

新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 E6 基因突变分析

马正海¹, 张富春¹, 梅新娣¹, 马彩玲², 刘开江³

Analysis of Human Papillomavirus 16 E6 Oncogene Mutation in Xinjiang Uygur Women with Cervical Carcinoma

MA Zheng-Hai¹, ZHANG Fu-Chun¹, MEI Xin-Di¹, MA Cai-Ling², LIU Kai-Jiang³

1. 新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046
2. 新疆医科大学第一附属医院 妇科, 新疆 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学第三附属医院 (新疆肿瘤医院) 妇科, 新疆 乌鲁木齐 830011

1. Key Laboratory of Molecular Biology, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumuqi, Xinjiang, 830046, P. R. China

2. Department of Gynecology, The First affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumuqi, Xinjiang, 830011, P. R. China

3. Department of Gynecology, The Thurd affiliated Hospital for Cancer, Xinjiang Medical University, Urumuqi, Xinjiang, 830011, P. R. China

通讯作者 张富春

Correspondence to: ZHANG Fu-Chun
Tel: 86-991-8583259
Fax: 86-991-8583259
E-mail: zfc@xju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 39960079); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (No. 200221103)

Funds: National Natural Science Foundation of China (No. 39960079); Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China (No. 200221103).

收稿日期 2003-12-10
修回日期 2004-03-04

[ABSTRACT]BACKGROUND & OBJECTIVE: High-risk human papillomaviruses (HPVs), such as HPV16, and HPV18, are major causes of cervical cancer (CC), and HPV16 was found most frequently in CC patients. HPV16E6 is one of major oncogenes. In some region, specific E6 mutation is considered as dangerous factor causing CC. There is a very high incidence of CC in southern Xinjiang, where the Uygur are the majority. As we reported before, we found HPV16E6 mutation from this district. This study was designed to investigate distribution of the mutation in CC of Xinjiang Uygur women, and the relationship between the mutation and high incidence of CC in southern Xinjiang. **METHODS:** The tissue DNA was extracted from 35 CC biopsies of Xinjiang Uygur Women. HPV16E6 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the CC tissue DNA. The PCR fragments were sequenced and analyzed. **RESULTS:** The result of PCR showed that the positive rate of HPV16E6 was 82.86% (29/35); 26 of these 29 PCR fragments were sequenced and analyzed, 15 of them maintained prototype (57.69%), 11 have L83V mutation (34.62%), and 2 have L83V/D63E mutation (7.69%). **CONCLUSIONS:** There is mutation within the HPV16E6 gene in CC of Xinjiang Uygur women. Our research suggested that the distribution of HPV16 prototype and HPV16E6 mutation might be associated with high incidence of CC in southern Xinjiang.

KEYWORDS: Cervical carcinoma; Human papillomavirus; E6 gene; Gene mutation

【摘要】 背景与目的: 高危型人乳头状瘤病毒 16 和 18 (human papillomavirus type 16 and 18, HPV16, HPV18) 是宫颈癌主要病因之一, 尤其以 HPV16 最为常见, 其中 HPV16E6 是主要癌基因之一。在一些地区, 特定的 E6 基因突变株是宫颈癌发生的危险因素。新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区, 我们已在前期的研究中发现该地区 HPV16E6 基因发生突变, 本研究旨在检测该突变在新疆南部维吾尔族妇女宫颈癌组织中的分布规律, 并探讨其与该地区宫颈癌高发的关系。方法: 从 35 例中国新疆南部维吾尔族妇女宫颈癌活检标本中提取组织 DNA 作为模板, PCR 扩增 HPV16E6 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中 HPV16E6 基因的突变。结果: PCR 检测结果表明宫颈癌组织中 HPV16E6 阳性率为 82.86% (29/35); 26 例中 E6 分离片段的测序和序列分析表明, 15 例 (57.69%) 分离株 E6 基因与原型相同, 另有 11 例 (42.31%) E6 基因突变, 其中 9 例 (34.62%) 分离株发生了 L83V 突变, 2 例 (7.69%) 分离株发生了 L83V/D63E 突变。结论: 中国新疆南部地区 HPV16E6 基因发生变异, 其原型和变异型在该地区维吾尔族宫颈癌患者中的分布规律可能与该地区宫颈癌高发存在一定关系。

关键词: 宫颈癌; 人乳头状瘤病毒; E6 基因; 基因突变

中图分类号: Q344

文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2004)09-1016-05

人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一种致癌 DNA 病毒,可引起人生殖道和肛门皮肤、粘膜发生良性和恶性肿瘤,其中与宫颈癌发病密切相关的有 HPV16、18 等^[1,2]。HPV16 基因组主要由早期基因区 (E 区)、晚期基因区 (L 区) 和长控制区 (long control region, LCR) 组成, E 区有 6 个开放读码框架 (open reading-frame, ORF), 即 E1、E2、E4、E5、E6、E7, 其中与转化有关的为 E6 和 E7。E6 蛋白与 P53 结合导致 P53 降解以及生物功能丧失, 从而引起细胞周期紊乱, DNA 损伤累积, 最终引起细胞癌变。

核酸杂交和 HPV16E6、L1、L2 和 LCR 核苷酸序列分析表明, HPV16 存在多态性。目前, 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^[3,4], E6 是 HPV16 主要癌基因之一。在一些国家和地区, 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 HPV16E6 原型和不同突变株的分布不一致。

新疆南部维吾尔族聚居区是我国宫颈癌高发区, 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宫颈癌高发与 HPV16 感染密切相关, 其宫颈癌组织中 HPV16 检出率达 77.6% ~ 82.6%^[5,6]。我们已经证明在新疆南部维吾尔族妇女宫颈癌组织中存在 HPV16E6 基因突变株^[7], 本研究在此基础上扩大标本数量, 进一步分析并检测 HPV16E6 原型及突变型在该地区妇女宫颈癌组织中的分布情况, 以探讨该区宫颈癌组织中 HPV16E6 基因突变的规律及其与该地区宫颈癌高发的可能关系。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌组织

采取 2000 年 2 月 ~ 2003 年 10 月之间新疆医科大学附属第三医院 35 例宫颈癌手术或活检标本 (经病理检查确诊), 患者均为维吾尔族, 年龄 30 ~ 66 岁, 中位年龄 50 岁, 术前未进行放化疗。标本 -80℃ 保存。

1.2 主要试剂及材料

克隆质粒 pUCm-T 购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 菌种 *E. coli* DH5α 为本室保存。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大连宝生物工程有限公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 Seedorf 等^[8]1985 年发表的 HPV16 型 DNA

全序列, 利用 Perkin Elmer (PE) 公司 primer express 软件设计跨 HPV16E6 整个阅读框的一对引物。引物 1 的序列为: 5'-CAA TGT TTC AGG ACC CAC AGG-3'; 引物 2 的序列为: 5'-TGC ATG ATT ACA GCT GGG TTT C-3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.4 宫颈癌组织 DNA 的提取及 PCR 扩增

以按 TaKaRa Minibest Animal Tissue Genomic DNA Extraction Kit Ver. 2.0 说明书提取的宫颈癌组织 DNA 作为模板, 加 HPV16E6 引物, 按常规方法扩增 HPV16E6 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。实验中以正常宫颈组织作为阴性对照。取 5 μl PCR 产物在 1% 琼脂糖、1 × TAE 中电泳, EB 染色, 紫外灯下观察结果。

1.5 HPV16E6 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 HPV16E6 P1、P2 进行 DNA 测序。用 DNAMAN version 5.2.2 软件对序列进行分析。

1.6 pUCm-T /HPV16E6 重组质粒的构建

将 HPV16 E6PCR 回收片段与克隆载体 pUCm-T 用 T4 DNA 连接酶 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, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定其正确性, 酶切鉴定正确的质粒用 pUCm-T 通用的 M13/PUC 正反向引物测序后与同一标本 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。

2 结果

2.1 宫颈癌组织中 HPV16E6 DNA 片段的扩增结果

35 份标本中有 29 份 PCR 扩增为 HPV16E6 阳性 (82.86%), 图 1 所示为 8 份样品 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果, 可见一清晰扩增条带, 大小约为 465 bp。

2.2 pUCm-T/HPV16E6 重组质粒的构建

将 HPV16E6 PCR 回收片段与克隆载体 pUCm-T 连接, 重组质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切, 切出约 590 bp 的 DNA 片段 (图 2, 3), 该重组质粒用 M13/PUC 正反向引物分别测序, 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。

2.3 HPV16E6 基因序列测定及一级结构分析

29 份标本 PCR 扩增产物测序结果表明扩增产

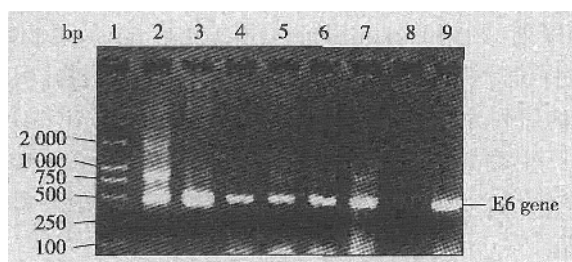


图1 PCR 扩增 HPV16E6 基因

Figure 1 PCR amplification of HPV16E6 gene

Lane 1: DL2000 marker; Lane 2-9: HPV16E6 PCR products

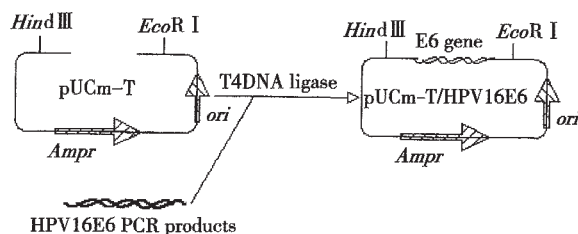


图2 pUCm-T/HPV16E6 质粒构建图

Figure 2 Construction of recombinant plasmid

pUCm-T/HPV16E6

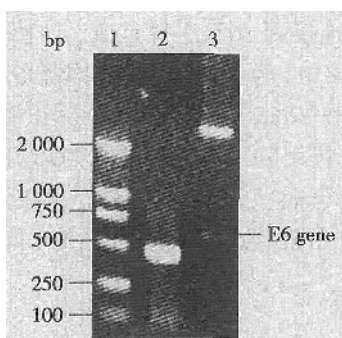


图3 重组质粒 pUCm-T/HPV16E6 酶切鉴定

Figure 3 RE analysis of recombinant plasmid

pUCm-T/HPV16E6

1: DL2000 marker; 2: amplification of HPV16E6 gene

3: pUCm-T/HPV16E6 by *EcoR* I/*Hind* III

物均为 HPV16E6 基因,其中 3 例 E6 PCR 回收片段测序结果较差,未进行突变分析,其余 26 例 E6 PCR 回收片段测序结果与德国标准株进行比较。结果显示,15 例(57.69%)分离株 E6 基因与原型相同;9 例(34.62%)分离株 E6 基因核苷酸发生一处突变,即第 350 nt(在 HPV16 基因组中的位置)的 T 变为 G,核苷酸三联密码由 TTG 变为 GTG,其编码的 E6 蛋白第 83 位氨基酸由亮氨酸变为缬氨酸(L83V);2 例(7.69%)分离株 E6 基因核苷酸发生两处突变,

即在 L83V 突变的基础上第 295 nt 的 T 变为 G,核苷酸三联密码由 GAT 变为 GAG,其编码的 E6 蛋白 63 位氨基酸由天门冬氨酸变为谷氨酸(L83V/D63E)(图 4.5)。

REF.	MFQDPQGERFRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLRR	40
L83V	-----	40
L83V/D63E	-----	40
REF.	EVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYC	80
L83V	-----	80
L83V/D63E	-----	80
REF.	YSLYGTTLQQYVKNKPLCDLLIRCINQKPLCPPEKQRHLD	120
L83V	-----	120
L83V/D63E	-----	120
REF.	KKQRFHNIINGRMTGRCHSCCRSSRTTRETOL	151
L83V	-----	151
L83V/D63E	-----	151

图4 HPV16 新疆株 E6 蛋白氨基酸序列与参考株的同源性比较

Figure 4 Homologous analysis of amino acid sequence of HPV16E6 protein from Xinjiang strain with that of REF.

3 讨论

宫颈癌是一种严重威胁妇女生命健康的疾病,发病率和死亡率均较高,并有逐年上升的趋势。高危型 HPV 与宫颈癌发病密切相关,在 80%~90% 的宫颈癌组织中可检测到 HPV16 和/或 HPV18 的存在,HPV16 和 HPV18 被认为是宫颈癌的主要病因^[1,2]。然而,HPV 的存在并不是引发宫颈癌的充分条件,在一些正常的或轻微异常的宫颈癌组织中也可检测到 HPV16、HPV18 的存在;很多感染者并无症状^[9],病毒在体内呈潜伏状态。已有的研究表明,病毒的变异和高危型 HPV 持续感染是宫颈癌发生的重要危险因素^[9-11]。

一些国家和地区 HPV16 分子流行病学调查表明,E6 基因突变增强了 HPV16 致癌的危险性;同时,E6 基因突变株的致癌危险性具有地域性,即同一 E6 基因突变类型在不同地区的致癌危险性存在明显的差异。HPV16E6 原型和 L83V 突变型是宫颈癌组织中的主要分布型,但其在不同国家和地区宫颈癌组织中的分布也有较大的差异。HPV16E6L83V 变异株在多个国家的分布规律及其致癌性已有详细的报道,例如:墨西哥为宫颈癌高发区,HPV16E6L83V 变异在墨西哥侵袭性宫颈癌中占 93.5%^[9],HPV16E6 原型和 L83V 突变型在北美洲分别为 53% 和 40%,在欧洲(德国、波兰和西班牙)分别为 40% 和 44%,在美洲中部及南美洲分别为 25% 和 52%,在东南亚(印度尼西亚、菲律宾、泰国)分别为 54% 和 6%,在非洲分别为 8% 和 2%^[3],在

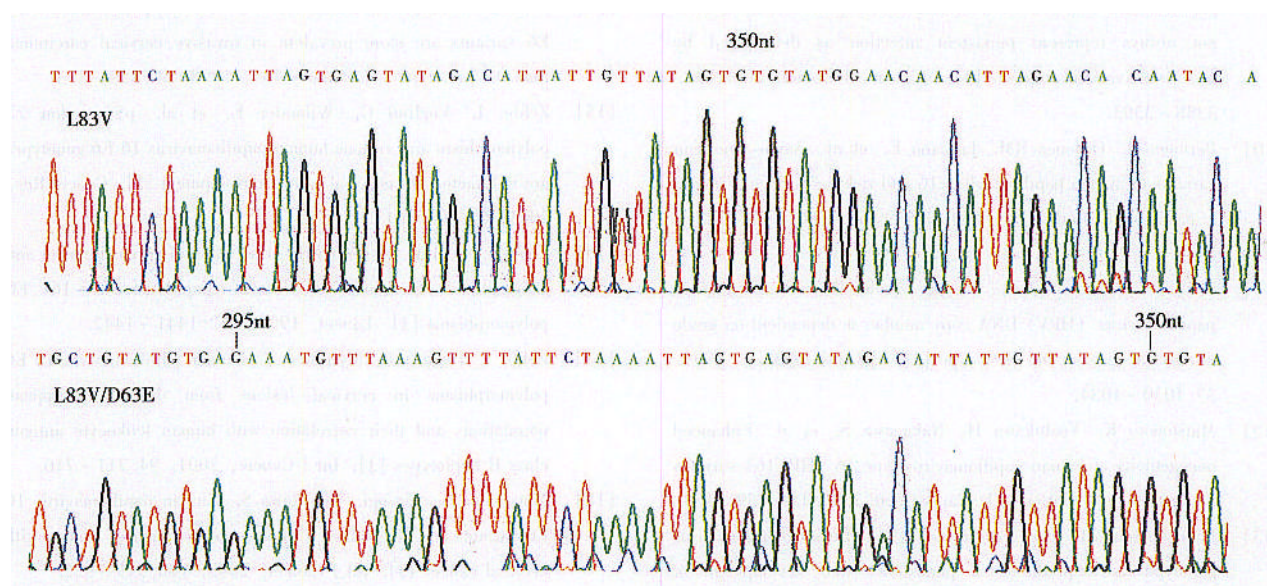


图5 HPV16E6 L83V 和 L83V/D63E 突变株 295nt 及 350nt 处突变的测序峰图

Figure 5 Chromatographic of the mutations at 295nt and 350nt of HPV16E6 L83V and L83V/D63E variants

日本分别为 40% 和 28%^[12]。我们的结果表明,在新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中, HPV16E6 原型占 57.69% (15/26), HPV16E6L83V 变异株占 34.62% (9/26), HPV16E6L83V/D63E 变异株占 7.69% (2/26), 后两者均含 L83V 变异, 含 L83V 变异的 HPV16E6 共占 42.30% (11/26), 新疆南部地区 HPV16E6 原型和 L83V 突变型在宫颈癌组织中的分布与其在北美洲的分布接近。

HPV16E6L83V 与宫颈上皮内瘤样病变 I 级向 III 级的转化有关^[13]。在瑞典, L83V 与浸润性宫颈癌有关^[14, 15], 而在意大利和捷克却主要与宫颈早期坏死有关, 与浸润性宫颈癌无相关性, 并认为 E6L83V 变异株的致癌性与感染人群的 HLA II 分子配型有关^[16, 17], 在日本, HPV16E6 原型和突变株的致癌能力与感染者的 HLA II 分子配型密切相关^[18]。新疆南部维吾尔族聚居区宫颈癌高发, 不仅与 HPV16 的感染和变异有关, 还可能与该地区人群的遗传背景也存在着一定的联系, 但由于标本数量较少, 我们没有开展这方面的研究。

本研究报道的新疆地区 HPV16E6 基因变异及其在宫颈癌中的分布, 将为我国宫颈癌患者组织中 HPV16E6 基因结构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] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis [J]. Br J Cancer, 2003, 88: 63 – 73.
- [2] Hwang TS, Jeong JK, Park M, et al. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray [J]. Gynecol Oncol, 2003, 90: 51 – 56.
- [3] Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide Perspective [J]. J Virol, 1997, 71: 2463 – 2472.
- [4] 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, E2, and E1 coding segments [J]. J Virol, 1995, 69: 7743 – 7753.
- [5] 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 [J]. 新疆医学院学报, 1996, 19 (3): 199 – 203.
- [6] 拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班, Amy EN, 等. 维吾尔妇女宫颈癌中 p53 基因的表达和 HPV DNA 检测研究 [J]. 新疆医学院学报, 1997, 20 (2): 77 – 81.
- [7] 马正海, 钱东, 马纪, 等. 中国新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒 16 型 E6 基因的克隆和序列分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (3): 400 – 404.
- [8] Seedorf K, Kraemmer G, Duerst M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence [J]. Virology, 1985, 145: 181 – 185.

- [9] 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]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 3388 – 3393.
- [10] Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93: 1325 – 1330.
- [11] Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 1030 – 1034.
- [12] Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population [J]. Cancer Lett, 2000, 156: 159 – 165.
- [13] Londesborough P, Ho L, Terry G, et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities [J]. Int J Cancer, 1996, 69: 364 – 368.
- [14] Zehbe I, Wilander E, Delius H, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype [J]. Cancer Res, 1998, 58: 829 – 833.
- [15] Zehbe I, Voglino G, Wilander E, et al. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development [J]. Cancer Res, 2001, 61: 608 – 611.
- [16] Zehbe I, Voglino G, Delius H, et al. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms [J]. Lancet, 1998, 352: 1441 – 1442.
- [17] Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes [J]. Int J Cancer, 2001, 94: 711 – 716.
- [18] Matsumoto K, Yasugi, Nakagawa S. Human papillomavirus 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer [J]. Int J Cancer, 2003, 106: 919 – 922.

[编辑:刘玮,校对:庄爱华]

《白血病·淋巴瘤》、《肿瘤研究与临床》联合征订启事

《白血病·淋巴瘤》杂志是经国家科委批准的以白血病、淋巴瘤为主的血液系统恶性肿瘤学科的专业学术期刊,读者对象为从事血液病研究和临床工作的中、高级医务人员。编委会由国内外著名血液学专家、学者组成。

办刊宗旨:促进我国白血病防治事业发展,临床与基础并举,但侧重于临床,提高与普及普顾,但侧重于提高。

主要栏目有:述评、论著、临床研究、实验研究、专题论坛、综述讲座、调查报告、短篇报道、个案报告等。

《白血病·淋巴瘤》杂志为双月刊,大16开本,64页。国内统一刊号:CN14-1292/R,国际连续出版物号:ISSN1009-9921,邮发代号:22-107,每期定价6.00元,全年定价36.00元,双月25日出版,国内总发行山西省邮政报刊发行局,全国各地邮局均可订阅,也可直接向本刊编辑部邮购(免邮寄费)。

《肿瘤研究与临床》杂志是反映肿瘤学领域科研成果、学术动态及临床经验的肿瘤学科专业学术性期刊。国内统一刊号CN14-1213/R,国际连续出版物号ISSN1006-9801,邮发代号:22-137。主要栏目有述评、基础研究、临床研究、综述讲座、调查报告、技术改进、短篇报道等。读者对象为中、高级肿瘤防治工作者及医药卫生技术人员。

《肿瘤研究与临床》杂志为双月刊,大16开本,72页,双月28日出版,每期定价6.00元,全年定价36.00元。国内总发行山西省邮政报刊发行局,全国各地邮局均可订阅,也可直接向本刊编辑部邮购(免邮寄费)。

凡订阅上述两刊全年刊物的作者,向上述两刊投稿时可凭2005年邮局订阅存根复印件,免交稿件处理费(30元/篇),稿件发表时版面费适当减免。

编辑部地址:山西省太原市职工新街3号 邮政编码 030013

电话:(0351)4650389、4650386 传真 0351-4651415

E-mail: ZLYJYLC@sina.com