

新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型 E6 基因的克隆和序列分析*

马正海 钱东 马纪 林仁勇 闻明 钟哲 张富春**

(新疆大学生物系分子生物学重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

张秋云

(乌鲁木齐市医学研究所, 乌鲁木齐 830010)

摘要 为了分析新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 型 E6 基因结构特点, 从中国新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织标本中提取 DNA, 以宫颈癌活检组织标本 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 HPV16 E6 基因, 将其克隆到 pUCm-T 载体上, 并对其进行基因全序列分析. PCR 检测结果显示宫颈癌组织中 HPV16 E6 阳性率为 82.35% (14/17); 测序结果显示, 新疆株 HPV16 E6 基因全长 456 bp, 大小与德国标准株一致. E6 基因的第 247 位碱基发生 T→G 突变, 并由此引起所编码的氨基酸亦发生改变. 上述结果表明, 中国新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌患者组织中 HPV16 E6 的基因结构与德国标准株 HPV16 E6 基因之间存在差异.

关键词 人乳头瘤病毒 16 型, 宫颈癌, E6 基因, 核苷酸序列分析

学科分类号 Q5

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一种重要的致癌 DNA 病毒, 可引起人生殖道和肛门皮肤、粘膜产生良性和恶性肿瘤, 其中与宫颈癌发病密切相关的有 HPV16、18 等^[1,2]. 李洁等^[3]对来自我国 14 个省市自治区的 1455 份宫颈癌组织进行检测, 结果表明我国人群宫颈癌感染以 HPV16 和 HPV58 为主, 其中北方以 HPV16 为主. 新疆南部维吾尔族聚居区是我国宫颈癌高发区, 患病率高达 459/10 万~590/10 万, 已有的调查表明, 新疆南部维吾尔族妇女高发宫颈癌与 HPV16 感染密切相关, 其宫颈癌组织中 HPV16 检出率高达 77.6%~82.6%^[4,5].

HPV16 基因组主要由早期基因区 (E 区)、晚期基因区 (L 区) 和长控制区 (long control region, LCR) 组成, E 区有 6 个开放读码结构 (ORF), 即 E1, E2, E4, E5, E6, E7, 其中与转化有关的为 E6 和 E7 基因^[6]. 近年来, E6 蛋白独立致癌性日益受到重视^[7]. E6 蛋白致癌关键是由于 E6 与 P53 相互作用导致 P53 降解以及 P53 功能减弱或丧失, 从而引起细胞周期紊乱, DNA 损伤累积, 最终引起细胞癌变^[8,9], Song 等^[10]将 E6 基因导入小鼠得到转基因小鼠, 在上皮细胞基底层表达的 E6 可诱导上皮细胞过度生长和增生, 并导致小鼠皮肤肿瘤, 且较 E7 引起的肿瘤更恶型化, 并由此

认为, HPV 致癌过程中, E7 基因主要在癌发生的早期引起细胞转形, E6 基因主要在癌发生的后期导致细胞恶化. 我国学者相继克隆到湖北株 HPV16E6 基因 (HPV16E6-HB) 及山东株 HPV16E6E7 基因 (HPV16E6E7-SD), HPV16E6-HB 和 HPV16E6E7-SD 基因结构与德国标准株 HPV16E6E7 基因之间均存在一定差异^[11,12].

为了解我国新疆地区宫颈癌患者组织中 HPV16 E6 基因结构特点, 本实验对新疆南部维吾尔族聚居区宫颈癌活检组织中 HPV16 E6 基因的核苷酸序列进行分析, 以检测新疆南部维吾尔族聚居区妇女感染 HPV 的类型及其变异, 探讨该区宫颈癌高发的分子机制, 为我国 HPV16 E6 相关疫苗的研制奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 宫颈癌组织: 采自新疆医科大学附属第三医院 (新疆肿瘤医院) 手术及活检标本 (经临床病理确定均为宫颈癌), -20℃ 保存.

* 国家自然科学基金资助项目 (39960079).

** 通讯联系人.

Tel: 0991-2862753-3259, E-mail: zfc@xju.edu.cn

收稿日期: 2000-07-07, 接受日期: 2000-09-28

1.1.2 质粒和菌种: 克隆质粒 pUCm-T 载体购自上海生工生物工程技术有限公司; 质粒 pCMV₄/HPV16E6 (含 HPV16 E6 基因) 为宾西法尼亚大学病理系王宾教授惠赠; 菌种 *E. coli* DH5 α 为本室保存.

1.1.3 引物的设计与合成: 根据 Seedorf 等^[13] 1985 年发表的 HPV16 型 DNA 全序列, 利用 Perkin Elmer (PE) 公司 primer express 软件设计跨 HPV16 E6 整个阅读框的一对引物. 引物 1 的序列为: 5' CAA TGT TTC AGG ACC CAC AGG 3'; 引物 2 的序列: 5' TGC ATG ATT ACA GCT GGG TTT C 3'. 引物由 TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co. 合成.

1.1.4 主要试剂及工具酶: 核酸内切酶、DNA marker、Taq 多聚酶、T4DNA 连接酶及 PCR 片段回收试剂盒均购自 TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co..

1.1.5 测序试剂盒 (ABI PRISM Bigdye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit) 及测序 PCR 引物 pUC18/19M13 引物、pUC18/19M13 反向引物购自美国 PE 公司.

1.2 方法

1.2.1 宫颈癌组织 DNA 的提取: 采用酚氯仿萃提法^[14].

1.2.2 PCR 扩增: 以宫颈癌组织 DNA 为模板,

加 HPV16 E6 引物, 按常规方法扩增 HPV16 E6 基因片段. 扩增参数: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min 35 个循环; 72℃ 7 min.

1.2.3 pUCm-T/HPV16 E6 重组质粒的构建: 用 PCR 片段回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收 PCR 产物, 该片段与克隆载体 pUCm-T 用 T4DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 连接产物转化至 *E. coli* DH-5 α 中, 经蓝白斑筛选、增菌培养后提取质粒, 并以 *Pst* I 酶切鉴定其正确性.

1.2.4 HPV16 E6 基因序列测定及分析: 将鉴定正确的 pUCm-T/HPV16 E6 重组质粒精制提纯, 在 377 全自动测序仪上用 pUC18/19M13 引物和 pUC18/19M13 反向引物对 E6 基因进行双向 DNA 序列测定. 用 PE 公司 SeqEd v1.0.3 软件对序列进行分析.

2 结 果

2.1 宫颈癌组织中 HPV16 E6 DNA 片段扩增结果

以宫颈癌组织 DNA 为模板, 用 HPV16 E6 引物进行 PCR 扩增, 17 份标本有 14 份标本为 HPV16 阳性, 图 1 所示为 10 份样品 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果, 可见一清晰扩增条带, 其大小与 pCMV₄/HPV16E6 阳性对照扩增出的片段大小一致, 为 465 bp.

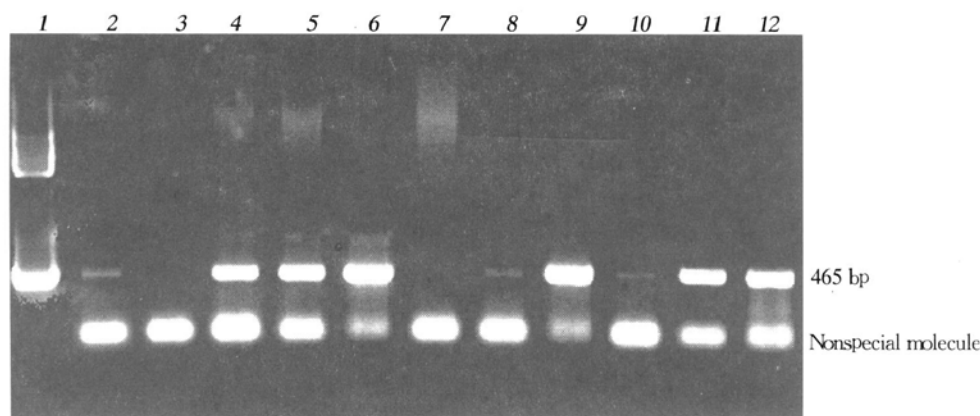


Fig. 1 Amplification of HPV16 E6 gene

1: pCDNA₃/HPV16 E6 plasmid positive control; 3: DNA of normal cervical tissue negative control;

2, 4~12: DNA samples of cervical carcinoma tissue.

2.2 pUCm-T/HPV16 E6 重组质粒的构建

6 份宫颈癌组织中扩增产物 HPV16 E6 DNA 与克隆载体 pUCm-T 连接, 构建了重组质粒 pUCm-T/HPV16 E6 (1~6). 将重组质粒用 *Pst* I 酶切, 切出约 510 bp 的 DNA 片段.

2.3 HPV16 E6 基因序列测定及分析

对 6 个 pUCm-T/HPV16E6 重组质粒分别用 pUC18/19M13 引物、pUC18/19M13 反向引物进行双向测序, 测序结果表明克隆的 6 个基因均为 HPV16 E6 基因, 测定序列相当于 HPV16 原始序

列第 102 位到第 566 碱基, 该区间包括 HPV16 E6 基因, E6 基因全长 456 bp, 大小与德国标准株一致. 6 个 E6 基因的第 247 位碱基均发生了 T → G

的突变, 此变异使 E6 基因第 84 位亮氨酸密码子 TTG 变异为缬氨酸密码子 GTG (图 2).

1	ATG	TTT	CAG	GAC	CCA	CAG	GAG	CGA	CCC	AGA	AAG	TTA	CCA	CAG	TTA	TGC	ACA	GAG	CTG
2	Met	Phe	Gln	Asp	Pro	Gln	Glu	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu	Pro	Gln	Leu	Cys	Thr	Glu	Leu
3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	CAA	ACA	ACT	ATA	CAT	GAT	ATA	ATA	TTA	GAA	TGT	GIG	TAC	TGC	AAG	CAA	CAG	TTA	CTG
	Gln	Thr	Thr	Ile	His	Asp	Ile	Ile	Leu	Glu	Cys	Val	Tyr	Cys	Lys	Gln	Gln	Leu	Leu
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	CGA	CGT	GAG	GTA	TAT	GAC	TTT	GCT	TTT	CGG	GAT	TTA	TGC	ATA	GTA	TAT	AGA	GAT	GGG
	Arg	Arg	Glu	Val	Tyr	Asp	Phe	Ala	Phe	Arg	Asp	Leu	Cys	Ile	Val	Tyr	Arg	Asp	Gly
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	AAT	CCA	TAT	GCT	GTA	TGT	GAT	AAA	TGT	TTA	AAG	TTT	TAT	TCT	AAA	ATT	AGT	GAG	TAT
	Asn	Pro	Tyr	Ala	Val	Cys	Asp	Lys	Cys	Leu	Lys	Phe	Tyr	Ser	Lys	Ile	Ser	Glu	Tyr
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	AGA	CAT	TAT	TGT	TAT	AGT	TTG	TAT	CGA	ACA	ACA	TTA	GAA	CAG	CAA	TAC	AAC	AAA	CCG
	Arg	His	Tyr	Cys	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Gly	Thr	Thr	Leu	Glu	Gln	Gln	Tyr	Asn	Lys	Pro
	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	Val	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	TTG	TGT	GAT	TTG	TTA	ATT	AGG	TGT	ATT	AAC	TGT	CAA	AAG	CCA	CTG	TGT	CCT	GAA	GAA
	Leu	Cys	Asp	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Ile	Asn	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Cys	Pro	Glu	Glu
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	AAG	CAA	AGA	CAT	CTG	GAC	AAA	AAG	CAA	AGA	TTC	CAT	AAT	ATA	AGG	GGT	CCG	TGG	AOC
	Lys	Gln	Arg	His	Leu	Asp	Lys	Lys	Gln	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Arg	Gly	Arg	Trp	Thr
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	GGT	CGA	TGT	ATG	TCT	TGT	TGC	AGA	TCA	TCA	AGA	ACA	CGT	AGA	GAA	ACC	CAG	CTG	TAA
	Gly	Arg	Cys	Met	Ser	Cys	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Thr	Arg	Arg	Glu	Thr	Gln	Leu	<O>
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 2 The mutation of HPV16E6-XJ

1: nucleotide sequence of standard strain; 2: amino acids of standard strain; 3: nucleotide sequence of HPV16E6-XJ;

4: amino acids of HPV16E6-XJ.

3 讨 论

HPV16 型感染与子宫颈癌发生密切相关, 病毒的主要致癌基因是病毒早期基因 E6、E7, 研究表明 E7 基因主要在癌发生的早期引起细胞转形, E6 基因主要在癌发生的后期导致细胞恶化^[10]. E6 蛋白是小分子质量的核磷蛋白, 有 151 个氨基酸, 氨基酸功能分 4 区, 其中 N 端 1~139 个氨基酸结构完整性决定着 E6 蛋白转化功能. E6 蛋白致癌关键是由于 E6 与 p53 作用的结果, E6 使 p53 功能减弱或丧失, 使 p53 对细胞增殖周期相关因子 p21, PCNA, Cyclins, Cdk 的调节作用丧失, 细胞中 DNA 损失累积并最终造成细胞癌变^[8].

据资料显示, 新疆维吾尔妇女子宫颈癌的患病率高, 患病年龄较其他民族低, 宫颈癌以 HPV16 感染为主^[4,5,15]. 我们根据 HPV16 德国标准株 DNA 序列设计了一对引物, PCR 检测了 17 例宫颈癌组织, 其中 14 例扩增出 HPV16 E6 基因, 进一步证明新疆维吾尔妇女患宫颈癌以 HPV16 感染为主. 本实验克隆到的 6 株 HPV E6 经酶切鉴定后, 分别在正反两个方向对目的基因的正链及负链进行测序, 最大限度地减少了测序中可能存在的错配模板, 且双向测序具有一定的校对功能, 以保证测序结果的正确. 对克隆到的 6 株 HPV E6 基因序列分析结果显示, 6 株新疆妇女宫颈癌组织感染的 HPV16 E6 DNA 序列一致, 与 1985 年 Seedorf 报

道的HPV16核苷酸序列比较有1处发生变异,上述结果充分说明新疆株HPV16 E6基因这一变异是可以肯定的。Yamada^[16]对美国29个洲的HPV16分离株的E6、L2、L1基因进行测序,以分析美国人群中HPV16的变异,结果表明,E6、L2、L1基因都有一定程度的变异,其中E6基因相对保守。许雪梅^[12]报道了我国山东地区HPV16E6E7变异株。本研究报道的新疆地区HPV16E6变异株,将为我国宫颈癌患者组织中HPV16E6基因结构特点积累流行病学资料,也为我国HPV16E6相关疫苗的研制奠定基础。

基因序列分析表明,新疆株HPV16 E6基因这一变异引起所编码氨基酸的改变,氨基酸发生变化,可能会导致E6蛋白降解p53的功能以及其免疫原性的改变。Dalal等^[17]对HPV16 E6进行了一系列突变,其中一个位置的突变可显著增强E6结合和降解p53的能力,并能有效诱导人乳腺细胞(MECs)永生化,另有一些突变可降低E6结合和降解p53的能力以及诱导MECs永生化的能力,还有一些突变使E6丧失降解p53和诱导MECs永生化的能力,说明E6基因的突变直接影响E6蛋白的功能,进一步研究新疆株HPV16 E6基因这一变异是否改变E6蛋白功能,以及这种改变在新疆南部维吾尔族聚居区宫颈癌高发中的地位,将对阐明该区宫颈癌高发的分子机制起到重要的作用,我们仍在进行这方面的研究工作。

参 考 文 献

- Lowy D R, Kimbauer R, Schiller J T. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 2436~ 2440
- Hausen H, Villiers E M. Human papillomavirus. *Annu Rev Microbiol*, 1994, **48**: 427
- 李洁, 刘宝印, Zur Hausen, 等. 中国妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒感染及其地理分布的调查. *中国实验和临床病毒学*, 1996, **10** (1): 50~ 55
Li J, Liu B Y, Zur Hausen, *et al.* *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 1996, **10** (1): 50~ 55
- 李庭芳, 古丽娜·库尔班, 王涛, 等. 新疆伽师县夏普桃勒乡妇女宫颈癌防治的研究. *新疆医学院学报*, 1996, **19** (3): 199~ 203
Li T F, Gulnar Kurban, Wang T, *et al.* *Bulletin of Xinjiang University*, 1996, **19** (3): 199~ 203
- 拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班, Noffersinger A E, 等. 维吾尔妇女子宫颈癌中p53基因的表达和HPV DNA检测研究. *新疆医学院学报*, 1997, **20** (2): 77~ 81
Lalai Suzuk, Gulnar Kurban, Noffersinger A E, *et al.* *Bulletin of Xinjiang University*, 1997, **20** (2): 77~ 81
- 闻玉梅. 现代医学微生物学. 上海: 上海医科大学出版社, 1999. 957~ 970
Wen Y M. *Modern Microbiology in Medicine*. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1999. 957~ 970
- Romanczuk H, Vill L, Schlegel R, *et al.* The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 gene is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol*, 1991, **65**: 2739~ 2743
- Jonathor P. P21 inhibits cyclin shock. *Nature*, 1994, **369** (16): 520~ 525
- Lowy D R, Kimbauer R, Schiller J T. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 2436~ 2440
- Song S Y, Pitot H C, Lambert P F. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol*, 1999, **73** (7): 5887~ 5893
- 伍欣星, 赵文先, 丁晓华, 等. 湖北地区宫颈癌组织中乳头瘤病毒16型E7基因的分离、克隆和序列分析. *中国病毒学*, 1996, **11** (3): 220~ 224
Wu X X, Zhao W X, Ding X H, *et al.* *Virologica Sinica*, 1996, **11** (3): 220~ 224
- 许雪梅, 司静懿, 刘世德, 等. PRIVATE中国山东地区妇女宫颈癌组织中乳头瘤病毒16E6E7基因的分离、克隆和序列分析. *中国医学科学院学报*, 1999, **21** (3): 185~ 191
Xu X M, Si J Y, Liu S D, *et al.* *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 1999, **21** (3): 185~ 191
- Seedorf K, Kraemmer G, Duerst M, *et al.* Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *J Virol*, 1985, **145**: 181~ 185
- 萨姆布鲁克J, 弗里奇E F, 曼尼阿蒂斯T. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992. 463~ 469
Samrrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 463~ 469
- 拉莱·苏祖克. 不同民族妇女中2727例子宫颈癌的统计分析. *新疆医学院学报*, 1990, (6): 47
Lalai Suzuk. *Bulletin of Xinjiang University*, 1990, (6): 47
- Yamada T, Wheeler C M, Halpern A L, *et al.* Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*, 1995, **69** (12): 7743~ 7753
- Dalal S, Gao Q, Androphy E J, *et al.* Band Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol*, 1996, **70** (2): 2683~ 2688

Cloning and Sequencing of HPV16 E6 Gene from Cervical Carcinoma Biopsies in Xinjiang^{*}

MA Zheng-Hai, QIAN Dong, MA Ji, LIN Ren-Yong, WEN Ming, ZHONG Zhe, ZHANG Fu-Chun^{**}

(Key Laboratory of Molecular Biology, Department of Biology, Xinjiang University, Urumuqi 830046, China)

ZHANG Qiu-Yun

(Institute of Urumuqi Medicine, Urumuqi, Xinjiang 830010, China)

Abstract In order to study the structure specificity of HPV 16 E6 gene of a Chinese Uygur patient of cervical carcinoma in south Xinjiang, the tissue DNA was extracted from cervical carcinoma biopsies. HPV 16E6 gene was amplified by PCR from the cervical carcinoma tissue DNA. The HPV 16 E6 gene was cloned into pUCm-T and analyzed the whole sequence. The result of PCR showed that the positive rate of HPV 16 E6 was 82.35% (14/17). The result of sequence showed that the overall length of strain is 456 bp, it was the same as the German strain. The 247th nucleotide of HPV 16 E6 mutate T to G, the mutation had changed the triplet codes, subsequently changed the amino acids coded. There is a structure difference between HPV 16 E6 gene of Xinjiang strain and the standard strain.

Key words human papillomavirus type16, cervical carcinoma, E6 Gene, DNA sequencing

^{*} This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39960079).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-991-2862753-3259, E-mail: zfc@xju.edu.cn

Received: July 7, 2000 Accepted: September 28, 2000