

# 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV-16 型 L2 基因多态性分析

马正海 梅新娣 张富春

**【摘要】目的** 探讨新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型(human papillomavirus 16, HPV-16) L2 基因的变异,并预测 L2 蛋白的功能变化。**方法** 从 19 份中国新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织标本中提取 DNA,以此 DNA 为模板,PCR 扩增 HPV-16 L2 全长基因,PCR 产物直接测序或克隆后测序,分析新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV-16 L2 基因多态性及 HPV-16 L2 蛋白功能的变化。**结果** PCR 检测结果显示宫颈癌组织中 HPV-16 L2 阳性率为 84.21% (16/19);测序和序列分析表明 L2 基因核苷酸多处发生变异,并引起编码氨基酸的变异;L2 基因在核苷酸水平上形成 7 种突变模式(XJL2-1 ~ XJL2-7),各模式与 HPV-16 原型比较,同源性在 99.37% ~ 99.79% 之间;在氨基酸水平上形成 5 种突变模式,其中 XJL1-1/2/3 突变模式占 66.67% (8/12),是突变的主流模式,各模式与 HPV-16 原型比较,同源性在 98.31% ~ 99.58% 之间;以上突变引起 HPV-16 L2 蛋白疏水性和抗原性的改变,继而改变了 L1 蛋白的结构及功能。**结论** 中国新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV-16 L2 基因发生多位点变异,并形成多种突变模式和突变主流模式;这些突变引起 HPV-16 L2 蛋白疏水性和抗原性的改变,提示 HPV-16 L2 基因突变可能与 HPV-16 的系统发生以及病毒逃避机体免疫识别有关。

**【关键词】** 人乳头瘤病毒 16 型;宫颈癌;L2 基因;序列多态性

**Polymorphism of HPV-16 type L2 genes from cervical carcinoma biopsies in southern Xinjiang Uygur women** MA Zheng-hai, MEI Xin-di, ZHANG Fu-chun. National Key Laboratory Basis of Xinjiang Biological Resources and Genetic Engineering, Xinjiang University, Urumchi 830046, China

**Corresponding author:** ZHANG Fu-chun, Email: zfc@xju.edu.cn

**【Abstract】Objective** To study the mutations of HPV-16 type L2 genes of cervical carcinoma biopsies from Uygur women in southern Xinjiang, and to analyze the changes of L2 protein function. **Methods** The tissue DNA was extracted from cervical carcinoma biopsies. HPV-16 L2 genes were amplified by PCR, HPV-16 type L2 genes were sequenced and analyzed. **Results** The positive rate of HPV-16 L2 was 84.21% (16/19). We sequenced DNA found some mutations in comparison with the previously published sequence of prototype HPV-16 L2. Some of the mutations changed the triplet codes, subsequently led to changes of amino acids. The mutations of all twelve HPV-16 L2 fragments formed seven patterns(XJL2-1 to XJL2-7) at nucleic acid level. Compare to HPV-16 prototype, their homology was 99.37% to 99.79%. The mutations of all twelve HPV-16 L2 fragments formed five patterns at amino acid level, among the mutations XJL1-1/2/3 was by 66.67% (8/12). **Conclusion** HPV-16 type L2 genes from cervical carcinoma biopsies had some mutations in Uygur women from southern Xinjiang, and formed several patterns as well as mainstream pattern. The mutations of L2 proteins changed its hydrophobicity and antigenicity. The research suggested that the mutations of HPV-16 type L2 genes can explain HPV-16 phylogenesis and escaping from immune recognition.

**【Key words】** Human papillomavirus 16; Cervical carcinoma; L2 gene; Sequence polymorphism

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种重要的致癌 DNA 病毒,可引起人生殖道和肛门皮肤、黏膜产生良性和恶性肿瘤,其中与宫颈癌发病

密切相关的有 HPV-16、18 等<sup>[1,2]</sup>。HPV-16 基因组为双链环状 DNA 分子,全长 7905bp,由早期基因区(E 区)、晚期基因区(L 区)和长控制区(long control region, LCR)组成, E 区包含了与转化有关的 E6 和 E7 基因, L 区包括 L1 与 L2 基因,表达产物分别为病毒的主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白,是 HPV 预防性疫苗的主要候选抗原。近年的研究表明, HPV-16 L1 疫苗能够预防 HPV-16 感染引起的宫颈癌,但不能

基金项目:教育部重点项目(地方:02171),新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(200221103)

作者单位:830046 乌鲁木齐,新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程国家重点实验室

通讯作者:张富春, Email: zfc@xju.edu.cn, 电话:0991-8583259

预防 HPV 其他型感染引起的宫颈癌<sup>[3]</sup>,而 L2 含有交叉的保护性抗原表位,其诱导产生的抗体能预防多种 HPV 亚型的感染<sup>[4,6]</sup>,更为重要的是,L2 通过协助病毒进入细胞促进了病毒的感染,L2 诱导产生的抗体能有效地阻断病毒的感染<sup>[6,9]</sup>,因此,HPV L2 相关疫苗能够广谱、高效地预防 HPV 的感染。

HPV-16 存在型内变异并导致 HPV-16 的多态性,HPV-16 变异谱系分布有着明显的地域差别,并依此将 HPV-16 分为欧洲型(E)、亚洲型(As)、亚裔美洲型(AA)、非洲 1 型(Af1)、非洲 2 型(Af2)5 个主要的种系发生群<sup>[10-12]</sup>。病毒基因组中碱基突变可造成病毒生物学特性的改变,并继而影响该病毒的感染和转归<sup>[13-15]</sup>。

新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区,患病率高达 459~590/10 万,已有的调查表明,新疆南部维吾尔族妇女高发宫颈癌与 HPV-16 感染密切相关,其宫颈癌组织中 HPV-16 检出率达 77.6%~82.61%<sup>[16,17]</sup>。我们曾报道了新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV-16 E6 基因<sup>[18]</sup>和 L1 基因<sup>[19]</sup>的变异,由于 HPV-16 与不同遗传背景的宿主相互作用会引起病毒的变异,影响 HPV 感染和转归,了解 HPV-16 多态性将对明确宫颈癌的发生和运用免疫学策略预防 HPV-16 相关疾病提供新的思路。本研究分析了新疆南部维吾尔族聚居区宫颈癌活检组织中 HPV-16 L2 基因的多态性,并对其功能进行预测分析,以探讨该区宫颈癌组织中 HPV-16 L2 基因突变的规律以及突变与宫颈癌发生的关系,并为 HPV-16 预防性疫苗的研制奠定基础。

### 材料和方法

**宫颈癌组织标本:**采取 2002 年 11 月~2003 年 10 月新疆医科大学附属第三医院(新疆肿瘤医院)19 例宫颈癌手术或活检标本(经病理检查确诊为宫颈癌),标本采集量约 0.8g,患者均为新疆南部维吾尔族妇女,年龄 30 岁~66 岁,中位年龄 50 岁,术前未进行放化疗。标本-80℃保存。

**质粒和菌种:**克隆质粒 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司,菌种 *E. coli* DH5α 为本室保存。

**主要试剂:**基因组提取试剂盒、核酸内切酶、DNA marker、Taq 多聚酶、T4 DNA 连接酶及 PCR 片段回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。

**引物设计和合成:**根据 Seedorf 等<sup>[20]</sup>1985 年发表的 HPV-16 型 DNA 全序列,设计了 3 条引物,引物 1 的序列为:5'-TTAATACATACACATGCACGCTTTTA-3'

(4064~4090);引物 2 的序列为:5'-CGTTTACGTCGTTTCGTAACATG-3'(5593~5116)。以上两条引物可以扩增跨 HPV-16 L2 整个阅读框的 L2 基因,引物 3 的序列为:5'-CTTCCATTCCCCAGATGTATC-3'(4605~4626),3 条引物均用于 PCR 产物的测序。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

**宫颈癌组织 DNA 的提取:**按 TaKaRa Minibest animal tissue genomic DNA extraction kit ver.2.0 说明书进行。

**PCR 扩增:**以宫颈癌组织 DNA 为模板,HPV-16 L2 P1 和 P2 为引物扩增 HPV-16 L2 基因片段。扩增参数:95℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 7 min。

**HPV-16 L2 基因序列测定及分析:**用 PCR 片段回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收 PCR 产物,分别用 HPV-16 L2 P1、P2、P3 进行 DNA 测序,用 DNAMAN version 5.2.2 软件对序列进行分析。

**pMD18-T/HPV-16 L2 重组质粒的构建:**将 HPV-16 L2 PCR 回收片段与克隆载体 pMD18-T 用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜,连接产物转化至 *E. coli* DH5α 中,经蓝白斑筛选、增菌培养后提取质粒,酶切鉴定正确的质粒用 pMD18-T 载体特异性引物 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 以及 HPV-16 L2 P3 引物分别测序,并与同一标本 PCR 产物直接测序的结果比较,验证 PCR 回收片段直接测序的可信度。

### 结 果

**1. 宫颈癌组织中 HPV-16 L2 基因的扩增:**19 份标本有 16 份标本为 HPV-16 L2 阳性,图 1 所示为 8 份样品 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果,可见一约为 1562bp 的扩增条带,其大小与预计相符。



图 1 PCR 扩增 HPV-16 L2 基因

Fig 1. Amplification of HPV-16 L2 gene

1: DL2000 marker; 2-9: HPV-16 L2 PCR products

**2. pMD18-T/HPV-16 L2 重组质粒的构建:**将 HPV-16 L2 PCR 回收片段与克隆载体 pMD18-T 连

接,重组质粒用 HindⅢ 和 XbaⅠ 酶切,切出约 1600bp 的 DNA 片段,该重组质粒用 pMD18-T 载体特异性引物 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 以及 HPV-16 L2 P3 引物分别测序,测序结果与该 PCR 回收片段直接测序的结果一致,说明 PCR 回收片段直接测序的结果是可信的(图 2)。

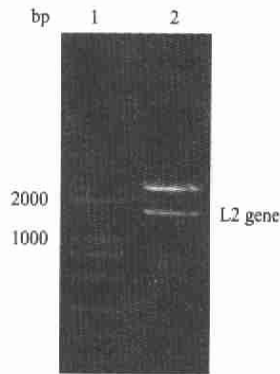


图 2 重组质粒 pMD18-T/HPV-16 L2 酶切鉴定

Fig 2. Restrictive enzyme analysis of recombinant plasmid

pMD18-T/HPV-16 L2

1: DL2000 marker; 2: pMD18-T/HPV-16 L2 by HindⅢ/XbaⅠ

**3. HPV-16 L2 基因序列测定及一级结构分析:** 测序结果表明 PCR 扩增得到的均为 HPV-16 L2 基因,其中 4 个 L2 PCR 回收片段测序结果较差,不进行突变分析,其余 12 个 L2 PCR 回收片段测序结果与德国标准株进行比较(表 1、表 2 和图 3),结果显示各分离株 L2 基因核苷酸多处发生变异,其中一些突变引起编码氨基酸的变异,另一些为同义突变。12 个分离株 L2 基因在核苷酸水平形成 7 种突变模式,分别命名为 XJL2-1 ~ XJL2-7, BLAST 和 DNAMAN version 5.2.2 分析表明,各模式与 HPV-16 原型比较,同源性在 99.37% ~ 99.79% 之间,在氨基酸水平形成 5 种突变模式,各模式与 HPV-16 原型比较,同

源性在 98.31% ~ 99.58% 之间, XJL2-1、XJL2-2、XJL2-3(XJL2-1/2/3)突变模式在氨基酸水平是一致的, XJL1-1/2/3 突变模式占 66.67%,是突变的主流型。

表 1 宫颈癌组织中 HPV-16 L2 基因序列的变异分析

Table 1. Mutation analysis of HPV-16 L2 gene sequence in cervical carcinoma tissue

| Pattern        | Positions |        |        |        |        |        |        | Frequency (%)** |
|----------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------|
|                | REF       | XJL2-1 | XJL2-2 | XJL2-3 | XJL2-4 | XJL2-5 | XJL2-6 |                 |
| 4363           | A         | T      | T      | T      | T      | T      | T      | 12/12(100)      |
| 4561           | G         | -      | -      | -      | -      | -      | T      | 1/12(8.33)      |
| 4936           | G         | A      | A      | A      | A      | A      | A      | 2/13(91.67)     |
| 5015           | G         | -      | -      | -      | -      | -      | -      | 1/12(8.33)      |
| 5039           | T         | -      | -      | -      | -      | -      | C      | 1/12(8.33)      |
| 5043           | G         | -      | -      | -      | -      | -      | A      | 1/12(8.33)      |
| 5224           | A         | C      | T      | C      | T      | T      | C      | 12/12(100)      |
| 5291           | T         | -      | -      | -      | -      | -      | C      | 1/12(8.33)      |
| 5292           | C         | -      | -      | -      | -      | -      | T      | 1/12(8.33)      |
| 5367           | C         | -      | -      | -      | -      | -      | T      | 1/13(7.69)      |
| 5485           | C         | -      | -      | T      | -      | -      | -      | 1/12(8.33)      |
| 5491           | A         | -      | -      | -      | -      | G      | -      | 1/12(8.33)      |
| 5516           | A         | -      | -      | -      | -      | -      | C      | 1/12(8.33)      |
| 7058           | A         | -      | -      | -      | T      | -      | -      | 1/12(8.33)      |
| Frequency (%)* | 6/12      | 1/12   | 1/12   | 1/12   | 1/12   | 1/12   | 1/12   |                 |
|                | 50        | 8.33   | 8.33   | 8.33   | 8.33   | 8.33   | 8.33   |                 |

Note: \* frequency of the mutation pattern in all twelve HPV-16 L2 fragments; \*\* frequency of the site mutation in all twelve HPV-16 L2 fragments

**4. HPV-16 L2 蛋白疏水性和抗原性分析:** 用 DNAMAN version 5.2.2 分析原型和新疆各突变株 HPV-16 L2 蛋白的疏水性和亲水性, XJL2-1/2/3 和 XJL2-5 L2 蛋白氨基酸残基 327 ~ 332 的疏水性增强; XJL2-4 L2 蛋白氨基酸残基 327 ~ 332 的疏水性增强,氨基酸残基 444 ~ 449 的亲水性增强; XJL2-6 L2 蛋白氨基酸残基 327 ~ 332 的疏水性增强,氨基酸残基 350 ~ 355 的疏水性增强(结果未显示); XJL2-7 L2 蛋白氨基酸残基 266 ~ 272 的疏水性增强,氨基酸残基 327 ~ 332 的疏水性增强,氨基酸残基 351 ~ 358 的亲水性增强,氨基酸残基 375 ~ 380 的亲水性增

表 2 HPV-16 L2 蛋白的变异

Table 2. Amino acid sequence variations among HPV-16 L2 protein

| Patterns        | Frequency (%)* | Variation positions at amino acid position of HPV-16 L2 protein |        |        |        |       |         |        |        |        |
|-----------------|----------------|-----------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|-------|---------|--------|--------|--------|
|                 |                | 43                                                              | 261    | 269    | 270    | 330   | 353     | 378    | 420    | 428    |
| REF             |                | E                                                               | D      | S      | S      | L     | S       | -      | -      | -      |
| XJL2-1/2/3      | 8/12(66.67)    | D                                                               | -      | -      | -      | F     | -       | -      | -      | F      |
| XJL2-4          | 1/12(8.33)     | D                                                               | -      | -      | -      | F     | -       | -      | V      | -      |
| XJL2-5          | 1/12(8.33)     | D                                                               | -      | -      | -      | F     | -       | -      | -      | -      |
| XJL2-6          | 1/12(8.33)     | D                                                               | -      | -      | -      | F     | P       | -      | -      | -      |
| XJL2-7          | 1/12(8.33)     | D                                                               | N      | P      | N      | F     | L       | F      | -      | L      |
| Frequency (%)** |                | 12/12                                                           | 1/12   | 1/12   | 1/12   | 12/12 | 2/12    | 1/12   | 1/12   | 1/12   |
|                 |                | (100)                                                           | (8.33) | (8.33) | (8.33) | (100) | (16.67) | (8.33) | (8.33) | (8.33) |

Note: \* frequency of the mutation pattern in all proteins coded by the twelve HPV-16 L2 fragments; \*\* frequency of the variation in all proteins coded by the twelve HPV-16 L2 fragment

强,图 4 和图 5 分别显示了原型 HPV-16 L2 蛋白和 XJL2-7 L2 蛋白亲疏水性预测结果。由于氨基酸的变异及其亲疏水性的改变,各分离株抗原性也发生变化,抗原分析显示,HPV-16 标准株 L2 蛋白 321-GAKVHYYDLSTI-333 肽段具有抗原性,新疆各分离株 L2 蛋白 321-GAKVHYYDFS-331 肽段抗原性减弱;XJL2-6 新增了具有抗原性的肽段 352-TPHAASP-358, XJL2-7 新增了具有抗原性的肽段 350-TTTL-HAASP-358; XJL2-5、XJL2-6 和 XJL2-7 L2 蛋白 42-ADQILQYCGSMGVFF GG-57 肽段的抗原性稍有增加。

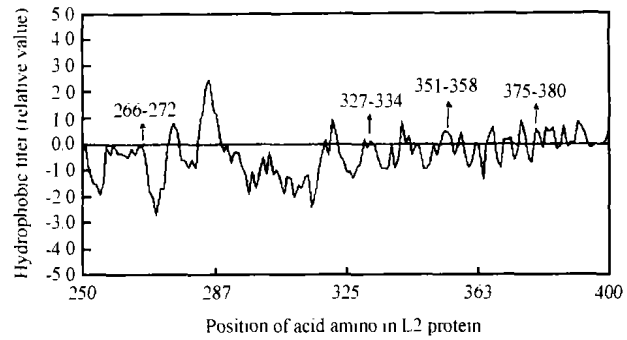


图 5 HPV-16 XJL2-7 L2 蛋白疏水性预测

Fig 5. Calculation of hydrophobicity of HPV-16 XJL2-7

L2 protein

中可检测到 HPV-16 和/或 HPV-18 的存在, HPV-16 和 HPV-18 被认为是妇女宫颈癌的主要病原<sup>[1,2]</sup>。然而, HPV 的存在并不是引发妇女宫颈癌的充分条件, 在一些正常的或轻微异常的宫颈组织中也可检测到 HPV-16、HPV-18 的存在, 很多感染者无临床症状<sup>[14]</sup>, 病毒在体内呈潜伏状态, 已有的研究表明病毒的变异、病毒的持续性感染和反复感染、病毒 DNA 拷贝数以及机体的免疫状态等因素与高危型 HPV 感染者发展为宫颈癌相关, 其中病毒的持续性感染和反复感染以及病毒 DNA 在宫颈组织中的高拷贝数可由高危型 HPV 的型内变异引起<sup>[14,15]</sup>。

核酸杂交和 HPV-16 E6、L1、L2 和 LCR 核苷酸序列分析表明, HPV-16 型内存在多态性, 目前, 将世界范围不同种族、不同人群中分离的 HPV-16 区分为 5 种主要的种系发生群<sup>[10-12]</sup>, 国内尚没有大样本的 HPV-16 型内变异规律及种系发生群的相关报道, 不同地区 HPV-16 分离株部分基因的突变已有报道。

新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区。据资料显示, 新疆维吾尔族妇女宫颈癌的患病率高, 患病年龄较其他民族低, 宫颈癌以 HPV-16 感染为主<sup>[16,17]</sup>。我们根据 HPV-16 德国标准株 DNA 序列设计了一对引物, PCR 检测了 19 例宫颈癌组织, 其中 16 例扩增出 HPV-16 L2 基因, 进一步证明新疆维吾尔族妇女患宫颈癌以 HPV-16 感染为主。

基因序列分析表明, 12 个 L2 PCR 回收片段测序结果与德国标准株相比发生了不同程度的变异(表 1、表 2), 部分核苷酸突变引起编码氨基酸的变异, 另一些为同义突变。各分离株 L2 基因与 HPV-16 原型 L2 基因比较, 同源性在 99.37% ~ 99.79% 之间; 各分离株 L2 基因推导的氨基酸序列与 HPV-16 原型的 L2 蛋白氨基酸序列比较, 同源性在 98.31% ~ 99.58% 之间, 以上结果表明 HPV-16 L2 基

|            |                                                                        |     |
|------------|------------------------------------------------------------------------|-----|
| REF        | MRHRSAPRTKASATQYKTCQAGTCPPDIIIPKVEKTIAGQILQYSGNGVFFGGIGIGTSSJTGGR      | 70  |
| XJL2-1/2/3 | -----d-----                                                            | 70  |
| XJL2-4     | -----d-----                                                            | 70  |
| XJL2-5     | -----d-----                                                            | 70  |
| XJL2-6     | -----d-----                                                            | 70  |
| XJL2-7     | -----d-----                                                            | 70  |
| REF        | GYIPLGTTPPTATDTLAPVRPLTVDFVGPSPDSISLVLEETSPIDAGAPTSVPSIPFQVSJFSLITSTSD | 140 |
| XJL2-1/2/3 | -----d-----                                                            | 140 |
| XJL2-4     | -----d-----                                                            | 140 |
| XJL2-5     | -----d-----                                                            | 140 |
| XJL2-6     | -----d-----                                                            | 140 |
| XJL2-7     | -----d-----                                                            | 140 |
| REF        | TTFAILDINNITVTITTHNNPTFTDPSVLQPTTGAETGGHTLSSTISTHNYEEIPMOTFIVSTNPNV    | 210 |
| XJL2-1/2/3 | -----d-----                                                            | 210 |
| XJL2-4     | -----d-----                                                            | 210 |
| XJL2-5     | -----d-----                                                            | 210 |
| XJL2-6     | -----d-----                                                            | 210 |
| XJL2-7     | -----d-----                                                            | 210 |
| REF        | TSSPTIPGSRPVARGLYSRTTQGVVVPFAVTTTXXLITYDNPAVEGIDVNTL/FSSVDSNINIAPE     | 280 |
| XJL2-1/2/3 | -----d-----                                                            | 280 |
| XJL2-4     | -----d-----                                                            | 280 |
| XJL2-5     | -----d-----                                                            | 280 |
| XJL2-6     | -----d-----                                                            | 280 |
| XJL2-7     | -----d-----                                                            | 280 |
| REF        | PFDFIDVALHRAFTSRTTGIYSRIGNKQLTRASGKSGAKVHYYDLSTYDPAEEIEELQITFSTYT      | 350 |
| XJL2-1/2/3 | -----d-----                                                            | 350 |
| XJL2-4     | -----d-----                                                            | 350 |
| XJL2-5     | -----d-----                                                            | 350 |
| XJL2-6     | -----d-----                                                            | 350 |
| XJL2-7     | -----d-----                                                            | 350 |
| REF        | TTSHAASPTINNGLYDIADDFITDTSTTPEVSPSTLSGYIPANTTI/FGGAYN/PLVSGGIPIN       | 420 |
| XJL2-1/2/3 | -----d-----                                                            | 420 |
| XJL2-4     | -----d-----                                                            | 420 |
| XJL2-5     | -----d-----                                                            | 420 |
| XJL2-6     | -----d-----                                                            | 420 |
| XJL2-7     | -----d-----                                                            | 420 |
| REF        | TDQAPSLIPVFGSPQYTIADAGDFYLPSPYMLKKRKRPLVFFSDVSLAA                      | 470 |
| XJL2-1/2/3 | -----d-----                                                            | 470 |
| XJL2-4     | -----d-----                                                            | 470 |
| XJL2-5     | -----d-----                                                            | 470 |
| XJL2-6     | -----d-----                                                            | 470 |
| XJL2-7     | -----d-----                                                            | 470 |

图 3 新疆 HPV-16 分离株及标准株 L2 蛋白序列的比较

Fig 3. Comparison of the amino acid sequence of HPV-16

L2 protein of Xinjiang and standard strains

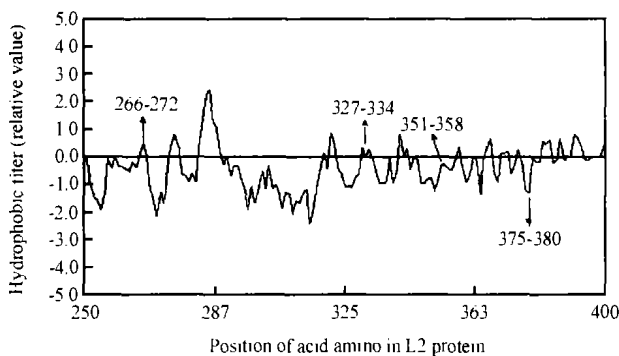


图 4 HPV-16 参考株 L2 蛋白疏水性预测

Fig 4. Calculation of hydrophobicity reference L2 protein

## 讨 论

宫颈癌是一类严重威胁妇女生命健康的疾病, 宫颈癌的发病率和死亡率高, 并有逐年上升的趋势。高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与宫颈癌发病关系密切, 在 80% ~ 90% 的宫颈癌组织

因序列及其编码蛋白的氨基酸序列在新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中比较保守,但仍然有多处发生突变,各分离株 L2 基因及其编码蛋白的氨基酸序列形成多种突变模式,其中 XJL1-1/2/3 突变模式占 66.67% (8/12),说明在新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中,HPV-16 L2 基因和蛋白序列存在多态性,并形成突变的主流模式。

L2 蛋白是 HPV-16 的次要衣壳蛋白,能促进 HPV 病毒样颗粒的高效组装和核定位,L2 通过协助病毒进入细胞促进了病毒的感染,与 HPV 的感染能力和致病力有关<sup>[6-9]</sup>。新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV-16 的 L2 蛋白氨基酸发生多处变异,DNA-MAN version 5.2.2 分析表明其亲水性和抗原性亦发生改变,L2 蛋白以上改变可能导致病毒组装效率和感染能力的改变,而抗原性的改变将导致病毒逃避机体免疫识别,从而造成病毒的持续和重复感染,促进宫颈癌的发生。另一方面,L2 含多个抗原表位,其诱导产生的抗体能有效地阻断病毒的感染,且 L2 的 108~120 肽段为交叉保护性抗原表位,其氨基酸序列在各 HPV 黏膜型中高度保守,其诱导产生的抗体能预防多种 HPV 亚型的感染<sup>[4,6]</sup>。因此,HPV L2 相关疫苗可望广谱、高效地预防 HPV 的感染。

HPV-16 型 L2 是一个保守的基因,推测其在新疆形成的突变谱及主流型是长期形成并将持续较长时间,用本地分离的 HPV-16 型 L2 基因制备 HPV-16 型预防性疫苗将能更有效地预防本地区流行株的感染。

本研究分析了新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV-16 型 L2 基因的多态性,并预测了其功能变化,为 HPV-16 型种系发生提供了确凿的资料,也为 HPV-16 型预防性疫苗研制提供新的思路和基本条件。深入研究新疆株 HPV-16 L2 蛋白的结构与功能,将对阐明该区宫颈癌高发的分子机制起到重要的作用,也将促进宫颈癌预防性疫苗的研制。

### 参 考 文 献

- Hwang TS, Jeong JK, Park M, et al. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol*, 2003, 90: 51-56.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 2003, 88: 63-73.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*, 2002, 347: 1645-1651.
- Roden RB, Yutzy WH 4th, Fallon R, et al. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*, 2000, 270: 254-257.
- Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, et al. Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus types 16 and 6. *J Virol*, 1999, 73: 6188-6190.
- Kawana Y, Kawana K, Yoshikawa H, et al. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol*, 2001, 75: 2331-2336.
- Roden RB, Day PM, Bronzo BK, et al. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol*, 2001, 75: 10493-10497.
- Roden RB, Greenstone HL, Kimbaurer R, et al. *In vitro* generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol*, 1996, 70: 5875-5883.
- Yang R, Day PM, Yutzy WH 4th. Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J Virol*, 2003, 77: 3531-3541.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*, 1997, 71: 2463-2472.
- Ho L, Chan SY, Burk RD, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*, 1993, 67: 6413-6423.
- Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*, 1995, 69: 7743-7753.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2959-2968.
- Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 3388-3393.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89: 796-802.
- 李庭芳, 古丽娜·库尔班, 王涛, 等. 新疆伽师县夏普桃勒乡妇女宫颈癌防治的研究. *新疆医学院学报*, 1996, 19(3): 199-203.
- 拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班, Amy E Noffersinger, 等. 维吾尔族妇女宫颈癌中 p53 基因的表达和 HPV DNA 检测研究. *新疆医学院学报*, 1997, 20(2): 77-81.
- 马正海, 钱东, 马纪, 等. 中国新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头状瘤病毒 16 型 E6 基因的克隆和序列分析. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 38(3): 399-404.
- 马正海, 张富春, 梅新娣, 等. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒 16 型 L1 基因突变谱分析. *中华医学杂志*, 2004, 84(12): 987-991.
- Seedorf K, Krammer G, Durst M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 1985, 145: 181-185.

(收稿日期:2004-04-12)