

新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16型 E6基因变异分析^{*}

830001 乌鲁木齐 新疆维吾尔自治区人民医院临床医学研究中心

朱开春, 玛依努尔·尼娅孜^{1,2}, 刘芳², 代建霞, 阿丽娅·克里木, 张晓玲, 刘熔

【摘要】 目的: 新疆维吾尔族妇女宫颈癌的发生主要与人乳头状瘤病毒 16(HPV16)感染相关, 特定的 HPV16 E6突变株具有更高的致癌危险性。本研究通过检测维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6基因突变情况, 探讨其与维吾尔族妇女宫颈癌高发的关系。方法: 从 140例维吾尔族妇女宫颈癌石蜡包埋组织中提取 DNA作为模板, PCR扩增 HPV16 E6全长基因, PCR产物直接测序, 进行突变分析。结果: 本组维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16的阳性率是 73.6%(103/140), 91例 E6基因测序及分析结果表明, 维吾尔族妇女宫颈癌组织中存在 HPV16 E6变异株, 其中 49例(53.8%)分离株发生 L83V突变, 4例(4.39%)发生 D25E突变, 2例(2.20%)发生 D64E/L83V突变, 36例(39.6%)与野生型相同。结论: 新疆维吾尔族妇女宫颈癌患者 HPV16 E6基因发生变异, 主要以 L83V突变为主, HPV16变异株在维吾尔族妇女宫颈癌患者中的分布可能与维吾尔族妇女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: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2008)03-0209-04

Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in Xinjiang Uyghur women with cervical carcinoma

ZHU Kai-chun, MAYNUER·NIYAZI, LIU Fang, DAI Jian-xia, ALIYA·KELIM, ZHANG Xiaoling, LIU Rong. Clinical Medical Study Center, the People's Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi Xinjiang 830001, China

Corresponding author: MAYNUER·NIYAZI, E-mail: mny168@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective: High-risk human papillomaviruses (HRHPVs), especially HPV16, is the major cause of cervical carcinoma (CC) in Xinjiang Uyghur women. In some region, specific E6 mutation is considered as dangerous factor causing CC. This study was designed to investigate distribution of HPV16 mutation and the relationship between the mutation and high incidence of CC in Uyghur women. Methods: The tissue DNA was extracted from 140 CC paraffin embedded tissue of Uyghur women. HPV16 E6 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 HPV16 was 73.5% (103/140). Ninety-one of 97 PCR fragments were sequenced and analyzed. Thirty-six of them maintained prototype (39.6%). Forty-nine have L83V mutation (53.6%) and 4 have D25E (4.25%), and 2 have L83V/D64E (2.27%). Conclusion: There are mutations within the HPV16 E6 gene in CC of Xinjiang Uyghur women. The most common mutation was L83V. Our research suggested that the distribution of HPV16 E6 mutation might be associated with high incidence of CC in Uyghur.

【Key Words】 Cervical carcinoma; Human papillomavirus; E6 gene; Gene mutation

宫颈癌是常见妇科恶性肿瘤之一,近 10年来,大规模人群为基础的流行病学资料显示,在 99%以上的宫颈癌组织中存在人乳头状瘤病毒 (human

papillomavirus, HPV) DNA。HPV感染是宫颈癌发生的首要因素且为始动因素^[1]。HPV是一种环状双链 DNA病毒,目前确定的 HPV型别有 130余种,约

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (N0200521107)

1 通讯作者, E-mail: mny168@yahoo.com.cn

2 830001 新疆维吾尔自治区人民医院妇产科

20种与宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的发生高度相关,被称为高危型 HPV(high risk HPV HRHPV)^[2]。新疆维吾尔族妇女宫颈癌的发生主要与高危型的 HPV16感染相关^[3]。前期小样本研究指出,新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6基因存在一定的突变^[4],本研究在此基础上扩大标本数量,进一步检测维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16突变株的分布情况,探讨维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6基因突变的规律。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌组织 收集新疆维吾尔自治区人民医院 2000年 1月~2005年 6月病理科归档的维吾尔族妇女宫颈癌患者石蜡包埋标本 140例,中位年龄 42岁(25~68岁)。

1.2 主要试剂及材料 TaqDNA聚合酶、dNTP DNA marker DI2000 购自大连宝生物工程有限公司,氯仿异戊醇(24:1)、Tris饱和酚(PH8.0)、SDS Tris为美国 BB公司产品,蛋白酶 K 二甲苯、氯仿、EDTA-Na均购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 引物设计与合成 根据文献^[5],合成 HPV16 特异性引物: P₁ 5'-TGCTAGTGCTTATGCAGCAA-3', P₂ 5'-ATTACTIGCAACATIGGTAC-3', 扩增长度 152 bp 根据 Genebank提供的 HPV16标准株序列,设计一对跨 HPV16 E6整个阅读框引物, HPV16 E6 P₁ 5'-CGTAACCGAAATCGGTTGAAC-3', P₂ 5'-GCTCATAACAG TAGAGATC-3', 扩增长度 550 bp 含 E6基因全长序列。上述引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 宫颈癌石蜡组织 DNA提取 切取石蜡包埋组织 5μm厚度蜡片 10张放入 1.5 ml 灰菌离心管中,经二甲苯脱蜡水化后,采用酚 氯仿抽提法提取组织 DNA 提取的组织 DNA 置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.5 PCR扩增 第一步筛选 HPV16阳性标本,以组织 DNA 为模板,用 HPV16 特异性引物扩增。PCR反应条件如下: 95℃ 预变性 5 min 94℃ 30 s 46℃ 30 s 72℃ 30 s 35 个循环, 72℃ 7 min PCR产物在 2% 琼脂糖电泳, EB 染色, 紫外灯下观察, 第二步 PCR扩增 HPV16 E6基因, 用 HPV16 阳性组织 DNA 为模板, 扩增 HPV16 E6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

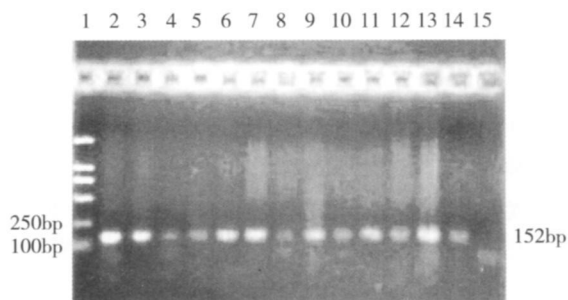
1.6 HPV16 E6基因测序及分析 PCR产物纯化

后, 利用 HPV16 E6 P₁/P₂引物, 正反向对 PCR产物直接测序。纯化和测序服务由上海生工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。

2 结果

2.1 宫颈癌石蜡包埋组织中 HPV16 扩增结果

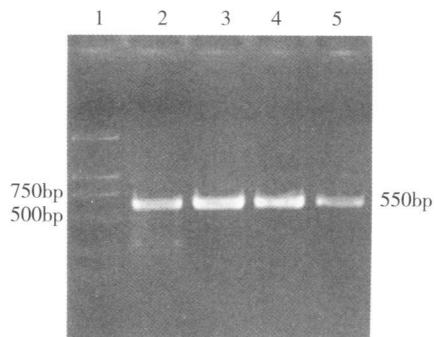
140份维吾尔族妇女宫颈标本中 HPV16 DNA阳性结果为 103例, 阳性结果在 152 bp 处呈现一亮带。本组维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型阳性率为 73.6%。见图 1。



1 DNA Marker DI2000 2 阳性对照 (152 bp) 3~14 宫颈癌标本; 15 阴性对照

图 1 HPV16 PCR电泳结果

2.2 HPV16 阳性标本中 HPV16 E6 基因扩增结果 以 HPV16 阳性组织 DNA 为模板, 利用跨 HPV16 E6 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。103例 HPV16 阳性标本中有 96例扩增出 E6 基因, 7例未扩增出。见图 2。



1 DNA Marker DI2000 2~5 HPV16 E6 基因

图 2 HPV16 E6 PCR电泳结果

2.3 HPV16 E6 基因测序结果及分析 E6 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 91份, 另外 5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, 共发现 3 个突变位点, 分别位于 178 nt、295 nt 和 350 nt (在 HPV16 全基因序列中的位置)。见图 3。

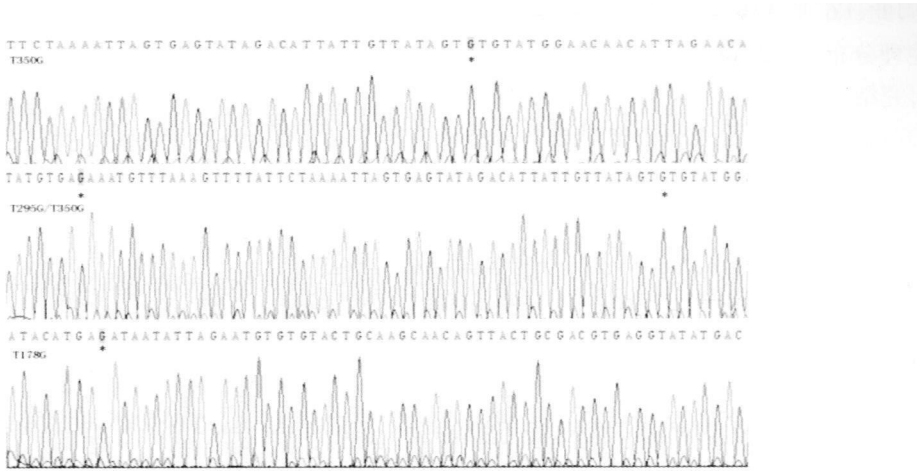


图 3 HPV16 E6 突变株 178 nt、295 nt 和 350 nt 处碱基突变测序峰图 (*: 突变碱基位置)

在 91 例样品中, 有 49 例样品 (53.8%) 350 nt 处碱基 T 突变为 G, 核苷酸三联密码由 TIG 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 (I83V)。另外 2 个位点的突变分别位于 E6 蛋白第 25 位和 64 位氨基酸, 均为天冬氨酸变为谷氨酸 (D25E、D64E)。其中发生 D64E 突变的 2 例样品同时存在 I83V 突变。利用 DNAMAN 软件, 与 HPV16 标准株 E6 蛋白氨基酸参考序列进行比对。参见表 1、图 4。

表 1 91 例维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 E6 基因突变分布表

碱基突变位置	E6 蛋白氨基酸突变及位置	突变例数	所占比例 (%)
178 nt T→G	D25E	4	4.39
295 nt T→G	D64E	2	2.20
350 nt T→G	I83V	49	53.80

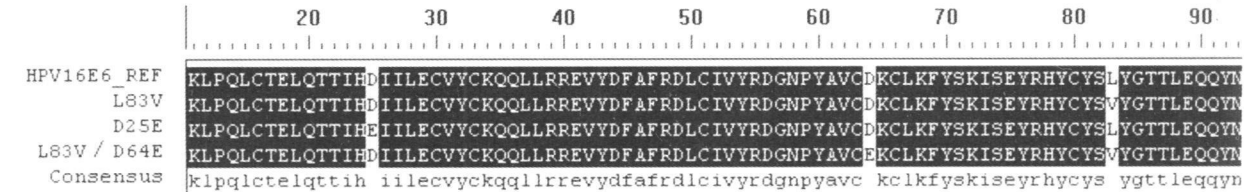


图 4 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 变异株与参考株 E6 蛋白氨基酸序列比较

3 讨论

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一, 与新疆维吾尔族妇女宫颈癌发病密切相关是 HPV16 型感染。HPV16 基因组包括早期转录基因 E1 ~ E7 和晚期转录基因 L1 与 L2。引发宿主细胞癌变的主要是病毒的早期基因 E6 和 E7。E6 和 E7 基因在宫颈细胞中的表达增加, 产生的 E6 和 E7 两个癌蛋白分别与抑癌蛋白 p53 和 pRb 结合, 诱导后两者降解, p53 和 pRb 的失活是细胞永生化的重要原因^[2]。

HPV16 E6 基因常发生型内变异, 欧美地区流

行的 HPV16 E6 变异株主要是 G350 (I83V)^[6], 而东亚地区主要是 G178 (D25E)^[7]。某些特定的 HPV 变异株的感染会增加发生宫颈高度病变的风险, 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^[8-9]。

E6 基因序列的改变可能引起病毒 DNA 的功能区域或抗原决定簇区域的改变。这些改变对于病毒蛋白功能以及宿主免疫反应均十分重要。病毒抗原是由宿主 HLA I / II 呈递给 T 细胞的, 因此, HPV 和 HLA 基因组多态性均能对这一过程产生影响。一些 E6 变异株含有 T 细胞受体或 HLA 结合区的核

苷酸改变,从而使变异株有可能逃脱自然免疫反应^[19]。因此,E6基因变异株的致癌危险性往往在人种和地理分布上不均衡。

本研究结果显示,维吾尔族妇女宫颈癌组织中,HPV16 E6的变异主要是 I83V(53.8%),I83V变异株所占比例远远高于前期小样本的结果(34.62%)^[4]。同时,本组维吾尔族妇女宫颈癌组织中还存在东亚流行的 D25E(4.39%)变异,而在前期文献中没有报道。此外,发现存在 I83V D64E(2.2%)两处变异的 HPV16变异株。

新疆维吾尔族妇女宫颈癌的患病率和死亡率在全国少数民族中居首位。维吾尔族妇女宫颈癌发生,除了与 HPV16的感染有关,还可能与 HPV16变异以及维吾尔民族的遗传背景相关。本研究结果提示,在维吾尔族妇女宫颈癌组织中,存在较多的 HPV16 I83V变异株。该变异株是否与维吾尔族 HLA多态性存在一定的相互作用,从而在宫颈癌的发生中更具风险性,还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Nicolas FS, Andrea T, Eljane DE, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Int J Cancer* 2003, 103(4): 519—524.
- [2] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer [J]. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16(1): 1—17.
- [3] 古扎丽努尔·阿不力孜,彭芝兰,刘珊玲,等. HPV及其亚

型在四川西北地区汉族及新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中的差异表达 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(5): 408—409.

- [4] 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型 E6基因突变分析 [J]. *癌症*, 2004, 23(9): 1016—1020.
- [5] Brule AJ, Pol R, Fransen D, et al. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes [J]. *J Clin Microbiol* 2002, 40(3): 779—787.
- [6] DelRegio GLM, Lavie JM, Teran MA, et al. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer [J]. *J Clin Virol* 2004, 29(2): 95—98.
- [7] Kang S, Jeon YT, Kim W, et al. Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical tissues of Korean women [J]. *Int J Gynecol Cancer* 2005, 15(1): 107—112.
- [8] Tomesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer [J]. *J Med Virol* 2004, 74(1): 117—126.
- [9] Martha G, Guillaume B, Christine C, et al. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, 15(4): 820—822.
- [10] Zehbe I, Mytilineos J, Wikström J, et al. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women [J]. *Hum Immunol* 2003, 64(5): 538—542.

收稿日期: 2007—08—13 修回日期: 2007—12—05