DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.046
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
106 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0106-03

重庆地区1例宫颈癌组织人乳头瘤病毒16型E6,E7基因的结构和变异

胡丽娜[1],徐 波[1],漆洪波[1],任 红[2],顾美礼[1] (重庆医科大学第二临床学院:[1]妇产科;[2]肝炎研究所,重庆 400010)

提 要:目的 报告1例重庆地区宫颈癌组织人乳头瘤病毒16型E6、E7基因的结构及其变异。方法 应用聚合酶链式反应(PCR)从宫颈癌组织扩增出人乳头瘤病毒16型重庆株E6、E7基因,分子克隆技术进行基因的克隆,测序。结果 成功地扩增出重庆地区宫颈癌人乳头瘤病毒16型株E6、E7基因,并克隆于质粒载体pBKS(+)。结论 该例宫颈癌组织中人乳头瘤病毒16型E6、E7与标准株HPV16 E6、E7基因的长度相同,E6基因无变异,但E7基因有两处点突变。

关键词:宫颈癌;人乳头瘤病毒16型;聚合酶链式反应(PCR);分子克隆
中图法分类号:R373.9;R394.2;R737.33 文献标识码:A

Structure and variation of E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 from 1 case of cervical carcinoma in Chongqing

HU Li-na, XU Bo, QI Hong-bo, REN Hong, GU Mei-li (Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To study the sequence and variation of the E6 and E7 genes of human papillomavirus 16 type (HPV16) from cervical carcinoma in Chongqing. **Methods** PCR was used to amplify HPV16 E6 and E7 genes from a sample of cervical carcinoma obtained by biopsy in Chongqing. E6 and E7 the sequences of genes were analyzed before being inserted into the vector pBKS(+) with molecular cloning. **Results** HPV16 E6, E7 genes were amplified with PCR and inserted into the vector pBKS(+) successfully. **Conclusion** The lengths of HPV16 E6 and E7 genes are the same as their counterparts of standard HPV16. The sequence of E6 gene is identical to the E6 sequence of Germany strain of HPV16, but, two point-mutations were found in E7 gene.

Key words: cervical carcinoma; human papillomavirus 16 type; PCR; molecular cloning

宫颈癌是妇女常见恶性肿瘤,严重威胁妇女健康,影响生存质量。流行病学和分子生物学的研究已经证实人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)高危型(16,18型等)是宫颈癌发生的重要原因。宫颈癌的发生发展与HPV E6、E7原癌蛋白关系密切。分子生物学和免疫学的研究表明,E6、E7原癌蛋白可作为抗原,诱发机体产生细胞免疫和体液免疫。宫颈癌治疗性疫苗的研究工作早已开展,在国外,蛋白疫苗和多肽疫苗已经用于I期临床。结果表明有良好前景[1]。我们用PCR从重庆地区1例宫颈癌组织中扩增出HPV16E6、E7基因,分析其序列是否存在变异,为研究变异株致癌的机制和开发适用于本地区的宫颈癌治疗性疫苗工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 宫颈癌活检组织取自重庆医科大学附属第二医院门诊患者1例,病理诊断为宫颈鳞状细胞癌。组织离体后迅速投入液氮,-70 ℃冷冻保存。

1.1.2 引物 根据标准株序列设计,E6,E7引物5′端分别有*EcoRI*,*Hind*Ⅲ和*Hind*Ⅲ,*XbaI*酶切位点。由上海生工生物工程公司合成。

E6上游引物:5′-TTGAAGCTTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATG-3′
*Hind*Ⅲ
E6下游引物:5′-CATTCTAGATTACAGCTGGGTTTCTCTACGTG-3′
XbaI
E7上游引物:5′-GGCGAATTCATGCATGGAGATACACCTAC-3′
EcoRI
E7下游引物:5′-GGCAAGCTTATGGTTTCTGAGAACAGATGG-3′
*Hind*Ⅲ

1.1.3 酶及试剂 高保真TaqDNA聚合酶为加拿大Sangon产品。核酸限制性内切酶和T4 DNA连接酶是Promega产品。组织DNA抽提试剂盒,PCR产物纯化试剂盒购自上海华舜公司。质粒提取试剂盒,胶回收试剂盒是Boehringer Mannheim产品。ITPG,X-gal是sigma产品。

1.1.4 菌种,质粒 受体菌XL1-blue,质粒pBKS(+)由重庆医科大学病毒性肝炎研究所任红教授赠送。含标准株HPV16 DNA全序列pBR322-HPV16质粒由德国Dr Zur Hausen赠送。

1.1.5 仪器 PCR扩增仪(PE 2400美国),核酸电泳仪(Bio-Rad美国)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 从宫颈癌活检组织中提取DNA,以此为模板,用上述上下游引物扩增HPV16-CQ E6,E7。反应体系为100 μl,其中含模板DNA 0.5 μg,dNTP(5 mmol/L)8 μl,引物各20 pmol/L。Taq聚合酶2 U。94 ℃变性7 min后,进行两类共30次循环:

基金项目:重庆市科委、卫生局资助项目
作者简介:胡丽娜(1959-),女,重庆市人,硕士,教授,主要从事生殖医学,妇科肿瘤方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)63826964
收稿日期:2001-04-05;修回日期:2001-12-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

94 ℃ 40 s, 45 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 10 次循环后 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 90 s, 20 次循环, 最后 72 ℃延伸 7 min。

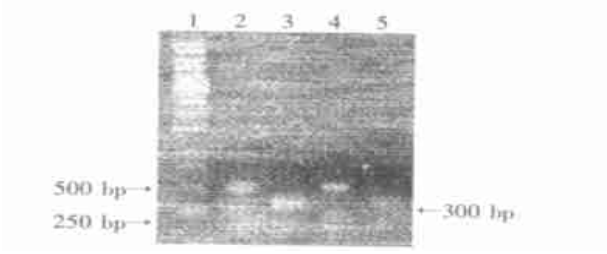
1.2.2　克隆 HPV16-CQ E6, E7　　质粒 pBKS(+), E6, E7 PCR 产物纯化后分别用 *Hind* Ⅲ, *XbaI* 和 *EcoRI*, *Hind* Ⅲ酶切 2 h。0.8%琼脂糖电泳分离, 胶回收。按外源基因和载体分子 3∶1 摩尔比在 T4DNA 连接酶作用下, 15 ℃过夜。取约 0.2 μg 连接产物转化感受态 XL1-blue。转化菌在含 X-gal, IPTG, Amp 的 LB 平皿中 37 ℃培养 16 h, 筛选白色菌落。

1.2.3　序列测定　　由上海基康生物技术有限公司测定。

2　结果

2.1　宫颈癌组织 DNA 中扩增出 HPV16 E6, E7 基因

PCR 30 次循环后, 扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上, 于约 500, 300 bp 处见清晰的扩增带。分别与标准株 HPV16 E6, E7 扩增产物处于同一水平, 见图 1。



1: Marker; 2: E6 of pBKS322-HPV16; 3: E7 of pBKS322-HPV16; 4: E6 of cervical carcinoma tissue DNA; 5: E7 of cervical carcinoma tissue DNA

图 1　宫颈癌组织 DNA PCR 产物 1%琼脂糖电泳分析

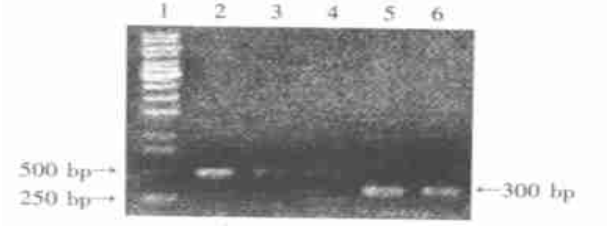
Fig 1　Electrophoresis of PCR products of cervical carcinoma

2.2　pBKS(+)-HPV16-CQ E6, E7 克隆筛选

挑选白色菌落, 提取质粒 DNA, 用 PCR 扩增出约 500bp 的条带, 用 *Hind* Ⅲ, *XbaI* 双酶切 2 h, 1%电泳分析, 有约 500bp 的条带, 两者均为阳性筛选出 pBKS(+)-HPV16 E6 阳性克隆, 见图 2。PCR 扩增出约 300 bp 的条带, 用 *EcoRI* 和 *Hind* Ⅲ双酶切 2 h, 1%电泳分析, 有约 500 bp 的条带, 两者均为阳性筛选出 pBKS(+)-HPV16 E7 阳性克隆, 见图 3。

2.3　HPV16 E6, E7 的序列测定

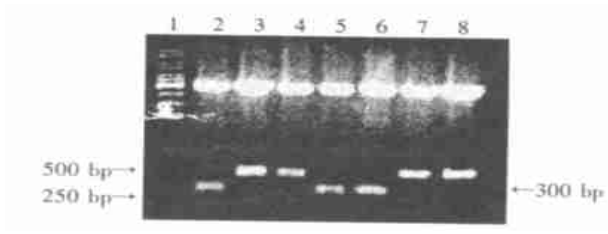
本例重庆宫颈癌 HPV16 E6、E7 的基因与标准株长度完全一致, E6 的结构无变异, 但 E7 有两处碱基发生了点突变。第 43 位密码子由标准株 CAA 变为 TAA, 第 76 位密码子由标准株 CGT 变为 TGT, 见图 3。



1: Marker; 2~4: pBKS322-HPV16-CQ E6; 5, 6: pBKS322-HPV16 E7

图 2　PCR 鉴定重组克隆

Fig 2　Detection of recombinant clone with PCR



1: Marker; 2~5: pBKS322-HPV16 E6/*Hind* Ⅲ+ *Xba*Ⅰ; 6~8: pBKS322-HPV16 E7/*EcoR*Ⅰ+*Hind* Ⅲ

图 3　酶切鉴定重组克隆

Fig 3　Detection of recombinant clone with enzyme digestion

3　讨论

宫颈癌与高危型 HPV 感染的密切关系已经受到广泛关注。HPV E6、E7 所编码的原癌蛋白不仅在肿瘤的发生发展中具有重要的意义, 而且能诱发机体针对 HPV 感染及其相关疾病如宫颈癌、尖锐湿疣等特异性免疫应答, 特别是细胞毒性淋巴细胞反应(CTL); HPV16 E6、E7 具备的 T 细胞表位是 E6、E7 作为疫苗的免疫基础[2]。目前将 E6、E7 原癌蛋白视为肿瘤特异性抗原研究开发治疗型疫苗, 已成为世界领域的研究热点。但 HPV 不仅株型繁多, 而且变异常见。研究资料表明, HPV 核苷酸序列变异可能参与决定 HPV 相关性疾病的进展或消退; HPV 的早期开放阅读框架 E2、E6、E7 的突变, 在导致 HPV 相关疾病的恶性转化中可能起决定性作用[3~6]。因此, 对 E6、E7 的结构及其变异的了解有其重要价值。

我们从重庆地区 1 例宫颈癌患者活检组织中扩增出 HPV16 E6、E7 基因, 经克隆测序后发现, HPV16 E6、E7 基因长度与德国标准株完全一致, E6 的结构无变异, 但 E7 有两处碱基发生点突变。第 43 位密码子由标准株 CAA 变为 TAA 成为翻译终止密码, 第 76 位密码子由标准株 CGT 变为 TGT, 此处变异为无效突变。经 GENEBANK 中查阅, 我们所测定的 HPV16 E7 序列的变异点与中国湖北株相同, 而与 HPV16 美国 AF125673 株、U89348 株的变异点不同。E7 编码蛋白的特定的氨基酸位置对 E7 诱导的细胞转化、细胞协调、细胞免疫及 E7 与视网膜母细胞癌蛋白结合、酪蛋白磷酸转移酶Ⅱ对 E7 的磷酸化反应起有重要作用[2]。HPV E7 编码蛋白为 98 个氨基酸残基, E7 功能结构单位—两个锌指结构 Cys-X-X-Cys(色氨酸-X-X-色氨酸)分别位于第 58~61 和 91~94 的氨基酸位点, 锌指结构与 E7 二聚体形成之间有密切关系, E7 二聚体的形成对细胞恶性转化有重大意义[7]。而该例重庆宫颈癌 HPV16 E7 和中国湖北 HPV16 E7 蛋白第 43 位密码子由 CAA 变为翻译终止密码 TAA 后, 仅编码 43 个氨基酸残基, 缺乏 C 端的锌指结构。完整的 C 端对 E7 蛋白的生物学功能有稳定和增强作用, 锌指结构突变可

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

消除角化细胞永生态，部分或完全抑制细胞转化[8]。而且 E7 的 T 细胞表位于第 47～57 的氨基酸位点[7]。所以中国地方株 E7 变异后，其功能如何和致癌性及抗原性的大小还值得研究。

Song[9] 报道 E6、E7 基因能联合致癌，但只导入 E6 基因，可诱发小鼠皮肤恶性肿瘤，而仅导入 E7 基因却发生皮肤良性肿瘤。似乎在 HPV16 致癌中 E6 基因发挥更大的作用。我们的实验结果未发现 E6 基因序列变异，也未见到国内有关 E6 基因变异的报道。说明中国地方株 E7 变异多态性大于 E6。可见，相对稳定的结构是维持其功能的保障。

由于 Taq 酶介导的 DNA PCR 合成中，碱基错配率为 0.25%，在全长 294bp 的序列中发生两处差异，用实验误差难以解释，而其变异与中国湖北株完全相同，美国、菲律宾、印度、乌干达 E7 克隆株亦有一级结构及编码蛋白变异的报道[2]，也说明 HPV E7 基因存在多态性差异。

参考文献：

[1] Gariglio P, Benitez-bribriesca L, Berunen J, *et al*. Therapeutic Uterine-Cervix Cancer Vaccines in Humans[J]. Arch Med Res, 1998, 29: 279—284.

[2] Feltkamp M C, Smits H L, Vierboom M P, *et al*. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(9): 2 242—2 249.

[3] Barbosa M S, Vass W C, Lowy D R, *et al*. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential[J]. J Virol 1991, 65(1): 292—298.

[4] Tornesello M L, Buonaguro F M, Meglio A, *et al*. Sequence variations and viral genomic state of human papillomavirus type 16 in penile carcinomas from Ugandan patients[J]. J Gen Virol 1997, 78 (Pt 9): 2 199—2 208.

[5] Veress G, Szarka K, Dong X P, *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 (Pt 4): 1 035—1 043.

[6] Icenogle J P, Sathya P, Miller D L, *et al*. Nuxleotide and Amino Acid Sequence Variation in the L1 andE7 Open Reading Frames of Human Papillomavivus Type 16[J]. Virology, 1991, 184(): 101—107.

[7] Iochmuller H, Johns T, Shoubridge E A. Expression of the E6 and E7 genes of human papillomavirus (HPV16) extends the life span of human myoblasts[J]. Exp Cell Res, 1999, 248(1): 186—193.

[8] 伍欣星，赵文先，丁晓华，等. 中国地方株人乳头瘤病毒 16 型基因一级结构及其变异[J]. 中华微生物和免疫学杂志，1996, 16(6): 395—398.

[9] Song S, Pitot H C, Lambert P F. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals[J]. J Virol, 1999, 73(7): 5 887—5 893.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)01-0108-02

子宫内膜异位症患者外周血及腹腔液中 NK 细胞活性及细胞因子的测定分析

NK cell activity and cytokine levels in periphoral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis

周龙书[1]，焦亚萍[2]，黄立萍[1]，唐伟琼[1]　（[1] 广州军区总医院妇产科；[2] 广州市妇婴医院妇产科；广州 510010）

许多研究表明，子宫内膜异位症与患者全身及腹腔内一系列细胞因子的改变有关，影响其发生和发展[1]。本研究通过测定 34 例内异症外周血及腹腔液内 NK 细胞活性及 IL-6、IL-8、TNF-α 水平，旨在了解它们的改变，并探讨其与内异症的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究共收集 1999 年 6 月至 2000 年 6 月在广州军区总医院、广州市妇婴医院行剖腹探查术后病理确诊为子宫内膜异位症的患者 32 例，年龄 27～48 岁。按美国生育协会修正标准分期：轻度组（Ⅰ、Ⅱ期 13 例），重度组（Ⅲ、Ⅳ期 19 例）。同时选择正常育龄妇女 19 例为对照组，年龄 28～42 岁，无结核、肝炎、肿瘤及其他自身免疫性疾病。

1.2 标本收集

手术前、术中分别收集患者外周血 5 ml、腹腔液 10 ml，水平离心 2 000 r/min，20 min，收集淋巴细胞，用 Hanks 液洗涤 3 次，调至细胞含量为 5×10^8/L 备用。另一只水平离心 2 000 r/min，20 min，取上清液，分 3 管置于－30 ℃冰箱内待测。

1.3 测定方法

1.3.1 NK 细胞活性测定　分别将已制备的淋巴细胞（含 NK 细胞）与经 ^{3}H-胸腺嘧啶标记的 K_{562} 细胞混合作为实验孔，另设自然释放孔（无淋巴细胞孔）。加入小牛血清 0.1 ml，置 5% CO_2 孵箱内，37 ℃，48 h 后分别收集各孔内细胞，冲洗后经液闪计数器测定未被杀灭的 K_{562} 细胞内 ^{3}H-胸腺嘧啶的每分钟脉冲数（cpm）。观察结果按下列公式计算。

$$\text{NK 细胞活性\%} = \left[1 - \frac{\text{实验孔(cpm)}}{\text{自然释放孔(cpm)}}\right] \times 100\%$$

1.3.2 IL-6、IL-8 及 TNF-α 测定　采用酶联免疫吸附法，试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室，操作方法按药盒说明进行。

1.4 统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，经 t 检验及方差分析法处理。

（下转 111 页）

作者简介：周龙书（1959－），男，江苏省泰兴市人，硕士，主治医师，主要从事妇科疾病、肿瘤方面的研究，发表论文 10 篇。电话：36222917

收稿日期：2000-01-15；修回日期：2001-09-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net