

文章编号: 1001-6325(2014)01-0011-05

研究论文

新疆汉族、维吾尔族 *HPV16E6* 基因变异与子宫颈癌及宫颈病变的关系

古丽娜尔·阿不拉¹, 朱开春¹, 玛依努尔·尼牙孜^{1*}, 马正海²

(1. 新疆维吾尔自治区人民医院 妇科, 新疆 乌鲁木齐 830001; 2. 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:目的 探讨新疆地区汉族、维吾尔族宫颈癌及宫颈病变中 HPV16 型 *E6* 基因变异分布及频率, 比较两个民族之间的差异。方法 对 140 例 HPV16 阳性标本, 设计 *E6* 基因特异性引物, 通过 PCR 扩增 *HPV16E6* 全长基因, PCR 产物直接测序, 进行序列分析并与德国标准株对比, 筛选突变位点。结果 123 例汉族、维吾尔族妇女宫颈癌及宫颈病变标本中均存在 *HPV16E6* 变异株, 其中突变率分别为: 47.37% (27/57) 和 50% (33/66), *E6* 突变位点主要是 L83V、D25E、D64E、I73V、H78Y、D113E, 其中 L83V 变异株在两个民族突变中占的比例均最高, 汉族 L83V 突变频率为 29.82% (17/57) 显著低于维吾尔族的 40.90% (27/66) ($P < 0.05$)。而汉族 D25E 突变频率为 19.30% (11/57) 显著高于维吾尔族的 7.58% (5/66) ($P < 0.05$), D64E 变异株在维族突变株中占的比例为 6.1%, 而汉族标本中未检出。结论 两个民族 HPV16 *E6* 基因变异发生的位置和变异发生的频率存在差异, 维吾尔族人群中 *HPV16E6* 基因 D64E 变异株可能与该地区维吾尔族宫颈癌高发存在一定的关系。

关键词: 汉族; 维吾尔族; 宫颈癌及宫颈病变; 人乳头瘤病毒; *E6* 基因

中图分类号: R 737.33 文献标志码: A

The relationship of *HPV16E6* mutation to cervical lesions and cervical carcinoma in Han and Uygur in Xinjiang

GULINAER · Abula¹, ZHU Kai-chun¹, MAYINUER · Niyazi^{1*}, MA Zheng-hai²

(1. Dept. of Gynaecology, the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001;

2. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Objective To investigate distribution of *HPV16E6* mutation and whether there are differences in Han, Uygur cervical cancer(CC) and precancerous lesions, the relationship between the mutation and high incidence of CC in Han and Uygur women. **Methods** 140 precancerous lesions samples and cervical carcinoma patients with HPV16 genotypes was chosen and *HPV16E6* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR fragments were sequenced and analyzed. **Results** There was mutations in 123 cases, the distribution in Han and Uygur were 47.37% (27/57) and 50% (33/66) respectively. They were positive for mutations D25E, D64E, I73V, H78Y, D113E, L83V, the hot mutation was L83V with rates was 29.82% (17/57) in Han and 40.90% (27/66) in Uygur, Rates was D25E 19.30% (11/57) in Han and 7.58% (5/66) in Uygur. Rates of D64E 6.1% was only found in Uygur. **Conclusions** There was difference between *HPV16E6* gene mutation sites and rates in two nations. Our research suggested that the distribution of D64E in Uygur might be associated with higher incidence of

收稿日期: 2013-03-21 修回日期: 2013-05-07

基金项目: 国家自然科学基金 (81160317); 自治区人民医院内科研基金 (20080110)

* 通信作者 (corresponding author): mynr68@yahoo.com.cn

CC in this population.

Key words: Han; Uighur; cervical cancer and lesions; human papillomavirus; *E6* gene

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,大量流行病学资料显示,在99%以上的宫颈癌组织中存在人乳头瘤病毒(human Papillomavirus, HPV) DNA, HPV感染是宫颈癌发生的主要并且为始动因素^[1]。HPV存在100多种亚型,其中HPV16与宫颈癌发病密切相关^[2]。HPV16早期基因区(early region, E区)、由6个开放读码框架(open reading frame, ORF)组成,其中*E6*是HPV16主要致癌基因之一。*E6*蛋白与抑癌基因P53结合导致P53蛋白降解以及生物学功能丧失,从而引起细胞周期紊乱, DNA损伤积累,最终引起细胞癌变。

将世界范围不同种族、不同人群中分离的HPV16区分为5种主要的种系发生群^[3]。有研究表明^[4], *HPV16E6*基因及其编码蛋白的变异与宫颈癌发生有关,不同地区宫颈癌组织中*E6*变异株的分布不一致。前期研究指出,新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中*HPV16E6*基因存在突变^[5],本研究在此基础上,进一步检测新疆汉族、维吾尔族宫颈癌及宫颈病变细胞中*HPV16E6*变异株的分布,探讨随病变的加重*HPV16E6*变异的变化规律及其在两个民族间的差异。

1 材料与方法

1.1 病例收集

收集从2011年9月至2012年3月在新疆维吾尔自治区人民医院住院或门诊就诊的汉族、维吾尔族妇女宫颈癌及宫颈病变标本244例进行凯普基因芯片检测,筛选出HPV16阳性病例140例(汉族65例,维吾尔族75例)为研究对象。患者年龄22~78岁,中位年龄45岁。所有标本收集均经患者本人知情同意。

1.2 主要试剂和引物的设计和合成

TaqDNA聚合酶、dNTP和DNA marker DL2000(上海生工生物工程技术有限公司)根据HPV16DNA全长序列,利用primer express软件PE公司设计跨*HPV16E6*整个阅读框的一对*HPV16E6* P1:5'-CGT AACCGAAATCGGTTGAAC-3', P2:5'-GCTCATAACA GTAGAGATC-3'引物,上述引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 *HPV16E6* 基因 PCR 扩增和序列测定及分析

通过凯普基因芯片技术进行HPV基因分型,筛选HPV16阳性标本,用HPV16阳性细胞DNA为模板,扩增*HPV16E6*基因,PCR反应条件如下:95℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35个循环, 72℃ 7 min。

1.4 *HPV16 E6* 基因测序及分析

PCR产物纯化后,利用*HPV16 E6* P1/P2引物,正反向对PCR产物直接测序。纯化和测序服务由英潍捷基生物工程有限公司提供。测序结果用DNAMAN(6.0.3.48)软件进行比对分析。

1.5 统计学分析

采用SPSS13.0统计学软件,基因突变率比较均采用 χ^2 检验。

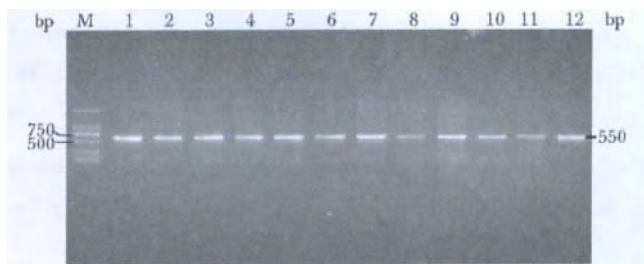
2 结果

2.1 *HPV16* 阳性标本中 *HPV16 E6* 基因扩增结果

以HPV16阳性细胞DNA为模板,利用跨*HPV16E6*整个阅读框引物扩增*E6*基因,阳性结果在550 bp处呈现一亮带。140例HPV16阳性标本中有129例扩增出*E6*基因,11例未扩增出(图1)。

2.2 *HPV16E6* 基因测序结果及分析

*HPV16E6*基因PCR产物经过纯化后直接进行双向测序,得到清晰的测序结果123份(汉族57份、维吾尔族66份),另外6个样品信号较差,未进行突变分析。将所测序列与HPV16标准株*E6*基因序列进行比较,汉族、维吾尔族宫颈癌及宫颈病变标本*HPV16E6*突变率分别为:47.37% (27/57)和50% (33/66),两个民族标本中共发现8个基因突变位点:178:T→G (25:D



M. DNA Marker DL2000; 1~12. HPV16 *E6* PCR products

图1 *HPV16E6* PCR电泳结果图

Fig 1 PCR amplification of *HPV16E6* gene

→E)、256:T→C(同义突变)、295:T→G(64:D→E)、320:A→G(73:I→V)、335:C→T(78:H→Y)、350:T→G(83:L→V)、430:A→G(同义突变)、442:A→C(113:E→D)(数字代表碱基在 HPV16 全基因序列中的位置) E6 变异株在新疆汉族、维吾尔族中的分布以亚洲株和欧洲株为主(表 1 图 2)。

2.3 HPV16E6 突变在汉族、维吾尔族各级别宫颈病变之间的分布

发生变异的 27 例汉族宫颈癌及宫颈病变标本中主要突变位点分别为 178:T→G(25:D→E)、320:A→G(73:I→V)、335:C→T(78:H→Y)、350:T→G(83:L→V)、442:A→C(113:E→D) ,在 33 例维吾尔族宫颈癌及宫颈病变标本中 ,主要突变位点分别为 350:T→G(83:L→V)、295:T→G(64:D→E)、178:T→G(25:D→E)、320:A→G(73:I→V)、335:C→T(78:H→Y)、442:A→C(113:E→D) ,其中 L83V 变异株在汉族、维吾尔族突变中占的比例均最高 ,汉族 L83V 突变频率为 29.82%(17/57)显著低

于维吾尔族的 40.90%(27/66)($P < 0.05$) ,而汉族 D25E 突变频率为 19.30%(11/57)显著高于维吾尔族的 7.58%(5/66)($P < 0.05$)。D64E 变异株在维吾尔族中突变频率为 6.1%(4/66) ,而汉族标本中未检出。E6 基因突变率随宫颈病变的加重均具有增加趋势 ,在汉族各级别宫颈病变之间无差异 ,在维吾尔族各级别宫颈病变之间也无差异(表 2)。

3 讨论

宫颈癌是严重威胁妇女生命健康的疾病之一 ,在维吾尔族人群中发病率和死亡率均较高并有年轻化趋势。高危型 HPV 持续性感染与宫颈癌发病密切相关 ,大多数宫颈癌组织中可检测到 HPV16 和 HPV18 ,所以 HPV16 和 HPV18 感染被认为是宫颈癌的主要病因^[6]。大多数研究显示 ,某些特定的 HPV16 变异株的感染增加宫颈病变的风险 ,或其感染与宫颈病变程度有关 ,相同的变异株在不同地区、不同种族的致癌危险性也存在明显的差异^[4]。

表 1 HPV16E6 碱基及氨基酸变异
Table 1 HPV16E6 nucleotide and amino acid mutation of HPV16E6

HPV16E6 ORF nucleotide position (nt)								amino acid changes	linage
178	256	295	320	335	350	430	442		
T	T	T	A	C	T	A	A	-	EP(350T)
-	-	-	-	-	G	-	-	L83V	EV(350G)
G	-	-	G	T	-	-	-	D25E/I73V/H78Y	EV(As)/AF1
-	-	-	G	T	G	-	C	I73V/H78Y/L83V/E113D	AF1/EV(As)
-	-	-	G	G	-	G	-	I73V/H78Y	AF1/EV
G	C	-	-	-	G	-	-	D25E/L83V	EV(As)
-	-	G	-	-	G	-	C	D64E/L83V/E113D	EV(As)/EV

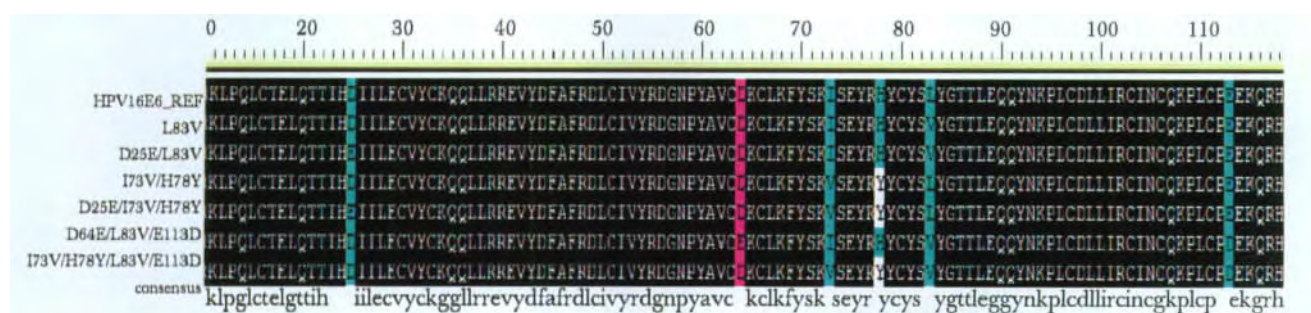


图 2 新疆汉族、维吾尔族妇女宫颈癌及宫颈病变标本 HPV16E6 变异株与参考株 E6 蛋白氨基酸序列比较

Fig 2 The specimen mutant and reference strains of HPV16E6 amino acid sequence of cervical cancer and cervical lesions in Han , Uyghur women

表2 HPV16E6 突变在汉族、维吾尔族各级别宫颈病变之间的分布

Table 2 HPV16E6 mutation distribution of cervical cancer and cervical lesions in Han ,Uyghur

amino acid changes	han		uyghur			
	ch cervicitis	CIN	CC	ch cervicitis	CIN	CC
-	7	12	11	8	13	12
L83V	1	3	6	0	4	11
D25E/I73V/H78Y	1	2	3	1	0	1
I73V/H78Y/L83V/E113D	0	1	1	1	2	3
I73V/H78Y	1	1	2	2	1	0
D25E/L83V	0	2	3	0	1	2
D64E/L83V/E113D	0	0	0	0	2	2

HPV 的基因变异、病毒持续和反复感染及宿主免疫状态等因素与宫颈癌的发生密切相关,其中 HPV 病毒持续和反复感染可由基因的变异所引起,所以干扰致癌基因 *E6* 的型内变异使 P53 蛋白的稳定性增强,具预防宫颈癌的作用^[7]。HPV16 *E6* 基因常发生变异,不同地区流行的变异株也有差异。欧美地区流行的 HPV16E6 变异株主要是 G350 (L83V),而东亚地区主要是 G178 (D25E)^[8]。研究发现,中国广东地区宫颈癌中 HPV16E6 突变株以 D25E 为主,还有 E113D、H78Y、L83V、F69L^[9]。前期研究指出新疆维吾尔族宫颈癌组织中存在 HPV16E6 基因突变,突变株以 L83V 为主,也有 D25E、D64E^[5,10]。本研究中,新疆汉族、维吾尔族宫颈癌及宫颈病变标本中 HPV16E6 变异株均以 L83V 为主,汉族 L83V 突变频率显著低于维吾尔族中的突变频率,还存在 D25E、I73V、D64E、H78Y、E113D 的变异株,汉族 D25E 突变频率显著高于维吾尔族,汉族标本中未发现 D64E 变异株,同时本组汉族、维吾尔族妇女宫颈癌及宫颈病变标本中还存在非洲亚型 H78Y 变异株和亚洲亚型 E113D,这在前期文

献中未报道。在我国新疆地区除了有亚洲型 *E6* 突变外,还有欧洲型和非洲型突变类型,这可能与新疆汉族、维吾尔族种族特异性有关。

目前 HPV16 基因突变与宫颈癌的相关性报道,国外研究结论不一,国内报道较少。有研究报道,HPV16 基因 350 位 T 到 G 的突变是宫颈癌的高危因素^[11]。本研究结果显示,350 nt、178 nt 等位点的 *E6* 基因突变率在两个民族中随宫颈病变的加重均具有增加趋势,但无显著性差异。此结果与一些研究结果不一致^[12]。

本研究结果提示,在新疆汉族、维吾尔族妇女宫颈癌及宫颈病变标本中均存在较多的 HPV16E6 变异株,各变异株在两个民族病样中的分布有差异,维吾尔族标本中 L83V 变异株比汉族多并随病变的加重具增加趋势,汉族标本中检出的 D25E 变异株多于维吾尔族,汉族标本中未发现 D64E 变异株,可能是维吾尔族特异变异株,此结果将为我国不同民族宫颈癌及宫颈病变患者组织中 HPV16E6 基因变异特点积累流行病学资料,对阐明该区宫颈癌高发原因有一定的意义。

参考文献:

- [1] Patricia Dhar J, Lancaster W, Gregoire L, et al. HPV cervical infection and immunodysregulation: synergistic risks for neoplasia-review [J]. Current Women's Health Reviews 2010 6:287-296.
- [2] Whyte J. HPV and cervical cancer: Latest developments [J], Consultant 2012, 52:555-560.
- [3] Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. HPV 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide Perspective [J]. J Virol 1997, 71:2463-2472.
- [4] Zehbe I, Richard Ch, Decarlo CA et al. Human papilloma-virus 16E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis [J]. Virology,

- 2009 ,383:69-77.
- [5] 朱开春, 玛依努尔·尼牙孜, 刘芳, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 型 E6 基因的变异分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13:209-212.
- [6] 曾四元, 梁美蓉, 李隆玉, 等. 血清 SCCA 水平及盆腔淋巴结 HPV16/18 感染状况与宫颈鳞癌患者预后的关系[J]. 基础医学与临床, 2012, 32:1167-1170.
- [7] 李晶华, 王伟娟, 高婉丽, 等. HPV18E6siRNA 对宫颈癌细胞增殖及化疗药物敏感性的影响[J]. 基础医学与临床, 2010, 30:500-504.
- [8] Revilla RL, Pineda MA, Valdez JO, et al. Human papillomavirus type16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosi City, Mexico[J]. Infectious Agents and Cancer, 2009, 4:1-9.
- [9] Cai HB, Chen CC, Ding XH, et al. Human papillomavirus types 16E6 gene variations in Chinese population[J]. EJ-SO, 2010, 36:160-163.
- [10] 马正海, 张富春, 梅新娣, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6 基因的突变分析[J]. 癌症, 2004, 23:10-16.
- [11] Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, et al. Association of HPV16E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population[J]. Int. J. Cancer, 2009, 125:2609-2613.
- [12] 李清阳, 玛依努尔·尼牙孜, 阿不力孜, 等. 新疆南部维吾尔族 HPV16E6、E7 突变与宫颈癌、癌前病变的相关性研究[J]. 新疆医学, 2009, 5:1-4.

新闻点击

早睡 1 小时能使高血压大幅减低

据英国《BBC 新闻》(BBC NEWS)2012-12-06 日报道, 美国哈佛医学院一项研究显示, 比平时提前 1 小时就寝, 有助于防止高血压。研究人员观察血压值接近高血压边缘, 且每晚睡 7 个小时或更少时数的受测者, 当他们每天增加 1 小时的睡眠时间, 仅短短 6 个星期后, 其平均血压值便大幅下降了 8 mmHg ~ 14 mmHg。

据英国《每日邮报》报道, 目前英国民众有高血压的比例为 1/5, 此症状是造成心脏病发作和中风的原因。

尽管英国“国家健康中心”(National Health Service)有一系列不同的降血压药物, 然而, 据估计, 超过 50% 患者的血压“控制不佳”, 这意味着他们的血压仍有 140 mmHg/90 mmHg 以上的危险值。高血压是指收缩压高于 140 mmHg, 或者是舒张压超过 90 mmHg。

过去的研究显示, 缺乏睡眠和紧张的生活, 是增加高血压状况的风险因子。而哈佛医学院的研究首次证明, 仅仅经由睡眠时间增多, 即可控制血压。

哈佛医学院的研究人员招募了 22 位中年男性和女性, 他们都有早期高血压的征兆, 尽管血压值未过高, 但研究前已不断增高并接近高血压的危险值。所有的志愿者都声称, 晚上睡眠时间少于 7 个小时。

其中 13 人被告知延长睡眠时间, 6 个星期内每天提早 1 h 入睡。其余的志愿者则维持平常的睡眠习惯。

他们每天 24 h 都穿着监视仪器检查血压, 也进行了血液和尿液检查。延长睡眠组的参与者都增加至少 35 分钟额外的睡眠时间。

结果显示, 他们的平均血压值大幅下降了 8 mmHg ~ 14 mmHg。这项结果说明了睡眠不足使血压升高的激素增多, 影响了人体调降血压的能力。研究人员在研究报告中还提到, 增加睡眠时间可能很快被指定作为高血压的治疗方法。

上述研究结果发表于《睡眠研究杂志》(Journal of Sleep Research)。

非洲人易患疟疾原因被发现

据英国《BBC 新闻》(BBC NEWS)2012-12-07 报道, 澳洲科学家在疟疾研究上取得一项新发现, 该发现可解释为何疟疾在非洲比其它国家要普遍和致命。

据澳新社消息, 《科学》(Science)杂志发表了麦觉理大学研究人员的一项研究报告。根据这项报告, 研究人员发现, 人体红血细胞的一种名为 Duffy 的分子, 是杀死一种疟疾寄生虫——P 恶性疟原虫(P falciparum)的关键要素。而非洲人体内缺乏这种分子。

麦觉理大学副教授麦克莫兰(Brendan McMorran)说, 人们都知道血小板通过杀死在红细胞的寄生虫而抵御人体感染疟疾, 但却不知道是如何杀死的。他们的研究小组发现, 血小板释放一种名为 PF4 的分子, 该分子杀死疟疾寄生虫, 但是 PF4 需要与红血细胞中名为 Duffy 的另一种分子联手才能让这一情况发生。而研究发现, 98% ~ 100% 的非洲人体内缺乏 Duffy 这种分子。