎(1960-),男,主任医师,教授,硕士生导师。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 宫颈癌组织标本 手术切除宫颈癌组织标本 43 例,取自 2008 年 3 月—2009 年 3 月我院妇科,取材后立即置 -80°C 冰箱保存;宫颈癌组织石蜡切片标本 68 例,取自 2007 年 9 月—2009 年 3 月莱西市人民医院妇科。病人均未接受过放化疗,年龄 26~82 岁,平均 47.5 岁。病理学诊断:鳞癌 106 例,腺癌 4 例,腺鳞癌 1 例。临床病理资料于两院病理科获得。

1.1.2 主要试剂 TaqDNA 聚合酶、 $10\times$ PCR Buffer、dNTP Mixture、 $6\times$ Loading Buffer、DNA 分子标志物 DL 2000、DNA 提取试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计、合成 β -Globin、HPV L1 及 HPV16 E6、URR、E7 引物序列见文献[2-3]。各引物序列均由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 组织 DNA 提取、PCR 反应体系和条件 新鲜组织用酚-氯仿-异戊醇法常规提取 DNA,石蜡切片组织按 QIAmpDNA 提取试剂盒说明书步骤提取 DNA 作为模板。PCR 反应总体积均为 $25\ \mu\text{L}$,其中模板 DNA 约 50 ng,dNTP $200\ \mu\text{mol/L}$,上、下游引物各为 $0.5\ \mu\text{mol/L}$,TaqDNA 聚合酶 1 U, MgCl_2 $1.5\ \text{mmol/L}$, $10\times$ PCR 扩增缓冲液 $2.5\ \mu\text{L}$,加无酶水至 $25\ \mu\text{L}$ 。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳 将 PCR 产物置于 $16\ \text{g/L}$ 琼脂糖凝胶中进行电泳。长度为 268、450、140、617 和 315 bp 扩增条带分别为 β -Globin、HPV L1 及 HPV16 E6、URR、E7 目的基因条带。

1.2.4 PCR 产物测序及序列分析 将 PCR 产物送北京华大基因研究中心纯化后进行双向测序,凡发现突变的样品均经 PCR 重新扩增,并再次测序以排除 PCR 过程中碱基错配而可能产生的误差。最后,应用 DNASTar 100 软件和在线 BLAST 查找 HPV16 URR 和 E7 基因片段变异位点并进行序列多态性分析。

2 结 果

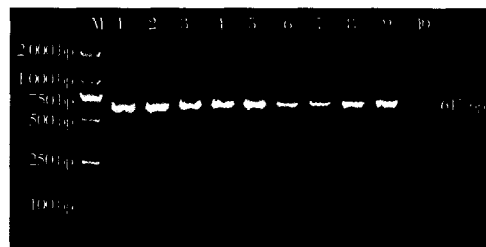
2.1 PCR 扩增

2.1.1 β -Globin 扩增结果 所有 111 例标本均在 268 bp 处出现目的条带。重复检测结果相同,故上述 111 份标本均纳入本次实验。

2.1.2 HPV L1 和 HPV16 E6 扩增结果 110 例 PCR 产物在 450 bp 处出现目的条带,HPV 总感染率为 99.10%(110/111),81 例在 140 bp 处出现目

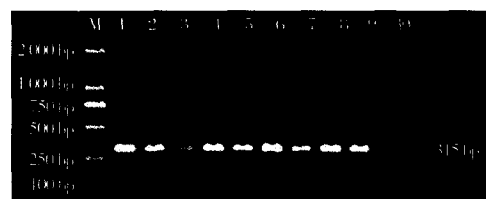
的条带,HPV16 阳性率为 73.63%(81/110)。

2.1.3 HPV16 URR 和 E7 基因片段的扩增结果 81 例 HPV16 阳性标本中分别有 51 例在 617 bp 处、70 例在 315 bp 处出现目的条带,HPV16 URR 和 E7 双向测序成功者分别为 26 例和 41 例。部分标本 HPV16 URR 和 E7 基因 PCR 扩增产物电泳结果见图 1、2。



M:DNA 分子标志物 DL 2000;①~⑨部分 HPV16 URR PCR 扩增产物条带;⑩阴性对照。

图 1 部分标本 HPV16 URR 基因 PCR 扩增产物电泳结果



M:DNA 分子标志物 DL 2000;①~⑨部分 HPV16 E7 PCR 扩增产物条带;⑩阴性对照。

图 2 部分标本 HPV16 E7 基因 PCR 扩增产物电泳结果

2.2 测序比对

2.2.1 HPV16 URR 变异 本研究 26 例测序成功的 HPV16 URR 片段显示多个位点的变异,热点突变为 nt7518 G $\rightarrow$ A 和 nt7861 A 缺失,均为 100%(26/26);而较高变异情况的位点为 nt7727 A $\rightarrow$ C、nt7494 A 缺失,均为 69.23%(18/26);nt7839 G $\rightarrow$ A、nt7928 C $\rightarrow$ T 及 nt7477 A 缺失,均为 61.53%(16/26)。见表 1。

2.2.2 HPV16 E7 变异 HPV16 E7 核苷酸水平上一些位点变异引起三联密码子改变,进而引起氨基酸变化;另一些位点突变虽改变了三联密码子,并未导致氨基酸水平上的变化。见表 2。

3 讨 论

HPV 的基因变异、病毒持续和反复感染、病毒 DNA 拷贝数及宿主免疫状态等因素与高危型 HPV 感染者发展为宫颈癌密切相关,其中 HPV 病毒持续和反复感染、病毒 DNA 高拷贝数可由 HPV 的型内变异所引起^[4]。研究表明,某些特异的 HPV 变异株更容易形成持续性感染,2000 年 VILLA 等^[5]

表 1 HPV16 URR DNASTar 100 和在线 BLAST 分析结果 (n=26, χ /%)

核苷酸位点	参考碱基	腺嘌呤	鸟嘌呤	胞嘧啶	胸腺嘧啶	缺失率	变异率
7465	A					3.8	3.8
7467	G					3.8	3.8
7468	C				3.8		3.8
7476	C					7.7	7.7
7477	A					57.0	57.7
7478	C					11.5	11.5
7479	A					38.0	38.5
7488	T			3.8		3.8	7.7
7494	A					57.7	57.7
7499	G			3.8			3.8
7510	G	3.8	7.7				11.5
7518	G	100.0					100.0
7522	T			3.8			3.8
7523	A			3.8			3.8
7711	T		3.8				3.8
7727	A			69.2			69.2
7749	A			3.8			3.8
7778	T			3.8			3.8
7789	C		3.8		3.8		7.7
7796	T			3.8			3.8
7839	A	61.5					61.5
7861	A					100.0	100.0
7866	A					3.8	3.8
7871	C		3.8				3.8
7872	C		19.2				19.2
7917	C				3.8		3.8
7928	G				61.5		61.5
7998	C	19.2					19.2
8128					3.8		3.8

表 2 HPV16 E7 DNASTar 100 和在线 BLAST 检测结果 (n=41)

核苷酸位点	碱基突变	三联密码子改变	氨基酸变化	氨基酸变化位点	突变率(χ /%)
579	T→A	CCT→CCA	Silent	P6P	4.88
580	A→C	ACA→CCA	Thr→Pro	T7P	2.44
581	C→A	ACA→AAA	Thr→Lys	T7K	2.44
585	G→A	TTG→TTA	Silent	L8L	2.44
585	G→T	TTG→TTT	Leu→Phe	L8F	2.44
586	C→G	CAT→GAT	His→Asp	H9D	2.44
590	A→C	GAA→GCA	Glu→Ala	E10A	7.32
590	A Abence				21.95
593	A→G	TAT→TGT	Tyr→Cys	Y11C	2.44
647	A→G	AAT→AGT	Asp→Ser	N29S	58.54
666	G→A	GAG→GAA	Silent	E35E	24.39
835	C→A	CCC→ACC	Pro→Thr	P92T	2.44

研究发现,HPV16 的非欧洲型变异株更容易引起持续性感染(OR:4.5,95%CI:1.6~12.4)。

URR 内顺式作用元件的点突变或缺失突变可以改变 URR 的调控功能,URR 的突变可通过阻遏子结合位点的缺失和(或)激活因子结合能力的增强而增强 URR 的启动活性。本研究成功测序的 26

例 URR 片段中此区间有 15 个位点共计 69 个核苷酸的碱基发生替换,27 个核苷酸的碱基缺失。已有报道此区间 nt7729 A→C 突变的 URR 转录活性是标准株的 2~4 倍,本研究中 nt7727 A→C 即为这种突变情况(参考序列不同);另外,本文结果中存在位于特异蛋白 1(SP1)和 YY1 结合位点的 nt7839 G→A 突变,该突变可能改变 p97 启动活性,进而改变早期癌基因 E6/E7 的转录活性,这一突变在韩国妇女宫颈癌组织中也较普遍。

SCHMIDT 等^[6]研究结果显示,波兰妇女宫颈癌组织中 HPV16 URR 片段 100%发生 nt7520 G→A 的突变,并认为是宫颈癌病人与无症状带毒者的主要区别,该处突变的毒株显示出更强的侵染活性,突变株的转录活性略高于标准株。本研究结果显示,HPV16 URR 序列有 24 种变异模式,有 29 个位点共计 104 个核苷酸的碱基发生了替换,75 个核苷酸发生了碱基缺失,测序成功的 26 例 HPV16 URR 片段均发生了 nt7518 G→A 突变,该突变与文献报道的 nt7521 和 nt7520 实为同一突变(两者的参考序列不同)^[7-8],说明该位点突变在亚裔美洲型(AA)及亚洲型(As)中普遍存在。另外,测序成功的 26 例 HPV16 URR 片段均发生了 nt7861 A 缺失变异,这一位点的高突变率及其与 HPV16 URR 调控功能之间的相关性尚未见报道,这为我们今后的研究内容提供了思路。本文还检测到较高的 nt7928 C→T、nt7477 和 nt7479 A 缺失的变异情况以及 7499、7872、7465、7523、7917 和 7478 等位点的突变,提示山东省青岛地区妇女宫颈癌组织中 HPV16 URR 变异具有多样性。

世界不同地区妇女的宫颈癌组织都普遍存在 HPV16 E7 变异株。HPV16 E7 基因结构变异导致的蛋白质氨基酸水平上的变异势必在一定程度上影响其功能,不同的变异位点抑或会产生生物学功能不同的 E7 蛋白。HPV16 E7 基因第 29 位密码子突变导致天门冬酰胺变为丝氨酸(Asn→Ser N29S),丝氨酸被磷酸化,蛋白质构象和极性可能发生改变,从而改变结合视网膜母细胞抑制基因产物(pRb)的能力,影响 HPV 的转化作用和免疫原性等生物学特性。在韩国妇女中 E7 N29S 变异会增强 E7 的致癌性。本研究亦显示了 nt647 A→G 这一突变情况,且与中国香港地区和日本报道的突变率相似^[9]。

此外,本研究测序成功的 41 例 HPV16 E7 基因片段中,有 2 例与标准株序列完全一致,除 1 例 nt835 位于 E7 蛋白羧基端外,其余 9 种变异均位于氨基端,提示 HPV16 E7 基因片段内氨基端变异相

对频繁;而 nt590A 缺失尚未见大量报道。

综上所述,山东省青岛地区妇女宫颈癌组织中 HPV16 URR 和 E7 在核苷酸水平上均存在变异,与国外文献报道一致,二者的热点突变及突变率与国内外报道相似,而与国内相关文献报道的 HPV16 E7 在山东地区“未发现变异”结论不同^[1]。这可能与样本的大小、样本的代表性、病人选择标准、实验设计、检测方法等因素存在差异有关,此外,亦不能除外与这一地区 E7 基因序列存在多态性有关。该地区 HPV16 URR 和 E7 还存在尚未见报道的突变位点,提示这一地区 HPV16 变异具有多样性;相对于 HPV16 E7, URR 基因片段变异频繁;HPV16 E7 基因片段内,变异相对频繁的位点多位于氨基酸端。HPV16 URR 的突变一方面与病毒的感染和宫颈癌的发生相关,另一方面可增强病毒基因的转录活性,HPV16 E7 变异会增强其致癌性,故本研究检测到的各种突变与这一地区宫颈癌发生的相关性已成为我们近一阶段正在研究和深入探讨的课题。

【参考文献】

- [1] 许雪梅, 司静懿, 刘世德, 等. 中国山东地区妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 E6 E7 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.
- [2] FARHADI M, TAHMASEBI Z, MERAT S, et al. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of esophagus in a

high-risk population[J]. *World Gastroenterol*, 2005, 28(8): 1200-1203.

- [3] 史文天, 王言奎, 袁月秀, 等. 化学合成 siRNA 沉默宫颈癌 si-Ha 细胞 E6 基因表达的进一步研究[J]. 青岛大学医学院学报, 2008, 44(3): 198-200.
- [4] MAYRAND M H, COUTLEE F. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent infection as determined by molecular variant analysis[J]. *Clin Microbio*, 2000, 38(9): 3388-3393.
- [5] VILLA L L, SICHERO L, RAHAL P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia[J]. *Gen Virol*, 2000, 81(12): 2959-2968.
- [6] SCHMIDT M, KEDZIA W, COZDZICKA-JOZEFIAK A. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers[J]. *Clin Virol*, 2001, 23(12): 65-77.
- [7] KURVINEN K, YLISKOSKI S, SAARIKOSKI S, et al. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16[J]. *Eur Cancer*, 2000, 36(11): 1402-1410.
- [8] 余勤, 马正海, 王艳萍, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型上游调控区 DNA 多态性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(11): 1000-1004.
- [9] PAUL K S C, CHING W L, TAK H C, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China[J]. *Infect Dis*, 2002, 186(5): 696-700.

(本文编辑 马伟平)

(上接第 214 页)

【参考文献】

- [1] 王艳, 林凤茹, 陈静, 等. 凋亡抑制蛋白基因在白血病患者中的表达及临床意义[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26: 697-698.
- [2] 刘建刚, 管洪在, 卢伟. 急性白血病人白血病细胞 Survivin 基因的表达及其临床意义[J]. 青岛大学医学院学报, 2007, 43(4): 302-304.
- [3] 林茂芳, 孟小莉, 蔡真, 等. 抗凋亡基因 survivin 在急性白血病细胞表达及临床意义[J]. 中华血液学杂志, 2002, 5: 251-253.
- [4] GAZZANIGA P, GRADILONE A, GIULIANI L, et al. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer[J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(1): 85-90.
- [5] ASHHAB Y, ALIAN A, POLLIACK A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern [J]. *FEBS Lett*, 2001, 495(1-2): 56-60.
- [6] LIN J H, DENG G, HUANG Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(3): 820-831.
- [7] SCHMOLLINGER J C, VONDERHEIDE R H, HOAR K M, et al. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction [J]. *Proc Natl*

Acad Sci USA, 2003, 100(6): 3398-3403.

- [8] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2008: 219-228.
- [9] 周晓彬, 纪新强, 徐莉. 医用统计学软件 PPMS 1.5 的组成和应用特点[J]. 齐鲁医学杂志, 2009, 24(1): 29-32.
- [10] MA L, HUANG Y, SONG Z, et al. Livin promotes Smac / DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(12): 2079.
- [11] YAGIHASHI A, ASANUMA K, TSUJI N, et al. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(7): 1206-1208.
- [12] CRNKOVIC-MERTENS I, HOPPE-SEYLER F, BUTZ K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene[J]. *Oncogene*, 2003, 22(51): 8330-8336.
- [13] ABE S, YAMAMOTO K, HASEGAWA M, et al. Bone marrow cells of myelodysplastic syndromes exhibit significant expression of apollon, livin and ILP-2 with reduction after transformation to overt leukemia [J]. *Leuk Res*, 2005, 29(9): 1095-1096.
- [14] QIUPING Z, JIE X, YOUXIN J, et al. Selectively frequent expression of CXCR5 enhances resistance to apoptosis in CD8 (+) CD34 (+) T cells from patients with T-cell-lineage acute lymphocytic leukemia[J]. *Oncogene*, 2005, 24(4): 573.

(本文编辑 马伟平)