

• 论 著 •

宫颈癌组织中 HPV16 URR 基因多态性分析

宋春涵, 高素华, 何旭瑛

(浙江省金华职业技术学院病原生物与免疫学教研室 321017)

摘 要:目的 分析宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型(HPV16)上游调控区(URR)基因多态性。方法 收集宫颈癌组织标本 25 例,提取 DNA 作为模板,聚合酶链反应(PCR)扩增 URR 目的片段,扩增产物直接或构建克隆重组质粒后测序,以 GenBank Blast 软件分析序列。结果 宫颈癌组织标本中,HPV16 检出率为 72%(18/25);检出 10 种 HPV16 URR 核苷酸突变模式,同源性在 98.67%~99.69%之间;检出 3 个 URR 序列中的热突变位点,分别为 G7520A(100.00%)、G7192T(100.00%)和 T7713G(33.33%)。结论 宫颈癌组织中 HPV16 URR 存在多种基因突变类型和模式,可能与病毒致癌潜能及宫颈癌的发生相关。

关键词:宫颈肿瘤; 人乳头瘤病毒 16; 上游调控区; 多态性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.008 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)09-0939-03

Polymorphism analysis of HPV16 URR gene in cervical cancer tissues

Song Chunhan, Gao Suhua, He Xuying

(Department of Medical Microbiology and Immunology, Jinhua Polytechnic, Zhejiang 321017, China)

Abstract:Objective To analyze the polymorphism of HPV16 URR gene from the cervical cancer tissues. **Methods** Tissue DNA were extracted from 25 cervical cancer tissue samples and used as templates to amplify URR gene fragment by using specific primers. PCR products were directly sequenced, or were inserted into vectors and the recombinant plasmids were sequenced. All base sequences were analyzed by GenBank blast software to evaluate gene mutation. **Results** The positive rate of HPV16 in detected cervical cancer tissues was 72%(18/25). 10 patterns of gene mutation of HPV16 URR were detected, the homology of which were between 98.67%—99.69%. Tree most frequently mutated sites were identified, which were G7520A(100.00%), G7192T(100.00%) and T7713G(33.33%). **Conclusion** There are various mutation types and patterns in URR gene of HPV16 from cervical cancer tissues and were likely to be associated with the enhanced oncogenic potential of HPV16 and oncogenesis of cervical cancer.

Key words: uterine cervical neoplasms; human papillomavirus 16; upstream regulatory region; polymorphism

宫颈癌在妇科恶性肿瘤中的发病率仅次于乳腺癌,其发病率和死亡率日益升高且患者年龄逐渐年轻化^[1]。不同基因型别的人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)具有不同的致病能力,不同变异型的高危型别 HPV 的致病能力也可能不同。高危型 HPV16、18 持续感染是诱发宫颈癌最主要的因素,其中 HPV16 在宫颈上皮组织细胞中长期复制能力更强、更易导致宫颈上皮内瘤变,而 HPV16 不同基因变异型有不同的致癌能力^[2-5]。本研究拟通过分析宫颈癌组织中 HPV16 上游调控区(upstream regulatory region, URR)的突变情况,探讨 URR 图片规律及其与宫颈癌发病的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 25 例宫颈癌组织标本取自 2007 年 5 月至 2010 年 5 月本院附属医院,经病理检查确诊,且未接受放化疗的宫颈癌患者;取材后立即置于-80℃条件下保存。

1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、10×聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)缓冲液、三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)混合液、6×上样缓冲液、Minibest 动物组织基因组提取试剂盒、T4 DNA 连接酶、pMD19-T 载体质粒等均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 根据 Seedorf 等^[6]确认的 HPV16 基因组全序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计针对 HPV16 URR 的 1 对引物,上游引物:5'-CTA GAT CAG TTT CCT

TTA GGA CG-3',下游引物:5'-TCT TTT GGT GCA TAA AAT GTC T-3';引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3.2 组织基因组 DNA 提取 按 Minibest 动物组织基因组提取试剂盒 2.0 说明书进行操作。

1.3.3 PCR 扩增 以所提取 DNA 为模板,常规方法扩增 HPV16 URR DNA 片段。反应条件:95℃ 5 min;94℃ 45 s, 55℃ 30 s,72℃ 60 s,35 个循环;72℃ 5 min。

1.3.4 重组质粒构建 将回收的 HPV16 URR PCR 扩增特异性片段与 pMD19-T 载体质粒用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜,所构建重组质粒转化至大肠埃希菌 DH5α 中,氨苄西林和蓝白斑双重筛选,克隆扩增后碱变性法抽提重组质粒。

1.3.5 HPV16 URR DNA 序列测定及分析 以重组质粒为模板进行 HPV16 URR 片段扩增,并以双酶切鉴定质粒,PCR 回收产物和经双酶切鉴定理想的重组质粒由上海英骏生物技术有限公司完成测序;采用 PubMed Blast 将测序结果与 GenBank 所收录德国标准株^[6](登录号:K02718)进行序列比对。

2 结 果

2.1 HPV16 URR PCR 扩增产物分析 25 例标本中 18 例为 HPV16 URR 阳性,PCR 产物琼脂糖凝胶电泳可见大小为 980 bp 的扩增条带,与预期相符,见图 1。

2.2 重组质粒双酶切鉴定 将 HPV16 URR PCR 回收片段与 pMD19-T 载体质粒相连接,重组质粒 Hind III/EcoR I 双酶切产物琼脂糖凝胶电泳可见大小为 445、535、2 692 bp 的 3

个条带,与预期相符,见图 1。

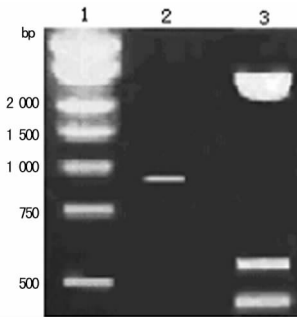
2.3 测序比对分析 所扩增 HPV16 URR PCR 产物序列与标准株对应序列大小一致。18 例阳性标本中共检出 10 种

HPV16 URR 基因突变模式,各模式与 HPV16 标准株比较,同源性在 98.67%~99.69%之间。HPV16 URR 基因突变分析见表 1。

表 1 HPV16 阳性标本 URR 基因突变分析(n=18)

位点	标准株	突变模式										点突变检出率(%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
7122	T	/	/	/	/	/	/	/	/	/	C	16.67
7126	A	/	/	/	G	/	/	/	/	/	/	22.22
7157	G	/	/	/	/	/	A	/	/	/	/	5.56
7173	A	/	/	/	/	/	/	/	C	/	/	5.56
7180	C	/	/	/	/	/	/	/	/	T	/	5.56
7189	T	C	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5.56
7192	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	100.00
7247	T	/	/	/	/	/	/	/	G	/	/	5.56
7256	T	/	/	/	/	/	/	/	/	G	/	5.56
7286	A	/	/	/	/	C	/	/	/	/	/	22.22
7417	A	/	/	/	/	/	/	/	/	T	/	5.56
7430	C	/	T	/	/	/	/	T	/	/	/	11.11
7486	T	/	/	G	/	/	/	/	/	G	/	11.11
7493	T	/	/	/	/	/	/	/	/	C	/	5.56
7520	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	100.00
7713	T	/	G	/	G	/	/	/	/	G	/	33.33
7729	A	/	/	/	/	/	/	/	/	C	/	5.56
7764	C	/	/	/	/	/	/	/	/	A	/	5.56
7789	G	/	/	/	/	/	/	/	/	T	/	5.56
7841	G	/	/	/	/	/	/	/	/	A	/	5.56
7879	T	C	/	/	/	/	/	/	/	C	/	11.11
突变模式检出率(%)	—	5.56	5.56	5.56	22.22	22.22	5.56	5.56	5.56	5.56	16.67	—

/:未检出该类型点突变;—:无数据。



1:标记;2: HPV16 URR PCR 扩增产物;3:重组质粒 *Hind*Ⅲ/*Eco*RⅠ 双酶切产物

图 1 HPV16 URR PCR 扩增产物与重组质粒双酶切产物电泳图

3 讨 论

基因变异有可能导致高危型 HPV 的持续、反复感染和病毒 DNA 拷贝数升高,与宫颈癌的发生密切相关^[7]。URR 具有启动并调控 HPV 癌基因 E6/E7 表达的功能,许多细胞因子和转录因子可通过结合 URR 而调控 E6/E7 的表达,该区域也是 HPV16 发生基因变异的最常见区域^[8-11]。

10 种突变模式中,模式 4 和 5 各占 22.22%(4/18),模式 10 占 16.67%(3/18),其余模式各占 5.56%(1/18),说明本研究所检测的 HPV16 URR 基因存在多种突变模式,以模式 4

和 5 为主;就点突变类型而言,18 例 HPV16 URR 均发生了 G7192T、G7520A 突变,与相关报道一致^[12-13],与 Kurvinen 等^[9]报道的 G7193T、G7521A 突变为同一突变(参考序列不同),说明上述点突变在亚裔美洲型中普遍存在。Schmidt 等^[14]也曾报道有症状宫颈癌患者来源的 HPV16 URR 均发生 G7520A 突变,认为这是该类患者与无症状带毒者主要区别。提示这两种点突变与 HPV 感染性、致病性增强有关。

URR 内顺式作用元件的点突变或缺失突变可通过阻遏结合位点的缺失和(或)激活因子结合能力的增强而增强 URR 的启动活性。Dong 和 Pfister^[15]报道,HPV16 URR 序列中存在 YY1 蛋白结合位点(7 840~7 848 bp)和 SP1 蛋白结合位点(7 842~7 847 bp),两者竞争性结合位点位于 7 843 bp, A7843G 突变可使 P97 活性增加 4~7 倍。突变模式 9 所包括的 G7841A 突变也可改变 P97 启动活性,进而改变 E6/E7 的转录活性。Veress 等^[12]的研究显示,亚裔美洲型可由于 URR 末端 7 660~7 890 bp 区间碱基的突变导致 URR 转录活性的提高。本研究在此区间共检出 6 种点突变,其中 A7729C 突变的 URR 转录活性是标准株的 2~4 倍^[16]。

本研究显示,临床宫颈组织标本来源的 HPV16 URR 存在多种点突变类型,其中部分类型未见报道,可能为本地区所特有。HPV16 URR 序列变异多样性可能与病毒致癌潜能和宫颈癌发生相关,深入了解 HPV 基因变异位点与宫颈癌发病

的确切关系有助于阐释相关生物学机制。

参考文献

[1] 乔友林. 子宫颈癌预防研究的里程碑[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(12):1293-1295.

[2] Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution[J]. Virology, 2005, 337(1):76-84.

[3] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus(HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(14):1072-1079.

[4] Castle PE, Solomon D, Schiffman M, et al. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 94(14):1066-1071.

[5] Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review[J]. Virus Res, 2002, 89(2):229-240.

[6] Sedorf K, Krammer G, Durst M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. Virology, 1985, 145(1):181-185.

[7] Mayrand MH, Coutlee F. Detection of human papillomavirus variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia[J]. J Gen Virol, 2000, 81(12):2959-2968.

[8] Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, et al. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity [J]. J Gen Virol, 2000, 81(8):1975-1981.

[9] Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, et al. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(11):1402-1410.

[10] Pande S, Jain N, Prusty BK, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7 and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3):1060-1066.

[11] Arany I, Grattendick KJ, Whitehead WE, et al. A functional interferon regulatory factor-1 (IRF-1)-binding site in the upstream regulatory region (URR) of human papillomavirus type 16[J]. Virology, 2003, 310(2):280-286.

[12] Veress G, Szarka K, Dong XP, et al. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16[J]. J Gen Virol, 1999, 80:1035-1043.

[13] 余勤, 马正海, 王艳萍, 等. 新疆吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型上游调控区 DNA 多态性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(11):1000-1004.

[14] Schmidt M, Kedzia W, Gozdizcka-Jozefiak A. Intratype HPV-16 sequence variation with LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers[J]. J Clin Virol, 2001, 23(1/2):65-77.

[15] Dong XP, Pfister H. Overlapping YY1 and aberrant SP1-binding sites proximal the early promoter of human papillomavirus type 16[J]. J Gen Virol, 1999, 80(Pt 8):2097-2101.

[16] Park JS, Hwang ES, Lee CJ, et al. Mutation and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia[J]. J Gynecol Oncol, 1999, 74(1):23-29.

(收稿日期:2011-01-09)

(上接第 938 页)

能减小 MDRD 方程在健康人群中的系统性低估, 扩宽估算 GFR 的适用性。GFR 的下降与传统性危险因素相关。

参考文献

[1] Levey AS, Andreoli SP, DuBose T, et al. Chronic kidney disease: common, harmful, and treatable-world kidney day 2007[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(2):374-378.

[2] 张路霞, 左力, 徐国宾, 等. 北京市石景山地区中老年人中慢性肾脏病的流行病学研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(2):67-71.

[3] National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. [J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(2):S1-266.

[4] Zuo L, Ma YC, Zhou YH, et al. Application of GFR-estimating equations in Chinese patients with chronic kidney disease[J]. Am J Kidney Dis, 2005, 45(3):463-472.

[5] Myers G, Miller W, Coresh J, et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the laboratory working group of the national kidney disease education program [J]. Clinical Chemistry, 2006, 52(1):5-18.

[6] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. CKD-EPI(chronic kidney disease epidemiology collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate[J]. Ann Intern Med, 2009, 150(9):604-612.

[7] Levey AS, Coresh J, Greene T, et al. Expressing the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values[J]. Clinical Chemistry, 2007, 53(4):766-772.

[8] Poggio ED, Wang X, Greene T, et al. Performance of the modification of diet in renal disease and cockcroft-gault equations in the estimation of GFR in health and in chronic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(2):459-466.

[9] 全国 eGFR 课题协作组. MDRD 方程在我国慢性肾脏病患者中的改良和评估[J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(10):589-595.

[10] Montanés Bermúdez R, Bover Sanjuán J, Oliver Samper A, et al. Assessment of the new CKD-EPI equation to estimating glomerular filtration rate[J]. Nefrologia, 2010, 30(2):185-194.

[11] Bakris G, Vassalotti J, Ritz E, et al. National kidney foundation consensus conference on cardiovascular and kidney diseases and diabetes risk: an integrated therapeutic approach to reduce events [J]. Kidney Int, 2010, 78(8):726-736.

[12] 侯凡凡, 马志刚, 梅长林, 等. 我国五省市、自治区慢性肾脏病患者心血管疾病的危险因素调查[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(11):753-759.

(收稿日期:2011-02-01)