

• 临床探讨 •

# 川渝地区 HPV-33 L1 和 L2 基因多态性研究

王九兵<sup>1</sup>, 陈祖翼<sup>2</sup>

(1. 重庆市精神卫生中心检验科 401147; 2. 四川大学生命科学院, 成都 610041)

**摘要:**目的 研究川渝地区人乳头瘤病毒(HPV)33 亚型 L1 和 L2 基因多态性, 为相关探针和疫苗设计提供基础数据。方法 用 PCR 方法扩增 HPV-33 阳性样品中 HPV-33L1 和 L2 基因, 测序并与 Genbank 中常用参考序列进行对比, 分析突变位点。结果 和参考序列相比, 本地区 HPV-33 L1 突变率为 70.69%(41/58)。在 58 例样品中, 共发现单核苷酸突变 20 个, 其中非同义突变 8 个, 同义突变 12 个。本地区 HPV-33 L2 突变率为 100.00%(58/58)。在 58 例样品中, 共发现单核苷酸突变 12 个, 其中非同义突变 7 个, 同义突变 5 个。结论 川渝地区 HPV-33 L1 和 L2 基因多态性具有自己的特点, 疫苗和探针设计时需要因地制宜提高效率 and 准确率。

**关键词:** 人乳头瘤病毒; 突变; 基因多态性

**DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.17.050 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)17-2527-02**

宫颈癌是女性中最常见的癌症之一, 每年约有五十万宫颈癌新增病例, 并导致超过 25 万人死亡, 人类乳头瘤病毒(HPV)是引起宫颈癌的主因<sup>[1-2]</sup>。根据 HPV 不同亚型的致癌性, 将 HPV 分为高危和低危两种, 世界范围内最常见的高危型是 HPV-16、-18、-31、-33、-45 和 -58<sup>[3]</sup>。感染 HPV 的女性患宫颈癌的概率是未感染 HPV 妇女的 50 倍<sup>[4]</sup>。HPV 的基因组被包裹在主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 组成的衣壳内<sup>[3]</sup>。L1 蛋白和 L2 蛋白可以组装为病毒样颗粒(VLPs), 在疫苗设计上具有重要意义。HPV 亚型及其变异位点的分布具有人种和地域性差异, 在不同人种和地区均存在一定数量的病毒变异株<sup>[2,5]</sup>。这些变异可能导致病毒功能区氨基酸的变化, 影响蛋白质结构, 与病毒的持续感染等相关, 增加再次感染和从免疫系统逃逸的概率。在世界范围内 HPV-33 导致了 5% 的宫颈癌, 但在亚洲地区 HPV-33 流行率极高, 特别是在中国, 尤其需要重视<sup>[2,6]</sup>。国内对 HPV-33 研究很少, 本文将讨论在川渝地区 HPV-33L1 和 L2 的多态性及其对疫苗和探针设计

可能带来的影响, 为 HPV-33 的防治提供分子依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2012 年 1 月 1 日至 2015 年 1 月 1 日, 共收集 HPV-33 阳性宫颈上皮细胞标本 100 例。标本主要通过重庆市第四人民医院、成都安琪儿妇产医院、四川生殖专科医院等联合采集。标本采集前征得患者的知情同意, 严格保护患者的隐私。

**1.2 仪器与试剂** 包括 PCR 扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司), GSG-2000 核酸/蛋白凝胶图像分析系统(珠海黑马医学仪器有限公司), 人乳头瘤病毒基因分型(23 型)检测试剂盒(亚能生物技术有限公司), Pfu DNA 聚合酶(生工生物工程有限公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 引物设计** 引物设计参考序列为 Genbank: M12732.1, 见表 1。

表 1 HPV-33 L1/L2 PCR 引物设计

开放阅读框	引物名称	起止位置	引物序列	退火温度(°C)
33L1	HPV33L11F	5 468	5'-ATT TGT TCC TAT TTC GCC T-3'	54
	HPV33L11R	6 388	5'-CAG CCC TAT TAA AAA AGT GTC-3'	54
	HPV33L12F	6 271	5'-CAG TAC ATG CAA ATA TCC AGA TTA-3'	54
	HPV33L12R	7 183	5'-ACA TAC ACA AAA AAC AAA CAA CA-3'	54
33L2	HPV33L21F	4 116	5'-GCA CAT GGT GGT GTT TTA AC-3'	54
	HPV33L21R	5 050	5'-AGT AGG TCA GAG AGG T-3'	54
	HPV33L23F	4 834	5'-AAT GTA ACA TCA AGC ACG CC-3'	55
	HPV33L23R	5 827	5'-TAA ACG GAC CCT AAA AAC CC-3'	55

**1.3.2 HPV DNA 提取** 按照人乳头瘤病毒基因分型(23 型)检测试剂盒说明书提取 HPV-33 DNA。

**1.3.3 PCR 扩增** (1)PCR 体系: 200 μmol MgCl<sub>2</sub>, 200 μmol dNTPs, dNTPs 2 μL, 引物各 0.25 μmol, Pfu DNA 聚合酶 2 U, DNA 样品 5 μL(10~100 ng), 加无菌双蒸水至 50 μL。(2)扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 退火(因引物不同退火温度不同)30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 5 min。(3)用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 产物由生工生物工程有限公司测序。

**1.4 统计学处理** 用 DNAMAN 软件与参考序列(Genbank;

M12732.1)进行对比分析, 所有序列均进行一次验证测序以保证准确。用 MEGA5.0 构建 L1 和 L2 基因进化树。HPV-33 L1 和 L2 蛋白二级结构用在线生物信息学软件 PSIPred 进行预测。

## 2 结果

因为部分样品中 HPV-33 病毒拷贝数太低, 共成功获得了 58 例 HPV-33 L1 和 L2 测序结果。

**2.1 HPV-L1 结果分析** 和参考序列相比, 本地区 HPV-33 L1 突变率为 70.69%(41/58)。在 58 例样品中, 共发现单核苷酸突变 20 个, 其中非同义突变 8 个, 同义突变 12 个。这些突

变是: C5760A (T56N)、T5960C、G5990A (G133S)、A5997G (K135R)、T6385G、C6390A (T266K)、G6396A (G268E)、T6463C、T6478C、A6487C、G6520A、A6544G、T6613C、A6664G、A6673G、A6694G、A6748C (E385D)、A6951C (K453T)、C7044A (P484H)、G7063A (P484H)。其中突变 A6748C(E385D)发生在  $\alpha$  螺旋。

**2.2 HPV-L2 结果分析** 和参考序列相比,本地区 HPV-33 L2 突变率为 100.00% (58/58)。在 58 例样品中,共发现单核苷酸突变 12 个,其中非同义突变 7 个,同义突变 5 个。这些突变是: G4438A (D77N)、T4671C、C4809A、C4905T、A5026G (I273V)、T5051A (F281Y)、C5220T、G5257C (D350H)、G5287A (D360N)、G5314A (D369N)、A5324C (N372T) 和 C5457T。

### 3 讨 论

宫颈癌每年新增病例约为 50 万,并导致超过 25 万人死亡,其中 80% 的宫颈癌病例都是发生在发展中国家,高危型 HPV 持续感染是引发宫颈癌的主因<sup>[7]</sup>。目前 HPV 疫苗只能针对 HPV-16 和 HPV-18 两种高危型进行预防,这显然是不够的,针对 HPV-31、-33、-45 和 -58 这几种世界范围内常见高危型 HPV 疫苗的研究迫在眉睫<sup>[3]</sup>。相比其他地区,在中国常见高危亚型 HPV-33、-52 和 -58 尤其需要重视<sup>[2]</sup>。HPV 突变分布具有地域性差异,基因突变,会导致疫苗型内保护减弱,影响疫苗的效率,所以研究本地区 HPV-33 基因多态性对疫苗设计具有重要意义<sup>[8]</sup>。

HPV-33 病毒株按照同源性被分为 2 个病毒谱系 A 和 B<sup>[9]</sup>。在本研究中,所有 58 株 HPV-33 L1 基因序列都属于 A 谱系,其中 91.38% (53/58) 株属于 A1, 8.62% (5/58) 株属于 A2; 所有 58 株 HPV-33 L2 基因序列都属于 A 谱系,其中 91.38% (53/58) 株属于 A1, 8.62% (5/58) 株属于 A2。在亚洲地区以及世界地区对 HPV-33 E6 和 E7 基因进行了同源性分析,发现 HPV-33 E6 和 E7 在 A1 和 A2 中分布相距不远<sup>[10]</sup>。本地绝大多数 HPV-33 L1 和 L2 基因序列均属于 A1 谱系,与其研究结果有所差异,说明本地 HPV-33 L1 和 L2 的多态性具有地域性特点。

L1 基因编码 HPV 的主要衣壳蛋白,L1 和 L2 蛋白组装成的 VLPs 可以诱导产生中和抗体,具有保护作用<sup>[3,11]</sup>。L1-VLPs 是目前针对特殊型别疫苗的靶标,L1-VLPs 一般只能预防某一针对性的 HPV 亚型,不具备或者只具备较弱的不同亚型之间的交叉保护作用<sup>[3]</sup>。因为 L1-VLPs 疫苗昂贵的价格,以及其只能针对某一型别 HPV 对接种者提供良好的保护,HPV L2 被发现是非常具有潜力的 HPV 防御性疫苗的靶标。

目前已经确定的几乎所有 L1-VLPs 构象表位都是在 BC、DE、EF、FG、和 HI 这 5 个环上<sup>[12]</sup>。突变 G4438A(T56N) 发生在 BC 环上;突变 G5990A(G133S) 和 G5997A(K135R) 发生在 DE 环上;突变 C6390A(T266K) 和 G6396A(G268E) 发生在 FG 环上。当以 HPV-33 L1 为靶标设计疫苗时,上述位点都必须纳入考虑。

L2 基因编码 HPV 的次要衣壳蛋白,HPV L2 N 端含有可以诱导产生交叉防御效果的“交叉中和抗原表位”,L2 蛋白 69~80 和 108~120 位氨基酸非常保守而且在诱导产生交叉防御中和抗体上具有极其重要的作用<sup>[3]</sup>。突变 G4438A (D77N) 发生在 HPV-33 L2 的 69~80 位氨基酸之间。L2 蛋白 33~52、73~84、89~100、和 121~140 位氨基酸包含非中和抗体抗原表位,突变 G4438A(D77N) 发生在 HPV-33 L2 的 73~84 位氨基酸之间。在以 HPV-33 L2 为靶标设计疫苗时,

G4438A(D77N) 将是必须考虑的一个重要位点。

HPV L1 具有高度保守性,是作为 HPV DNA 临床检测探针的良好靶标。本研究中发现,在 HPV-33 L1 中最常见的突变位点包括 C5760A、G5990A、C6390A、T6478C、T6613C、A6664G、EA6673G 和 A6748C。在临床探针的设计上,为了尽可能提高探针的准确率,需要综合考虑这些常见的突变位点。

本研究所报道突变位点对蛋白的影响还需要进一步研究。本研究的结果可以为本地区 HPV-33 疫苗设计、探针设计提供基础数据,为 HPV 的预防和治疗提供参考。

### 参考文献

- [1] 陈祖翼,丁显平,景亚玲,等. 成都地区 HPV-33E6/E7 多态性分析[J]. 检验医学与临床,2015,12(22):3364-3365.
- [2] Chen Z, Wang Q, Ding X, et al. Characteristics of HPV prevalence in Sichuan Province, China[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2015, 131(3): 277-280.
- [3] Yue Y, Yang H, Wu K, et al. Genetic variability in L1 and L2 genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e55204.
- [4] 聂双双,丁显平,陈祖翼,等. 成都地区人乳头瘤病毒感染亚型、年龄分布、多重感染及相关趋势研究[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(22):3026-3028.
- [5] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4): 321-322.
- [6] Sun ZR, Ji YH, Zhou WQ, et al. Characteristics of HPV prevalence among women in Liaoning province, China[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2010, 109(2): 105-109.
- [7] 张辉,陈祖翼,丁显平,等. 基因芯片分型与实时荧光 PCR 筛查成都地区妇女宫颈 HPV-DNA 感染结果比较[J]. 中国优生与遗传杂志,2014,22(6):8-11.
- [8] Fleury MJ, Touzé A, Coursaget P. Human papillomavirus type 16 pseudovirions with few point mutations in L1 major capsid protein FG loop could escape actual or future vaccination for potential use in gene therapy[J]. Mol Biotechnol, 2014, 56(5): 479-486.
- [9] Chen Z, Schiffman M, Herrero R, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67 [J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20183.
- [10] Chen AA, Heideman DA, Boon D, et al. Human papillomavirus 33 worldwide genetic variation and associated risk of cervical cancer [J]. Virology, 2014, 448(1): 356-362.
- [11] Karanam B, Jagu S, Huh WK, et al. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection[J]. Immunol Cell Biol, 2009, 87(4): 287-299.
- [12] Guan J, Bywaters SM, Brendle SA, et al. Structural comparison of four different antibodies interacting with human papillomavirus 16 and mechanisms of neutralization [J]. Virology, 2015, 483(1): 253-263.