

人乳头状瘤病毒 58 型 L1 基因序列测定及同源性分析*

涂海健¹, 俞柳敏¹, 李励军², 陈智伟³(莆田学院附属医院: 1. 检验科; 2. 妇产科; 3. 病理科, 福建莆田 351100)

【摘要】 目的 了解莆田地区人乳头状瘤病毒(HPV)58 型 L1 基因结构特点和变异规律, 为临床治疗和预防提供理论依据。方法 采用核酸分子快速流杂交基因分型芯片(HybriMax)进行 HPV 基因分型, 随机选 4 例 HPV 58 型阳性标本, 进行基因克隆测序; 进一步用 DNASTAR, clustalx 2.0 和 Mega5.0 软件对测序结果与 GenBank 中发布的其他国家及国内的 32 株 HPV 58 型病毒株 L1 基因核苷酸和氨基酸序列建立同源性矩阵并分析, 同时进行进化树构建。结果 4 株 HPV 58 型病毒株之间的核苷酸同源性为 96%~98%, 氨基酸同源性为 92%~98%; 1986 年法国株之间的核苷酸同源性为 83%~86%, 氨基酸同源性为 84%~89%; 1987 年英国株之间的核苷酸同源性为 53%~54%, 氨基酸同源性为 39%~42%; 国内 2010 年香港分离株、2004 年江苏分离株之间核苷酸的同源性为 96%~100%, 氨基酸同源性为 92%~99%。从构建系统进化树图可以看出, 4 株本地区 HPV 58 型病毒株分别与上海和香港 EV999963、DQ057326、HM639611 病毒株基因背景最紧密。结论 本地区 HPV 58 型 L1 基因具有一定的区域性特点。

【关键词】 人乳头状瘤病毒; 基因型; 同源性; 基因序列

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.23.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)23-3108-02

Sequencing and homology analysis on human papillomavirus type 58 L1 gene* TU Hai-jian¹, YU Liu-min¹, LI Li-jun², CHEN Zhi-wei³ (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Gynecology and Obstetrics; 3. Department of Pathology, Affiliated hospital of Putian University, Putian, Fujian 351100, China)

【Abstract】 Objective To understand the structure and variation regulation of human papillomavirus(HPV) type 58 L1 gene in Putian city, Fujian province, in order to provide theoretical basis for clinical treatment and prevention. Methods Nucleic acids rapid diversion genotyping chip(HybrMax) was used in HPV genotype. Four strains of type HPV58 positive samples was randomly selected, then cloned and sequenced; further results sequenced and 32 strains of HPV type 58 virus strains L1 gene nucleotide sequence in Gen Bank were used to establish homology matrix, analyzed and build phylogenetic tree construction by DNASTAR, clustalx 2 and Mega5.0 software. Results The gene of these four strains of HPV virus type 58 strains shared highly homology 96%—98% in nucleotide with each other, 92%—98% in protein level too; with 1986 French line, nucleotide homology is 83%—86%, the homology of amino acid is 84%—89%; with 1987 the British lines, nucleotide homology is 53%—54%, the amino acid sequence is 39%—42%; with separation and the 2010 Hongkong, 2004 Jiangsu isolates nucleotide strains, homology is 96%—100%, the homology of amino acid is 92%—99%, the highest homology. From the phylogenetic tree diagram, the gene background of these 4 strains of HPV58 virus in the region and that of the EV999963, DQ057326, HM639611 strains virus from Shanghai, Hongkong were most closely. Conclusion The region type HPV58L1gene has certain regional characteristics.

【Key words】 human papilloma virus; genotype; homology; gene sequence

人乳头状瘤病毒(HPV)58 型是一种高危型的 HPV 病毒, 与宫颈癌的发生密切相关。流行病学研究表明, 亚洲地区 HPV 58 型的感染率明显高于世界其他地区, 而我国特别是东南省 HPV 58 型仅次于 HPV 16 型^[1-3]。目前, 国内外对 HPV 58 型的研究较少, 基于 HPV 58 型在我国妇女宫颈癌发生的特殊位置, 本文对莆田地区 HPV 58 型基因结构及同源性进行研究, 为明确 HPV 58 型流行病学特点和运用免疫学预防 HPV 58 型感染的相关疾病提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 采集本院妇产科门诊的女性宫颈疾病患者的宫颈脱落细胞, 采用核酸分子快速流杂交基因分型芯片(HybriMax)进行 HPV 基因分型, 随机选 4 份 HPV 58 型阳性标本, 进行基因克隆测序。

1.2 仪器及试剂

1.2.1 仪器 HybriMax 医用核酸分子快速杂交仪 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪, ABI 3730 基因序列分析仪, JY200C-电泳仪, CHB-1200 加热模块, TCL-18R、HC-3018R 高速冷冻离心机。

1.2.2 试剂 HPV 基因分型试剂: 细胞提取裂解试剂、HPV 聚合酶链反应(PCR)试剂、杂交试剂由潮州凯普生物化学有限公司提供; 测序试剂: Qiagen 公司的 QIAamp MinElute Virus Spin, Qiagen 公司的 Taq PCR。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取 使用 Qiagen 公司的 QIAamp MinElute Virus Spin 进行 HPV 核酸提取, 按试剂盒说明书操作, 提取宫颈脱落细胞标本的 DNA。

* 基金项目: 福建省莆田市科技立项项目[2009S09(1-2)]。

1.3.2 HPV 58 型 L1 短基因扩增和型别鉴定 以标本 DNA 为模板,用 L1 通用引物上游引物 MY09 :5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC-3',下游引物 MY11:5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG-3',由上海英骏生物技术公司合成,行 PCR 扩增,扩增片段为 450 bp。扩增参数为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 15 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共 40 循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,纯化后送达安基因公司测序用 Blast 软件进行型别鉴定。

1.3.3 HPV 58 型 L1 基因克隆及序列测定 PCR 产物经凝胶纯化试剂盒纯化,将扩增的目的片段克隆至 PMD 18-T 载体 (Takara 公司)中,转化于 *E. coli* DH5 α 株,挑选单克隆菌株,PCR 扩增鉴定阳性的菌株送交上海英骏生物技术公司进行 L1 基因序列测定。

1.3.4 同源性分析 用 DNASTAR 中的 Editseq, clustalx 2.0 和 Mega5.0 软件对测序结果与 GenBank 中发布的其他国家及国内的 32 株 HPV 58 型病毒株 L1 基因核苷酸和氨基酸序列建立同源性矩阵并分析,同时进行进化树构建。

2 结 果

2.1 检出 HPV 58 型情况 采用核酸分子快速流杂交基因分型芯片 (HybriMax) 对 345 例女性宫颈疾病患者进行 HPV 基因型的检测,检出 HPV 阳性型别频数为 204 次,其中高危型 HPV 58 型检出频率 11.8%,仅次于 HVP16 型的 13.2%。

2.2 HPV 58 型 L1 基因扩增琼脂糖凝胶电泳和型别鉴定 4 份 HybriMax 测定 HPV 58 型阳性标本 L1 基因扩增后,PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,见图 1。经测序后用 Blast 软件与 GenBank 中 HPV 58 型病毒株 L1 基因核苷酸对比: query coverage 99%,Max ident 98%~100%。

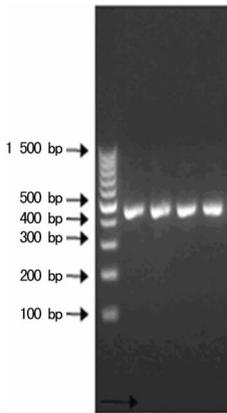


图 1 HPV 58 型 L1 基因扩增琼脂糖凝胶电泳图 450 bp

2.3 HPV 58 型 L1 基因克隆及序列测定 见图 2。

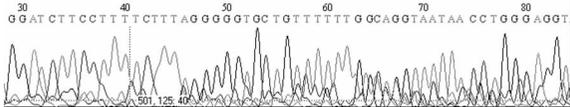


图 2 HPV 58 型 L1 部分基因序列

2.4 HPV 58 型病毒株 L1 基因序列同源矩阵分析及进化树构建 见图 3。4 株 HPV 58 型病毒株之间的核苷酸同源性为 96%~98%,氨基酸同源性为 92%~98%;1986 年法国株之间的核苷酸同源性为 83%~86%,氨基酸同源性为 84%~89%;1987 年英国株之间的核苷酸同源性为 53%~54%,氨基酸同源性为 39%~42%;国内 2010 年香港分离株、2004 年江苏分离株之间核苷酸的同源性为 96%~100%,氨基酸同源性为 92%~99%。从构建系统进化树图可以看出,4 株本地区

HPV 58 型病毒株分别与上海和香港 EV999963、DQ057326、HM639611 病毒株基因背景最紧密。

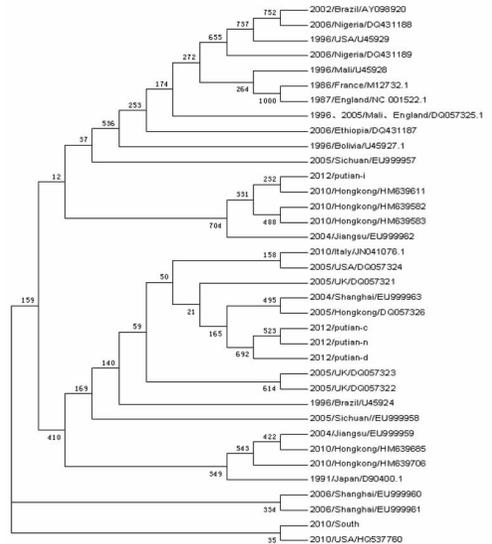


图 3 HPV 58 型 L1 基因核苷酸序列系统进化树

3 讨 论

L1 基因是乳头瘤病毒晚期结构蛋白基因具有较强的抗原性和免疫原性,可刺激机体 B 细胞产生中和抗体,从而阻断病毒感染,因而 L1 蛋白是防治 HPV 感染基因工程疫苗研究的重要靶抗原。研究证实,不同地域间 HPV L1 基因存在变异现象^[4];所以本文将 4 株莆田地区 HPV 58 型病毒株与 GenBank 中发布的其他国家及国内的 32 株 HPV 58 型病毒株核苷酸和氨基酸序列建立同源性矩阵,并用邻接法构建 L1 基因进化树。

4 株本地区 HPV 58 型病毒株从生物信息学的角度分别与上海和香港 EV999963、DQ057326、HM639611 病毒株基因背景最紧密。这与李燕云等^[5]报道国内上海、江苏、香港的 HPV 58 型序列与国外日本、菲律宾等东南亚洲株同源结论相符。

HPV 58 型 L1 基因核苷酸序列同源矩阵分析结果显示,4 株 HPV 58 型病毒株之间的核苷酸同源性为 96%~98%,氨基酸同源性为 92%~98%;1986 年法国株之间的核苷酸同源性为 83%~86%,氨基酸同源性为 84%~89%;1987 年英国株之间的核苷酸同源性为 53%~54%,氨基酸同源性为 39%~42%;国内 2010 年香港分离株、2004 年江苏分离株之间核苷酸同源性为 96%~100%,氨基酸同源性为 92%~99%。由此表明本地区所克隆的 4 株 HPV 58 型 L1 基因的核苷酸和氨基酸序列变异程度在文献报道的范围内具有较高的同源性,而与欧洲株比较同源性存在较大变异性,国内特别是东南地区同源性最高。

综上所述,本地区分离 HPV 58 型病毒株基因背景相同,与上海、江苏、香港等病毒株具有较高的同源性,也进一步说明了 HPV 58 型感染存在迁移性和地域差异^[5]。本研究结果对开发适合本区域的宫颈癌疫苗有一定指导意义。

参考文献

[1] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papilloma-virus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2003, 88(1): 63-73. (下转第 3135 页)

表 2 PCOS 患者治疗前后临床和生化特征比较 ($\bar{x} \pm s, n=100$)

组别	BMI(kg/m ²)	WHR	FSH(U/L)	LH(U/L)	TSTO(μ g/L)	E2(μ g/L)	P(μ g/L)	PRL(μ g/L)
治疗前	24.25 \pm 3.97	0.79 \pm 0.15	7.35 \pm 2.02	16.37 \pm 4.62	3.02 \pm 0.36	112.85 \pm 39.75	0.58 \pm 0.22	17.28 \pm 8.54
治疗后	23.17 \pm 2.89 [#]	0.72 \pm 0.11 [#]	7.21 \pm 1.79 [#]	8.53 \pm 3.16*	1.46 \pm 0.39*	110.48 \pm 35.28 [#]	0.57 \pm 0.18 [#]	16.92 \pm 7.89 [#]

注:与治疗前比较,* $P<0.05$,[#] $P>0.05$ 。

2.2 PCOS 患者治疗前后性激素比较 见表 2。

3 讨 论

PCOS 最初由 Stein 和 Leventhal 在 1935 年以 Stein-Leventhal 综合征描述,它是青春期育龄妇女常见的内分泌疾病,也是导致不孕症的原因之一^[3-4]。正常情况下,在下丘脑促性腺激素释放激素以及卵巢雌激素的负反馈作用共同调控下,腺垂体分泌 FSH 和 LH 并作用于卵巢,形成下丘脑-垂体-卵巢轴(HPO 轴)。FSH 是促进卵泡生长发育的主因之一,并参与优势卵泡的选择。LH 能诱发排卵,促进雄激素合成^[5]。

本研究结果显示,实验组 LH、TSTO 与对照组相比差异有统计学意义,FSH 等其他性激素两组差异不大。这说明 PCOS 发生原因与 LH、TSTO 的血清浓度改变有重要关系^[6];在分析肥胖与这两种激素水平的关系后发现,LH、TSTO 与 PCOS 患者的肥胖程度没有太大的关联。实验组经过达英-35 联合二甲双胍治疗后,LH、TSTO 水平均有明显下降,更加证实了二者在 PCOS 发病中的作用。由此可见在青春期高雄激素血症患者中,通过胰岛素增敏剂、抗雄激素药物以及口服避孕药治疗高雄激素血症,对维护 HPO 轴正常功能、降低成年期 PCOS 风险均有积极意义,与国外报道相一致^[7]。

在 PCOS 患者中,排卵障碍导致雌、孕激素缺乏周期性变化,引起下丘脑对孕酮的负反馈调节敏感度降低,因此卵巢对 LH 分泌的负反馈作用减弱^[8];另一方面,PCOS 患者促性腺激素释放激素分泌频率增加,更有利于 LH 的合成与分泌。由于 LH 的分泌增加,过高的 LH 驱动雄激素合成,进一步干扰 HPO 轴,形成恶性循环^[9-10]。PCOS 患者中过高的雄激素主要来源于卵巢和肾上腺,而肝脏、脂肪组织中的 5 α 还原酶活性增强,可将睾酮转化为不可被芳香化的双氢睾酮,进一步加重高雄激素血症的形成^[11]。由于雄激素过多,双侧卵巢则易增大并持续不排卵,临床表现则为肥胖、不孕、闭经等^[12-13]。在 PCOS 患者中,痤疮、多毛等高雄激素的体征可一直持续到绝经后期。因此,LH、TSTO 水平增高是有一定病理生理基础的,更加说明了二者在 PCOS 诊断中的临床意义。然而 PCOS 的表现较为复杂,性激素水平测定仅是其辅助诊断的方法之一,还应结合病史、体征以及其他检查方法,如 B 超、空腹胰岛素检测等进行综合分析^[14]。

总的来说,在年轻 PCOS 患者中常伴有性激素的分泌异常,尤其以 LH、TSTO 的升高多见,具有很高的临床意义,但 PCOS 的诊断仍需联合其他检查方法。

参考文献

[1] 廖彩韵,梁晓燕.多囊卵巢综合征的病理生理[J].广东医学,2013,34(1):9-11.

[2] The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril,2004,81(1):19-25.

[3] Archer JS,Chang RJ. Hirsutism and acne in polycystic ovary syndrome[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004,18(9):737-754.

[4] 杨冬梓,陈晓莉.青春期多囊卵巢综合征的诊治进展[J].中国实用妇科与产科杂志,2010,26(7):549-553.

[5] 于传鑫.实用妇科内分泌学[M].2版.上海:复旦大学出版社,2004:50-51.

[6] 陈兰荪.多囊卵巢综合征 256 例治疗体会[J].当代医学,2008,14(17):52-53.

[7] Flannery CA,Rackow B,Cong X,et al. Polycystic ovary syndrome in adolescence: impaired glucose tolerance occurs across the spectrum of BMI[J]. Pediatr Diabetes, 2013,14(1):42-49.

[8] 陈晓红,潘玉红.多囊卵巢综合征发病机制的研究进展[J].医学综述,2012,18(20):3444-3447.

[9] Franks S,Stark J,Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod Update,2008,14(4):367-378.

[10] Tsai YH,Wang TW,Wei HJ,et al. Dietary intake, glucose metabolism and sex hormones in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) compared with women with non-PCOS-related infertility[J]. Br J Nutr,2013,109(12):2190-2198.

[11] Landay M, Huang A, Azziz R. Degree of hyperinsulinemia, independent of androgen levels, is an important determinant of the severity of hirsutism in PCOS[J]. Fertil Steril,2009,92(2):643-647.

[12] 周乔芳.多囊性卵巢综合征患者临床特点与并发症综合征的相关性分析[J].中国现代医生,2011,49(16):44-45.

[13] 熊红萍,李仙东.多囊卵巢综合征痰证病理与胰岛素抵抗、性激素关系的研究[J].现代中西医结合杂志,2009,18(1):13-14,16.

[14] 王秀梅.血清睾酮水平改变对多囊卵巢综合征的诊断价值[J].中国卫生检验杂志,2009,19(12):2859-2860.

(收稿日期:2013-04-07 修回日期:2013-07-17)

(上接第 3109 页)

[2] Wu Y,Chen Y,Li L,et al. Associations of high-risk HPV types and viral load with cereical cancer in China[J]. J Clin Virol,2006,35(3) 264-269

[3] Lai CH,Huang H J,Hsueh S,et al. Human papillomavirus genotype in cervical cancer: a population-based study [J]. Int J Cancer,2007,120(9):1999-2006.

[4] Icenogle JP,Sathya P,Miller DL,et al. Nucleotide and a-

mino acid sequence variation in the L 1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16 [J]. Virology,1991,184(1):101-107.

[5] 李燕云,李作峰,何以丰,等.人乳头瘤病毒 58 型的系统地理学分析[J].中国科学 C 辑:生命科学,2009,7(7):654-661.

(收稿日期:2013-04-11 修回日期:2013-07-05)