

237-243

维普资讯 http://www.cvip.com
6846(8)

构建来自宫颈癌并带有突变及缺失 LCR 的 HPV 16 重组体

刘红 董小平 / 刘廷娜 楚雍烈 H. Pfister*

(西安医科大学微生物学教研室, 西安 710061)

(Institut für Virologie, der Universität Zu Köln, D-50935 Köln, Germany)

R737.330.2

R373.9;

A 摘要 为研究 HPV 16 转录调节蛋白 YY1 结合位点改变对病毒致癌性的影响, 以 HPV 16 野毒株质粒 p1203 为基础, 经多次克隆, 将来自宫颈癌组织并带有缺损突变的 LCR 重组到 HPV₁₆ 基因组中。核酸序列分析证实, 质粒 pDV390 在第 2 个 YY1 位点上有一 G→A 点突变, 质粒 pDV1326 和 pDV401 分别带有 115 bp 和 143 bp 的缺失突变, 从而涉及 2 和 4 个 YY1 结合位点, 重组质粒其它核苷酸序列与 HPV 16 标准序列一致。这些重组质粒的组成为进一步研究 YY1 蛋白对 HPV 16 致癌基因表达的调控及 HPV 16 致癌作用的影响打下基础。

关键词 人乳头瘤病毒, 转录调节蛋白, 克隆, 序列分析

宫颈癌

人乳头瘤病毒(HPV)16 型属致癌“高危”型, 与宫颈癌的发生密切相关^[1-5]。其基因组早期区域的 E6、E7 基因为病毒致癌基因, 在宫颈癌组织和肿瘤细胞系中持续表达^[4,5], 它们共同受启动子 P₉₇ 的控制。最近研究证实, 细胞转录调节蛋白 YY1 能特异地结合在高危型 HPV 16 的长控制区(Long Control Region, LCR), 并抑制 P₉₇ 启动子的活性^[5]。我们曾报道, LCR 上 YY1 结合位点的缺失及突变时, HPV 致癌基因启动子有活性增高现象^[6]。可见探讨宫颈癌组织中 HPV 16 LCR 上 YY1 结合位点突变情况, 对研究 HPV 致癌的分子机理具有重要意义。现采用多次克隆技术, 把从宫颈癌组织扩增来的 HPV16 LCR, 重组到 HPV16 野毒株相应部位并替代原来 LCR, 构建了新的 HPV16 重组体。序列分析表明, 从宫颈癌组织扩增的 HPV16 LCR 序列有缺失或点突变。

材料与 方法

1 聚合酶链反应(PCR) 宫颈癌活检标本取自本校附属医院肿瘤科, 均经临床确诊和病理室证实, 按本室常规提取宫颈癌组织 DNA^[6], 纯化后作为模板。按 PCR 引物设计原则, 设计了扩增 HPV16 LCR 的一对引物。引物 1: 5' - GACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGA - 3' (HPV 16 nt 7008 - 7032), 引物 2: 5' - TCCTGTGGGTCCTGAACATTGCAGT - 3' (HPV 16 nt 123 - 98)。由 Eurogentec 公司合成, Vent DNA 聚合酶由 Biolabs 提供, dNTP 等试剂购自 Pharmacia 公司。

PCR 反应总体积为 100 μl, 包括 1 μg 纯化的宫颈癌组织 DNA(模板), 200 μmol/L dNTP, 1 μmol/L 引物 1 和引物 2, 1 U Vent DNA 聚合酶。反应条件是: 变性 94 °C 1 min, 退火 57 °C 40 sec, 延伸 72 °C 1 min, 循环扩增

30~35次。反应产物均经琼脂糖凝胶电泳检测,纯化后-20℃保存备用。

2 限制性核酸内切酶 *Ban* II、*Pvu* II、*Sal* I和*Sph* I等来自 MBI Fermentas 公司, T₄ DNA 连接酶为 Biolabs 产品, DNA 酶解片段的回收和纯化采用 Gene-Clean 试剂盒, 操作均按文献进行^[7]。DNA 核苷酸序列分析采用 T₇ Sequence 试剂盒, 由 Pharmacia 生产, ³⁵S-dATP 购自 Amersham Bucher 公司。

测序工作按 T₇ Sequence 试剂盒说明书进行, 取 4 μg 纯化的待测 DNA, 经 200 mmol/L NaOH, 2 mmol/L EDTA 变性后, 以单链寡核苷酸 1022 (5'-CATGAATTATTGTAGTTTAG-3' HPV 16 nt16~7900) 为引物进行测序。反应产物经 95℃ 变性 5 min, 经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳并转印到滤膜上, 常规放射自显影后进行分析。

3 质粒及重组质粒的构建 (参见图 1) 质粒 p1203 是在载体质粒 pML 2D 中克隆入了 HPV16 野毒株的全基因组, 由美国 Dr. Howley 惠赠。受体菌 *E. coli* SURE™, 购自 Stratagene 公司。基因克隆、次级克隆方法均按文献操作^[8], 先后构建了以下重组质粒。质粒 p1203ΔE 的构建, 用 *Pvu* II 酶切 p1203 质粒 DNA, 缺失掉 HPV16 基因组中早期区及大部分晚期区序列后重新连接而成。质粒 p1203ΔEΔ*sph* 则是把 p1203ΔE 质粒 DNA 中临近 HPV16 序列的一小段载体序列缺失掉, 再重新连接, 保证质粒上只有一个 *Sph* I 单一酶切点。质粒 pDVS 的构建如下: ①首先用 *Sph* I 和 *Pvu* II 联合酶解 p1203ΔEΔ*sph* 质粒 DNA, 将 HPV16 野毒株的 LCR 片段切除 (含 YY1 结合位点); ②分别将 PCR 扩增的、来自宫颈癌组织中的 HPV16 LCR 片段, 用 *Sph* I 和 *Pvu* II 酶切; ③将两个片段连接后, 肿瘤来源的 HPV16 LCR 就替代了野毒株 HPV16 的 LCR。重组质粒 pDV 系列的构建: 把 HPV16 野毒株 *Pvu* II-*Pvu* II 片段 (它含有 HPV16 基因组的早期区和大部分晚期区) 插入到 pDVS 质粒 DNA 中 *Pvu* II 单一酶切点上, 构建了 HPV16 全基因组的新的重组质粒, 不同的是其 LCR 均来自不同宫颈癌组织中的 HPV16 DNA, 而不是来自野毒株。pDV390、pDV401 及 pDV1326 三个重组质粒就是按上述方法构建的, 390、401 和 1326 为三个宫颈癌标本代号。分别提取 pDV390、pDV401 及 pDV1326 质粒 DNA, 并对各自的 LCR 区域进行测序。

结 果

1 PCR 扩增的目的片段

采用 PCR 技术从提取的宫颈癌组织 DNA 中扩增 HPV16 的 LCR 片段, 所用引物 1 (有意义链) 位于 L₁ 开放读码框架 (ORF) 末端, 引物 2 (反意链) 位于 E₆ ORF 的起始部, 整个扩增片段约 1000 kb 大小, 包含 HPV16 基因组 LCR 的全长。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 肿瘤 401 和 1326 扩增产物明显低于 HPV16 野毒株 DNA 阳性对照, 肿瘤 390 PCR 产物泳动位置与阳性对照一致, 阳性对照组, 三个肿瘤标本中均扩增出了相应目的片段 (图 2), 多种阴性对照均无目的片段产物 (图中未表示)。

2 含宫颈癌来源 HPV16 LCR 片段的 HPV16 全基因组重组质粒的构建

选用含 HPV16 野毒株基因组质粒 p1203, 该重组质粒载体为 pML2D。经过一系列基因操作 依次获得如下重组质粒: ①经两次克隆后组建了 *Pvu* II 和 *Sph* I 为单一酶切点的质粒 p1203ΔEΔ*sph*, 该质粒保留了 HPV16 完整的 LCR 区域和部分晚期序列, 但却丢失了 HPV16 早期区和大部分晚期区, 保证操作的简便易行, 避免多次克隆对 HPV16 基因组其他序列的改变; ②将 PCR 扩增宫颈癌中 HPV16 的 LCR 序列替代 p1203ΔEΔ*sph* 质粒中 HPV16 野毒株的 LCR, 分别组建了含肿瘤来源的 LCR 重组质粒 pDVS 390、410 及 1326。③再将 HPV16 野毒株的 *Pvu* II 大片段与 pDVS 连接, 最终组建了只有 LCR 来自肿瘤的 HPV16 基因组较为完整重组质粒 pDV390 pDV410 和 pDV1326 (图 1 显示构建全过程)。

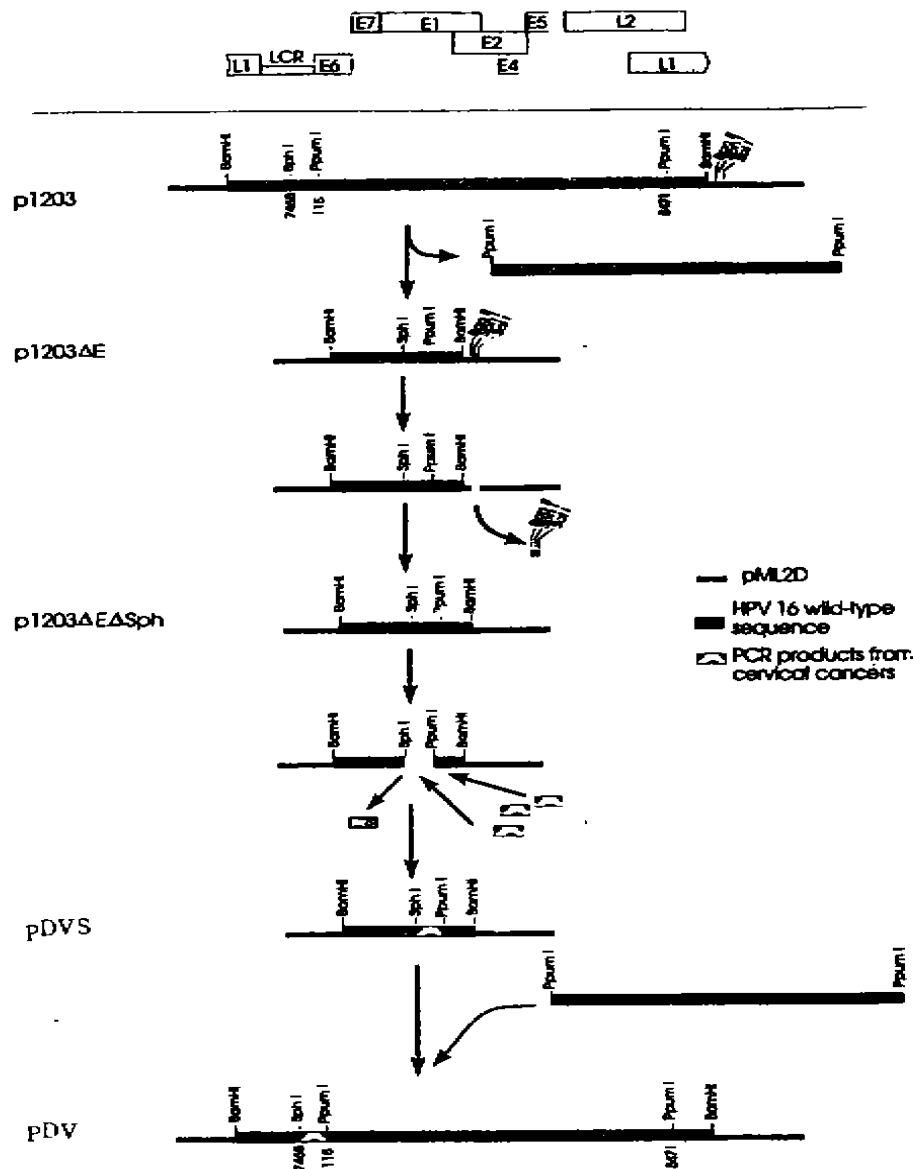


图 1 重组体质粒 pDV 的构建。上方显示 HPV16 ORF 的位置

Fig 1 Construction of recombinant pDV, as above, showing the ORF location of HPV16.

3 LCR 核苷酸序列分析检查突变

比较 HPV16 野毒株 LCR 和三种 pDV 重组质粒中 LCR 区域测序结果可以发现(图 3、图 4):①质粒 pDV1326 中, HPV16 LCR 区域存在有一 115 bp 的缺失突变, 该缺失区从 7680 nt 位到 7804 nt 位置。与现公认的序列资料比较研究可看出, 这段序列包含 2 个 YY1 结合位点, 1 个另一类转录因子 NF1 结合位点和部分增强子序列, 而被置换的 LCR 其它区域核苷酸序列与 HPV16 野毒株一致。②质粒 pDV410 中 HPV16 LCR 区域也有一段序列缺失, 缺失区域略有差异, 从 7703 nt 位到 7845 nt 位置, 约 143 bp 大小。这一缺失突变序列中则包含了 4 个

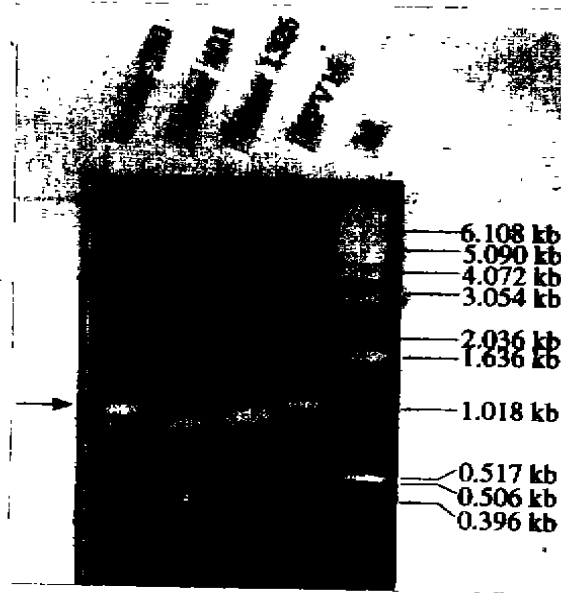


图 2 PCR 扩增结果

箭头指 PCR 扩增片段, M: 为分子量标志

Fig 2 Result of PCR amplifications.

The arrow shows the fragments of PCR amplification. M: molecular marker.

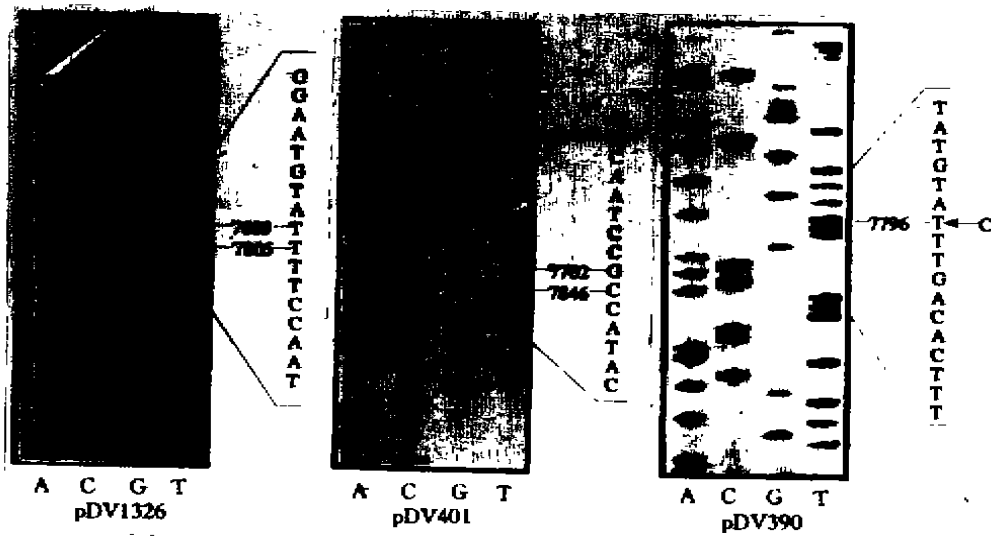


图 3 宫颈组织中 HPV16 LCR 片段的测序结果 显示有缺失突变和点突变

Fig 3 The sequencing results of HPV16 LCR fragment from the cervical cancers, showing the deletion or site mutation.

YY1 位点, 1 个 NF1 位点, 1 个 API 位点和部分增强子序列(图 3、图 4)。除此之外, 还发现在 7851 nt 位后有一 GCA 缺失突变, 在 7847 nt 位后有一 TA 插入突变, 此测序结果与我们先前

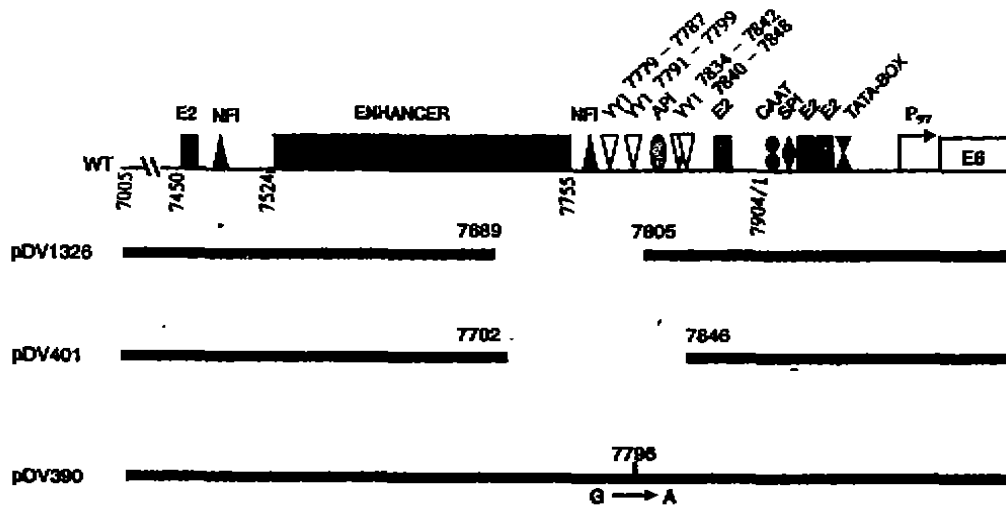


图 4 HPV16 野毒株 LCR 区域结构示意图,同时显示重组质粒 PDV 中 LCR 上的缺失突变和点突变

Fig 4 The LCR region structure of HPV16 wild-type strain, and showing the deletion of LCR from the recombinant plasmid PDV.

报道另一肿瘤来源 HPV16 LCR 测序结果一致。比较其他 LCR 序列,与 HPV16 野毒一致。③质粒 pDV390 中 HPV16 的 LCR 并无发现缺失突变,但在 7796 nt 位上有一 C→T 的点突变。值得指出的是肿瘤 390 患者淋巴转癌组织 DNA 中,PCR 扩增出 HPV16 LCR 目的片段,对其测序结果也同样发现 7749 nt 位点上 C→T 的点突变。点突变的位置正好位于第二个 YY1 结合位点上^[6]。另外在 7788 nt 位点上有 T→G 的点突变,此结果和从前测序结果相同^[6]。

讨 论

HPV16 与宫颈癌的发生密切相关,业已证实其 E₆、E₇ 癌蛋白的过度表达是导致肿瘤发生的重要原因之一^[1-5]。研究表明,下述途径影响 HPV16 E₆、E₇ 致癌基因表达。首先,两基因共用的启动子 P₉₇能接受一些细胞和病毒因子的影响,如多个转录激活因子可结合在 P₉₇上游 LCR 中的结合位点起正性调节作用^[5],其中还有增强子序列也起到正性调节作用。在 P₉₇上游序列中也含有三个 E₂ 特异性结合位点,但 HPV16 的 E₂ 对 P₉₇起调节作用^[2]。最近研究还发现,转录调节蛋白 YY1 也能结合到 HPV 的高危型 LCR 上,并表现抑制 P₉₇的活性^[6,7]。已知 HPV16 LCR 上共有四个 YY1 特异性结合位点,分布在增强子与 P₉₇启动子之间的序列内,其中第 3 和第 4 位点相互重叠。众所周知,HPV16 DNA 在宫颈癌细胞中常在 E₂ORF 处整合至细胞染色体上,因 E₂ ORF 破坏,E₂ 蛋白减少,导致 P₉₇去除抑制作用,造成 E₆、E₇ 癌蛋白过度表达诱发肿瘤发生^[2,9]。我们在研究中发现约 30% 的 HPV16 阳性宫颈癌组织中 HPV16

DNA 是游离状态^[6,7],而且实验证实 7 例游离状态 HPV16 LCR YY1 有突变,并使 P₉₇活性增加 3.5-6.5 倍^[6]。

上述结果有两点启示,其一,对 P₉₇有抑制作用的机制若减弱或消失,HPV16 癌蛋白就过度表达,E₂蛋白是这样,其他呢?其二,病毒 LCR 上有多个细胞转录蛋白因子结合位点,初步发现游离状态 HPV16 阳性瘤组织中,HPV16 LCR 有突变,这是否使病毒逃避宿主细胞抑制系统,使癌蛋白过度表达诱发肿瘤的发生?为了进一步搞清这些问题,有必要对宫颈癌中 HPV16 基因组 LCR 的突变情况,包括宫颈癌组织中 HPV16 DNA 游离状态(已研究 7 例)和整合状态深入研究。

通过基因重组建立新质粒是进行目的 DNA 片段功能及结构分析的基本手段,HPV16 全基因组约 8 kb 大小,为了用肿瘤组织中 HPV16 的 LCR 置换出野毒株的 LCR,需要复杂的基因操作,多次酶解、电泳、回收纯化过程,可能导致基因组的损伤和人为变化。所以我们采用分步克隆的技术路线,避免了大片段克隆的损害和困难,放弃了难于准确获得目的片段的部分酶消化法。结果表明,先去除 HPV16 野毒株 P_{pum}I 大片段,既保证 HPV16 结构蛋白基因的完整性,又便于对 LCR 两侧进行基因操作。构建 p1203△E1, p1203△E△sph 和 pDVS 三个中间重组质粒后,完成了宫颈癌组织 HPV16 LCR 的置换工作,最后使整个 HPV16 基因组复原,达到了构建重组体的目的。

序列分析结果显示,在三例宫颈癌组织 HPV16 LCR 中均有突变现象发生,两例为缺失突变,1 例为点突变,而且突变均涉及 YY1 结合位点。YY1 属 GLI-Krüppe I 蛋白,有转录抑制、增强及转录起始多重作用^[10],在许多细胞及病毒的 TATA 序列双侧都有其结合位点^[11]。研究证实,HPV 宫颈癌阳性细胞系(Hela、SiHa 及 Caski 等),人类传代角质细胞系及多种上皮细胞中均有 YY1 蛋白存在。我们过去已证实 HPV16 游离株 DNA 上 YY1 结合位点的突变,可明显增强早期启动子 P₉₇的作用^[6,10],本研究又发现直接来自 HPV16 阳性的宫颈癌组织中的 LCR,都有不同程度 YY1 结合位点的突变。这又从另一侧面提出问题,即 HPV16 LCR 区 YY1 位点的破坏可能在病毒逃避宿主细胞抑制系统,引起细胞癌变上扮演重要角色。本研究组建了 HPV16 基因组 LCR 中 YY1 结合位点带有不同突变的重组体,而且 LCR 均来自不同宫颈癌组织中,这为解决上述提出的问题,为确定 YY1 位点突变对 HPV16 E₆、E₇ 基因表达及 HPV16 致癌作用的影响打下基础。也有可能从病毒与细胞相互作用角度,揭示出一条新的病毒致癌途径。

参 考 文 献

- 1 Barbosa M S, Lowy D R, Schiller J T. Papillomavirus polypeptides E₆ and E₇ are zinc-binding proteins. *J Virol*, 1989, 63:1404-1407
- 2 Berned B A, Bailly C, Lenoir M C *et al*. The human papillomavirus type 18 E₂ gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol*, 1992, 66:4317-4324
- 3 Dyson N, Howley P W, Munger K *et al*. The human papillomavirus 16 E₇ oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 1989, 243:934-936
- 4 Bohm S, Wilczynski S P, Pfister H *et al*. The predominant mRNA class in HPV 16-infected genital neoplasias does not encode the E₆ or the E₇ protein. *Int J Cancer*, 1994, 55:791-798

- 5 chong T, Chan W K, Bernard H U. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor 1, API, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF; a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acid Res*, 1990, 18:465~470
- 6 Dong X P, Stubenrauch F, Beyer-finkler *et al*. Prevalence of deletion of YY-1 binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *J Virol*, 1994, 66:6893~6902
- 7 May M, Dong X P, Beyer-Finkler E *et al*. The E₄ and E₇ promoter of extrachromosomal HPV 16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J*, 1994;13:1406~1466
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al*. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1.21~1.86
- 9 McBride A A, Romanczuk H, and Howley P M. The papillomavirus E₂ regulatory proteins. *J Biol Chem*, 1991, 266:18411~18414
- 10 Shi Y, Seto E, Chang L S, *et al*. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1 A protein. *Cell*, 1991, 67:337~388
- 11 Hahn S. The yin and yang of mammalian transcription. *Curr Biol*, 1992, 2:101~109

Construction of HPV16 Genomes Containing Mutated and Deleted Long Control Regions from Cervical Cancers

Liu Hong Dong Xiaoping Liu Yanna Chu Yonglie Herbert Pfister*

(Xi'an Medical University, Xi'an 710061)

* (Institut für Virologie, der Universität Zu Köln, D-50935 Köln, Germany)

YY1 is an important cellular transcriptional regulator which is ubiquitously expressed in various kinds of cells. The specific binding sites of YY1 protein are found in the flanking sequences of many cellular and viral promoters. In the "high risk" human papillomaviruses (HPVs) YY1 works as a transcriptional repressor for the viral early gene promoter. In the episomal HPV 16 genomes extracted from cervical cancers, removal of YY1 binding sites in LCR is a repeated event, resulting in increasing the activity of viral oncogene promoter P₉₇. In order to study the effect of removal of YY1 binding sites in LCR on the viral tumorigenicity, HPV16 wild-type plasmid p1203 was used as basic sequences, through multiple-step-clone to construct the new HPV16 plasmids containing deleted and mutated LCRs. Sequence analysis confirmed that pDV390 had a G to A exchange in the second YY1 site, whereas pDV1326 and pDV401 contained 115 bp and 143 bp deletions in the respective LCRs that removed 2 and 4 YY1 binding sites. The rest nucleotide sequences of the new plasmids showed no variation comparing with HPV 16 wild-type sequence. These reconstructed HPV 16 genome plasmids supply a basic work for study of YY1 protein on the regulation for the expression of viral oncogenes as well as viral oncogenicity.

Key words Human Papillomavirus, YY1, Clone, Sequence