

湖北地区宫颈癌组织 HPV16 E7 和 E5 转化基因变异分析

王 华¹ 蔡红兵¹ 晓华²

¹ 武汉大学中南医院妇瘤科 湖北 武汉 430071

² 武汉大学医学院病毒学研究所 湖北 武汉 430071

摘要 目的: 分析湖北地区宫颈癌组织 HPV 16 E7 和 E5 基因序列变异情况。方法: 对 87 例宫颈鳞癌组织分别采用多重 HPV16 E7 引物进行巢式 PCR 扩增和 HPV 16 E5 特异引物进行 PCR 扩增, 并选择阳性扩增的基因片段 DNA 进行纯化、测序, 检测基因变异。结果: 测序成功的 20 例宫颈癌组织 DNA 中, HPV16 E7 基因的 5 个突变位点为: T846C、A647G、T732C、T789C、T795G, 突变频率分别为 85% (17/20)、70% (14/20)、15% (3/20)、10% (2/20)、5% (1/20); HPV16 E5 基因的 4 个突变位点包括: A3979C、A4042G、G3868A、C3991T, 突变频率分别为: 80% (16/20)、90% (18/20)、5% (1/20)、5% (1/20)。结论: 湖北地区宫颈癌的宫颈组织中 HPV 16 E7 热点突变为 A647G 和 T846C, HPV16 E5 的热点突变为 A3979C 和 A4042G, 本研究为湖北地区宫颈癌流行病学研究打下基础。

关键词 宫颈癌; HPV 16; E7 和 E5 基因; 基因多态性

中图分类号 R737.33 **文献标识码** A **文章编号** 1671-8852(2009)06-0759-04

Polymorphisms of E7 and E5 Genes in Human Papillomavirus Type 16 Among Patients with Cervical Cancer in Hubei Province of China

WANG Hua¹, CAI Hongbing¹, DING Xiaohua²

¹ Dept. of Gynecological Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

² Virology Institute, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract

Objective: To identify the sequence variations in the HPV 16 E7 and E5 genes among patients with cervical cancer in Hubei province of China. **Methods:** Eighty-seven patients with cervical cancer were involved in this study. Using polymerase chain reaction (PCR) and PCR-directed sequencing methods, the variations of the HPV 16 E7 and E5 genes were investigated. **Results:** The rank orders of incidence of HPV16 E7 variants from cervical cancer in Hubei were as follows: T846C in 85% (17/20), A647G in 70% (14/20), T732C in 15% (3/20), T789C in 10% (2/20), and T795G in 5% (1/20). There are four points of mutation in E5 gene, including A3979C, A4042G, G3868A, and C3991T with mutant frequencies of 80% (16/20), 90% (18/20), 5% (1/20), and 5% (1/20), respectively. **Conclusion:** The hot-spot mutations of HPV16 from cervical cancer in Hubei are A647G and T846C in E7 gene, and A3979C and A4042G in HPV16 E5 gene. The characterization of sequence variations within high-risk HPV 16 might be important in the search for epidemiological cervical cancer risk factors.

课题来源: 湖北省卫生厅科研基金重点项目(编号: JX3A17)

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

通讯作者: 蔡红兵, 女, 1961-, 教授, 硕士生导师, 主要从事妇科肿瘤的研究

Key Words Human Papillomavirus16 (HPV16); Cervix Cancer; E7 and E5 Genes; Polymorphism

宫颈癌是常见的危及女性健康的恶性肿瘤。大量的科学研究已证实人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是导致宫颈癌的主要病因。其中人乳头瘤病毒 16 型是中国湖北地区宫颈癌中最常见的高危型别(占 81%)^[1]。研究证实高危型 HPV16 所编码的癌蛋白中 E5、E6 和 E7 具有刺激生长和转化功能, E6 的主要功能是通过与 P53 和一种泛素连接酶 E6-AP 形成复合物, 使 P53 泛素化分解而失去作用; E7 蛋白主要是破坏 Rb 蛋白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。HPV 16 E6、E5 和 E7 的型内突变广泛存在, 并且具有地域特征, 5 种主要的变异种系群为欧洲型(E)、亚洲型(As)、亚裔美洲型(AA)、非洲 1 型(Af1)、非洲 2 型(Af2)。

虽然大多数研究认为 HPV16 E6、E5 和 E7 基因突变广泛存在, 但是各研究结果不尽一致, 同一变异株在不同地区、不同种族也存在明显的差异。因为湖北是中国宫颈癌的高发区之一, 尤其湖北省五峰土族自治县宫颈癌发病率和死亡率从 20 世纪 70 年代初至今居全国之首, 故在本研究我们分析了湖北地区人宫颈癌患者 HPV16 E7(nt 562±858)和 E5 (nt 3 850±4 101)基因的型内变异情况, 旨在为进一步大规模进行 HPV 流行病学调查和宫颈癌的

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 收集武汉大学中南医院妇瘤科 2008 年 8 月-2009 年 2 月间住院手术病人的宫颈癌组织标本 87 例, 患者全部出生并长期居留于湖北地区, 所有样本均经病理诊断确诊, 患者知情同意, 术后标本液氮处理后立即保存于-70℃低温冰箱中。

1.2 主要试剂及工具酶 DNA 2×Taq PCR Mix、DNA maker DL600 和 10×PCR Buffer 购自北京天根公司, 氯仿、平衡酚、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 宫颈癌组织 DNA 的提取 将癌组织先研磨匀浆后经蛋白酶 K 消化, 经酚/氯仿/异戊醇提取 DNA, 提取的基因组经过 β-globin 引物(F: 5'-CAACTTCATCCACG TTCACC-3', R: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') PCR 扩增验证所提取 DNA 质量。

1.4 引物的设计和合成 参照 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 巢式 PCR 引物和 HPV16 E5 PCR 特异性引物, 引物由上海生工公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 HPV16 E7 和 E5 基因引物序列和 PCR 产物长度
Tab. 1 Primer sequences and PCR length of E7 and E5 genes

名称		序列(5'-3')	长度
HPV16 E7	OutsideF	CATAATATAAGGGT CGG TGA	682 bp
	OutsideR	CTGCATCTCTATGTTGTTTTG	
HPV16 E7	InsideF	GCAGATCA TCAAGAACACG	487 bp
	InsideR	CAAA TCTTCACCTGTA TCACTG	
HPV16 E5	F	CAGTG TCTACTGGATTTATGTCTA TATG	294 bp
	R	ACA TTATGTACATA TACATTA TGTAATT A	

1.5 PCR反应 反应总体系为 50 μl, 其中 DNA 样本 3 μl, 上游引物和下游引物各 1 μl, 2×Taq PCR Mix 25 μl, 去离子双蒸水 20 μl。HPV16 质粒为阳性对照。扩增 HPV16 E7 引物的反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 54℃退火 45 s, 72℃延伸 60 s, 进行 32 个循环, 72℃最后延伸 300 s, 挑选出 682 bp 处出现 DNA 带者分别用 HPV16 E7 内侧引物进行第 2 次 PCR 扩增; 扩增 HPV16 E5 的反应条件为: 94℃预变性 15 min; 94℃变性 45 s, 41℃退火 45 s, 72℃延伸 60 s, 进行 35 个循环, 72℃

最后延伸 5 min。

1.6 核酸序列测序 将 PCR 扩增的阳性 DNA 片段产物送南京思特进测序部纯化并双向测序。测序结果使用 DNAMAN version 5.2.2 软件分析, 以 GenBank 的德国标准株(AF534061)作为 HPV16 E7 和 E5 原型进行比对分析。

2 结果

2.1 宫颈癌组织中 HPV16 E7 基因和 E5 基因序列的检出情况 宫颈癌组织经巢式 PCR 扩增出 HPV16

E7 基因序列 PCR 扩增的产物进行凝胶电泳在 682 bp 处出现 DNA 带(图 1a), 第 2 次 PCR 扩增在 487 bp 出现 DNA 带, HPV16 E5 基因序列 PCR 扩增的产物进行凝胶电泳在 294 bp 处出现 DNA 带(图 1b)。

2.2 HPV16 E7 和 E5 基因多态性分析 将测序成功的 HPV16 E7 和 E5 基因序列和氨基酸序列与基

因序列数据库(AF534061)中的 HPV16 德国参照株序列进行比对分析。变异种系按已知的 HPV16E7 和 E5 变异株分布^[2,3]进行分类: Ep (原型序列), As (A3979C, A4042G, A4042T, A647G, T846C), E (A3979C, A4042G), Af (G3868A, C3991T, T789C, T795G), AA (T732C, T789C, T795G)。

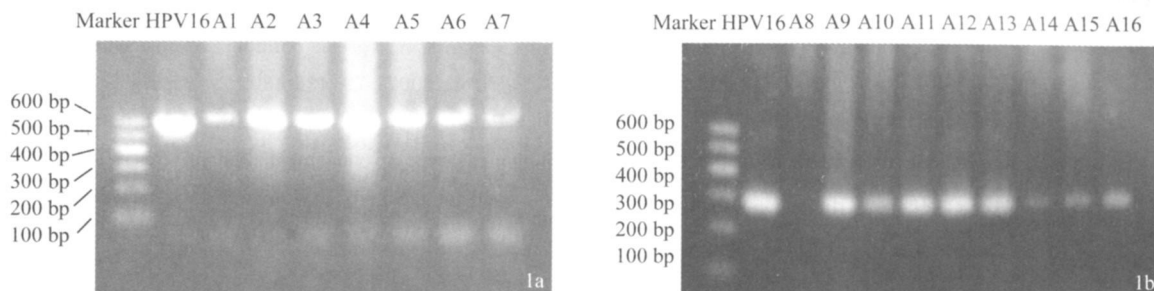


图1 HPV16 E7 和 HPV16 E5 基因 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoresis analysis of PCR products of HPV16 E7 and HPV16 E5 gene amplified from cervicitis tissue DNA

1a. HPV16 E7; 1b. HPV16 E5; HPV16 为质粒 DNA; A1-A7 为 DNA HPV16 E7 PCR 扩增的阳性产物带结果; A8 为阴性对照; A9-A16 为 DNA HPV16 E5 PCR 扩增产物带结果

2.3 HPV16 E7 基因突变性分析 HPV16 E7 常见的突变位点是 A647G, 导致第 29 位氨基酸由天冬氨酸变为丝氨酸(变异情况见插页 2 图 2a), 在 20 例测序的标本中有 14 例发生这一位点的变异, 突变频率为 70%, 最常见的为 T846C 同义突变, 位于氨基酸位置的 95 位(丝氨酸), 在 20 例中发现 17 例这一位点的变异, 突变频率为 85%; 研究还发现湖北地区宫颈癌组织中 HPV16 E7 基因序列 T732C, T789C, T795G 的同义变异, 分别位于氨基酸位置的 57 位(苯丙氨酸)、76 位(异亮氨酸)和 78 位(苏氨酸), 突变频率分别为 15%(3/20), 10%(2/20)、5%(1/20); HPV16 E7 基因突变大部分(85%)属于亚洲型变异株, 10%属于非洲型(Af1), 5%属于亚裔美洲型(AA), 没有欧洲型(E)和非洲-2 型(Af2)。

2.4 HPV16 E5 基因突变性分析 在 HPV16 E5 中, 常见的变异位点为 A3979C, 导致相应的第 44 位氨基酸由异亮氨酸变为亮氨酸, 在 20 例测序标本中有 16 例发生这一位点的变异, 突变频率为 80%, HPV16 E5 另一常见高频率变异位点为 A4042G 变异, 使 E5.65 位相应的氨基酸由异亮氨酸变异为缬氨酸, 在测序的 20 例标本中 18 例都存在这一位点的变异, 突变频率为 90%, 研究也发现湖北地区宫颈癌组织中 HPV16 E5 基因序列各存在 G3868A(A7P)的突变和 3991C(原型为 T)位点的同义基因突变。HPV16 E5 基因突变 90%属于欧洲和亚洲型, 10%属于非洲-

1 型(Af1), 没有属于亚裔美洲型(AA)和非洲-2 型(Af2), 变异情况见插页 2 图 2b 和 2c。

3 讨论

本研究通过 PCR 扩增的 HPV16 E7 片段(大小为 480 bp)与德国标准株 E7 区序列一致, 但是其分离株的基因序列和德国标准株相比发生了多处点突变, 突变位点依次为: T846C (17/20)、A647G (14/20)、T732C (3/20)、T789C (2/20)、T795G (1/20)。我们研究发现在湖北地区亚洲型的突变株发生频率高, 且大部分(83%)的突变位点具有联合变异的特征。但是在亚洲的香港、韩国、印度^[3-5], A647G 突变频率分别为 72%, 58.0%、37.8%, 而在美国^[6]突变频率为 2%, 在欧洲的德国、瑞典、意大利^[7-9]未见此变异株。湖北地区 HPV16 E7 第 2 个常见的热点突变为亚洲型的变异株(T846C), 其突变频率为 85%, 但是在香港^[3]和日本^[10]突变频率分别为 52.9%、42%, 在亚洲的香港^[3]和印度的东部^[5]、欧洲的德国和意大利^[8,9]都未见到此变异, 以上的研究反映了湖北地区 HPV16 E7 变异株与这些国家或地区有明显不同。同时国内研究也显示: 广东地区^[11]的 E7 基因突变位点分别为: T846C (68%)、A647G (68%)、C666T (50%)、G823A (4%)、A844C (4%); 北京地区^[12]的 E7 基因热点突变 A647G (31.9%), 湖北地区最常见的 T846C 突变株在本地区没见到。结果进一步证实 HPV E7 突变株同一

国家不同地区之间存在着差异。

国内外对 HPV16 E5 基因序列分析及其变异报道很少,本研究通过 PCR 方法对临床病例样品进行检测,并从正反两个方向对目的基因正链及负链进行测序后分析: HPV16 E5 基因 4 个突变位点分别是: A3979C (16/20)、A4042G (18/20)、G3868A (1/20)、C3991T (1/20), 且大部分属于欧洲型和亚洲型的变异株。但是 E5 基因在欧洲的瑞典^[8] 突变位点为: A3979C (45/61), A4042G (47/61), T3867A (5/61); 在美国^[3] 用 PCR-RFLP 技术研究显示: 在 HPV16 感染的宫颈组织中可见到高频率的突变位点: T4040C 及 A4042G; 在我国的台湾地区^[13] 热点突变为: A3979C (23/29), A4042G (23/29), A4077T (23/29)。以上研究反映了这些国家流行的变异株与湖北地区有明显的不同。我们的研究结果表明: 从系统学发生来说, HPV16 E5 基因在湖北地区虽然有 As 型和欧洲型变异株的主流突变模式趋势, 但是突变频率较高, 突变位点中未见到亚裔美洲型(AA)和非洲-2 型(Af2), 故再次证明了 E5 基因突变具有地域特征。

我们先前对湖北地区宫颈癌组织中 HPV16 E6 基因变异的研究表明: E6 的 168 位存在高频率的 T 到 G 的突变^[14], 突变频率为 51.43%。对 E6、E7 和 E5 基因变异联合分析表明: 与欧洲原型 HPV16 病毒相比, 存在 E6. T178G-E7. A647G-E5. A3979C-E5. A4042G 的联合变异, 这表明在中国湖北地区流行的 HPV16 变异株不同于欧洲型(E)和非洲型(Af)型 HPV16 变异株, 且此联合变异可能为亚洲地区和中国湖北地区流行的 HPV16 病毒变异株。

对我们研究发现的这一湖北地区流行的亚洲型 HPV16 变异株是否与湖北地区的宫颈癌高发有关, 有待于我们进一步扩大研究样本, 特别是正常宫颈组织、慢性宫颈炎和宫颈上皮内瘤变中这些基因的变异分布情况, 而且还需研究这些基因变异后对其基因编码产物功能的改变, 从而确定它们是否有更强的细胞转化能力和致癌性。

参考文献

- [1] 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: 157-161.
- [2] Eriksson A, Herron JR, Yamada T, et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment

and the E2 hinge region[J]. *General Virology*, 1999, 80: 595-600.

- [3] Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China[J]. *Infect Dis*, 2002, 186: 696-700.
- [4] Choi BS, Kim SS, Yun H, et al. Distinctive distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S intratypic Asian variants in Korean commercial sex workers[J]. *Med Virol*, 2007, 79: 426-430.
- [5] Pande S, Jain N, Prusty BK, et al. 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]. *Clinical Microbiology*, 2008, 46: 1060-1066.
- [6] Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, et al. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants[J]. *Gynecologic Oncology*, 2005, 96: 695-700.
- [7] Nindl IK, Rindfleisch B, Lotz A, et al. Uniform distribution of HPV16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 1999, 82: 203-207.
- [8] Hu XR, Pang TY, Guo ZM, et al. Oncogenic lineages of human papillomavirus type16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma[J]. *Pathol*, 2001, 195: 307-311.
- [9] Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello L, et al. Analysis of Human Papillomavirus Type-16 Variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer[J]. *Medical Virology*, 2004, 74: 117-126.
- [10] Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in pre-invasive and invasive neoplasia[J]. *Virus Genes*, 1994, 9: 85-92.
- [11] 刘欣, 刘国炳, 庞战军, 等. 宫颈癌组织中 HPV16 E7 序列多态性分析[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 20(10): 1272-1276.
- [12] 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, 3(21): 32-34.
- [13] Hsieh CH, Tsao YP, Wang CH, et al. Sequence variants and functional analysis of human papillomavirus type16 E5 gene in clinical specimens[J]. *Arch Viro*, 2000, 145(11): 2273-228.
- [14] 丁晓华, 蔡红兵, 张帆, 等. 98 例宫颈癌人乳头瘤病毒 16 型 E6 基因突变及多态性分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(11): 989-992.

(2009-06-12 收稿)

编辑 张峻

肝细胞脾内移植治疗大鼠肝衰竭(正文第714页)
Hepatocyte Transplantation Intraspplenically for Rats with
Acute Hepatic Failure(Page 714)

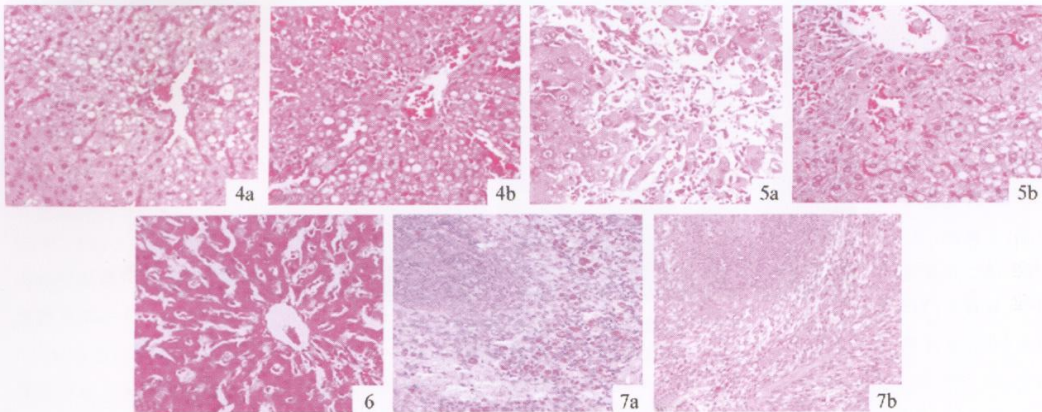


图4 大鼠肝细胞移植后第1天肝组织HE染色照片(HE×400)
图5 大鼠肝细胞移植后第3天肝组织HE染色照片(HE×400)
图6 大鼠肝细胞移植后第7天肝组织HE染色照片(HE×400)
图7 I 组大鼠肝细胞移植后脾组织PAS染色照片(PAS×400)
Fig.4 HE stain photos of liver tissue at the first day after hepatocytes transplantation in the two groups
Fig.5 HE stain photos of liver tissue at the 3rd day after hepatocytes transplantation in the two groups
Fig.6 HE stain photo of liver tissue in group I at the 7th day after hepatocytes transplantation
Fig.7 HE stain photos of spleen tissue in group I after hepatocytes transplantation in the two groups
4a: I 组; 4b:II 组; 5a: I 组; 5b:II 组; 7a: 3 d; 7b:7 d

湖北地区宫颈癌组织HPV16 E7和E5转化基因变异分析(正文第759页)
Polymorphisms of E7 and E5 Genes in Human Papillomavirus Type 16 Among Patients
with Cervical Cancer in Hubei Province of China(Page 759)

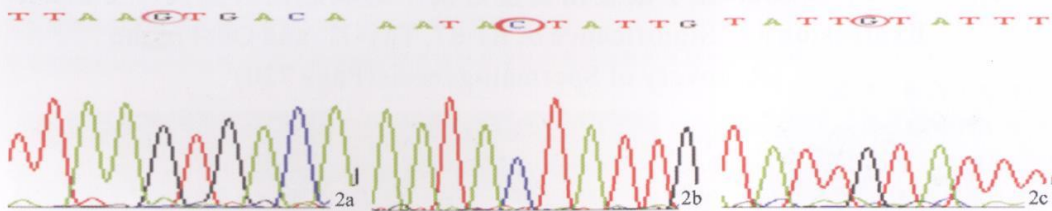


图2a 宫颈癌组织中HPV16 E7基因第647 位核苷酸由A突变为G
图2b 宫颈癌组织中HPV16 E5基因第3979 位核苷酸由A突变为C
图2c 宫颈癌组织中HPV16 E5基因第4042 位核苷酸由A突变为G
Fig.2a HPV16 E7 gene mutation in Nt647 result in nucleotide change of A to G
Fig.2b HPV16 E5 gene mutation in Nt3979 result in nucleotide change of A to C
Fig.2c HPV16 E5 gene mutation in Nt4042 result in nucleotide change of A to G