[文章编号] 1007-385X(2006)03-0219-02

HPV16 病毒中国山西襄垣流行株基因 *HPV16Z* 的序列分析

Sequence analysis of *HPV16Z* gene of HPV16 virus from Xiangyuan city in Shanxi of China

王小兵, 李 莱, 田海梅, 张 伟 (中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所生物检测中心, 北京 100021)

[摘要] **目的:** 分析中国山西襄垣地区人乳头瘤病毒 16 型 *HPV16Z* 基因的结构特点。**方法:** 对 *HPV16Z* 进行双向测序, 并将其基因全序列与德国标准株进行对比分析。**结果:** DNA 序列分析表明, *HPV16Z* 与已发表的德国标准株基因长度相等, 其中 LCR 和 L1、E6 部位的核酸片段存在变异。LCR 的变异部位分别位于 7431 ~ 7432 nt、7433 nt、7495 nt、7852 nt, 变异方式分别为碱基插入、碱基替代及碱基缺失突变; L1 的变异部位分别位于 6169 ~ 6171 nt、6901 ~ 6902 nt、6949 ~ 6951 nt, 其变异方式为碱基替代、碱基插入及碱基缺失突变; E6 的变异部位位于 350 nt, 其变异方式为碱基替代突变。**结论:** 中国山西襄垣地区妇女宫颈癌患者组织中 HPV16 型病毒 *HPV16Z* 基因结构与德国标准株 *HPV16* 基因之间存在一定的差异。

[关键词] 人乳头瘤病毒 16 型; 宫颈癌; 基因序列分析

[中图分类号] R373.9

[文献标识码] A

人乳头瘤病毒(HPV)是一种无包膜的 DNA 病毒, 可广泛感染人生殖道和肛门的皮肤、黏膜并导致良性或恶性肿瘤, 其中与宫颈癌发病关系密切的有 HPV16、18 等型。在妇女宫颈癌和癌前病变组织中, HPV 感染检出率大于 99%, 其中高危型 HPV16 占 60% 以上。在我国, 不同地区宫颈癌患者的癌组织中 HPV16 的平均检出率为 79.6%^[1]。流行病学研究已证实, 不同地区的 HPV16 往往存在着变异。自 1985 年 Seedorf^[2] 首次公布从德国人宫颈癌组织中克隆的 HPV16 病毒序列以来, 研究人员在不同地区检测到 HPV16 变异株的存在, HPV16 的变异可能与区域性宫颈癌的高发存在关联。张伟教授^[3] 于上世纪 90 年代初期首次在我国山西襄垣地区获得 HPV16 流行株, 并命名该病毒基因组为 *HPV16Z*, 通过核酸杂交试验发现 *HPV16Z* 与当地宫颈癌和癌前病变显著相关, 且随组织病变加重 *HPV16Z* 检出率明显增高, 结果提示当地宫颈癌高发可能与 HPV16 感染有关。本实验对中国山西襄垣流行株 *HPV16Z* 的核苷酸序列进行测序分析, 以探索中国人 *HPV16Z* 基因结构特点, 为探讨该地区宫颈癌高发的分子机制及 HPV16 相关疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HPV16Z 质粒, 自山西襄垣获得的 HPV16 型流行株病毒基因序列与 pAt153 载体融合而成的, 并由本室保存。

1.2 病毒基因组的序列测定

根据病毒基因组插入质粒的位点, 设计一对引物,

序列分别为: 上游引物 5'-TGGAGCCACTATCGAC-TACGC; 下游引物 5'-GGCGCCGGTGATGCC, 利用 377 自动测序仪分别从 2 端进行测序, 并利用软件 Primer premier 5.0 获得继续测序的引物, 通过分步测序的方法获得 *HPV16Z* 的全基因序列。

1.3 *HPV16Z* 病毒基因序列与 HPV16 标准株序列比较

将测序获得 *HPV16Z* 序列利用 DNASIS 软件与德国标准株进行序列对比, 比较其核苷酸及编码氨基酸的同源性。

2 结果与讨论

HPV16 是人乳头瘤病毒高危型之一, 可引起皮肤、黏膜的恶性肿瘤。德国标准株基因全长 7 904 bp, 呈双链环状, 根据功能不同可将其基因组结构可分为早期区(E区)、晚期区(L区)和长末端控制区(LCR)。

早期区基因编码 E1、E2、E4、E5、E6、E7, 其表达产物为控制病毒 DNA 复制的非结构蛋白; 晚期区基因编码 L1 与 L2, 其表达产物是构建病毒壳体的结构蛋白; LCR 位于 L1 与 E6 之间, 约 1 000 bp, 含内含子和增强子序列, 控制所有 ORF 的转录, 其保守序列与 HPV 的表皮向性有关。经测序, *HPV16Z* 病毒基因组长度为 7 904 bp, 与标准株一致。其中 LCR、L1 和 E6 基因片段存在变异(表 1)。

[作者简介] 王小兵(1980-), 男, 硕士, 实习研究员, 主要从事基因工程药物研究。Email: bingzi@263.net

[通讯作者] 张 伟, Email: zhangwe@public.bta.net.cn

表 1 HPV16Z 基因和蛋白序列的变异

区域	单核苷酸部位 (nt)	密码子变异	氨基酸部位	氨基酸变异
LCR	7 431 ~ 7 432	Insert C		
	7 433	C-G		
	7 495	A-T		
	7 852	Delete A		
L1	6 169 ~ 6 171	TTG-CCC	204	Leu-Pro
	6 901 ~ 6 902	Insert ATC	448 ~ 449	Insert Ile
	6 949 ~ 6 951	Delete GAT	465	Delete Asp
E6	350	T-G	90	Leu-Val

LCR 是乳头瘤病毒基因组中变异较大的一个区段,测序结果表明,LCR 有 4 处变异,LCR 区的变异可能影响到编码基因的转录,进而影响病毒的致病力,这可能与当地宫颈癌高发有关。

标准株晚期蛋白 L1 是 HPV16 的主要衣壳蛋白,L1 基因全长 1 596 bp,位于 5 559 ~ 7 154 nt 之间。HPV16Z 的 L1 核苷酸序列与标准株比较有 3 处密码子存在变异,即 6 169 ~ 6 171 nt 密码子由 TTG 替代突变为 CCC,其编码氨基酸由苯丙氨酸突变成脯氨酸;6 901 ~ 6 902 nt 间插入 3 个碱基 ATC,氨基酸序列相应位置插入异亮氨酸;原始序列 6 949 ~ 6 951 nt 编码天冬氨酸的密码子 GAT 缺失并导致氨基酸序列相应位置上的天冬氨酸缺失。L1 氨基酸序列发生改变可能引起疏水性和抗原性的改变,其结果可能导致病毒抗原表位的改变,使病毒逃避机体免疫识别,从而造成病毒的持续和重复感染,促进宫颈癌的发生。

HPV16Z E6 基因全长 477 bp,位于第 83 ~ 559 nt 之间,E6 基因序列与德国标准株比较有一处发生变异,即第 350 位碱基由 T 突变为 G,密码子由 TTG 错意突变为 GTG,此变异导致其编码氨基酸由亮氨酸突变成缬氨酸。E6 基因这一变异引起所编码氨基酸的改变,可能会改变 E6 蛋白对 p53 的降解功能,进而影响到癌症的发生。进一步研究 HPV16Z LCR、L1、E6 变异对阐明该地区宫颈癌高发的分子机制有重要作用。

目前,我国学者已克隆到 HPV16 新疆株 L1E6E7 基因、湖北株 E6 基因、山东株 E6E7 基因及北京株 E6E7 基因^[4-7],并对各基因特点进行分析,各基因序列与德国标准株 HPV16 基因之间均存在一定差异,与本研究结果部分吻合。说明 HPV16 在我国不同的地区存在不同的流行株,但同时其变异也有共同性,这为研究我国 HPV16 基因结构的特点积累了流行病学资料;该结果也可用于 HPV16 进化谱系分析,以设计出最大程度通用的寡核苷酸探针,使用于流行病学调查及诊断。另外,本实验结果为采用免疫学方法预防和治疗我国 HPV16 流行株引起的相关疾病提供了新的线索,对相关疫苗的研制奠定了实验基础^[8-9]。

[参 考 文 献]

- [1] Lo KW, Wong YF, Chan MK, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A multicenter study in China[J]. *Int J Cancer*, 2002, 100(3): 327-331.
- [2] Seedorf K, Krammer G, Durst M, *et al.* Human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. *Virology*, 1985, 145(1): 181-185.
- [3] 张 伟, 金顺钱, 梁 肖, 等. 我国人乳头瘤病毒(HPV16Z) 基因克隆与鉴定[J]. *中国病毒学*, 1993, 8(1): 45-52.
- [4] 伍欣星, 赵文先, 丁晓华, 等. 湖北地区宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因的分、克隆和序列分析[J]. *中国病毒学*, 1996, 11(3): 220-224.
- [5] 马正海, 钱 东, 马 纪, 等. 中国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[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(3): 400-404.
- [6] 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、克隆和序列分析[J]. *中国医学科学院学报*, 1999, 21(3): 185-191.
- [7] 左亚刚, 王家壁, 许雪梅, 等. 北京地区人乳头瘤病毒 16 E6E7 基因变异和序列分析[J]. *中华皮肤科杂志*, 2003, 36(11): 650-652.
- [8] 王小兵, 李荣, 刘朝阳, 等. HPV162-HSP65-E6/E7 无佐剂重组蛋白疫苗的研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 13(1): 8-12.
- [9] 王小兵, 张叔人. 人乳头瘤病毒(HPV) 疫苗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12(1): 80-83.

[收稿日期] 2006 - 05 - 29

[修回日期] 2006 - 06 - 10

[本文编辑] 郁晓路

欢迎浏览《中国肿瘤生物治疗杂志》网站

为了方便更多的读者浏览杂志,为肿瘤生物治疗工作者提供一个更宽广的信息交流平台,《中国肿瘤生物治疗杂志》开通了网站,网站设置了期刊概况、期刊内容、出版发行、投稿指南、科研动态、政策法规等栏目,同时有期刊检索功能,您可以轻松浏览每期杂志内容,了解相关的研究进展。

网站地址为: <http://www.biother.org>