

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.16.024

重庆市南川地区 HPV31 E6 基因多态性研究

汪文明, 陈 林, 李跃梅, 周 靖, 丁正林[△]

重庆市南川区人民医院, 重庆 408400

摘要:目的 研究重庆市南川地区人乳头瘤病毒(HPV)31 E6 基因多态性,为 HPV 疫苗设计和 HPV 防治提供依据。方法 采用 PCR 扩增和导流杂交技术检测 HPV31 阳性患者宫颈脱落细胞 HPV31 E6 基因,通过测序并与参考序列对比寻找变异位点。使用 ProPred- I server 和 ABC pred server 分析 HPV31 E6 蛋白的二级结构并寻找理想的 B 细胞免疫表位。结果 与参考序列 HPV31 REF 对比,40 株 HPV31 病毒株中,与参考序列 E6 基因完全一致的病毒株为 10 株,占 25.0%; HPV31 E6 基因突变株 14 株,占 35.0%,其中非同义突变 6 个,同义突变 8 个,主要的非同义突变为 C520T(A138V)和 C285T(H60Y),主要的同义突变为 A321T、G404A、A428G 和 C176T。寻找到理想的 B 细胞免疫表位 10 个,最理想的 HPV31 E6 蛋白 B 细胞预测免疫表位为 441PEEKQRHLDK K KRF455 和 285HG VCTKCLRFYSKVSE301。结论 该地区 HPV31 E6 基因分布呈多态性,该研究数据对 HPV 的防治和疫苗设计有指导价值。

关键词:人乳头瘤病毒; E6 基因; 多态性**中图法分类号:**R446.9**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)16-2354-03

Study on polymorphism of HPV31 E6 gene in Nanchuan area of Chongqing City

WANG Wenming, CHEN Lin, LI Yuemei, ZHOU Jing, DING Zhenglin[△]

Nanchuan District People's Hospital, Chongqing 408400, China

Abstract: Objective To study the gene polymorphisms of human papillomavirus (HPV) 31 E6 gene in Nanchuan area of Chongqing City to provide the evidence for HPV vaccine design and HPV prevention and treatment. **Methods** The HPV31 E6 gene in cervical exfoliated cells from the patients with HPV31 positive were amplified by adopting the PCR amplification and drift hybridization technology. The results were sequenced and compared with reference sequence for finding the variation points. The ProPred- I server and ABC pred server were used to analyze the protein secondary structure of HPV31 E6 and searched the ideal B-cell immune epitopes. **Results** Compared with the HPV31 reference sequence, among 40 strains of HPV31, 10 strains showed completely coincident with the reference sequence, accounting for 25.0%. There were 14 mutant strains of HPV31 E6 gene, accounting for 35.0%, including 6 non-synonymous mutations and 8 synonymous mutations. Major non-synonymous mutations were C520T (A138V) and C285T (H60Y). Major synonymous mutations were A321T, G404A, A428G and C176T. The ideal B-cell immune epitopes were searched out, the most ideal B-cell immune epitopes were 441PEEKQRHLDK K KRF455 and 285HG VCTKCLRFYSKVSE301. **Conclusion** The HPV31 E6 gene distribution in this area shows the polymorphisms and these study data have the guiding value for HPV prevention and treatment, and HPV vaccine design.

Key words: human papillomavirus; E6 gene; polymorphism

宫颈癌是女性第 3 大癌症,每年有超过 500 000 宫颈癌新增病例,每年因宫颈癌死亡者超过 250 000 例,其中超过 80% 的病例发生在发展中国家^[1]。人乳头瘤病毒(HPV)感染与宫颈上皮内瘤变和宫颈癌的发生、发展有密切的关系^[1-2]。目前已经鉴定的 HPV 亚型已经超过 200 种,按其致癌性可以分为低危型和高危型,HPV16、18、31、33、45、52 和 58 是世界范围内最常见的高危型 HPV^[3-4]。E6 基因是 HPV 的主要致癌基因之一,在肿瘤中高度表达,能诱导细胞不断增殖^[5-6]。HPV E6 基因是设计 HPV 治疗性疫苗

的理想靶点^[7]。基因突变可能会带来氨基酸序列的改变,导致蛋白质结构和功能的变化,影响宿主的免疫应答^[3-4]。目前对 HPV 的研究大部分集中在 HPV16 和 HPV18 两个型别上,HPV31 的研究数据非常有限,特别是国内极少有报道。本文将探讨重庆市南川地区 HPV31 E6 基因的多态性,探讨基因变化对 B 细胞免疫表位的影响,预测针对 HPV31 E6 蛋白的最佳 B 细胞免疫表位,为 HPV31 的防治提供信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2016 年 8 月至 2018 年 10 月本

院妇科、产科就诊的门诊及住院女性患者,年龄 14~70 岁。收集患者宫颈脱落细胞筛查为 HPV31 阳性标本 52 例,其中宫颈癌患者 14 例,宫颈炎患者 38 例。标本采集前取得患者知情同意,研究人员承诺保护其隐私。

1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪(美国应用公司),HB-2012A 医用核酸分子快速杂交仪(潮州凯普公司),凝胶成像系统(美国伯乐公司),ABI3500 测序仪(美国应用公司),采样用细胞保存液,HPV 基因分型检测试剂盒(潮州凯普公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 由医生以窥阴器暴露宫颈,用棉拭子将宫颈过多的分泌物擦去,将一次性宫颈脱落细胞采集器置于宫颈口,轻轻搓动宫颈刷使其顺时针旋转 3~5 圈。慢慢取出宫颈刷,将其放入标有患者编号的含细胞保存液的试管中,旋紧试管盖,密闭送检。

1.3.2 HPV DNA 提取 标本中加入 1 mL 生理盐水,振荡洗脱细胞,将液体转移至 1.5 mL 离心管。14 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 400 μ L 细胞保存液,振荡混匀,100 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。加入 400 μ L 细胞保存液,振荡混匀,放置 2 min,14 000 r/min 离心 6 min,弃上清液,加入 60 μ L 细胞裂解液,充分振荡混匀,取上清液 2.0 μ L 作为 PCR 扩增的模板,其余上清液保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.3 PCR 扩增

1.3.3.1 PCR 体系 使用 Primer3.0 软件进行引物设计,选择最佳条件引物(R: 5'-GAAAGTGGT-GAACCGAAAAC-3'; F: 5'-ACTGACAACAAAAG-GTAA-3'),并使用 NCBI 数据库 Primer-Blast 进行比对,产物全长 700 bp,覆盖 HPV31 E6 基因。PCR 体系为缓冲液(含 10 $\times$ MgCl₂)2.50 μ L,dNTPs 2.00 μ L,正反向引物各 1.25 μ L,DNA 聚合酶 0.25 μ L,DNA 样品 2.00 μ L,反应总体积 20.00 μ L。

1.3.3.2 扩增条件 95 $^{\circ}$ C 预变性 9 min;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.3.3.3 HPV DNA 分型 严格按照 HPV 基因分型检测试剂盒(潮州凯普公司)说明书进行分型。

1.3.3.4 HPV DNA 测序 用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。之后将标本送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.3.4 数据分析 测序所得结果与 PapillomaVirus Episteme database 中指定参考序列 HPV31 REF 进行对比,用 DNAMAN5.2.2 进行序列对比,鉴定突变。突变频率 $\geq$ 10%的位点被定义为主要突变。

1.3.5 二级结构分析 在默认设置下使用在线工具 ProPred-I server(<http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/>)分析 HPV31 E6 蛋白二级结构,根据蛋白质结合的各种力,按照力作用从大到小计算,预测可能影

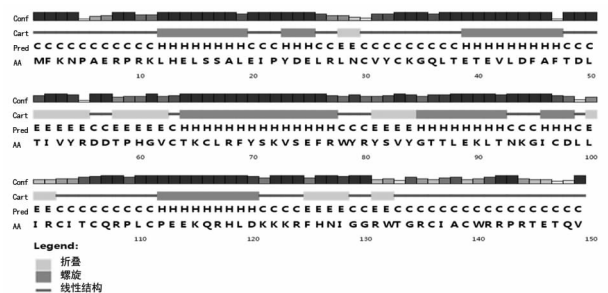
响 HPV31 E6 蛋白二级结构的突变。

1.3.6 细胞表位预测 在默认设置下使用在线工具 ABC pred server(http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)对 HPV31 E6 蛋白 B 细胞表位进行预测,筛选其中分数 $\geq$ 0.85 的优秀预测表位。

2 结果

2.1 HPV31 E6 基因突变 52 例 HPV31 阳性标本中成功测序 40 例,12 例因拷贝数低、DNA 提取液纯度低等原因测序失败。40 例成功测序标本中,和参考序列 HPV31 REF 对比,与参考序列 E6 基因完全一致的病毒株为 10 株,占 25.0%。14 株 HPV31 E6 基因序列发生突变,占 35.0%,发现突变 14 个:T134A、C176T、T248C、C285T(H60Y)、A297G(T64A)、A301G(K65R)、T312C(F69L)、A321T、A326G、T335C、G404A、A428G、A475G(K123R)、C520T(A138V)。其中主要非同义突变为 C520T(A138V)(频率 17/40)、C285T(H60Y)(频率 15/40);主要同义突变为 A321T(频率 17/40)、G404A(频率 15/40)、A428G(频率 13/40)、C176T(频率 10/40)。单个核苷酸突变的频率为 0.6%。

2.2 E6 蛋白二级结构预测结果 根据 HPV31 E6 蛋白二级结构预测结果分析,突变 H60Y 发生在 β 折叠,突变 T64A 发生在 α 螺旋,突变 K65R 发生在 α 螺旋,突变 F69L 发生在 α 螺旋,突变 K123R 发生在卷曲结构,突变 A138V 发生在卷曲结构。HPV31 E6 蛋白二级结构预测见图 1。



注:Conf 为预测确信度;Cart 为折叠、螺旋、线性分配图示;Pred 为折叠、螺旋、线性态预测值;AA 为目标氨基酸序列

图 1 HPV31 E6 蛋白二级结构预测图

2.3 HPV31 E6 蛋白 B 细胞结合位点预测 根据设定的标准(筛选其中分数 $\geq$ 0.85 的优秀预测表位,1 分为满分),共获得了 10 个理想的 HPV31 E6 蛋白 B 细胞免疫表位:441PEEKQRHLDKKKRF455(0.91 分)、285HGVCTKCLRFYSKVSE301(0.91 分)、252DLTIVYRDDTPHGVCT268(0.90 分)、480FHNIGGRWTGRCIACW496(0.89 分)、285HGVCTKCLRFYSKVSEFR303(0.89 分)、318SKVSEFRWYRYSVYGTITLEK338(0.89 分)、267YRDDTPHGVCTKCLRFYSKV287(0.89 分)、507GRCIACWRRPRTE510(0.87 分)、492GGRWTGRCIACWRRPRTE510(0.87

分)、357YGTITLEKLTNKGICDL373(0.85 分)。

3 讨 论

宫颈癌已经成为威胁发展中国家女性最主要的疾病之一,仅仅在中国每年就有超过 130 000 例新增宫颈癌病例^[8]。HPV 是导致宫颈癌的主要病因,HPV31 E6 基因在宫颈癌的发生、发展中起到了重要作用。高危型 HPV31 E6 基因能够抑制肿瘤抑制基因 p53 的活性^[9],激活端粒酶表达,调节 PDZ 结构域蛋白和肿瘤坏死因子的活性^[7,10]。

目前针对 HPV 的疫苗已经有 3 种,分别是 4 价疫苗 Gardasil(抗 HPV6、11、16、18 亚型,Merck 公司,2006 年),2 价疫苗 Cervarix(抗 HPV16、18 亚型,GSK 公司,2007 年)和 9 价疫苗(抗 HPV6、11、16、18、31、33、45、52、58 亚型,Merck 公司,2014 年)^[11]。已经上市的 HPV 疫苗均为预防性疫苗,治疗性 HPV 疫苗正在研发中。因 HPV31 E6 基因的特殊作用,E6 基因有望成为 HPV 治疗性疫苗的理想靶标。HPV 的分布具有地域和人种差异,在不同地域和人种中不同型别 HPV 流行率不一样,同种型别的变异株分布也不一样^[1,7]。HPV 的型内突变能降低预防性疫苗的保护效果以及改变病毒的致病性,增加病毒逃逸风险和增加致癌风险^[4,7]。同时,除了 HPV16、18 外,HPV31 也是一种比较流行的高危型 HPV 亚型。有研究报道,HPV31 可显著增加宫颈上皮高级别病变(CIN2/3)的风险^[12]。因此,综合考虑各种变异株中突变位点的频率,针对主要突变来设计疫苗、探针和治疗方案是十分必要的。

本研究对不同病毒株中的突变频率进行了统计。在针对 HPV31 E6 基因的探针设计中,所有常见突变均必须列入考虑。例如:A321T(频率 17/40)和 C520T(频率 17/40)出现频率远高于参考序列同位置 A321(频率 10/40)和 C520(频率 10/40),在探针设计中应优先考虑 A321T 和 C520T。同样,在 HPV 治疗疫苗的设计中,应首先考虑常见的非同义突变,特别是发生在 β 折叠和 α 螺旋结构的突变。蛋白质功能域多由 β 折叠和 α 螺旋构成, β 折叠和 α 螺旋上的突变能更有效地影响蛋白质的功能,甚至影响 HPV31 E6 基因的致癌功能和免疫逃逸功能。

B 细胞免疫表位的设计在疫苗和诊断方法的研发上具有重要意义。本实验通过工具 ProPred-I server 和 ABC pred server 预测筛选出 10 个理想的 HPV31 E6 蛋白 B 细胞免疫表位,分数最高的表位为 441PEEKQRHLDKKKRF455 和 285HGVCTKCLRFY SKVSE301。其余 8 个免疫表位中,主要非同义突变 H60Y 发生在 285HGVCTKCLRFYSKVSEFR303 和

267YRDDTPHGVCTKCLRFYSKV287 区域内,主要非同义突变 A138V 发生在 507GRCIACWRRPRTETQV 523 区域内,可能会对这 3 个 B 细胞免疫表位产生改变。

综上所述,重庆市南川地区 HPV31 E6 基因分布呈多态性,主要非同义突变为 C520T(A138V)和 C285T(H60Y),主要同义突变为 A321T、G404A、A428G 和 C176T。本研究数据对本地区 HPV31 E6 基因探针、疫苗和治疗方案的设计具有重要指导意义。

参考文献

- [1] CHEN Z, WANG Q, DING X, et al. Characteristics of HPV prevalence in Sichuan Province, China[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2015, 131(3): 277-280.
- [2] 王九兵, 陈祖翼. 川渝地区 HPV-33 L1 和 L2 基因多态性研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(17): 2527-2528.
- [3] CAO M, CHENZHANG Y, DING X P, et al. Genetic variability and lineage phylogeny of human papillomavirus type-16 and-53 based on the E6, E7, and L1 genes in Southwest China [J]. Gene, 2016, 592(1): 49-59.
- [4] CHEN Z, JING Y, QIANG W, et al. L1 and L2 gene polymorphisms in HPV-58 and HPV-33: implications for vaccine design and diagnosis[J]. Virol J, 2016, 13(1): 1-12.
- [5] NAGAYASU E, KIYOFUMI E, HEATHER G. Human papillomaviruses: epithelial tropisms, and the development of neoplasia [J]. Viruses, 2015, 7(7): 3863-3890.
- [6] ROMAN A, MUNGER K. The papillomavirus E7 proteins[J]. Virology, 2013, 445(1/2): 138-168.
- [7] CHEN Z Y, JING Y L, WEN Q, et al. E6 and E7 gene polymorphisms in human papillomavirus types-58 and 33 identified in southwest China[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0171140.
- [8] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [9] 陈祖翼, 丁显平, 景亚玲, 等. 成都地区 HPV-33 E6/E7 多态性分析[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(22): 3364-3365.
- [10] THOMAS M, NARAYAN N, PIM D, et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity[J]. Oncogene, 2008, 27(55): 7018-7030.
- [11] 张婧, 陶霞. HPV 疫苗研究进展及认知度、接受度现状[J]. 中国妇产科临床杂志, 2017, 18(1): 84-86.
- [12] XI L F, SCHIFFMAN M, KOUTSKY L A, et al. Lineages of oncogenic human papillomavirus types other than type 16 and 18 and risk for cervical intraepithelial neoplasia[J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(10): 1-10.

(收稿日期: 2019-01-18 修回日期: 2019-04-17)