

# HPV-18 型晚期基因 L1 在宫颈脱落细胞中的表达与突变研究

汪 萍<sup>1</sup> 宛传丹<sup>2</sup> 赵一琳<sup>2</sup> 崔燕红<sup>2</sup> 宫 磊<sup>1</sup> 林爱琴<sup>1</sup> 卜文婕<sup>1</sup> 朱晓蕾<sup>1</sup>

( 1. 皖南医学院 医学生物学教研室,安徽 芜湖 241002; 2. 常熟市医学检验所 分子生物学实验室,江苏 常熟 215500)

**【摘要】**目的: 研究人乳头瘤病毒 HPV-18 型晚期基因 L1 在不同宫颈上皮病变患者脱落细胞中表达分布与基因突变特征。方法: 收集单纯感染人乳头瘤病毒 HPV-18 型宫颈上皮病变组织脱落细胞,免疫细胞化学分析其中 L1 基因的蛋白表达情况。提取总 DNA 特异性引物针对 HPV-18 L1 基因进行 PCR 扩增检测,所得产物进行 Sanger 基因测序分析。结果: HPV-18 L1 基因在宫颈炎、CIN I + II 级、CIN III 级和宫颈癌组织中蛋白表达阳性率分别为 100%、81.8%、34.6% 和 12.2%。在不同病理分级宫颈上皮病变患者脱落细胞标本中,HPV-18 L1 蛋白表达阳性率差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Sanger 法基因测序显示 L1 基因序列存在突变,突变率 9.2%,共发现 11 类核苷酸变异,其中 4 类属错义突变。结论: HPV-18 型晚期基因 L1 蛋白表达量与宫颈组织病理病变严重程度呈负相关趋势。HPV-18 L1 基因突变较为突出,存在地区流行型突变株。L1 基因突变与宫颈恶性病变程度可能存在一定关系。

**【关键词】**人乳头瘤病毒 18 型; 晚期基因 L1; 宫颈脱落细胞; 基因突变

**【中图分类号】**R 737.33; R 373; R 392.11 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2019.04.003

## Expression and mutation of HPV18 late gene L1 in exfoliated cervical cells

WANG Ping, WAN Chuandan, ZHAO Yilin, CUI Yanhong, GONG Lei, LIN Aiqin, BU Wenjie, ZHU Xiaolei

Department of Medical Biology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To analyze the expression and variation of HPV-18 late protein L1 in cervical exfoliated cells at different stages. **Methods:** Exfoliated cells were obtained from cervical epithelia infected with human papillomavirus strain 18( HPV-18) and subjected to detection of L1 protein expression by immunocytochemistry. Total DNA was extracted and amplified by polymerase chain reaction( PCR) using primers specific to HPV-18 L1 gene. Then the amplified products were analyzed by Sanger gene sequencing. **Results:** L1 protein was positively expressed in cervical inflammation of HPV-18, CIN I + II, CIN III and cervical cancer tissues, with expression rate of 100%, 81.8%, 34.6% and 12.2%, respectively. The positive rate of L1 protein expression was statistically different in exfoliated cervical cells in CIN with different grade( $P < 0.01$ ). Sanger sequencing revealed mutation in L1 gene sequence, with a mutation rate of 9.2%. A total of 11 nucleotide variants were found among which 4 were missense mutations. **Conclusion:** Expression level of HPV-18 L1 protein is negatively correlated with the severity of cervical lesion by histopathology. Mutation of HPV-18 L1 gene is relatively prominent and characterized by endemic mutant strains, which indicates that L1 gene mutation may be related to the malignant degree of cervical lesions.

**【Key words】**human papillomavirus strain 18; late gene 1; exfoliated cervical cells; genetic mutations

全球宫颈癌每年新发病例 85% 以上集中在发展中国家,我国约占 12%<sup>[1]</sup>。宫颈癌及其癌前病变均与人乳头瘤病毒( human papilloma virus, HPV) 持续感染直接相关,尤以 HPV 16 和 18 型感染最为严重<sup>[2]</sup>。HPV 病毒颗粒的壳蛋白 L1 由其晚期基因( late gene) 编码,是 HPV 病毒的主要结构蛋白<sup>[3]</sup>。在病毒整合入宿主染色体后,L1 蛋白表达将缺失。因此,L1 蛋白的表达情况能直观地反映宫颈组织中

HPV 病毒感染状态<sup>[4-6]</sup>。临床检测 HPV-18 L1 基因表达水平将有助于诊断 HPV-18 持续感染所造成的宫颈病变程度,目前对 HPV-18 型感染的宫颈疾病中 L1 基因表达情况研究较少<sup>[7-8]</sup>。本文检测分析 HPV-18 型感染的宫颈脱落细胞中 L1 基因的蛋白表达阳性率分布,并针对 L1 基因突变进行测序分析,研究其在宫颈病变诊断中的作用与临床意义。

基金项目: 皖南医学院重点科研项目培育基金( WK2018Z10); 生物活性大分子研究安徽省重点实验室自主研究课题( LAB201605)

收稿日期: 2018-12-22

作者简介: 汪 萍( 1980-),女,讲师,(电话) 13866358082,(电子信箱) wangpingwnmc@163.com;

宛传丹,男,助理研究员,(电子信箱) cd\_wan@163.com,通信作者。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年8月~2017年8月在常熟市第一人民医院、常熟市第二人民医院、常熟市中医院妇产科门诊就诊的宫颈疾病患者。患者年龄21~65岁。以无菌棉拭子擦去宫颈口分泌物,再用锥形刷在宫颈口轻轻旋转3周获取脱落细胞标本。锥形刷置于专用细胞保存液试管中,尽快送检。经HPV分型检测,只收取单纯HPV-18型感染的脱落细胞。依据患者临床病理诊断为慢性宫颈炎192例、宫颈上皮内瘤变CIN I、CIN II共143例、宫颈上皮内瘤变CIN III 127例和宫颈癌41例。DNA提取与HPV分型检测采用港龙生物HPV 26型(基因芯片法)试剂盒进行。

1.2 L1基因PCR 以上述所提取并经分型检测为单纯HPV-18型的DNA为模板,用特异性引物进行L1基因扩增PCR反应,引物核苷酸序列及PCR反应参数参考文献[9-10]。PCR产物结果以1.2%琼脂糖凝胶电泳进行验证。

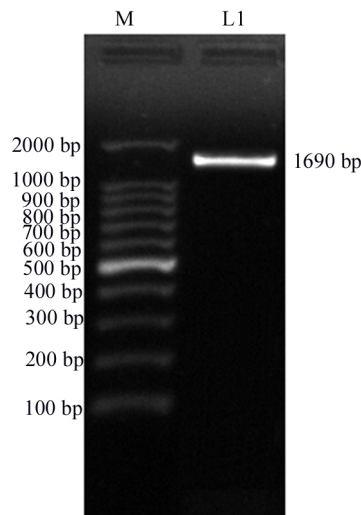
1.3 基因测序与比对 纯化PCR扩增产物后进行Sanger法核苷酸序列测定(ABI基因测序仪3500Dx)。将基因测序核苷酸结果与基因数据库中HPV-18 L1基因序列(GenBank reference X05015)差异进行比较分析,再利用DNASTar软件中的SeqMan程序分析基因区氨基酸序列变异。

1.4 L1壳蛋白检测 采用自动制片系统进行制片,所制涂片在96%乙醇中固定20 min后进行染色。使用HPV L1细胞蛋白检测试剂盒(购自美国Advanced公司)进行L1蛋白检测分析。L1壳蛋白为核蛋白,细胞核呈红色染色即为阳性染色,只要1个被红染即可诊断L1蛋白阳性表达。

1.5 统计学分析 运用SPSS 18.0软件进行统计学分析。分类资料采用例数或百分数表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验,趋势分析采用 $\chi^2$ 趋势检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 L1 DNA扩增结果 如图1所示,有单一DNA条带,预期长度为1690 bp长度的片段为L1基因PCR扩增阳性。根据扩增阳性率与临床病理不同分级诊断结果比较分析如表1所示。宫颈癌和CIN III组L1基因扩增阳性率均低于慢性宫颈炎和CIN I + II组( $P < 0.05$ ),且L1基因扩增阳性率随着宫颈疾病病理严重程度增高而下降( $\chi^2_{趋势} = 94.472, P = 0.000$ )。



注: M为DNA标准分子; L1为1690 bp

图1 HPV-18型L1基因扩增片段电泳检测图

表1 不同分组中L1基因扩增阳性率比较[n(%)]

分级	n	L1基因阳性	$\chi^2$	P
慢性宫颈炎	192	137(71.4) <sup>a</sup>	94.472	0.000
CIN I + II	143	87(60.8) <sup>a</sup>		
CIN III	127	33(26.0) <sup>b</sup>		
宫颈癌	41	3(7.3) <sup>b</sup>		

注:多组间两两比较,符号不同表示 $P < 0.05$ 。

2.2 基因突变分析 选取宫颈癌组20例进行L1基因序列测定。以突变类型分类,则20例中存在11种类型。对比GenBank中HPV-18 L1基因序列(GenBank reference X05015),通过SeqMan软件分析发现其中4种错义突变,导致氨基酸序列变异。包括第263位点C > G;第413位点C > T;第987位点A > C;第1256位点A > G。其余均为同义突变,并不导致L1壳蛋白氨基酸序列变化。结果见表2。

2.3 L1免疫细胞化学分析 503例患者的HPV-18型L1蛋白免疫细胞化学染色阳性率与宫颈病变病理分类结果比较分析列于表3。宫颈癌、CIN III和CIN I + II组HPV-18型L1蛋白阳性率均低于慢性宫颈炎组( $P < 0.05$ ),宫颈癌和CIN III组HPV-18型L1蛋白阳性率均低于CIN I + II组( $P < 0.05$ ),宫颈癌组HPV-18型L1蛋白阳性率均低于CIN III组( $P < 0.05$ );且L1蛋白阳性率随着宫颈疾病病理严重程度增高而下降( $\chi^2_{趋势} = 227.169, P = 0.000$ )。

3 讨论

高危型HR-HPV病毒基因能编码出具有转化功能的癌蛋白<sup>[11]</sup>,能促进宫颈上皮细胞病变。由HPV-16和HPV-18持续感染造成的宫颈癌约占

70%<sup>[12]</sup>。由于 HPV 病毒在持续感染过程中,其基因具有整合到宿主(人)染色体基因组中的能力,整合后 HPV 病毒晚期基因 L1 基因转录表达将逐渐缺

失,当 L1 免疫靶蛋白表达缺失后,HPV 病毒感染细胞将不能被免疫系统有效识别,进而促进了上皮细胞恶性病变<sup>[13]</sup>。

表 2 20 例宫颈癌患者 HPV-18 型 L1 基因测序突变情况

L1 基因突变类型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
c. 263C > G*		√		√	√				√	√			√		√					
c. 413C > T*			√		√												√			
c. 438C > T	√					√	√		√	√		√						√		
c. 495A > T	√	√	√		√		√		√					√			√		√	
c. 495A > G		√		√				√			√	√	√			√		√		
c. 969T > C						√			√									√		√
c. 987A > C*		√			√						√							√	√	
c. 1071T > C	√				√				√						√				√	√
c. 1236T > C			√					√					√		√			√		√
c. 1256A > G*				√						√								√		
c. 1287A > G	√		√		√			√	√				√				√	√		

\*表示引起氨基酸序列突变。

表 3 病理分级分组中 HPV-18 型 L1 蛋白阳性率比较

分级	n	L1 蛋白阳性 [n( % )]	$\chi^2$	P
慢性宫颈炎	192	192( 100.0 ) <sup>a</sup>		
CIN I + II	143	117( 81.8 ) <sup>b</sup>	227.169	0.000
CIN III	127	44( 34.6 ) <sup>c</sup>		
宫颈癌	41	5( 12.2 ) <sup>d</sup>		

注:多组间两两比较,符号不同表示 P < 0.05。

本研究中,L1 蛋白在慢性宫颈炎中阳性率最高,随着病变程度增加,其阳性率呈下降趋势,至宫颈癌变后,脱落细胞标本中已检测不出 L1 蛋白表达。宫颈病变病理分级越严重,其 HPV 病毒 L1 蛋白表达则越少。这与文献<sup>[14-15]</sup>报道的 HPV 病毒早期基因(early gene E 基因)表达情况完全相反,E 基因 mRNA 表达阳性率随宫颈病变严重程度而上升。结果提示,HPV-18 型晚期基因 L1 基因扩增阳性率与临床宫颈疾病进展存在密切关系。L1 表达的蛋白量与宫颈病变严重程度总体呈负相关趋势。

L1 基因表达的蛋白能触发宿主免疫系统反应,因此,L1 蛋白可作为人体细胞免疫反应靶蛋白,是 HPV 疫苗制作的抗原基础。经基因测序分析发现 20 例宫颈癌变中 HPV-18 型的晚期基因 L1 基因序列存在 11 种突变,同一突变类型出现在多位病例中,并且同一病例也会出现多种突变类型的现象,其中 4 种突变导致蛋白一级结构氨基酸序列的转换,而其余多数为无义突变,并不引起氨基酸的序列变化。突变位点类型中有 9 种已有报道<sup>[3,9-10]</sup>,另有 2 种基因突变( c. 969T > C, c. 438C > T) 本研究首次报道。

L1 蛋白表达状态直接反映病毒存在状态以及病变程度,可作为 HPV 病毒感染的检验指标。基于 L1 基因表达的 HPV 检测方法对宫颈疾病的早期筛查以及临床诊断预后发挥着重要的临床意义。研究基因突变形式对疫苗的研制与病毒感染的免疫治疗等有着重要意义。L1 基因序列的突变与致癌机制间的关系,目前尚不明确。这些突变对人体免疫系统的识别以及疫苗的预防与治疗作用可能产生潜在的影响,这将是未来宫颈癌早期诊断与治疗的研究方向。

【参考文献】

[1] 包鹤龄,刘福宁,王黎君,等. 中国 2006 ~ 2012 年子宫颈癌死亡情况与变化趋势分析[J]. 中华流行病学杂志 2017, 38( 1): 58 - 64.

[2] MCCANCE DJ. Human papillomaviruses and cervical cancer[J]. Journal of Medical Microbiology, 1998, 47( 5): 371 - 373.

[3] NIE J, LIU J, XIE H, et al. Multiple human papillomavirus infections and type-competition in women from a clinic attendee population in China[J]. J Med Virol 2016, 88( 11): 1989 - 1998.

[4] LEE SJ, LEE AW, KANG CS, et al. Clinicopathological implications of human papilloma virus( HPV) L1 capsid protein immunoreactivity in HPV16-positive cervical cytology [J]. International Journal of Medical Sciences 2014, 11( 1): 80 - 86.

[5] IZADI-MOOD N, SARMADI S, EFTEKHAR Z, et al. Immunohistochemical expression of p16 and HPV L1 capsid proteins as predictive markers in cervical lesions [J]. Archives of Gynecology and Obstetrics 2014, 289( 6): 1287 - 1292.

[6] 张涛,毛世华,唐良茜,等. 宫颈上皮内瘤变及早期宫颈癌组织中 P16、HPV1-4 壳蛋白的表达及与 HR-HPV 载量相关性研究 [J]. 实用妇产科杂志 2016, 32( 7): 536 - 539.

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217( 2019) 04 - 0317 - 03

## 实验性高脂血症大鼠模型的建立和评价

王 俊 孙雅利 房燕娜 陶梦君 袁 慧

( 皖南医学院 公共卫生学院 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 采用单纯高脂饮食喂养大鼠, 评价高脂血症动物模型的效果。方法: 将 Wistar 大鼠随机分为空白对照组和高脂乳剂实验组, 每组 10 只。空白对照组给予普通饲料喂养, 高脂乳剂实验组给予高脂乳剂按 1 mL/( 100 g · d) 灌胃, 每日给药 1 次。观察实验期间大鼠的身长、体质量以及 Lee's 指数的变化。结果: 对照组和实验组大鼠体长和体质量, 总体上随着时间的增加而增长, 两组大鼠的体质量和体长差异有统计学意义(  $P < 0.05$  )。两组间 Lee's 指数差异具有统计学意义(  $P < 0.05$  ), 但随着时间的推移有下降趋势。结论: 采用该乳化剂灌胃可促进大鼠体质量增长, 能建立较为理想的高脂血症大鼠模型。

**【关键词】**高脂血症; Lee's 指数; 高脂乳剂

**【中图分类号】**R-332; R 589.2 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2019.04.004

## Establishment and evaluation of experimental hyperlipidemia model in rats

WANG Jun, SUN Yali, FANG Yanna, TAO Mengjun, YUAN Hui

School of Public Health, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To establish and evaluate the experimental model of hyperlipidemia in rats. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into blank control group and experimental group(  $n = 10$  for each group ). Rats in the blank control group were fed with conventional diet, and those in the experimental group were intragastrically administered with simple high-fat emulsion in dose of 1 mL/100g, once a day. Changes, including the body length, body weight and Lee's index were observed in rats during experiment. **Results:** Body length and body weight tended to increase with days for rats in the two groups, and the difference was significant between groups(  $P < 0.05$  ). Lee's index was also different between groups(  $P < 0.05$  ), yet the difference was in downward trend over time. **Conclusion:** High-fat emulsion via intragastric route can lead to body weight increase in rats, which is an ideal technique for developing experimental animal models of hyperlipidemia.

**【Key words】**hyperlipidemia; Lee's index; high fat emulsion

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划( 201810368055 ); 安徽省大学生创新创业训练计划( 201710368066)

收稿日期: 2019-03-04

作者简介: 王 俊( 1979- ), 男, 讲师, 硕士, ( 电话) 13855308415, ( 电子信箱) 147139648@qq.com;

袁 慧, 女, 教授, 硕士生导师, ( 电子信箱) 782213588@qq.com, 通信作者。

- [7] 王爱萍, 蒋敏, 栗宁, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白 B 细胞表位预测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016( 4 ): 442 - 445.
- [8] 李肖甫, 邱翠, 智艳芳, 等. HPV-16 L1 甲基化和 HPV E6/E7 mRNA 检测宫颈病变的临床价值[J]. 郑州大学学报( 医学版), 2016, 51( 1 ): 47 - 51.
- [9] MA T, SU Z, CHEN L, et al. Human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes integrate into human hepatoma derived cell line Hep G2 [J]. Plos One, 2012, 7( 5 ): e37964.
- [10] KING A J, SONSMA J A, VRIEND H J, et al. Genetic diversity in the major capsid L1 protein of HPV-16 and HPV-18 in the netherlands [J]. Plos One, 2016, 11( 4 ): e0152782.
- [11] HERNADI Z, GAZDAG L, SZOKE K, et al. Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia [J]. European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology, 2006, 125( 1 ): 114 - 119.
- [12] 杨亚萍, 王建霞, 胥茜, 等. 2013 ~ 2014 年无锡市宫颈癌筛查结果分析[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50( 5 ): 451 - 454.
- [13] 王家建, 田其芳, 张甦, 等. 高危型 HPV 阳性妇女子宫颈脱落细胞 HPV L1 蛋白检测的临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50( 4 ): 253 - 257.
- [14] 王小红, 钱艺美, 缪铃, 等. 高危型 HPV E6/E7 mRNA 与宫颈癌相关性分析[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37( 7 ): 1003 - 1005.
- [15] 董立军, 宋国军. 人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测联合宫颈活检在宫颈病变中的应用价值[J]. 生殖医学杂志, 2013, 22( 7 ): 514 - 516.