

宫颈癌及癌前病变组织中含 HPV16 E7 基因转录本分析*

季红薇¹, 朱华², 林丛², 张文森², 陈俊³, 朱雪洁^{2△}, 邹阮敏^{2△}

(¹丽水市中心医院妇产科, 浙江 丽水 323000; ²温州医科大学附属第一医院妇产科, 浙江 温州 325000;

³温州医科大学微生物与免疫学教研室, 浙江 温州 325035)

[摘要] **目的:** 探讨宫颈癌发生发展过程中不同病变时期人乳头瘤病毒 16 型 (HPV16) E7 相关转录本的变化。**方法:** 乳头瘤病毒癌基因转录本扩增 (APOT) 检测 15 例低度鳞状上皮内病变 (LSIL)、20 例高度鳞状上皮内病变 (HSIL)、18 例宫颈癌及 9 例 HPV 阴性正常宫颈组织中的 E7 基因转录本; 对转录本进行测序和序列比对分析; Southern blot 验证 E7 相关转录本在宫颈癌组织中的表达。**结果:** 与 LSIL 组织比较, HSIL 及宫颈癌组织存在更加复杂、多样的 E7 基因转录本, 但未见特征的转录本。宫颈组织共获得 5 种 HPV16 E7 的转录模式, 模式 A、C 和 E 是本研究首次报道; 在 5 种转录模式中, 模式 A 与 B 在所有 HPV16 阳性的宫颈组织中都能检测到, 是 HSIL 组织的主要转录模式; 模式 C 主要在宫颈癌组织中检测到, 其次为 HSIL 组织; 而模式 D 和 E 却只在宫颈癌组织中被发现; 模式 D 和 E 转录都含 E4 序列, 部分宫颈癌标本未能检测到含 E4 转录本, 且不同宫颈癌标本检测的含 E4 转录本也存在明显差异条带。**结论:** HPV16 E7 的转录模式在宫颈癌变各时期中的差异都较大; 随着细胞癌变程度的加深, 病毒的某些特定转录模式会逐渐增多而形成优势转录。

[关键词] 宫颈癌; HPV16 E7 基因; 转录本; 癌前病变

[中图分类号] R730.23; R711.74 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.07.005

Analysis of HPV16 E7 gene transcripts in cervical cancer and precancerous lesions

JI Hong-wei¹, ZHU Hua², LIN Cong², ZHANG Wen-miao², CHEN Jun³, ZHU Xue-jie², ZOU Ruan-min²

(¹Department of Obstetrics and Gynecology, Lishui Central Hospital, Lishui 323000, China; ²Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ³Department of Microbiology and Immunology, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China. E-mail: zxj1022@163.com; 604407697@qq.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the changes of human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-related transcripts at different lesion stages during the development of cervical cancer. **METHODS:** Amplification of papillomavirus oncogene transcripts (APOT) assay was used to detect E7 gene transcripts in 15 cases of low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), 20 cases of high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), 18 cases of cervical cancer, and 9 cases of normal HPV-negative cervix. The sequencing of transcripts and alignment analysis of the sequences were performed. Southern blot was used to verify the expression of E7-related transcripts in cervical cancer tissues. **RESULTS:** Compared with LSIL, more complex and diverse E7 transcripts in HSIL and cervical cancer tissues were observed, but no characteristic transcripts was found. Transcriptional diversity and accumulation were synchronized with the degree of canceration. Five kinds of HPV16 E7 transcriptional patterns were obtained. The patterns A, C and E were found for the first time. The patterns A and B were detected in all HPV16-positive cervical tissues, and were predominantly in the HSIL tissue. The pattern C was detected mostly in cervical cancer, and secondly in HSIL tissue, whereas the patterns D and E were found only in cervical cancer. The pattern D and E transcription contained E4 sequences, which were not detected in some cervical cancer speci-

[收稿日期] 2018-07-06 [修回日期] 2018-12-29

* [基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目 (No. LQ15C010002); 温州市科技局项目 (No. Y20170013)

△通讯作者 Tel: 0577-55579151; E-mail: zxj1022@163.com (朱雪洁); 604407697@qq.com (邹阮敏)

mens, and significant differences of *E4* transcripts detected in different cervical cancer specimens were also observed.

CONCLUSION: The transcriptional pattern of HPV16 *E7* is different during various stages of cervical cancer. As the invadescent canceration of the cells, some specific transcriptional patterns of the virus are gradually increased to form dominant transcription.

[**KEY WORDS**] Cervical cancer; HPV16 *E7* gene; Transcripts; Precancerous lesions

宫颈癌是全世界引起女性死亡的第2大肿瘤。高危型人乳头瘤病毒(human papillomaviruses, HPV)持续感染是引起宫颈癌的重要原因^[1]。目前常见的高危型 HPV 有 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58 和 59^[1],其中,50%以上的宫颈癌与 HPV16 感染相关^[2]。现已经明确,HPV 基因整合是促进宫颈癌发生的另一重要因素^[3-4]。HPV DNA 整合使病毒重要调控基因 *E2* 断裂,HPV 的 *E6* 和 *E7* 癌基因与宿主基因组一起转录表达,促进 *E6* 和 *E7* 癌蛋白表达^[5]。*E6* 能结合并灭活抑癌蛋白 p53, *E7* 能结合并泛素化降解抑癌蛋白 pRb,这2种重要的细胞抑癌蛋白被降解是高危型 HPV 参与宫颈癌发生发展的重要机制^[6-7]。虽然 HPV16 早期基因转录模式近几年已有相关的报道,但迄今尚未见系统分析宫颈癌发生发展过程中的 *E7* 相关转录模式。因此,本研究通过扩增癌基因转录本的方法检测 HPV16 阳性的宫颈组织样本[包括低度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)组织、高度鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)组织和宫颈癌(cervical cancer, CxCa)组织]中 HPV16 *E7* 相关转录模式,探讨宫颈癌发生发展过程不同病变时期 *E7* 相关转录本的变化。

材 料 和 方 法

1 临床标本

53 例 HPV16 阳性宫颈组织标本(包括 15 例 LSIL、20 例 HSIL 和 18 例 CxCa)收集自温州医科大学附属第一医院 2016 年 12 月~2018 年 3 月期间门诊及住院患者,年龄范围 25~59 岁,中位数为 43 岁。所有患者术前均未进行放、化疗等治疗,收集的标本均经病理科确诊。同时收集 9 例 HPV 阴性正常宫颈组织作为对照。本研究使用的临床样本已经由

患者知情以及医院伦理委员会同意。每例标本离体后 10 min 内放入 RNAlater 保存待后续实验。

2 试剂

RNAlater 购自 Ambion;TRIzol 试剂购自 Invitrogen;RNase-free DNase I 试剂盒购自 TaKaRa;RT-PCR 试剂盒和 KOD -Plus- PCR 试剂盒购自 TOYOBO;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物科技有限公司;T 载体试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;Southern 检测试剂盒(North2South Chemiluminescent Detection Kit)购自 Thermo;生物素-亲和素化学发光试剂盒购自 Pierce。引物合成和测序由上海生物工程有限公司完成。

3 方法

3.1 RNA 提取 取 RNAlater 保存的宫颈组织样本,按照 TRIzol 试剂的说明书分离 RNA。为排除残余 DNA 污染,按 DNase I 试剂盒说明书提纯 RNA,溶解于 RNase-free 水,采用 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计(Thermo)检测 RNA 浓度,采用 Agilent 2100 生物芯片分析系统测定 RNA 纯度。

3.2 HPV16 *E7* 转录本的扩增 参考文献[8]进行 HPV16 *E7* 转录本的扩增(即乳头瘤病毒癌基因转录本扩增, amplification of papillomavirus oncogen transcripts, APOT),引物序列见表 1。按照 RT-PCR 试剂盒说明书,1 μg 总 RNA 以含 ployT₁₇(17 个 T 结尾)及通用序列的 RT 引物进行逆转录。cDNA 产物以 HPV16 *E7* 特异性引物(P1)和通用引物(P0)分别作为 PCR 的正向和反向引物,PCR 扩增 HPV16 *E7* 转录本。50 μL 反应体系含:1.0 mmol/L MgSO₄, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 μmol/L P1、P0,1.0 单位高保真酶(KOD -Plus-)。反应条件为:95 °C 90 s 预变性,94 °C 30 s 变性,59 °C 30 s 退火,68 °C 2 min 延伸,35 个循环,68 °C 6 min 最终延伸(保证扩增片段的完整性)。

表 1 HPV16 *E7* 转录本检测相关引物的序列

Table 1. Sequences of the primers related to HPV16 *E7* transcript detection

Name	Description	Sequence (5'-3')
RT	RT primer	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT
P1	HPV16 <i>E7</i> -specific primer (forward)	CGGACAGAGCCATTACAAT
P0	Universal primer (reverse)	GACTCGAGTCGACATCG

3.3 HPV16 E7 转录本 Southern blot 检测 HPV16 E7 转录本 PCR 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 切去边缘多余部分, 置于 200 mL 变性液中, 浸泡 45 min, 使凝胶上的双链 DNA 转变为单链 DNA, 用去离子水冲洗凝胶 2 次, 然后将凝胶中的 DNA 通过湿转的方法原位转移到硝酸纤维素膜上, 80 °C 干燥 2 h, 紫外交联固定。按 Southern blot 检测试剂盒说明书, 用生物素标记的 HPV16 E6 特异性探针 (5'-bCAGCTA-CACCTACAGGCAACAACAA-3', b 代表生物素标记) 55 °C 杂交过夜, 洗膜。最后采用生物素-亲和素化学发光试剂盒检测。

3.4 HPV16 E7 转录本序列分析 PCR 产物电泳

后, 回收琼脂糖凝胶中不同的 PCR 产物。参照 T 载体试剂盒说明书, 将回收片段连到 T 载体上, 挑单克隆, PCR 鉴定后, 进行测序, BLAST 比对 HPV16 参考基因组序列 (GenBank ID: K02718) 获得转录本中的病毒基因序列, BLAST 比对 NCBI 中人参考基因组 (GRCH38) 获得宿主基因序列。

结 果

1 宫颈癌 HPV16 E7 转录本 APOT 检测

与 LSIL 组织比较, HSIL 及 CxCa 组织存在更加复杂、多样的 E7 基因转录本, 但未见特征的转录本, 见图 1。

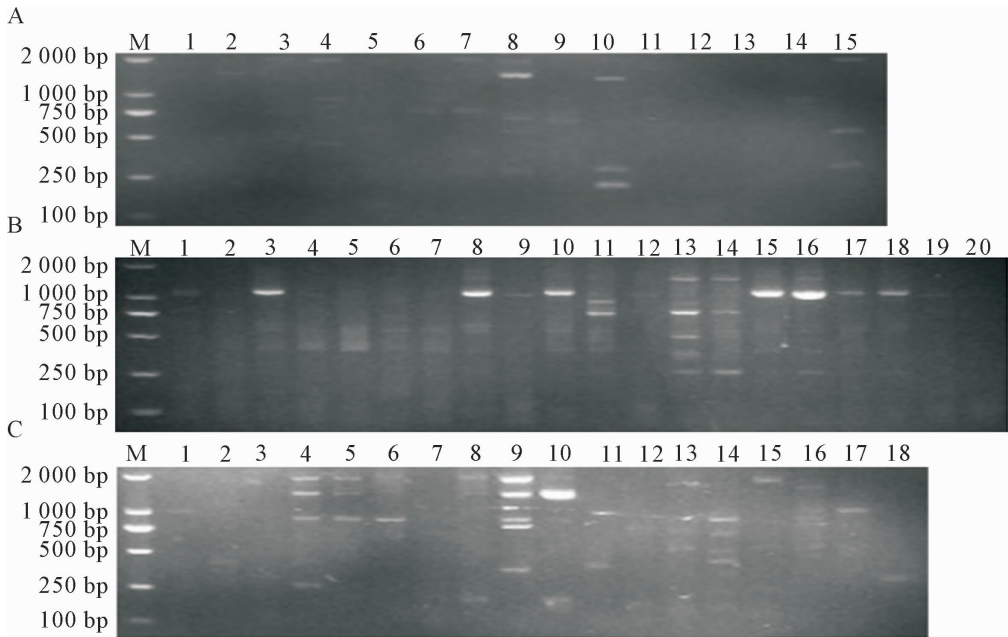


Figure 1. APOT assay was used to detect HPV16 E7-related transcripts. A: transcripts in LSIL; B: transcripts in HSIL; C: transcripts in cervical cancer tissues. M: marker.

图 1 APOT 检测 LSIL、HSIL 及宫颈癌组织中 HPV16 E7 相关的转录本

2 HPV16 E7 转录模式分析

经上述建立的方法扩增转录本片段, 连接 T 载体, 经测序以及序列比对分析后, 得到 5 种 HPV16 E7 的转录模式, 并绘制模式图, 见图 2。模式 A 和 B 均以 E7-E1 开始, 其中模式 A 的病毒基因直接以 polyA 结尾, E1 基因的 3' 端有 4 种断裂位点, 分别在 nt880、nt949、nt1054 和 nt1234; 而模式 B 中病毒基因与宿主序列发生整合, 其 E1 基因的 3' 端有 2 种剪切位点, 分别为 nt880 和 nt1107; 模式 C 和模式 D 中都包含了病毒基因序列和宿主基因序列, 属于典型的整合型转录本。模式 C 中 SD880 与 SA2709 剪接, E2 基因 3' 端的 nt2870 与宿主基因整合; 模式 D 中 SD880 与 SA3358 剪接, E4 基因 3' 端的 nt3619 位点与宿主基因整合。模式 E 与模式 D 类似, 也有

SD880-SA3358 的剪切形式, 并且还有 E4-L1 之间的晚期基因剪切 SD3632-SA5639, 见图 3。

3 HPV16 E7 转录模式在各病理级别的宫颈组织中的比例

HPV16 E7 的 5 种转录模式在不同癌变程度的宫颈组织中存在较大的差异。本研究发现, 模式 A 与 B 在所有 HPV16 阳性的宫颈组织中都能检测到, 并且主要在 HSIL 组织中, 分别占 61.5% 和 72.9%。模式 C 绝大多数在宫颈癌组织中检测到, 占 88.9%, 其次主要位于 HSIL 组织, 见图 4。

4 含 E4 序列 HPV16 E7 转录本在宫颈癌组织中表达

通过 E4 特异性探针的 Southern blot 验证模式 D 和 E 在宫颈癌组织中的表达。如图 5 所示, 部分标

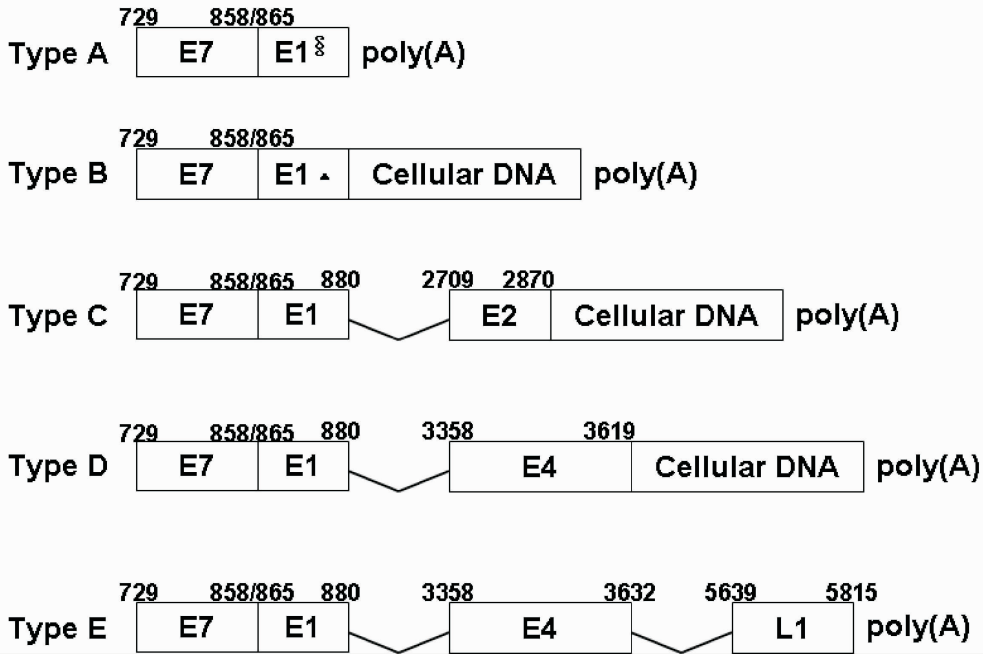


Figure 2. Five transcript pattern diagrams related to HPV16 *E7*. §: in pattern A, there were 4 cleavage sites of the *E1* gene, nt880, nt949, nt1054, and nt1234; ▲: in model B, there were 2 cleavage sites for the *E1* gene, nt880 and nt1107.

图2 HPV16 *E7* 相关的5种转录本模式图

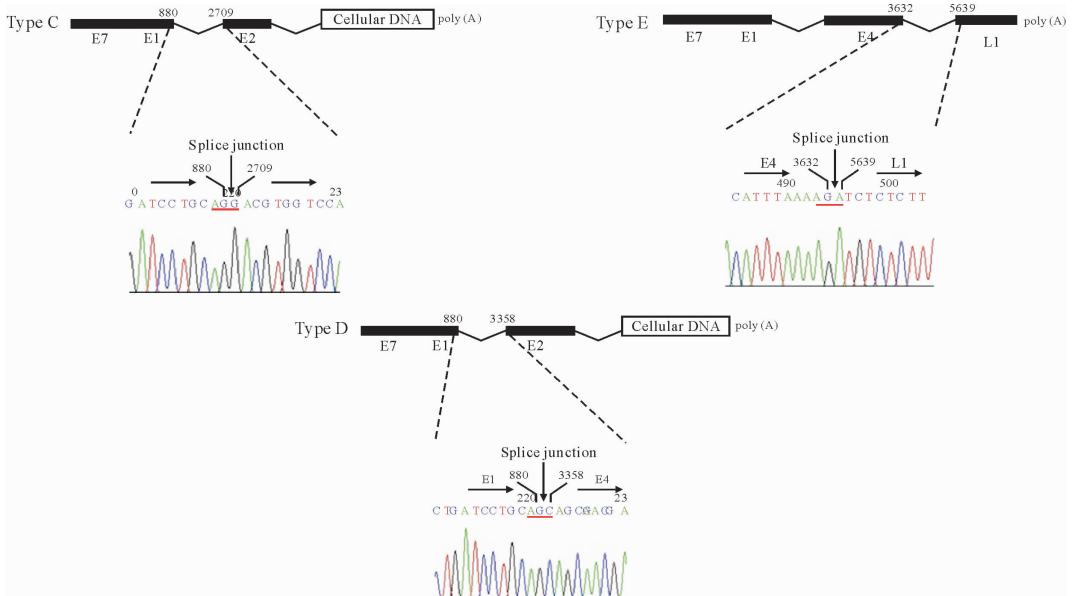


Figure 3. Alternative splicing sequence characteristics of types C, D and E in HPV16 *E7* transcripts.

图3 HPV16 *E7* 转录本 C、D、E 模式可变剪切序列特征

本(如3、4、8、9、14等标本)未能检测到含 *E4* 转录本,且不同宫颈癌标本检测的含 *E4* 转录本也存在明显差异条带。

讨 论

持续性感染高危型 HPV 会导致病毒拷贝量在宿主细胞中累积,同时病毒癌性基因的转录模式也会向有利于肿瘤细胞增殖的方向发展。因此,不同恶变程度的宫颈肿瘤细胞,HPV 转录模式也会不同。

与大多数病毒基因组类似,HPV 基因属于双顺反子或多顺反子,基因转录后未成熟的 mRNA 一般通过剪切加工才能变成成熟的 mRNA^[9],这种 RNA 的选择性剪切机制对于病毒基因的表达具有重要意义。不同的 RNA 剪切会产生不同的转录模式,因此表达的蛋白也会不同。目前也有不少研究者采用人乳头瘤病毒癌基因扩增的方法检测游离型和整合型的病毒癌基因转录模式^[8-9,14],但是这种巢式 PCR 的检测方法存在一定局限,它无法有效扩增由病毒基因和

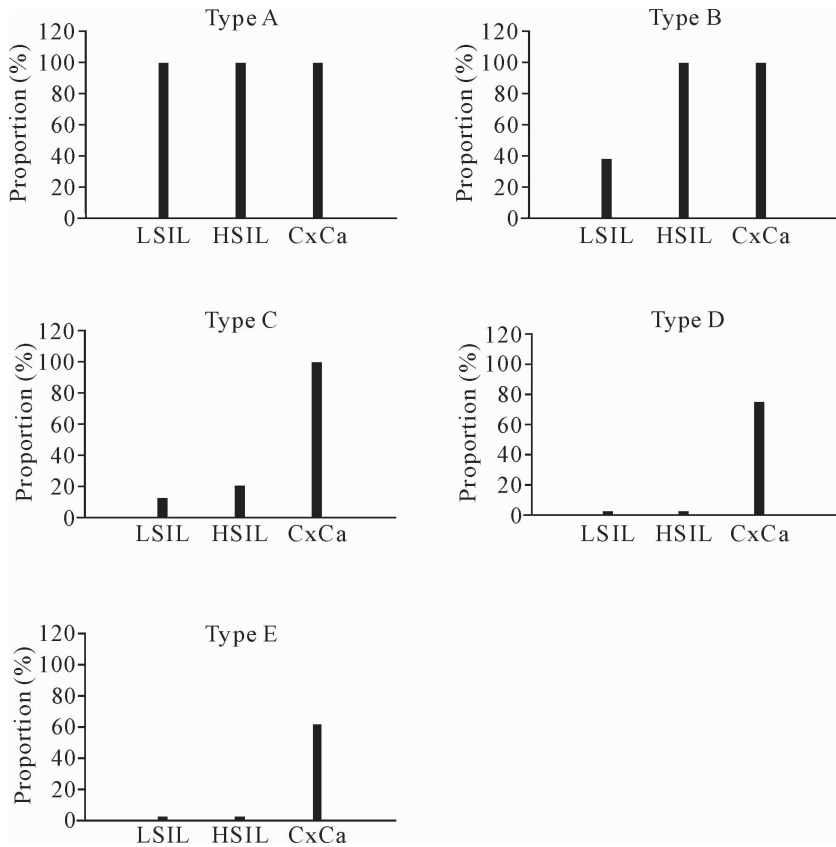


Figure 4. Proportion of the 5 transcriptional modes of HPV16 E7 in cervical tissues at various pathological levels.

图4 HPV16 E7 5种转录模式在各病理级别宫颈组织中所占的比例

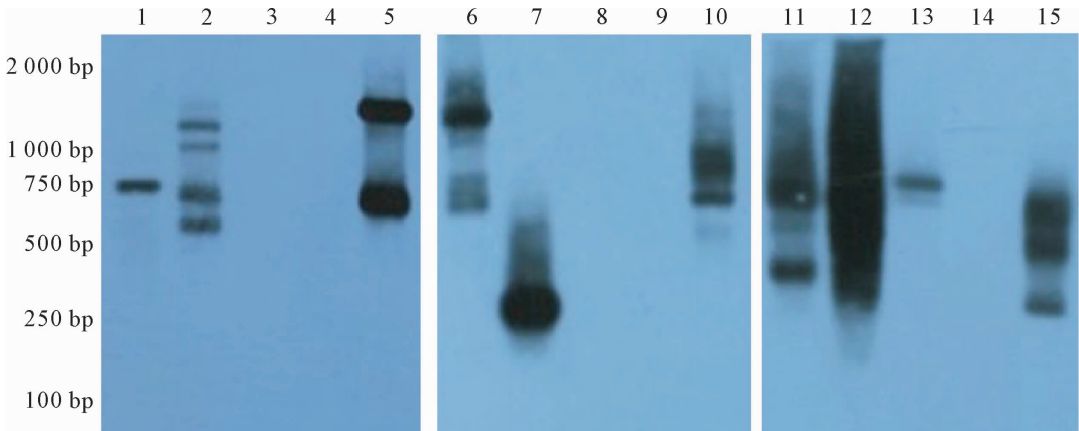


Figure 5. Southern blot analysis of HPV16 E7 transcript expression in cervical cancer tissues. Lanes 1 ~ 15 represent the specimens of cervical cancer tissue No. 1 ~ 15, respectively.

图5 Southern blot 检测 HPV16 E7 转录本在宫颈癌组织中表达

整合基因构成的融合型长序列的转录本,导致检测的整合型转录本数少于实际的数量。另外,这种方法倾向于扩增本底 mRNA 浓度高、转录本数量多的转录模式而忽略本底量少的转录模式^[14]。因此,我们通过优化检测方法避免人为增强高含量转录本的扩增优势,使检测结果更客观。

近年已有 HPV16 早期基因转录模式的报道^[8,10],例如,E6 的游离型转录本 E6-E7-E1[^]E4 和整合型转录本 E6-E7-E1[^]cellular DNA、E6-E7-E1[^]E4-

cellular DNA、E6-E7-E1-cellular DNA 等;E7 的游离型转录本 E7-E1[^]E4 和一些整合型的转录本 E7-E1[^]cellular DNA、E7-E1[^]E4-cellular DNA 等。HPV16 E7 早期基因转录模式在宫颈癌发生发展过程中的变化,迄今尚未阐明。本研究显示 HPV16 E7 早期基因转录模式在宫颈癌变各时期中存在很大差异。在 5 种 HPV16 E7 转录模式中,除了已经报道的转录模式 B 和 D^[10],转录模式 A、C 和 E 是首次发现,其中转录模式 B、C、D 和 E 属于融合型,模式 A 属于游离

型。我们发现在一些宫颈癌样本中甚至包含了所有5种检测到的转录本,提示游离型和整合型的转录模式在高度癌变的宫颈组织中可以同时存在^[8]。HPV16 E7的转录模式在宫颈癌变各时期中的差异都较大,模式D和E只在宫颈癌中检测到,而模式A和B却在所有类型的癌变宫颈组织中都能检测到。这些结果进一步证明转录模式的选择是一个动态的过程^[15]。为了促使宿主细胞能克服变化的环境带来的不利因素而不断地增殖,病毒基因组会选择最优的基因表达模式,这就容易理解:随着细胞癌变程度的加深,病毒的某些特定转录模式会逐渐增多而形成优势转录。

[参 考 文 献]

- [1] zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer[J]. *Virology*, 1991,184(1):9-13.
- [2] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. *New Engl J Med*, 2003,348(6):518-527.
- [3] Badaracco G, Venuti A, Sedati A, et al. HPV16 and HPV18 in genital tumors: significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness[J]. *J Med Virol*, 2002,67(4):574-582.
- [4] Hopman AH, Smedts F, Dignef W, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities[J]. *J Pathol*, 2004,202(1):23-33.
- [5] Nishimura A, Ono T, Ishimoto A, et al. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition[J]. *J Virol*, 2000,74(8):3752-3760.
- [6] Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53 [J]. *Cell*, 1990,63(6):1129-1136.
- [7] Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, et al. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells [J]. *Oncogene*, 2001,20(34):4740-4749.
- [8] Klaes R, Woerner SM, Ridder R, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes [J]. *Cancer Res*, 1999,59(24):6132-6136.
- [9] Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation [J]. *Front Biosci*, 2006, 11:2286-2302.
- [10] Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, et al. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions [J]. *Oncogene*, 2002,21(3):419-426.
- [11] Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques [J]. *Oncogene*, 2003, 22(25):3977-3984.
- [12] Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, et al. Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions [J]. *Cancer Res*, 2008,68(20):8249-8259.
- [13] Kraus I, Driesch C, Vinokurova S, et al. The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas co-transcribe cellular sequences of known or predicted genes [J]. *Cancer Res*, 2008,68(7):2514-2522.
- [14] Schmitz M, Driesch C, Jansen L, et al. Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer [J]. *PLoS One*, 2012,7(6):e39632.
- [15] Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, et al. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer [J]. *J Virol*, 2004,78(20):11172-11186.

(责任编辑:林白霜,罗 森)