

# 成都地区 HPV-33 E6/E7 多态性分析

陈祖翼<sup>1</sup>, 丁显平<sup>1,2△</sup>, 景亚玲<sup>1</sup>, 文强<sup>1</sup>, 张顺<sup>1</sup>, 曹曼<sup>1</sup> (1. 四川大学生命科学学院遗传医学研究所, 特色生物资源研究与利用川渝共建重点实验室, 成都 610041; 2. 重庆市南川生物技术研究院 408400)

**【摘要】** 目的 研究四川地区人乳头瘤病毒(HPV)的 33 E6/E7 基因变异情况, 为 HPV 的防治提供分子水平的数据。方法 用 PCR 方法扩增 HPV 阳性患者宫颈刷脱细胞中 HPV-33 E6/E7 基因, 测序并与 GenBank 的参考序列对比寻找变异位点, 对变异进行初步分析。结果 与参考序列相比, 成都地区 HPV-33 E6 基因变异率为 56.00% (28/50), HPV-33 E7 基因变异率为 54.00% (27/50)。结论 CINⅢ/CC 样品中 HPV-33 E6/E7 序列变异程度比宫颈炎中更高, 序列突变可能增加患宫颈癌风险。

**【关键词】** 宫颈癌; 人乳头瘤病毒; 变异

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.22.027 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)22-3364-02

**Analysis on HPV-33 E6/E7 polymorphism in Chengdu area** CHEN Zu-yi<sup>1</sup>, DING Xian-ping<sup>1,2△</sup>, JING Ya-ling<sup>1</sup>, WEN Qiang<sup>1</sup>, ZHANG Shun<sup>1</sup>, CAO Man<sup>1</sup> (1. Research Institute of Genetic Medicine, School of Life Science, Sichuan University, Bio-Resource Research and Utilization Joint Key Laboratory of Sichuan and Chongqing, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Nanchuan Biotechnology Academy, Chongqing 408400, China)

**【Abstract】** Objective To investigate human papillomavirus(HPV)33 E6/E7 gene variation in Chengdu area to provide the molecular level data for the prevention and treatment of HPV infection. Methods The HPV-33 E6/E7 genes in cervical exfoliated cells from the patients with HPV positive were amplified by PCR. The results were sequenced and compared with referencel sequence in GenBank for finding the mutant sites. Then the variations were preliminarily analyzed. Results Compared with the reference sequence, the variation rate of HPV-33 E6 in Chengdu area was 56.00% (28/50) and which of HPV-33 E7 was 54.00% (27/50). Conclusion The variation degree of HPV-33 E6/E7 in CINⅢ/CC sample is higher than that in cervicitis, the sequence mutations may increase the risk suffering from cervical cancer.

**【Key words】** cervical cancer; human papillomavirus; variation

人类乳头瘤病毒(HPV)是一种双链闭合环状小 DNA 病毒, 人是其唯一宿主<sup>[1]</sup>。HPV 亚型按照其与癌症的相关性, 分为高危型和低危型, 其中 HPV-16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68 和 73 等被认为是高危型, 可引发恶性肿瘤<sup>[2]</sup>。HPV 的分布及病毒基因序列的分布都有地域性差异, 在不同地区都存在一定的变异株<sup>[3]</sup>。HPV 功能基因核酸变异有可能引起病毒功能区氨基酸的变化, 从而改变病毒基因的功能, 与病毒的持续感染、肿瘤的发生、发展相关<sup>[4-6]</sup>。HPV-33 在成都地区是排名第 4 的常见高危亚型, 而且其感染率有上升趋势<sup>[5-6]</sup>。目前国内对于 HPV-33 的研究很少, 本试验调查了成都地区 HPV-33 E6/E7 序列的突变情况, 并对一些突变位点进行了对比分析, 旨在为 HPV-33 感染的防治提供一些流行病学数据。

## 1 资料与方法

**1.1 样品来源** 2012~2014 年间共收集 HPV-33 阳性样品 50 例, 其中宫颈上皮内瘤变(CINⅢ)和宫颈癌(CC)样品 13 例, 宫颈炎 37 例。样品主要通过成都地区部分医院、医师联合采集(样品由四川省肿瘤等医院确诊, 由成都妇女儿童、安琪儿、维多利亚女子、金沙、生殖专科、阳光、天府、锦江妇幼、丽人、棕南等医院联合采集)。

**1.2 仪器与试剂** PCR 扩增仪(杭州朗基公司), 微量移液器(上海大龙医疗设备有限公司), 生物安全柜(安徽航天生物科技公司), GSG-2000 核酸/蛋白凝胶图像分析系统(珠海黑马医学仪器有限公司), HPV 基因提取试剂盒(亚能生物技术有限公司), Pfu DNA 聚合酶(生工生物工程有限公司)。

**1.3 引物设计** 以 Genbank: M12732.1 为参考序列, 用 Primer5 设计巢式 PCR 引物, 外引物: 前引物 5'-AAA AAA GTA GGG TGT AAC CGA-3', 后引物 5'-TGC CAC TGT CAT CTG CTG T-3'; 内引物: 前引物 5'-ACG GTG CAT ATA TAA AGC AAA CAT T-3', 后引物 5'-CTT CTA CCT CAA ACC AAC CAG TAC A-3'。

## 1.4 方法

**1.4.1 HPV DNA 提取** 取宫颈细胞保存液 1 mL 加入离心管, 离心吸去上清液, 按照试剂盒加入裂解液提取 HPV DNA。

**1.4.2 PCR 扩增** (1)PCR 体系: Buffer(含 MgCl<sub>2</sub>) 2.5 μL, dNTPs 2 μL, 引物各 1.25 μL, DNA 聚合酶 0.25 μL, DNA 样品 5 μL, 加无菌双蒸水至 25 μL。(2)扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 53 °C 退火(内引物 57 °C 退火) 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环。最后 72 °C 延伸 5 min。(3)用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。其后将样品送生工生物工程有限公司测序。

## 2 结果

**2.1 HPV-33 E6** 研究结果显示与参考序列(Genbank: M12732.1)相比, 成都地区 HPV-33 E6 基因变异率为 56.00% (28/50), 共检出突变位点 15 种, 其中 3 种(A272G, T549C, A552C)不导致氨基酸改变。突变 A129C(E7D)、A213C(K35N)、G329C(S74T)、A364C(N86H)、G373A(K89N)、A387C(K93N)、G413C(R102T)、A446G(Q113R)、A446T(Q113L)、G508A(G134R)、G542T(R145I)、G544C(E146Q)均导致氨基酸改变。在宫颈癌样品中 HPV-33 E6 突变率为

76.92%(10/13),在宫颈炎样品中 HPV-33 E6 突变率为 48.65%(18/37)。

**2.2 HPV-33 E7** 研究结果显示与参考序列相比成都地区 HPV-33 E7 基因变异率为 54.00%(27/50),共检出突变位点 13 种,突变 G612T(D14Y)、G658C(S29T)、G669T(D33Y)、G674T(E34D)、G705A/C706T/A707T(A45I)、C706A(A45V)、G765A/T766C(V65T)、A780T(N70Y)、A792T(S74C)、A862T(Q97L)均导致氨基酸改变。在宫颈癌样品中 HPV-33 E7 突变率为 75.00%(9/12),在宫颈炎样品中 HPV-33 E7 突变率为 47.37%(18/38)。

### 3 讨 论

宫颈癌是一种在世界范围内常见的妇女恶性肿瘤,宫颈癌在女性常见恶性肿瘤中排名第 2,仅次于乳腺癌,其发病率高达 187/1 000 000,高危型 HPV 持续感染被认为是导致女性宫颈癌最主要的因素之一<sup>[2]</sup>。世界范围内每年大概有 50 万新增宫颈癌患者<sup>[7]</sup>,其中因 HPV-33 感染导致的宫颈癌占 5%<sup>[8]</sup>。

HPV 相对分子质量约为 8 000,其基因包括 8 个开放式阅读框,按功能可分为 3 个结构域:早期蛋白编码区(ER)、晚期蛋白编码区(LR)和上游调控区(URR)<sup>[1]</sup>。E1 和 E2 为调控蛋白,调控转录和复制,E4 与病毒成熟胞浆蛋白有关;早期蛋白 E5、E6、E7 为原癌基因,行使调控细胞转化的功能;L1 和 L2 基因分别编码 HPV 的主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白,组装成 HPV 的衣壳;URR 位于 E 区与 L 区之间,序列保守性较小,含有病毒基因组 DNA 的复制起点和基因表达所必需的调控元件<sup>[9]</sup>。E6 和 E7 是 HPV 最重要的两个功能基因,高危型 HPV 的 E6 蛋白能抑制 p53 的活性,E7 能使细胞往永生生化方向转化<sup>[10]</sup>。HPV E6 和 E7 序列变异会在一定程度上改变蛋白的功能,增强或减弱病毒的致病性<sup>[3,11]</sup>。宫颈癌的发生与病毒的变异、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相关,高危型 HPV 功能基因变异与病毒的持续性感染和反复感染以及病毒 DNA 在宫颈癌组织中的高拷贝数相关<sup>[3,12]</sup>。从试验结果中发现,HPV-33 E6/E7 基因在宫颈癌中的突变率与在宫颈炎中的突变率不同且前者高于后者,且在宫颈炎和 CINⅢ/CC 中不同病毒株的检出比例也不尽相同,说明基因突变会使 HPV E6/E7 基因的致癌性改变。

一项研究统计了全球性的 HPV-33 E6/E7 序列分析(其中中国只有 6 例阳性样品)<sup>[11]</sup>,其结果与成都地区序列变异调查结果差别较大,E6 基因中共同存在的突变位点只有 A213C 和 A273G,而 E7 基因的突变经对比则没有发现相同位点,提示 HPV-33 变异序列的分布有地域性差异。

一些研究显示存在 I73L、V83L、K93N 和 A138V 的 HPV-33 E6 基因在抑制 p53 活性的能力上更加突出<sup>[13]</sup>,本研究中仅发现了 K93N(A387C)的突变位点。对于 HPV-33 E6 基因,除了 K93N,值得注意的还有 K35N、N86H、E89K、R102T、Q113R 和 R145I,存在这些变异的病毒株在宫颈癌样品中的检出数都明显高于在宫颈炎样品中的检出数。对于 HPV-33 E7 基因,值得注意的是 D14Y、S29T、A45V、A45I、V65T、N70Y 和 Q97L,存在这些变异的病毒株在宫颈癌样品中的检出数都明显高于在宫颈炎样品中的检出数。

成都地区 HPV-33 E6/E7 基因变异程度较高,在研究例如 RNA 干扰等针对 HPV E6/E7 基因的治疗手段时,需要考虑针对优势变异株如 E6 G542T 的碱基改变进行治疗效果的优化。

HPV 变异株数据库对于其诊断、疫苗制备及其他治疗方法的研究都具有深远意义。本试验针对中国成都地区 HPV-

33 亚型 E6 和 E7 基因进行了多态性分析。该数据补充并拓展了早期对 HPV-33 亚型的研究。在以后的研究中,将会扩大样本量,做一个更全面的关于 HPV-33 基因突变带来的致癌性改变的评估。

### 参考文献

- [1] Godínez JM, Heideman DA, Gheit T, et al. Differential presence of Papillomavirus variants in cervical cancer: an analysis for HPV33, HPV45 and HPV58[J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 13(1): 96-104.
- [2] Liu JH, Lu ZT, Wang GL, et al. Variations of human papillomavirus type 58 E6, E7, L1 genes and long control region in strains from women with cervical lesions in Liaoning province, China[J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(7): 1466-1472.
- [3] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A Review of human carcinogens-part B: biological agents[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(4): 321-322.
- [4] Liu SQ, Tian YX, Greenaway FT, et al. A C-terminal hydrophobic, solvent-protected core and a flexible N-terminus are potentially required for human papillomavirus 18 E7 protein functionality[J]. *Biochimie*, 2010, 92(7): 901-908.
- [5] Guan P, Howell-Jones R, Li N, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women; a meta-analysis from cervical infection to cancer[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(10): 2349-2359.
- [6] 聂双双, 丁显平, 陈祖翼, 等. 成都地区人乳头瘤病毒感染亚型、年龄分布、多重感染及相关趋势研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(22): 3026-3028.
- [7] Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, et al. The role of heparan sulfate in HPV attachment and infection of the murine female genital tract[J]. *J Virol*, 2008, 83(5): 2067-2074.
- [8] Chen AA, Heideman DA, Boon D, et al. Human papillomavirus 33 worldwide genetic variation and associated risk of cervical cancer[J]. *Virology*, 2014, 448(5): 356-362.
- [9] Ainsworth J, Thomas M, Banks L, et al. Comparison of p53 and the PDZ domain containing protein MAGI-3 regulation by the E6 protein from high-risk human papillomaviruses[J]. *J Virol*, 2008, 82(5): 1-9.
- [10] 张辉, 陈祖翼, 丁显平, 等. 基因芯片分型与实时荧光 PCR 筛查成都地区妇女宫颈 HPV-DNA 感染结果比较[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2014, 22(6): 8-11.
- [11] Chan PK, Zhang C, Park JS, et al. Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(11): 2528-2536.
- [12] 许雪梅. 人乳头瘤病毒及宫颈癌疫苗的研究——解读 2008 年诺贝尔生理学或医学奖[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(10): 1095-1103.
- [13] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation[J]. *Nature Rev Cancer*, 2010, 10(8): 550-560.