

人乳头状瘤病毒 16 型感染及其 E6/E7 基因变异与宫颈病变的相关性

杨英捷 赵 健 廖秦平

摘 要:目的:探讨人乳头状瘤病毒(HPV)16 型感染及其 E6/E7 基因变异与宫颈病变的相关性。方法 采用导流杂交技术,对 1715 名门诊就诊妇女进行 HPV 感染分型检测,宫颈病变经病理确诊,并对 80 例 HPV16 阳性宫颈病变的 DNA 标本进行 E6/E7 基因测序,分析 HPV16 感染及其 E6/E7 基因变异与宫颈病变的关系。结果 21 种 HPV 亚型均被检出,HPV16 在门诊妇女中的检出率最高为 15.7%,其检出率与宫颈病变程度相关($P < 0.05$)。HPV16 E6/E7 基因 72 例测序成功,E6、E7 和 E6/E7 DNA 序列变异发生率分别为 70.8% (51/72)、65.3% (47/72)和 88.9% (64/72)。氨基酸序列 E6 - D32E(T96G)和 E7 - N29S(A86G)位点的突变率最高,并且这两位点均同时伴随存在,两者的检出率和 E6/E7 同变株 D32E/N29S 的检出率都为 38.9% (28/72),与宫颈病变程度相关($P < 0.05$)。结论 HPV16 是北京地区来源的门诊就诊妇女最常见感染亚型,也是宫颈病变最主要的致病型;E6/E7 基因变异是常见现象,变异株 D32E/N29S 可能是高度鳞状上皮内瘤变的高危因素。

关键词:人乳头状瘤病毒;基因亚型;E6;E7;变异;宫颈病变

中图分类号: **文献标识码:**A

流行病学和基础研究已证实人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌的主要病因^[1],HPV16 是世界范围内 CIN 和宫颈癌中最常见的亚型^[2],存在众多核酸系列变异,且其变异分布有明显的地域差别,并与宫颈病变程度相关^[3]。我们用核酸分子快速导流杂交基因分型技术(简称 HybriMax)对北京地区来源的门诊妇女进行女性下生殖道 HPV 感染的分型检测,并分析 HPV16 阳性宫颈病变患者的 E6/E7 基因序列,探讨 HPV16 型感染及其 E6/E7 基因变异与宫颈病变的相关性。

1. 资料和方法

1.1 临床资料 2005 年 1 月至 2005 年 10 月北京大学第一医院妇产科门诊,自愿接受下生殖道 HPV 感染分型筛查的 1715 名妇女,年龄 19~77 岁,

平均 38.5 ± 10.3 岁。宫颈病变以病理诊断为金标准,CIN 229 例(其中 CIN I 96 例、CIN II 80 例和 CIN III 53 例),同期 234 例宫颈炎症作对照。选取 HPV16 阳性的 DNA 标本各 20 例(合计 80 例)作 E6/E7 基因序列分析。所有标本采集和诊治过程均经就诊者本人同意。

1.2 主要试剂 HPV DNA 抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司;HPV-21 分型检测试剂盒购自北京仕基辰源公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天为时代公司;pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 研究方法

HPV 分型检测:采用 HybriMax 技术检测 21 种 HPV 亚型,实验操作按试剂盒说明进行,包括样本 HPV DNA 提取、PCR 扩增、核酸分子快速导流杂交和结果判读。21 种 HPV 分为高危型和低危型两

类^[4],高危型(high-risk types, HR-HPV)15种,包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66 和 68,低危型(low-risk types, LR-HPV)6种 HPV6、11、41、42、44 和 CP8304,有两型或两型以上者为多型感染(不论是高危型或低危型)。选取 HPV16 阳性宫颈病变的 DNA 做 E6/E7 PCR。

HPV16 E6/E7 PCR 扩增: HPV16 E6/E7 引物用 OLIGO 5.0 引物分析软件(National Biosciences, USA)辅助设计,由上海生工生物工程公司合成, PAGE 纯化。引物序列如下:上游引物, 5'-AAGGGCGTAACCGAAAT3';下游引物, 5'-TCCATTACATCCCGTACCCTC3',包含 E6/E7 基因全长序列 43~910bp。PCR 反应体系:10×扩增缓冲液 2.5?l, 2.5mM dNTP 混合物 2?l,上游引物 0.25?l,下游引物 0.25?l(引物稀释到 100?mol/L),模板 DNA 5?l(模板 DNA 按 1:20 稀释),Taq-DNA 聚合酶 1?l,补双蒸水至终体积 25?l。PCR 反应条件:94℃预变性 5 分钟,循环条件,94℃变性 20 秒,55℃退火 30 秒,72℃延伸 30 秒,共 35 个循环,75℃后延伸 5 分钟。

HPV16 E6/E7 克隆和测序:取 5?l PCR 样品, 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定回收,克隆入 pMD18-T 载体。实验操作按试剂盒说明进行,反应体系为 pMD18-T 载体 1?l,PCR 产物 3?l,双蒸水 1?l, Ligation Mix 5?l。全部连接产物(10?l)加到 100?l JM109 感受态细胞中,在含有 Amp⁺的 LB 固体培养基上培养 37℃过夜,形成单菌落。挑选分隔良好的菌落用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小,阳性质粒送交北京奥科生物技术有限责任公司进行测序,双向测通,测序引物 M13F(-47)和 M13R(-48)。DNA 分析软件(HITACHI Software Engineering 公司)拼接、比对数据分析。

1.4 统计方法 用 SPSS10.0 软件,列联表资料分析,统计学显著性为 $P < 0.05$ (双向)。

2. 结果

2.1 HPV16 在门诊人群和宫颈病变患者中分布 1715 名门诊妇女中 21 种 HPV 亚型均被检出, HPV 阳性率 57.1% (978/1715)。检出率在前 5 位亚型为 HPV16 (15.7%、270/1715, 下略)、58 (10.3%)、52 (8.9%)、33 (5.5%) 和 6 型 (5.5%)。其余亚型

检出率在 4.6%~0.4% 间,从高到低依次为 CP8304、53、51、11、31、18、68、59、39、66、56、44、45、43、42 和 35 型。HPV16 在宫颈炎中检出 20.1% (47/234)、CIN I 为 19.8% (19/96)、CIN II 为 60.0% (48/80) 和 CIN III 75.5% (40/53)。 $\chi^2 = 85.748$, $P = 0.000$, HPV16 感染在不同程度宫颈病变的检出差异有统计学意义,与病变程度相关。

2.2 HPV16 E6/E7 基因序列分析

以 GenBank K02718/HPV16R 基因序列为原型参照, HPV16 E6/E7 基因测序成功 72 例(宫颈炎 17、CIN I 18、CIN II 19 和 CIN III 18 例)。E6 DNA 序列 70.8% (51/72) 含有 1 至 3 个碱基替换,有 16 个位点突变, G12A、G94A 和 T159A 3 种点突变未导致氨基酸序列改变,其余 13 种点突变导致 9 种形式氨基酸变异 (62.5%)。1、D32E (DNA 序列 T96G、T18A + T96G, T18A 为同义突变下同) 30.6%; 2、D32E + C87R (A49C + T96G + T259A, A95G + T96G + T259A, T96G + T259A + G443A) 5.6%; 3、D32E + P119T (T96G + C355A) 2.8%; 4、I34R (T101G) 4.2%; 5、V35M + D51N (G112A + G151A) 2.8%; 6、C87R (T259A) 4.2%; 7、C104R (T310C) 2.8%; 8、H124R (A374G, A301T + A374G) 为 5.6%; 9、N134D (A401G) 4.2%。氨基酸变异以 D32E 位点最多 38.9% (28/72), 其次是 C87R 9.7% (7/72), 其余位点检出较少在 2.8%~5.6% 之间。

E7 DNA 序列 65.3% (47/72) 检测到 1 至 3 个碱基替换,有 16 种点突变,导致 10 个氨基酸位点改变,氨基酸变异率为 56.9%,形成 8 种形式氨基酸变异。1、N29S (A86G + T285C, A86G + T285C + T228C, A86G + T285C + T282C) 31.9%; 2、N29S + M12K (G35A + A86G) 2.8%; 3、N29S + D30G (A86G + A89G) 4.2%; 4、Q44L + C61R (A131T + T183C) 2.8%; 5、N53D + L67S (A157G + T200C) 4.2%; 6、F57S (T170C) 2.8%; 7、T72S (A214T) 4.2%; 8、H73Y (C217T) 4.2%。氨基酸 N29S 位点变异率最高为 38.9%,其余位点变异检出不超过 4.2%。

E6/E7 基因联合分析, DNA 序列 88.9% (64/72) 发生变异,氨基酸序列 31.9% (23/72) 为 E6 或 E7 变异, 43.1% (31/72) 是 E6/E7 同时变异。在同变异中有 5 种形式, 1、D32E/N29S 为 26.4%, 2、

D32E + P119T/N29S + M12K 2.8%, 3、D32E/N29S + D30G 4.2%, 4、D32E + C87G/N29S 5.6%, 5、C87R/H73Y 4.2%。E6 - D32E 与 E7 - N29S 位点变异均同时伴随存在,因而将含有 D32E 和 N29S 者合并为一种。按 Bethesda 临床处理策略分为低度鳞状上皮内瘤变(LSIL = CIN I 18 例 + 宫颈炎症、HPV16 阳性 17 例)组,高度鳞状上皮内瘤变(HSIL

= CIN II 19 例和 CIN III 18 例)组。E6、E7 和 E6/E7 的氨基酸原型及变异在两组宫颈病变中分布详见表 1。E6 - D32E、E7 - N29S 和 D32E/N29S 在 HSIL 为 51.4% (19/72) 高于 LSIL 中 25.7% (9/72), $\chi^2 = 4.974$, $P = 0.026$, 差异有统计学意义。而 E6、E7 和 E6/E7 原型及其他变异位点在宫颈病变中的分布经 χ^2 检验,均 $P > 0.05$, 差异无统计学意义。

表 1. HPV16E6 和 E7 氨基酸序列原型和变异位点在宫颈病变中的分布*

氨基酸序列	LSIL(35) n (%)	HSIL(37) n (%)	合计(72) n (%)	P 值
E6-PT	15(42.9)	12(32.4)	27(37.5)	0.361
E6-D32E	9(25.7)	19(51.4)	28(38.9)	0.026 [#]
E6-orther	11(31.4)	6 (16.2)	17(23.6)	0.129
E7-PT	18(51.4)	13(35.1)	31(43.1)	0.163
E7-N29S	9(25.7)	19(51.4)	28(38.9)	0.026 [#]
E7-orther	8(22.9)	5 (13.5)	13(18.1)	0.303
E6/E7-PT	8(22.9)	9(24.3)	17(23.6)	0.884
D32E/N29S	9(25.7)	19(51.4)	28(38.9)	0.026 [#]
C87R/H73Y	1(2.9)	2 (5.4)	3(4.2)	0.589

* PT, 为序列原型(prototype); -orther, 指 E6、E7 除原型和 D32E、N29S 外的其他位点变异。# $P < 0.05$

3. 讨论

3.1 门诊妇女 HPV 亚型的分布

HPV 有近 100 种亚型,约 40 种与肛门生殖道感染有关,根据在宫颈癌发生中的危险性不同,分为 HR - HPV 和 LR - HPV 两大类^[1],而且不同 HPV 亚型的感染其致病性和后果也有差异^[2]。因而,不同地区和人群 HPV 亚型感染的分布,是 CIN 和宫颈癌防治策略的基础。通过对北京地区来源的门诊妇女下生殖道 HPV 感染分型检测,常见亚型分布为 HPV16、58、52、33 和 HPV6 型。HPV16 是最常见的亚型(15.7%),其检出率随着宫颈病变程度而明显增加($P = 0.000$),CIN III 达 75.5%。香港^[5]对广东籍妇女筛查,HPV 亚型分布为 16、58、11、CP8304、33、18、6 和 53 型,Clifford 等^[2]荟萃分析,宫颈癌患者中的常见亚型是 HPV16、18、45、31、33、58 和 52 型。本组 HPV16 感染符合国内外大多数地区的分布趋势,但其他亚型有一定的地区或人群特点,值得在 CIN 和宫颈癌的防治中考虑。

3.2 HPV16 E6/E7 基因变异与宫颈病变的关系

HPV 致癌能力主要是与病毒的型别有关,当亚型中 98% 以上的核苷酸序列相同,2% 以下碱基不同时,就属于型内变异^[6]。HPV16 E6/E7 基因是主要的两个癌基因,其变异分布在不同国家或地区有差异,且变异体的致癌性也不完全相同^[3]。本文发现,E6 氨基酸序列变异为 62.5%,测出 9 个氨基酸改变的位点,D32E(T96G)变异最多(38.9%),未检出西方国家常见的 L83V 和亚洲国家常见的 D25E 变异。L83V 变异在瑞士是高危因素,与病变程度相关,但在意大利则相反是低危因素^[3];D25E 变异在日本和泰国是高危因素,宫颈癌中检出率约 70%^[7,8]。显示出 E6 变异具有一定的地区或人群的特点。一般认为 HPV16 E7 基因相对保守,较少变异^[9]。但我们检测 E7 氨基酸序列变异超过半数(56.9%),多数突变位点检出在 2.8% ~ 4.2% 之间,仅 N29S(A86G)变异检出最高(38.9%)。N29S 变异在亚洲国家检出率较高,其在泰国认为是宫颈癌的高危因素^[7],韩国^[10] CIN III 妇女中检出 50%,宫颈癌达 70%,我们的结果也有亚洲国家的分布特

点。

E6/E7 基因序列联合分析,变异检出率明显增加,75%氨基酸序列发生变异,其中 E6/E7 同变异有 43.1%。检出 5 种不同形式的 E6/E7 同变异,C87R/H73Y 较少占 4.2%,余下 4 种认为是 D32E/N29S 不同的变化。研究发现只要有 E6 - D32E 位点变异,就同时有 E7 - N29S 变异点伴随存在,因而 D32E/N29S 同变异与 E6 - D32E 和 E7 - N29S 的检出率相同,与病变程度相关($P < 0.05$)。泰国^[7]研究发现 90% 的 E6 - D25E 变异与 E7 - N29S 变异同时存在,是妇女宫颈癌各种 HPV16 变异中最常见的类型。而我们未检出 E6 - D25E 和 E7 - N29S 的同变异体,检出的 D32E/N29S 同变异也未见文献报道,有关 D32E/N29S 自然变异株的生物学活性还在研究中。

参考文献

- [1] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2002,2(5):342 - 350.
- [2] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta - analysis. *Br J Cancer*, 2003,88(1):63 - 73.
- [3] Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, et al. 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.
- [4] Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. [J]. *N Engl J Med*, 2003,348(6):518 - 527.
- [5] Chan PK, Chang AR, Cheung JL, et al. Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high - and low - oncogenic risk types. *J Infect Dis*, 2002,185(1):28 - 35.
- [6] Giannoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol*, 2001,193(3):295 - 302.
- [7] Vaeteewoottacharn K, Jearanaikoon P, Ponglikitmongkol M. Co - mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas. *Anticancer Res*, 2003,23(2C):1927 - 1931.
- [8] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett*, 2000,156(2):159 - 165.
- [9] Ginnoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol*, 2001,193:295 - 302.
- [10] 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. *Gynecol Oncol*, 1997,66(2):275 - 281.

作者：[杨英捷](#)，[赵健](#)，[廖秦平](#)
作者单位：

引用本文格式：[杨英捷](#) [赵健](#) [廖秦平](#) [人乳头状瘤病毒16型感染及其E6/E7基因变异与宫颈病变的相关性](#) [会议论文]

2006