

四川地区宫颈癌 HPV59 型感染及其 E6 基因突变*

乌恩奇¹, 任源², 邱爱东¹, 张国楠², 姜春来¹, 于湘晖¹, 吴永革¹, 查晓^{2**}, 孔维^{1**}

(1. 吉林大学生命科学学院疫苗研究中心, 长春 130023; 2. 四川省肿瘤医院, 成都 610041)

HPV59 Infection and E6 Gene Mutation from Patients with Cervical Cancer in Sichuan

WU En-qi¹, REN yuan², QIU Ai-dong¹, ZHANG Guo-nan², JIANG Chun-lai¹, YU Xiang-hui¹,
WU Yong-ge¹, ZHA Xiao^{2**}, KONG Wei^{1**}

(1. Center of Vaccine Research, College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China; 2. Sichuan Cancer Hospital And Institute, Chengdu 610041, China)

Abstract: The development of effective strategies against cervical cancer require knowledge on the prevalence and molecular biology of the *Human papillomavirus* (HPV). We have investigated HPV infection in 60 women suffering from cervical cancer. HPV was typed by PCR of DNA extracts. The prevalence of cervical HPV 59 infection was 5% (3/60). We also characterized E6 region nucleotide variation by PCR-directed sequencing. 1 of 3 cases showed 4 sites variations (T102C, C306T, A363C and T402C) in E6 region.

Key words: HPV-59; E6 gene variation; PCR; Cervical cancer

关键词: HPV-59; E6 突变; PCR; 宫颈癌

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)06-0673-02

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤,特定型别的人乳头瘤病毒(HPV)感染是引发宫颈癌的主要因素^[1]。根据 HPV 致癌性的不同可分为高危型,低危型。Munoz N^[2]等对来自 9 个国家的 1918 例宫颈癌组织进行各型 HPV 筛查,最终确认 HPV-16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73 及 82 型为高危型。李洁等^[3]用核酸印迹技术对 1986 至 1994 年间来自我国 14 个省市自治区的 1008 宫颈癌组织进行 HPV 型别检测,发现 HPV-16、18、31、35、51、58 等型的存在,并发现各地区主要流行型别随地理位置有所差异。

为进一步了解我国宫颈癌组织中 HPV 病毒感染及基因突变情况,本实验用 PCR 方法对来自四川省 60 例宫颈癌组织进行 HPV59 型感染情况检测,获得 3 例 HPV-59 型 E6 基因,对其进行了序列分析,发现几处突变。

1 材料和方法

1.1 标本收集

宫颈癌组织来自 2003 年 10 月至 2004 年 5 月间四川省肿瘤医院收治并诊断为宫颈癌的患者。所有组织经手术切除后立即保存于-40℃冰箱。

1.2 主要试剂

动物组织全基因组提取试剂盒(DNeasy Tissue Kit, QIAGEN 公司),高保真 TAQ 酶及相关试剂(Platinum Taq DNA Polymerase, dNTP, Invitrogen 公司),分子量 marker(DL2000, TAKARA 公司)。

1.3 DNA 提取

用 DNeasy Tissue Kit 提取基因组,具体步骤按说明书进行。提取的基因组经过 β-globin 球蛋白引物(上游 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

收稿日期:2005-05-28,修回日期:2005-08-31

作者简介:乌恩奇(1981-),男,硕士生,研究方向为分子生物学。

** 通讯作者:孔维(1965-),男,博士,教授,从事生物化学与分子生物学研究。

查晓(1953-),男,博士,教授,从事化学分子生物学研究。

Corresponding author. E-mail: weikong@mail.jlu.edu.cn; zha530909@sina.com

下游 5'-CAACTTCATCCACGTTTACC) PCR 扩增验证所提取 DNA 质量。

1.4 引物设计

E6 基因引物根据 Genbank 提供的 HPV-59 (X77858) 全基因组, 要求既能扩增出 E6 基因全序列, 又能确保型间的特异性, 由本实验室自行设计。

引物由上海 Sangon 生物工程公司合成。

HPV-59 E6 基因上游引物: 5'-CACGCTTTG AGGATCCTAC

HPV-59 E6 基因下游引物: 5'-CACCAGTG TTTCACTACGC

1.5 PCR

50 μ L 反应体系, 包含 1 μ L 模板 DNA, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟后进入循环, 94 $^{\circ}$ C 60s, 57 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 共循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。

取 3 μ L PCR 反应产物, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色检测。

1.6 核酸序列测序

对 PCR 产物进行双向测序, 以获得可靠的序列信息。所获得突变样品经过 PCR 重新扩增并再次测序以排除 PCR 过程中碱基错配而产生的误差。测序工作由上海 Sangon 生物工程公司完成。

2 结果与讨论

2.1 HPV 59 感染和 PCR 扩增结果

宫颈癌组织 DNA 为模板以 HPV59 E6 引物进行扩增。PCR 产物电泳观察, 可见一条位于 466bp 附近的带, 为 HPV-59 E6 基因阳性产物 (见图 1)。本实验对来自四川地区 60 例宫颈癌组织进行了 HPV59 型感染情况调查。发现 3 例阳性, 占总病例 5%。

HPV 各型流行状况在不同地区存在着差异。Bosch^[1] 等对非洲、北美、南美、东南亚及欧洲 932 例宫颈癌组织进行 HPV 检测, 只在中南美和南亚地区发现 HPV-59 型感染, 感染率分别为 2.77% 和 1.02%。中国各地区 HPV-59 感染情况报道很少, 只有刘继红^[5] 等用通用引物 PCR 结合反向杂交法对广州地区及湖南地区 115 例宫颈癌组织进行 HPV 检测分型, 发现 HPV-59 感染率达 6.8%, 与 58 型一起被列为继 16、18 型之后第三常见感染类型。与

我们发现的 5% 相近。提示 HPV-59 在我国部分地区较为普遍。

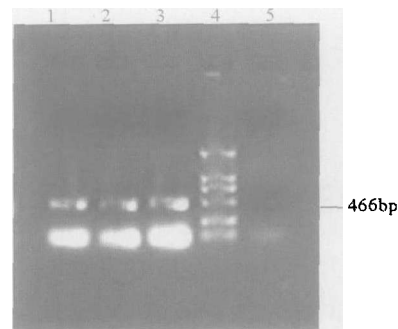


图 1 HPV-59 E6 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic analysis of PCR product of HPV59 E6 gene.

1/2/3, PCR amplified HPV59 E6 gene; 4, DNA marker; 5, Negative control

2.2 HPV-59 E6 基因核苷酸序列测定和分析

将结果为阳性的 PCR 产物进行测序分析, 测序结果表明 3 例样品 E6 基因产物长度为 466bp, 与标准株一致。其中 SC59-1 和 SC59-2 样品 E6 基因核苷酸序列同标准株一致, 未有突变。SC59-3 样品 E6 基因相对 GenBank 收录的来自日本和韩国的 HPV-59 标准株有 4 处碱基突变, 在国内外文献中均未见报道, 分别为 t102c、c306t、a363c 和 t402c。

SC59-3 样品 4 处碱基突变氨基酸水平上皆为同义突变, 不涉及氨基酸变化。

参考文献

- [1] Bosch F X, Lorincz A, Munoz N, *et al.* The Causal relation between human papillomavirus and cervical cancer [J]. J Clin Pathol, 2002, 55: 244-265.
- [2] Munoz N, Bosch F X, de Sanjosé S, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 348: 518-527.
- [3] 李洁, 刘宝印, Zur Hausen, 等. 中国妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒感染及地理分布的调查[J]. 中华实验和临床病毒学, 1996, 10: 50-55.
- [4] Bosch F X, Manos M M, Munoz N, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective [J]. J Natl Cancer Inst, 1995; 87: 796-802.
- [5] 刘继红, 荒信, 廖革望, 等. 中国和澳大利亚宫颈癌患者人乳头瘤病毒感染及其他危险因素的对比较研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 38: 748-752.