

尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒 6、11 型的检测及 L1 基因的序列分析[△]

张明策 刘跃华* 刘世德 张宝祥** 司静懿 许雪梅 陈莲凤 宋国兴[#]

(中国医学科学院 中国协和医科大学 基础医学研究所生物物理室, 北京 100005)

摘要 目的 检测尖锐湿疣患者组织中人乳头瘤病毒 (HPV) 6 型和 11 型的感染率, 分析 L1 晚期基因序列及其蛋白质的氨基酸序列, 为基因工程疫苗的研究提供依据。方法 采用 PCR 方法测定北京和锦州两地区 34 例尖锐湿疣患者病损组织中 HPV6 型及 11 型的感染率, 并扩增 L1 晚期基因 构建重组测序质粒, 双脱氧法测序观察其变异状况。结果 HPV11 型感染率为 73.5% (25/34) 6 型感染率为 44.1% (15/34), 其中两型混合感染率为 17.6% (6/34)。11 型 L1 基因 7~8 个碱基变异, 推导的蛋白质一级结构中可能有 1~3 个氨基酸变异, 6 型 L1 基因仅有 3 个碱基发生同义突变。结论 检测的 34 例患者中以 HPV11 型感染为主, 兼有 6 型和两型的混合感染。11 型 L1 基因及蛋白有一定变异, 6 型 L1 基因仅发生少数碱基同义突变。

关键词 尖锐湿疣 人乳头瘤病毒 6 型 人乳头瘤病毒 11 型 晚期基因 1

中图分类号 R373

Assay and L1 Gene Sequence Analysis of Human Papillomavirus Type 6 and 11 in Condylomata Acuminata[△]

Zhang Mingce Liu Yuehua* Liu Shide Zhang Baoxiang**
Si Jingyi Xu Xuemei Chen Lianfeng Song Guoxing[#]

(Department of Biophysics, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

Objective To determinate the prevalence of HPV type 6, 11 in condylomata acuminata, and analyze the sequence of L1 gene and its deduced L1 protein. **Methods** PCR was used to amplify DNA sequences between E6 and E7 of HPV type 6 and 11. The PCR products were identified by the fragment length cleaved with restriction enzyme RsaI. L1 genes were amplified with high fidelity Taq, and cloned DNA sequences were detected by the dideoxynucleotide method. **Results** In 34 examples of condylomata acuminata, HPV11 was found in 25 examples (73.5%), HPV6 in 15 (44.1%), including HPV6 + HPV11 in 6 (17.6%). In comparison with the prototypes there were 7~8 point mutations in HPV11 L1 gene and 3 in HPV6 L1 gene. L1 encoded protein changes showed up only in 1~3 amino acids in the former cases. **Conclusion** Most of patients tested with condylomata acuminata are mainly infected by HPV11, the rest of them by HPV6 or by co-infection of two mixed types. Sequence analysis of L1 genes indicated that mutations were found in both HPV6 and 11, whereas deduced amino acid mutations in L1 protein were limited in HPV11 only.

Key words condylomata acuminata; HPV type 6; HPV type 11; L1 gene

Acta Acad Med Sin, 2000, 22(5): 463~466

人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 为高度异质性小 DNA 病毒群体, 型别众多, 主要感染皮肤及粘膜上皮组织。低危型 HPV 如 6、11 型, 主要引起生殖器疣和良性宫颈病变, 高危型 HPV 如 16、

18、58 型, 与宫颈癌及阴道、外阴、阴茎、肛周癌和癌前病变密切相关^[1]。HPV 分布广泛, 但在不同地区各型相对感染率有明显差别。已知 HPV6 型是欧美地区尖锐湿疣的主要致病因子, 感染率在 70% 以上,

[△]国家自然科学基金资助项目 (39770687) Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (39770687); * Department of Dermatology, PUMC Hospital, Beijing, 100730; ** Department of Dermatology, the second affiliated hospital, Jinzhou Medical College, Jinzhou, 121001; [#] Corresponding author Tel: 010-65296442, Fax: 010-65256456, E-mail: songgx@cdm.imicams.ac.cn

其次是 11 型^[2]。我国有关致尖锐湿疣的 HPV 主要型别的分子流行病学资料尚不足。本研究对引起尖锐湿疣的 HPV 主要型别做了初步调查,同时克隆分析了晚期基因 L1 的序列,为 HPV 感染性疾病的防治研究提供一定依据。

材料和方法

研究对象 北京协和医院皮肤科或锦州医学院附属第二医院皮肤科临床诊断为尖锐湿疣的 34 例患者,男性 19 例,女性 15 例,年龄为 20~43 岁,病程 4 天~1 年,切取病变组织,提取 DNA,进行 PCR 扩增。

主要材料 质粒 pBluescript SK+: 本室保存,普通 Taq 酶及 PCR 试剂为 Promega 公司产品,Expand™ Long Template PCR System 为 Rocher 公司产品,Taq plus II 为 Sangon 公司产品,限制性内切酶 Rsa I、BamH I、BstN I、Pst I、Taq I 为本所产品。

PCR 测定 HPV6/11 型 选取 HPV 基因组中早期基因 E6、E7 之间的一段保守序列,设计 HPV6 型及 11 型特异性引物(图 1)P1 5'-TGCTAATTC-GGTGCTACCTG-3',P2 5'-GAGCTGTCTACTAAT-TGCTC-3',上海生工公司合成。50 μl PCR 反应体系中含 2U DNA 聚合酶,1μg 模板,各 25 pmol P1 和 P2。PCR 循环参数为 94℃ 变性 1 min,54℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,循环次数为 30 次,末次循环结束后 72℃ 延伸 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物及其 Rsa I 酶切结果。

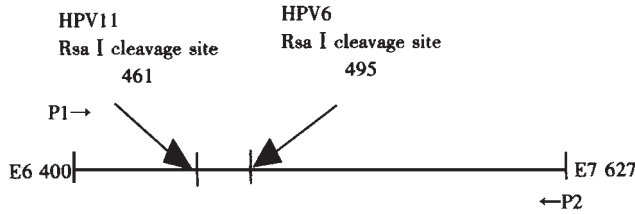


图 1 HPV6、11PCR 片段位置及 RsaI 酶切位点
Fig 1 Location of HPV6 ,11 PCR fragment and the RsaI cleavage site

L1 晚期基因 PCR 扩增、克隆和测序 PCR 特异扩增 HPV6/11 型全长 L1 基因。引物设计如下:11 型上游引物 5'-CCGGAATTCCTCCTGCTTTACCTA-CAGGC-3',下游引物 5'-CGGGGCCCTTACTTTT-TGGTTTTGGTACG-3' 6 型上游引物 5'-CGGGA-TCCCTCCTGCTTTACCTACAGGC-3',下游引物:5'-CCCAAGCTTTTACCATTTAGTTTTGGCGCGC-3',四条引物分别携带 EcoRI、ApaI、BamHI、HindIII 酶切位点。PCR 反应体系同前,循环参数为 94℃ 变

性 1 min,58℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,循环次数为 30 次,末次循环结束后 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物经过 BamH I、BstN I、Pst I、Taq I 酶切鉴定正确,再插入质粒 pBluescript SK+ 相应多克隆插入位点,应用 α 互补法筛选阳性克隆。双脱氧终止法测定 L1 序列(赛百盛公司完成)。

结 果

尖锐湿疣中 HPV6/11 型别的测定结果 从 34 例患者病变组织中提取的 DNA 经 PCR 扩增后均得到位于早期基因 E6、E7 之间的 228 bp 长度的保守序列(图 2 A),该序列经 Rsa I 酶切后,25 例(73.5%)标本得到 166 bp 和 62 bp 的两个片段,证实为 HPV11 型,15 例(44.1%)标本得到 132 bp 和 96 bp 的两个片段,证实为 HPV6 型,6 例(17.6%)标本得到上述四种不同长度的切割片段证实为 HPV6、11 型混合感染(图 2 B)。

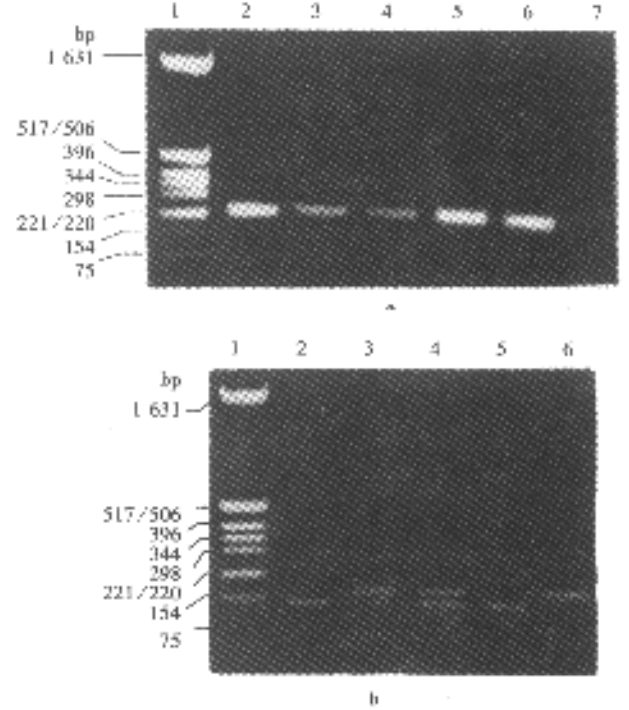


图 2 PCR 扩增及限制性内切酶片段分析鉴定尖锐湿疣中的 HPV11、6 型
Fig 2 The typing of HPV 6 and 11 in condylomata acuminata by PCR amplification and restriction enzyme fragment analysis
a. PCR specific amplifying HPV type11, 6 in condylomata acuminata examples b. PCR product cleaved by RsaI restriction enzyme; Lane 1 . pBR322/HinfI Marker; Lane 2. HPV6 infected example (228 bp amplified by PCR and 132, 96 bp - cleaved by RsaI); Lane 3. HPV11 infected example (228 bp amplified by PCR and 166, 62 bp - cleaved by RsaI); Lane 4. HPV6, 11 co - infected example (228 bp amplified by PCR and 166, 132, 96, 62 bp - cleaved by RsaI); Lane 5. HPV6 control; Lane 6. HPV11 control; Lane 7. HPV16 control(left picture)

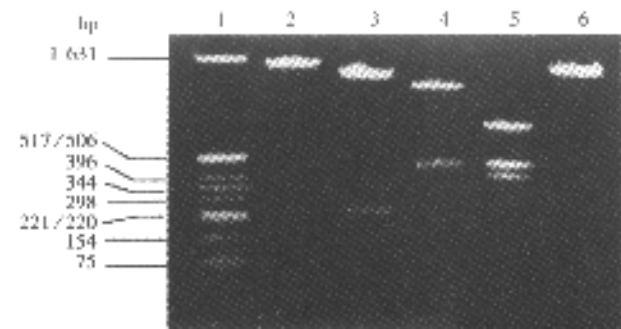


图 3 限制性内切酶分析 HPV11 型 L1 基因 PCR 产物

Fig 3 Restriction enzyme analysis of PCR product of HPV type 11 L1 gene

Lane 1. pBR322/Hinf I Marker; Lane 2. PCR prod - uct - 1506 bp; Lane 3. BamH I cleavage - 1302 bp, 204 bp; Lane4. Bst NI cleavage - 1100 bp 406 bp; Lane 5. Pst I cleavage - 704 bp, 435 bp, 367 bp; Lane6. Taq cleav. age - 1410 bp, 96 bp.

L1 基因测序分析结果 L1PCR 扩增产物及其 BamHⅠ、BstNⅠ、PstⅠ、Taq 酶切结果如图 3、4，与原型（prototype）HPV11、6 型 L1 基因序列限制性内切酶酶切位点分析结果一致。随机测定两个 11 型标本（J6、X2）和一个 6 型标本（J4）L1 基因序列，并推导 L1 蛋白氨基酸序列，并与原型比较，可见 11 型 L1 碱基变异较多，并有错义突变而导致相应 1 个和 3 个氨基酸的改变，6 型碱基的变异少且均为同义突变（附表）。

附表 HPV11、6 型 L1 碱基及氨基酸变异

Table Mutations of bases and amino acids in HPV 11, 6L1 gene and L1 protein		
Examples	Mutation of bases	Mutation of amino acids
HPV 11 positive		
J6	5875T→C	
	6028C→T	
	6607C→T	
	6860G→A	364E→K
	7057T→C	
	7127A→T	453S→Y
	7128G→A	
	7269A→G	500K→R
	6028C→T	
X2	6124A→G	
	6172T→G	
	6195T→G	142V→G
	6607C→T	
	7096T→C	
HPV 6 positive	7228T→C	
J4	6599A→T	
	7082A→G	
	7100G→A	

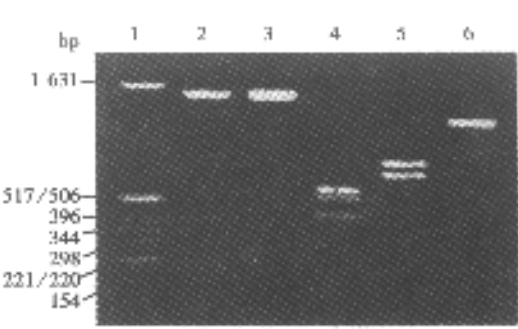


图 4 限制性内切酶分析 HPV6 型 L1 基因 PCR 产物

Fig 4 Restriction enzyme analysis of PCR product of HPV type 6L1 gene

Lane 1. pBR322/Hinf I Marker; Lane2. PCR product - 1503 bp; Lane 3 . BamH I cleavage (no cleavage site); Lane 4. Bst N I cleavage - 567 bp, 533 bp 403 bp; Lane 5. Pst I cleavage - 812 bp, 691 bp; Lane 6 Taq cleavage - 1240 bp, 263 bp

讨 论

本研究中 34 例尖锐湿疣 HPV 主要型别的测定结果说明，HPV6 型与 11 型同样是被检尖锐湿疣标本的主要致病因子；就 HPV6 型和 11 型而言，被检尖锐湿疣标本以 11 型感染为主，感染率为 73.5%，6 型感染率为 44.1%，此与欧美地区以 HPV6 型特别是 6a 型感染为主结果不同，这反映出尽管两型病毒均为主要致病因子，但它们在感染频率和分布上可能存在着一定的地区差异。L1 基因编码的 L1 蛋白是乳头瘤病毒衣壳的主要蛋白，多种乳头瘤病毒重组 L1 蛋白能够自发折叠为病毒样颗粒（VLP），免疫机体后可刺激 B 淋巴细胞产生中和抗体，从而阻断病毒感染。因而 L1 基因和 L1 蛋白成为基因工程疫苗的重要靶向基因与蛋白。本研究中基因测序发现 HPV11 L1 变异较多，并导致 L1 蛋白变异，这在 HPV 型内变异、L1 蛋白免疫原性变化、以及基因工程中外源基因表达等方面的意义需要深入研究。

针对 HPV6、11 型及其它型别感染的基因工程疫苗的研究已在世界各地开展，个别型别的疫苗已经进入临床试验阶段 [3, 4]。我国有关防治 HPV 感染的基因工程疫苗的研究正在起步，而相关的流行病学资料是疫苗研究的前提。本研究结果为我国基因工程疫苗研制提供了一定的依据。

参 考 文 献

1 Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomavirus: general features. Clin Dermatol 1997,15: 181-198

2 Labropoulou V, Diakomanolis E, Dailianas S, et al. Type-specific prevalence of genital human papillomaviruses in be-

nign, premalignant, and malignant biopsies in patients from Greece. *Sex Trans Dis* ,1997 24: 469-474

3 Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, *et al* . Immune responses against human papillomavirus (HPV) type16 virus-like Particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV – 16. *J Gen Virol* ,1999 80: 409-417

4 Thompson HSG, Davies ML, Holding FP, *et al* . Phase I safety and antigenicity of TA – GW: a recombinant HPV6 L2E7 vaccine for the treatment of genital warts. *Vaccine* , 1999 ,17: 40-49

(2000-03-10 收稿)

生物医学期刊中的重复发表问题

“国际医学期刊编辑委员会”制定的“生物医学期刊投稿的统一要求”(第5版)对重复发表的规定如下：

重复发表指与已发表文章实质上内容相同的文章发表。

除非明确声明该文章由作者和编辑选择，属于再次发表；否则源期刊的读者应该相信他们所读的文章是首次发表的原作品。此观点的基础是国际版权法、伦理道德和资源的有效利用原则。

多数期刊不愿意接收文章所涉及的大部分内容已在其他已经发表的文章中报道过，或包含在已投给其他刊物或已被某刊物接受并正在印刷中的印刷版或电子版文章中。该政策不包括已被其他期刊退稿的稿件或仅发表过初步研究结果（摘要或专业学术会议墙报）的完整报告。学术会议报告论文，未以全文发表或未以会议论文集或类似出版物的形式安排发表，仍可考虑发表。有关学术会议的新闻报道通常并不违反这一规定，但这类新闻报道不应通过附加更多的资料或图表而使内容描述过于详细。

作者在投稿时，应该向编辑充分说明所有的、可能被误认为是相同或极其相似研究工作的重复发表的投稿和先前报告。如果研究工作的主题涉及到以前曾经发表过的报告，作者也应向编辑说明，并应在稿件中作为参考文献引用。这些材料的复印件应附在稿件上一并寄给编辑部，以便编辑作出正确决断。

如果重复发表在文章发表前被发现，编辑会采取相应的措施，至少会立即退稿。如果因编辑不明真相而使文章得以发表，则无论作者如何解释或同意与否，该文为重复发表的声明将刊登在期刊上。

将已经被接受但尚未刊出的论文中的科学信息透露给公共媒介，也会违反许多期刊的编辑政策。在个别情况下，由编辑安排，可以对某些资料加以初步透露，如有关公众健康的紧急事件。

Ann Intern Med, 1997, 126(1): 36 – 47