

安徽省人乳头瘤病毒 16 型全基因组的结构特征

孙云峰¹, 江彤², 陈传俊¹

摘要 目的 克隆安徽省人乳头状瘤病毒 16 型(HPV16)全基因组,分析 HPV16 全基因组序列并了解其结构特征。方法 收集 5 例安徽省宫颈癌病理组织标本并提取总 DNA,设计 4 对特异性引物分段克隆 HPV16 全基因组,测序后进行序列拼接及核苷酸序列分析。结果 检测到 1 个宫颈癌病理样本中含有 HPV16 并获得全基因组序列,序列全长 7 906 nts (GenBank 登录号:KC935953)。序列比对显示,安徽 HPV16 (HPV16-Anhui)与泰国 HPV16 和日本 HPV16 的全基因组核苷酸序列相似性最高,达 99.5%。系统关系树分析显示,HPV16-Anhui 与其他 7 个 HPV16 型聚成 1 个单独的分支。结论 获得安徽省首例 HPV16 全基因组核苷酸序列,HPV16-Anhui 与不同地区 HPV16 亲缘关系均较近且基因组变异性较小。

关键词 人乳头状瘤病毒 16 型;全基因组;克隆;序列分析

中图分类号 R 730.261

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1456-05

人乳头瘤病毒(*human papillomavirus*, HPV)属于乳多空病毒科(*Papovaviridae*)乳头瘤病毒属(*Papillomavirus*),HPV 基因组全长约 8 000 nts,分为早期表达区(early expression region, E)、晚期表达区(late expression region, L)和上游调控区(upstream regulatory region, URR)3 个区域^[1]。早期各国学者^[2]采用 HPV 新型别被发现的先后顺序进行编号,Orth et al^[3]从寻常疣中分离出世界上最早的 2 例 HPV,命名为 HPV1 和 HPV2。直到 2004 年,国际病毒分类委员会将已知的乳头瘤病毒归入乳头瘤病毒属,并根据 L1 基因的核苷酸序列相似性制定了新的型别分类依据。L1 基因的序列相似性 < 90% 为新的型别,相似性在 90% ~ 98% 之间为同一型别的不同亚型,相似性 > 98% 为同一型别的不同变异株^[2],这一标准沿用至今。此前关于 HPV16-Anhui 全基因组序列的报道尚处于空白,该研究报道了 1

例宫颈癌病理样本中含 HPV16,并对其全基因组进行了序列分析,旨在进一步了解 HPV16-Anhui 基因组变异规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料 5 例样本采自安徽医科大学第三附属医院 2012 年 1 月 ~ 5 月间宫颈癌病理组织,术中切取的新鲜样本保存于 -70 °C。Omega D339601 Tissue DNA Kit 购自美国 Omega bio-tek 公司;Taq DNA 聚合酶、Long Taq DNA 聚合酶购自北京天根生物公司;TaKaRa Minibest Agarose Gel DNA Extraction Kit、pMD18-T 载体、T4 连接酶购自日本 TaKaRa 生物公司;大肠杆菌细胞株 DH5 α 为本实验室保存。

1.2 引物的设计与合成 在 GenBank 中下载不同的 HPV16 全基因组序列并用 DNASTar (DNASTAR Inc, Madison, 美国)软件进行序列比对,将 HPV16 全基因组分成 4 个区段,即 HPV-A、HPV-B、HPV-C 和 HPV-D,分别设计 4 对特异性引物进行 PCR 扩增。4 对引物分别为: HPV-AF (5'-ATCGATGGCCTCTG-TAGGTGTTGAG-3'), HPV-AR (5'-GTCCGACGATGAG-GTGGTGGGTGTAGCT-3'); HPV-BF (5'-CCAGGAG-GCACACTAGAAGATAC-3'), HPV-BR (5'-CTCATG-GCGCCCTTCTACCT-3'); HPV-CF (5'-GACAGCGGG-TATGGCAATACTG-3'), HPV-CR (5'-TCCGGTGTCTG-GCTCTGATC-3'); HPV-DF (5'-CACAGACGACTATC-CAGCGAC-3'), HPV-DR (5'-TGGCCACTAATGCCCA-CACC-3')。引物均由上海英潍捷基公司合成。

1.3 试验方法

1.3.1 总 DNA 提取 根据 Omega D339601 Tissue DNA Kit 说明书操作,分别提取 5 个宫颈癌病理标本的总 DNA。

1.3.2 PCR 扩增、克隆和序列测定 利用引物 HPV-AF/HPV-AR PCR 扩增片段 HPV-A,反应条件:94 °C 45 s,59 °C 45 s,72 °C 70 s,30 个循环。利用引物 HPV-BF/HPV-BR、HPV-CF/HPV-CR 和 HPV-DF/HPV-DR PCR 分别扩增片段 HPV-B、HPV-C 和 HPV-D,反应条件:94 °C 30 s,54 °C 30 s,72 °C 70 s,30 个循环。PCR 产物 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,用 TaKaRa Minibest Agarose Gel DNA Extraction Kit 回

2014-02-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81172574)

作者单位:¹安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)口腔颌面外科,合肥 230061

²安徽农业大学植物保护学院,合肥 230036

作者简介:孙云峰,男,硕士研究生;

陈传俊,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:cej6318@sina.com

收纯化特异性片段,与载体 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,菌落 PCR 筛选阳性克隆,菌液送上海英潍捷基公司测序。

1.3.3 序列分析 利用软件 DNASTar 中的 SeqMan 程序拼接 HPV-A、HPV-B、HPV-C 和 HPV-D 4 段序列,利用软件 MEGA version 5 构建系统关系树。多序列比对采用 DNASTar Clustal V 方法,系统关系树构建采用 MEGA5 的邻近相连法。用于序列比对和系统关系树构建的 7 个 HPV16 和其他 HPV 型别的来源地及 GenBank 登录号,见表 1。

表 1 HPV 型别的来源地及基因组序列 GenBank 登录号

HPV 型别	来源地	GenBank 登录号
HPV16-US	美国	NC_001526
HPV16-Gansu	中国甘肃	EU918764
HPV16-TH	泰国	FJ610146
HPV16-JP	日本	AB818688
HPV16-BR	巴西	HM057182
HPV16-HR	克罗地亚	JN565303
HPV16-GB	英国	K02718
HPV6b-US	美国	NC_001355
HPV11-SVN	斯洛文尼亚	HE962367
HPV18-US	美国	NC_001357
HPV31-US	美国	J04353
HPV39-DE	德国	M62849
HPV45-US	美国	EF202167
HPV52-US	美国	HQ537751
HPV58-Gansu	中国甘肃	EU918765
HPV59-Gansu	中国甘肃	EU918767
HPV67-US	美国	HQ537783
HPV68-Gansu	中国甘肃	EU918769
HPV69-JP	日本	AB027020
HPV70-SE	瑞典	U21941
HPV82-JP	日本	AB027021
HPV97-US	美国	DQ080080

2 结果

2.1 HPV16-Anhui 全基因组结构 1 例标本中可以扩增到 HPV-A、HPV-B、HPV-C 和 HPV-D 4 个条带,条带大小与预期相符,克隆并测序,序列长度分别为 1 180、2 361、2 244 和 2 617 nts。4 段序列经拼接获得全基因组序列,全长 7 906 nts (GenBank 登录号:KC935953 2014 年 4 月释放)。HPV16-Anhui 具有典型的 HPV16 全基因组结构特征,共编码 8 个 ORF。E 区包含 6 个开放阅读框 (open reading frame, ORF),即 E6 (83 ~ 559 bp),E7 (562 ~ 858 bp),E1 (865 ~ 2 814 bp),E2 (2 756 ~ 3 853 bp),E4 (3 333 ~ 3 620 bp),E5 (3 850 ~ 4 101 bp)。L 区包含 2 个 ORF,即 L2 (4 236 ~ 5 657 bp),L1 (5 560 ~ 7 155 bp)。L1 和 E6 之间(7 156 ~ 82 bp)是

非编码调节区,见图 1 ~ 5。

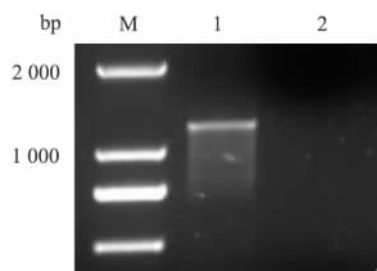


图 1 HPV16 片段 A 的 PCR 产物
M: DNA Marker; 1: HPV-A; 2: 阴性对照

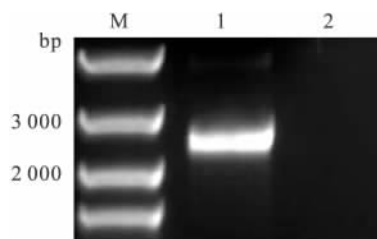


图 2 HPV16 片段 B 的 PCR 产物
M: DNA Marker; 1: HPV-B; 2: 阴性对照

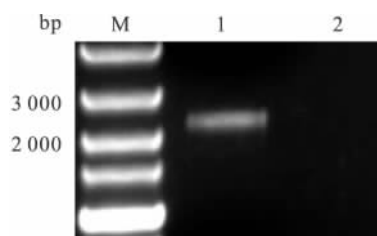


图 3 HPV16 片段 C 的 PCR 产物
M: DNA Marker; 1: HPV-C; 2: 阴性对照

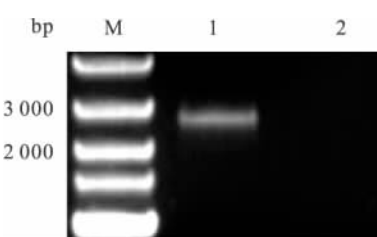


图 4 HPV16 片段 D 的 PCR 产物
M: DNA Marker; 1: HPV-D; 2: 阴性对照

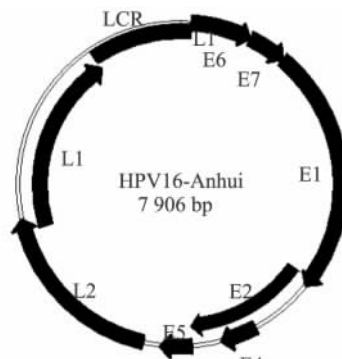


图 5 HPV16-Anhui 的基因组结构

2.2 序列分析 序列比对显示,HPV16-Anhui 与所有型别 HPV 全基因组序列相似性为 61.0% ~ 99.5%,与 7 个 HPV16 全基因组序列相似性达 98.3% ~ 99.5% 其中与 HPV16-TH 和 HPV16-JP 相似性最高,达 99.5%; HPV16-Anhui 与其他型别 HPV 的全基因组序列相似性为 61.0% ~ 73.4% 其中与 HPV31-US 相似性较高,为 73.4% 与 HPV11-SVN 相似性最低,仅为 61.0%。 HPV16-Anhui 的各 ORF 与所有型别 HPV 相对应的 ORF 核苷酸序列相似性为 28.4% ~ 99.8% 其中与 7 个 HPV16 相应的各 ORF 序列相似性均较高,达 95.7% ~ 99.8%; 各 HPV 全基因组序列相似性和相对应的各 ORF 序列相似性具有一致性,即 HPV 全基因组序列相似性较高 相对应的各 ORF 序列相似性也较高,反之也是如此,见表 2。

从构建的系统关系树可以得出,HPV6b 和 HPV11-SVN 聚成 1 组,HPV16、HPV18 和 HPV31 等聚成另外 1 组 其中 HPV16-Anhui 和其他地区 7 个 HPV16 聚成 1 个单独的分支,表明 HPV16-Anhui 与所有 HPV16 亲缘关系均较近,而低危型 HPV39、HPV70 和高危型 HPV16、HPV18、HPV31 等聚成另

外一组,甚至低危型 HPV39、HPV72 和高危型 HPV68 聚成 1 个单独的分枝,亲缘关系很近,见图 6。

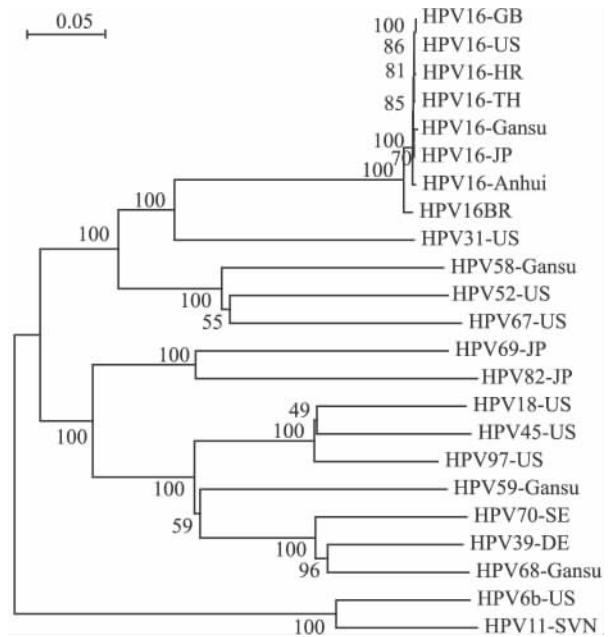


图 6 基于 HPV16-Anhui 与其他 22 个 HPV 全基因组核苷酸序列构建的系统关系树

表 2 HPV16-Anhui 与其他 22 个 HPV 全基因组及相对应的各 ORF 和 URR 核苷酸序列相似性

HPV 型别	序列相似性 (%)									
	基因组	E6	E7	E1	E2	E4	E5	L2	L1	URR
HPV16-US	99.4	99.8	99.3	99.5	99.0	98.6	98.8	99.6	98.9	96.4
HPV16-Gansu	99.3	99.0	99.0	99.5	99.3	99.3	99.6	99.5	99.6	98.1
HPV16-TH	99.5	99.8	99.3	99.7	99.3	99.3	99.6	99.7	99.7	98.0
HPV16-JP	99.5	99.3	99.0	99.8	99.4	99.3	99.6	99.6	99.7	98.2
HPV16-BR	98.3	98.1	96.6	99.2	98.5	97.6	97.2	98.4	98.6	95.7
HPV16-HR	99.4	99.6	99.3	99.6	99.2	99.0	99.6	99.7	99.7	98.0
HPV16-GB	99.4	99.8	99.3	99.8	99.0	98.6	98.3	99.6	99.7	96.4
HPV6b-US	61.3	40.8	47.5	54.1	48.5	42.4	29.5	48.4	63.8	28.6
HPV11-SVN	61.0	38.9	49.5	53.3	49.4	40.6	28.4	44.5	63.0	32.2
HPV18-US	62.7	53.0	44.8	59.4	45.4	39.7	36.0	44.9	60.8	32.8
HPV31-US	73.4	60.7	81.5	74.2	67.2	54.5	59.5	60.5	73.7	34.3
HPV39-DE	62.2	54.3	43.1	58.5	51.3	39.6	34.2	48.4	60.0	28.5
HPV45-US	62.9	52.4	46.8	62.2	47.8	40.3	38.7	45.5	60.6	32.1
HPV52-US	67.3	58.6	58.6	63.3	56.1	43.1	35.5	56.6	68.6	30.4
HPV58-Gansu	67.0	64.0	60.6	63.4	56.0	36.2	42.0	58.4	71.2	32.5
HPV59-Gansu	62.8	49.3	41.8	61.7	49.2	37.2	45.0	46.5	61.9	32.8
HPV67-US	67.1	58.4	64.6	63.5	55.6	42.7	42.3	55.7	68.1	33.6
HPV68-Gansu	61.2	52.0	42.8	60.2	52.8	41.8	38.3	48.1	60.5	29.9
HPV69-JP	63.8	56.1	42.4	56.9	51.5	36.8	40.5	48.1	59.9	35.1
HPV70-SE	61.8	51.6	44.1	59.1	50.8	41.6	30.4	47.6	59.9	30.4
HPV82-JP	62.5	56.8	44.1	58.6	52.7	39.3	37.3	45.1	61.4	35.2
HPV97-US	63.2	53.9	50.8	61.9	49.1	40.4	33.8	47.4	62.2	32.4

3 讨论

HPV 是一种小型无包膜、双链环状 DNA 病毒,其病毒粒子为直径 50 ~ 55 nm 的对称 20 面体,由 72 个衣壳微粒组成无包膜衣壳^[4]。E 区包括 8 个 ORF,即 E1 ~ E8,其中 E1、E2 编码的蛋白影响病毒的复制,E4 编码的蛋白在病毒生命周期的晚期起调控作用,E5 编码的蛋白在 HPV 感染初期阻止受感染细胞的编程性凋亡,E6、E7 编码的蛋白可以诱导细胞永生, E3 和 E8 的功能目前仍不清楚。L 区的 L1、L2 在病毒组装的晚期表达病毒的衣壳蛋白。URR 又称为长控制区(long control region, LCR),具有病毒基因转录所需启动子的结合位点,在基因转录和翻译中起调节作用^[5]。临床上根据 HPV 伴随上皮损伤的恶性程度分为低危型和高危型。低危型 HPV6、HPV11 与普通良性疣密切相关^[6],而高危型 HPV 可引起多种癌症,全世界约 70% 的宫颈癌和高危型 HPV16、HPV18 直接相关^[7]。安徽省合肥地区宫颈癌发生率与感染 HPV16 具有较高的相关性,齐丽敏等^[8]用 PCR 法检测 28 例宫颈癌样本,其中 26 例检测出 HPV16,检出率高达 92.9%,且以单一感染为主。

HPV^[1]是一种严重危害人类健康的肿瘤病毒,高危型 HPV16 对人类威胁最大。本研究克隆 HPV16-Anhui 并对其全基因组序列进行测定,这是首例有关 HPV16-Anhui 全基因组序列的报道。核苷酸序列分析显示 HPV16-Anhui 与不同地区 HPV16 亲缘关系均较近且基因组变异性较小,表明 HPV16 的进化比较缓慢,这可能是各地 HPV16 均保持高致病性的主要原因。HPV16-Anhui 及各 HPV 全基因组序列相似性和相对应的各 ORF 序列相似性具有一致性,表明 HPV 各 ORF 的核苷酸变异较为均匀,没有发生基因重组现象。系统关系树分析表明仅根据 HPV 各型别致病性的强弱来判断其亲缘关系远近是不准确的。因此,根据临床症状仅可以区分出 HPV 致病性差异,划分为高危型或低危型 HPV,但 HPV 致病性差异不能反映出 HPV 的分子变异规律和各型别间的亲缘关系,只有测定 HPV 全基因组序列并进行序列分析,才能揭示其分子变异本质。

不同地区 HPV16 基因组变异性较小,但这种较

小的变异也能导致其编码蛋白功能的改变。Richard et al^[9]研究发现,HPV16 的 E6 基因与 E7 基因共转染原代人包皮角质细胞(primary human foreskin keratinocytes, PHFKs),能使 PHFK 永生,但如果 E6 基因编码的蛋白中 3 个位点的氨基酸 Q14H/H78Y/L83V 发生改变,即变异较小的 E6 基因与 E7 基因共转染 PHFK,不仅能使 PHFK 永生、生命力更强,而且能使 PHFK 在体外转化,表现出更强的致癌性。克隆 HPV16 全基因组序列是研究其编码蛋白功能的基础,本研究克隆了安徽省宫颈癌患者的 HPV16 全基因组并对其序列进行分析,有利于了解 HPV16-Anhui 基因组变异与其致癌能力变化的关系,也为进一步研究 HPV16 基因组编码基因的功能奠定基础。

参考文献

- [1] Zheng Z M, Baker C C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcription regulation [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 2286 - 302.
- [2] McLaughlin-Drubin M E, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses [J]. *Virus Res*, 2009, 143 (2): 195 - 208.
- [3] Motoyama S, Ladines-Llave C A, Luis Villanueva S, et al. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis [J]. *Kobe J Med Sci*, 2004, 50(1-2): 9 - 19.
- [4] de Villiers E M, Fauquet C, Broker T R, et al. Classification of papillomaviruses [J]. *Virology*, 2004, 324 (1): 17 - 27.
- [5] Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts [J]. *J Virol*, 1977, 24 (1): 108 - 20.
- [6] Greer C E, Wheeler C M, Ladner M B, et al. Human papilloma-virus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33 (8): 2058 - 63.
- [7] Frazer I H. Measuring serum antibody to human papillomavirus following infection or vaccination [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 118 (1): 8 - 11.
- [8] 齐丽敏, 凌斌, 冯定庆, 等. 合肥地区 506 例宫颈乳头瘤病毒感染情况分析 [J]. *中国临床保健杂志*, 2010, 13 (2): 141 - 4.
- [9] Richard C, Lanner C, Naryzhny S N, et al. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (23): 3435 - 45.

VATS 治疗高龄早期非小细胞肺癌患者术后生活质量与开放手术的对比研究

张安庆 徐美青 解明然 梅新宇 马冬春 魏大中

摘要 目的 比较分析电视胸腔镜(VATS)和开胸手术治疗高龄(70岁以上)早期非小细胞肺癌(NSCLC)患者术后近期生活质量(QOL)。方法 收集术后病理诊断为 pT1-2N0M0 高龄 NSCLC 患者 118 例。其中 VATS 手术患者 63 例,开胸手术患者 55 例。比较分析两组患者临床资料、术中和术后并发症发生情况,同时应用欧洲癌症研究与治疗组织 QLQ-LC43 中文版量表比较两组患者术前及术后 2、4、12、24 周的 QOL。结果 两组在性别、年龄、肿瘤位置、病理类型、病理分期、术前合并症、手术时间、术后并发症方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。VATS 组在术中失血量、术后胸管留置时

间和术后住院日方面存在优势($P < 0.05$)。两组术前各项指标评分比较差异无统计学意义。VATS 组术后的总体生活质量、躯体功能较开放组有明显优势($P < 0.05$)。症状评分包括疲倦、胸痛和手臂或肩膀疼痛 VATS 组均优于开胸组($P < 0.05$)。结论 相对于开胸手术,高龄患者 VATS 肺叶切除术安全可靠,并且在术后 24 周内 QOL 评分存在优势。

关键词 非小细胞肺癌;电视胸腔镜手术;生活质量

中图分类号 R 655.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1460-05

2014-06-03 接收

基金项目:安徽省卫生厅科技课题(编号:13zc021)

作者单位:安徽省肿瘤医院(安徽省立医院西区)胸外科,合肥 230031

作者简介:张安庆,男,主治医师;

徐美青,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

xmqahslyy@163.com

经电视胸腔镜(video-assisted thoracoscopic surgery, VATS)肺叶切除联合纵隔淋巴结清扫技术治疗早期肺癌已被大多数胸外科医师所接受,但目前国内外的研究热点主要针对在手术安全性和远期生存率方面^[1-2]。多数早期肺癌患者在接受根治性手术后可获得较好的远期生存。因此,近年来有学者^[3-4]提出除了肿瘤学治疗标准以外,患者术后的

Genomic characterization of human papillomavirus

type 16 from Anhui province

Sun Yunfeng¹, Jiang Tong², Chen Chuanjun¹

[¹Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University (First People's Hospital of Hefei), Hefei 230061; ²School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036]

Abstract Objective To clone human papillomavirus type 16 genome from Anhui province, analyze genome sequence of HPV16 and study its genomic characteristics. **Methods** Five pathological specimens of cervical cancer from Anhui province were collected and the total DNA was extracted. Specific primers were designed to clone HPV16 genome in four fragments. The sequence of four fragments was assembled manually and nucleotide sequence was analyzed after sequencing. **Results** A cervical pathological sample containing HPV16 was detected and the genome sequence with full length of 7 906 nts (GenBank accession number: KC935953) was obtained. Sequence alignment of genome nucleotide sequence showed that HPV16 of Thailand and HPV16 of Japan were more similar to HPV16 of Anhui (HPV16-Anhui) than other HPV genome nucleotide sequence, their similarity reached 99.5%. Phylogeny tree analysis demonstrated that HPV16-Anhui and other 7 HPV16 clustered into a single branch. **Conclusion** HPV16 genome nucleotide sequence is obtained from Anhui province for first time with great significance for further understanding of HPV16 variation from Anhui even east China.

Key words human papillomavirus type 16; genome; clone; sequence analysis