

DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2011.03.027

湖北地区 HPV 16 E7 和 E5 基因突变与宫颈病变的相关性

王 华^{1*}, 蔡红兵¹, 晓华²

Association of Mutations in Human Papillomavirus Type 16 E7 and E5 Genes with Cervical Lesion in Hubei

WANG Hua¹, CAI Hong-bing¹, DING Xiao-hua²

1. Department of Gynecological Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Virology Institute of Medical College, Wuhan University (*Present; Department of obstetric and Gynecologic, Xiangyang No.1 People's Hospital, Xiangyang 441100, China)

Corresponding Author: CAI Hong-bing, E-mail: chb2105@163.com

Abstract Objective To identify variations in HPV 16 E7 and E5 genes and examine the association between these variants and cervical cancer development in Hubei, China. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) and PCR-directed sequencing methods were applied. Samples from 115 women infected with HPV16 E5 and E7 were analyzed. **Results** In addition to the prototype E7 and E5 genes sequence, the most frequently combined mutations A647G and T846C of HPV 16 E7 were detected 25% in normal cervix, 30% in CIN I ~ II, 53.3% in CIN III and 62.9% in ICC, respectively. The E5 combined mutations of A3979C and A4042 were 30% in normal cervix, 33.3% in CIN I ~ II, 56.7% in CIN III and 71.4% in ICC, respectively. The combined mutations of HPV16 E7 and E5 were statistically different at different stages of cervical lesion. **Conclusion** The most prevalent variations were HPV 16E7 A647G- E7 T846C - E5 A4042G - E5A3979C in Hubei, China. This combined variation was positively associated with cervical disease development.

Key words: HPV16; E7 and E5 genes; Polymorphism; Cervix lesion

摘要:目的 分析湖北地区宫颈病变组织中 HPV 16 E7 和 E5 基因序列变异及该变异与宫颈病变的相关关系。方法 对 HPV 16 E7 和 E5 DNA 阳性的 20 例正常宫颈、30 例 CIN I ~ II、30 例 CIN III 和 35 例宫颈鳞癌的基因片段进行纯化测序, 检测基因变异。结果 除了 HPV 16 E7 和 E5 原型序列以外, HPV 16 E7 最常见变异为 A647G 和 T846C 的联合变异株, 该联合变异株频率在正常宫颈、CIN I ~ II、CIN III 和鳞癌组中突变率分别为 25%、30%、53.3%、62.9%; HPV 16 E5 最常见变异为 A3979C + A4042G 联合变异株, 联合变异株在正常宫颈、CIN I ~ II、CIN III 组和鳞癌组中突变率分别为 30%、33.3%、56.7%、71.4%; HPV 16 E7 和 E5 联合突变株在宫颈病变各阶段差异有统计学意义。结论 HPV 16 E7、A647G/T846C 和 HPV 16 E5、A4042G/A3979C 联合变异株为中国湖北地区宫颈病变中流行的变异株, 此变异株与宫颈病变程度呈正相关。

关键词: HPV 16; E7 和 E5 基因; 基因多态性; 宫颈病变

中图分类号: R737.33; R73-31 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2011)03-0337-04

0 引言

人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌的主要致病因素, 其中人乳头瘤病毒 16 型是宫颈癌发病的最

常见高危型病毒类型^[1-3]。其 E7 和 E5 早期基因是 HPV 16 的主要致癌基因, 病毒早期基因 E7 和 E5 的存在和表达对保持转化细胞以及癌细胞的表现型起决定性作用^[3]。E7 蛋白主要是破坏抑癌蛋白 Rb 来促使细胞的恶性转化, E5 主要是干预生长因子受体, 促使宿主细胞增殖, 分化延缓。

大量的研究表明: 宫颈病变组织中 E7 和 E5 基因存在变异, 此种变异具有地域和种系发生的特点, 并与宫颈病变程度正相关。例如瑞典的研究^[4]表明: E5 基因突变和宫颈病变正相关, 韩国的研究^[5]

收稿日期: 2009-12-03; 修回日期: 2010-03-29

基金项目: 湖北省卫生厅科研基金重点资助项目(JX3A17)

作者单位: 1. 430071 武汉, 武汉大学中南医院妇瘤科;

2. 武汉大学医学院病毒研究所(*现工作单位: 441100 湖北襄阳, 襄阳市第一人民医院妇产科)

通信作者: 蔡红兵, E-mail: chb2105@163.com

作者简介: 王华(1977-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的研究

也证实了 E7. A647G 基因突变较原型发生宫颈上皮内瘤变和浸润性宫颈癌的风险大。如果 HPV16 基因突变和致瘤性相关,那么更多的 HPV 流行病学调查需要继续证实相关性。因为湖北是中国宫颈癌的高发区之一,尤其湖北省五峰土家族自治县宫颈癌发病率和死亡率从 70 年代初至今居全国之首,所以我们分析了湖北地区高危型 HPV16 E7 和 E5 基因变异与宫颈病变的相关性,旨在为进一步大规模进行 HPV 流行病学调查和宫颈癌预防及治疗性疫苗的研制探索路线。

1 材料与方法

1.1 样本

收集湖北武汉大学中南医院妇瘤科 2007 年 12 月—2009 年 5 月间自愿接受宫颈 HPV16 E7 和 E5 感染筛查的住院病人,包括病例组(CIN II 和宫颈浸润性鳞癌)160 例,平均年龄(45.21±8.76)岁(27~69 岁);对照组(正常宫颈和 CIN I~II)280 例,平均年龄(43.06±6.42)岁(35~62 岁);各组别年龄分布相近($F=1.303, P=0.275$)。选取两组中 HPV16 E7 和 E5 阳性的 DNA 标本作基因序列分析。所有标本采集和诊治过程均经患者知情同意,宫颈病变以病理诊断为金标准,标本液氮处理后立即保存于-80℃低温冰箱中。

1.2 主要试剂及工具酶

DNA 2×Taq PCR Mix、DNA marker DL600 和 10×PCR Buffer 购自北京天根公司,氯仿、苯酚、异戊醇购自武汉科瑞生物,蛋白酶 K 购自北京奇华盛生物技术有限公司。

1.3 提取 DNA

细胞学标本和宫颈活检标本的 DNA 按蛋白酶 K/苯酚/氯仿/异戊醇提取。提取的 DNA 经过 β -globin 引物(F: 5'-CAACTTCATCCACGTTTCCAC C-3', R: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') PCR 扩增验证所提取 DNA 质量。

1.4 引物的设计和合成

参照 Genome database 的 HPV16 E7 和 E5 基因序列及引物设计原则,采用引物设计软件自行设计 HPV16 E7 和 E5 PCR 特异性引物,引物序列如下: HPV16 E7 上游引物: 5'-CATAATATAAGGG GTCGGTGGA-3', 下游引物: 5'-CTGCATCTC-TATGTTGTTT-3'; HPV16 E5 上游引物: 5'-CAGTGTCTACTGGATTTATGTCTATATG-3'; 下游引物: 5'-ACATTATGTACATATACATTAT GTAATTA-3'。引物由上海生工公司合成。

1.5 PCR 反应

反应总体积为 50 μ l,其中 DNA 样本 3 μ l,上游

引物和下游引物各 1 μ l, 2×Taq PCR Mix 25 μ l, 去离子双蒸水 20 μ l, HPV16 质粒为阳性对照。HPV16 E7 PCR 反应条件为: 94℃预变性 300 s; 94℃变性 30 s, 54℃退火 45 s, 72℃延伸 60 s, 进行 33 个循环, 72℃最后延伸 5 min。HPV16 E5 的 PCR 反应条件为: 94℃预变性 300 s; 94℃变性 45 s, 41℃退火 45 s, 70℃延伸 60 s, 进行 31 个循环, 70℃最后延伸 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物带。

1.6 核酸序列测序

将扩增 HPV16 E7 和 E5 的 DNA 阳性基因片段反应体系 40 μ l 送南京思特进测序部, 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比对, 分析 HPV16 E7 和 E5 基因区的核苷酸和氨基酸序列的改变。

1.7 统计学方法

用 SPSS11.0 软件行 χ^2 检验进行统计分析, 计算相关危险度及 95% CI 以进行危险度评价, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV16 E7 基因突变性分析

HPV16 E7 DNA 序列测序后检出结果见表 1: (1)原型序列在正常宫颈、CIN I~II、CIN III 和鳞癌组分别为 60%、46.7%、30% 和 17.2%; (2)最常见的突变位点为 T846C 同义突变, 突变频率在正常宫颈、CIN I~II、CIN III 和鳞癌组分别为 40%、53.3%、70% 和 82.9%; (3)其次为 A647G, 导致相应的氨基酸由天冬氨酸变为丝氨酸(N29S), 突变频率在正常宫颈、CIN I~II、CIN III 和鳞癌组分别为 30%、36.7%、53.3% 和 68.6%; (4)C712A 突变株在各组的突变频率为 5%、6.7%、0%、5.7%; T732C 突变频率分别为 5%、10%、10% 和 8.6%; T789C 突变频率分别为 5%、6.7%、10% 和 5.7%; T795G 突变频率分别为 0%、0%、0% 和 2.9%; A822G 突变频率分别为 0%、0%、3.3% 和 2.9%; HPV16 E7. A647G + T846C 联合变异株在正常宫颈、CIN I~II、CIN III 组、鳞癌组中的突变率分别为 25%、30%、53.3%、62.8%, 差异有统计学意义($\chi^2=11.299; P=0.01$)。T846C 突变和 A647G + T846C + C712A 联合突变株在宫颈病变的分布差异无统计学意义, 结果见表 2。

2.2 HPV16 E5 基因突变性分析

HPV16E5 DNA 序列测序后检出结果见表 1:

(1)原型序列在正常宫颈、CIN I~II、CIN III 和鳞癌组分

别为 55%、50%、23.3%和 14.3%；(2)最常见的突变位点为 A4042G 变异,使 65 位异亮氨酸变异为缬氨酸,突变频率在正常宫颈、CIN I ~II、CIN II和鳞癌组分别为 45%、50%、76.7%和 85.7%；(3)其次为 A3979C,导致相应的氨基酸由异亮氨酸变为亮氨酸,突变频率在正常宫颈、CIN I ~II、CIN II和鳞癌组分别为 30%、36.7%、60%和 77.1%；(4)G3868A 在各组的突变频率为 0%、3.33%、3.33%、5.7%；T3991C 在

CIN III和宫颈癌组各检出 1 例(3.3%和 2.9%)；C3883T 仅在宫颈癌组检出 1 例(2.9%)；HPV16E5. A3979C + A4042G 联合变异株在正常宫颈和 CIN I ~II、CIN II组、鳞癌组中的突变率分别为 30%、33.3%、56.7%和 71.4%,联合突变株在宫颈病变各阶段表达差异有统计学意义($\chi^2 = 13.488; P = 0.004$)。A3979C + A4042G + G3868A 联合突变株和 A4042G 突变株在宫颈病变的分布差异无统计学意义,结果见表 3。

表 1 HPV16E7 和 E5 核苷酸和氨基酸序列的变异
Table 1 Nucleotide and amino acid variants in HPV16 E7 and E5 genes

Open reading frame							Predicted amino acid				Case number								
E7			E5				E7		E5		Normal	CIN ~II	CIN III	ICC					
							Prototype				(n= 20)	(n= 30)	(n= 30)	(n= 35)					
6	7	7	7	7	8	8	3	3	3	3	4								
4	1	3	8	9	2	4	8	9	8	9	0								
7	2	2	9	5	2	6	6	7	8	9	4								
							8	9	3	1	2								
A	C	T	T	T	A	T	G	A	C	C	A								
G	A	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	G	N29S/ H51N	I44L/ I65V	1	2	0	2	
G	-	C	-	-	G	C	-	-	-	C	-	T	G	N29S	I44L/ I65V	0	0	1	1
G	-	-	C	-	-	C	-	-	-	C	-	-	G	N29S	I44L/ I65V	0	0	1	1
G	-	C	-	-	-	C	-	-	-	C	-	G	N29S	I44L/ I65V	0	1	0	1	
G	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	G	N29S	I44L/ I65V	5	6	14	18	
-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	G	I44L/ I65V	0	1	1	1	
G	-	-	-	G	-	C	-	-	-	C	T	-	G	N29S	I44L/ I65V	0	0	0	1
-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	A	C	-	-	G	A7P/ I44L/ I65V	0	1	1	2
-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	G	I65V	2	2	2	2	
-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	I65V	1	2	2	1	
G					C							N29S			0	2	0	0	
					C											1	1		

表 2 HPV16 E7 氨基酸序列原型和变异位点在宫颈病变中的分布和分析

Table 2 Amino acid sequence prototypes and variations of HPV16 E7 distribution in cervical lesions

HPV 16 E7	Normal n= 20	CIN I ~ II n= 30	CIN III n= 30	ICC n= 35	P	OR	95% CI
647A + 846T	12(60)	14(46.7)	9(30)	6(17.2)	0.006	0.277	0.124~0.617
T846C	2(10)	5(16.7)	5(16.7)	5(14.2)	0.910	1.117	0.393~3.176
A647G + T846C	5(25)	9(30)	16(53.3)	22(62.8)	0.01	3.619	1.642~7.976
A647G + T846C + C712A	1(5)	2(6.6)	- (0)	2(5.8)	0.367	0.497	0.080~3.096

Note: OR: normal and CIN I ~ II; CIN III and ICC. Figures in brackets are percentage values

表 3 HPV16 E5 氨基酸序列原型和变异位点在宫颈病变中的分布和分析

Table 3 Amino acid sequence prototypes and variations of HPV16 E5 distribution in cervical lesions

HPV16 E5	Normal n= 20	CIN I ~ II n= 30	CIN III n= 30	ICC n= 35	P	OR	95% CI
3979 A + 4042 A	11(55)	15(50)	7(23.3)	5(14.3)	0.005	0.209	0.091~0.483
A4042G	3(15)	4(13.4)	5(16.7)	3(8.6)	0.793	0.862	0.290~2.561
A3979C + A4042G	6(30)	10(33.3)	17(56.7)	25(71.4)	0.004	3.880	1.775~8.482
A3979C + A4042G + G3868A	- (0)	1(3.33)	1(3.33)	2(5.7)	0.602	2.371	0.239~23.506

3 讨论

韩国 Song 等^[5]研究发现:在正常宫颈组织、CIN III、浸润性宫颈癌中, HPV 16 E7 最常见的变异株为亚洲型 A647G, 此突变株在浸润性宫颈癌中突变频率为 70%, 且此变异株在浸润性宫颈癌中较非浸润性宫颈癌中差异有统计学意义($P=0.0430$)。但是印度研究发现^[6]:热点突变 A647G 在各级宫颈病变中的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。在中国香港 Chan^[7]的研究中发现:亚洲型突变株 A647G 在正常宫颈、CIN I、CIN II~III 和鳞癌组突变频率分别为 47.9%、66.7%、52.9%、61.3%, 在宫颈病变各阶段中的分布差异无统计学意义。但是杨英捷研究发现^[8]: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。在本实验中我们对正常宫颈、CIN I~II、CIN III 和鳞癌组进行 HPV 16 E7 检测后测序发现:有 T846C、A647G (N29S)、C712A (H51N)、T732C、T789C、A822G 六个核苷酸位点的改变和两个氨基酸位点的改变, 最常见的型内突变是 A647G 和 T846C 联合突变株, 该联合突变株在宫颈鳞癌及其癌前病变中的分布差异有统计学意义($P=0.01$), A647G 和 T846C 联合突变株在病例组较对照组的相关危险度高 ($OR=3.619, 95\%CI=1.642\sim7.976$), 我们的研究显示该联合突变株对宫颈癌发病可能有影响, 故值得在 CIN 和宫颈癌的防治策略中考虑。

国内外对 HPV 16 E5 基因变异与宫颈病变相关性研究的报道还很少, 国内仅只有杨娥等^[9]用 SSPC 分析时发现宫颈癌组织 HPV 16 E5 突变率为 40% (6/15), 而未对正常宫颈和宫颈上皮内瘤变的 E5 基因突变进行研究分析。Hu 等^[4]在瑞典研究中发现: HPV 16 E5 的热点突变为欧洲型变异株 A3979C (16/61 A, 45/61 C) 及 A4042G (14/61 A, 47/61 G), 统计学处理发现宫颈癌组变异明显高于宫颈上皮内瘤变组 ($P<0.025$)。在本实验中我们对正常宫颈、CIN I~II、CIN III 和鳞癌的 HPV 16 E5 阳性宫颈组织进行正反两个方向测序发现:有 A3979C (I44L)、A4042G (I65V)、G3868A (A7P)、T3991C、C3883T 五个核苷酸位点的改变和三个氨基酸位点的改变, 最常见的型内突变是 A3979C + A4042G 联合突变株, 该联合突变株在宫颈鳞癌及其癌前病变各阶段中的分布频率有显著差异 ($\chi^2=13.488; P=0.004$), 这一联合突变株在病例组较对照组的相关危险度高 ($OR=3.880, 95\%CI$

$=1.775\sim8.482$), 我们的研究同 Hu 等^[4]的研究结果基本一致。

对同一 HPV 16 病毒株的 E5 和 E7 基因序列联合分析表明:只要有 E7. A647G/T846C 位点变异, 就同时有 E5. A4042G (I65V) 或 (和) E5. A3979C (I44L) 变异点伴随存在, 我们对这一中国湖北地区流行的 HPV 16 联合变异株进行统计分析发现该变异与宫颈病变程度正相关。但要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数量并对其进行长期的追踪研究, 同时还需要研究湖北地区 HPV 16 E5 和 E7 基因突变后的转录活性和基因突变对生长因子和细胞抑癌蛋白 Rb 功能的影响, 从而进一步证实 HPV 16 E5 和 E7 基因变异在宫颈细胞恶性转化的作用。

参考文献:

- [1] 吴心音, 黄民主, 李洪波, 等. 女性宫颈高危型 HPV 感染状况及其与宫颈病变剂量一效应关系分析 [J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(2): 158-161.
- [2] Cai HB, Ding XH, Chen CC. Prevalence of single and multiple human papillomavirus types in cervical cancer and precursor lesions in Hubei, China [J]. Oncology, 2009, 76(3): 157-161.
- [3] Pfister H. The role of human papillomavirus in anogenital cancer [J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 1996, 23(3): 579-595.
- [4] Hu X, Pang T, Guo Z, 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.
- [5] 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]. Gynecologic Oncology, 1997, 66(2): 275-281.
- [6] Radhakrishna Pillai M, Sreevidya S, Pollock BH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer [J]. Gynecol Oncol, 2002, 87(3): 268-273.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 杨娥, 楚雍烈, 刘文康, 等. 宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型 E5 基因的变异 [J]. 微生物学杂志, 2001, 21(4): 11-12.

[编辑: 刘红武; 校对: 安 凤]