

HPV 基因蛋白的相互作用与宫颈病变的关系

侯任 张为远

宫颈癌是世界上女性高发的第三大恶性肿瘤^[1],也是威胁我国妇女健康的主要恶性肿瘤,其发病年龄有年轻化趋势。人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈病变的主要病因^[2]。HPV 是一种常见的小 DNA 双链病毒,各型 HPV 基因组 DNA 长度在 722~8 000 bp 之间。研究显示目前有超过 100 个 HPV 亚型,大约有 40 种与生殖道病变有关^[3]。99.7% 的宫颈癌患者可检测到高危型 HPV DNA^[4],持续的高危型 HPV 感染是宫颈癌发生的必需因素,而病毒持续感染与病毒基因蛋白的相互作用有直接的关系。

HPV 基因组中包含开放阅读框(open reading frame, ORF)的 DNA 编码链可分为 3 个区域:早期蛋白编码区(early region, ER)、晚期蛋白编码区(late region, LR)和非编码区—长控制区(long control region, LCR)。

一、早期蛋白编码区(early region, ER)

早期区域编码 6 个开放阅读框,其产物 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7 的生物学功能主要涉及病毒基因组的复制、转录调节和诱导宿主细胞发生转化,一般情况 ER 区基因仅在病毒的非生长增殖性感染期或病毒诱导的转化细胞中表达。

1. E1 蛋白是六聚体蛋白,是参与病毒复制的重要因子,有 DNA 依赖的腺苷三磷酸酶(ATPase)和 ATP 依赖解旋酶的功能,是 DNA 合成的起始和延长的必要因子。E1 蛋白本身与 DNA 的亲合力较弱,但有 E2 蛋白存在时可明显增强其与复制起始位点的结合能力,使 DNA 复制增加。此外,除了和 E2 蛋白相互作用,也可以结合大量的细胞蛋白,可将细胞 DNA 复制起始元件用到病毒 DNA 复制的起始位点。

2. E2 蛋白是一种特殊的 DNA 结合蛋白,是细胞感染和完成病毒周期创造有利条件所必需,并参与 DNA 病毒复制、游离基因维护和病毒转录^[5]。E2 基因最有特征的功能是补充作用病毒解螺旋酶-E1 蛋白(及其他复制因子)到病毒 DNA,进而促进病毒基因的复制,但其本身并不引起 DNA 的复制^[6]。E2 直接与 E1 相互作用,参与 E1 依赖的病毒 DNA 复制及基因组的维持,E1 在 E2 的合作下允许 HPV 进入上游调控区并使 DNA 在该区域载入到宿主细胞进行复制合成^[7]。有丝分裂中,E2 通过凝聚有丝分裂的

染色质和病毒基因组的相互干扰作用促进病毒基因组分离^[8]。这个作用保证了病毒基因精确复制到子细胞,并维持病毒游离基因在基底上皮组织内的低拷贝状态。E1 和 E2 蛋白基因组是人角质细胞以游离体形式复制的必需蛋白,当 E1 或 E2 任何一个开放阅读框被阻断,病毒基因组便可整合到宿主染色体上。多数情况下,E2 抑制 HPV16 P97 或 HPV18 P105 的启动子,减少 E6 或 E7 的转录,下调它们的表达水平,进而导致细胞衰老或死亡^[9]。但当 E2 基因断裂时,E2 表达下降使得 E6、E7 基因过度表达,刺激了细胞复制,最终导致 HPV 感染的宫颈病变恶性进展。因此常将 E2 开放阅读框的断裂作为 HPV 病毒整合到宫颈癌宿主细胞的重要标志^[10]。

3. E4 基因位于病毒基因的早期区,但编码晚期胞质蛋白,参与病毒组装前与细胞的结合过程,与病毒成熟有关,常以 E1-E4 融合蛋白的形式表达。E4 可通过对 17-和 16-kDa 蛋白的调节表达^[11],抑制细胞从 G2 期到 M 期的转变,影响了正常的细胞周期的进行。通过这个作用降低了角质化细胞的完整性,通过破坏细胞骨架的角质素和角化病毒被膜进而通过线粒体功能的改变诱导程序性死亡^[12],使角蛋白骨架降解。这些均使较硬的角化细胞膜变得更脆弱,使病毒很容易从感染细胞中释放出来^[13],改变了细胞环境而有利于 DNA 复制。中一层成熟细胞内细胞骨架的破坏,产生了病理学诊断的 HPV 感染特征性“挖空细胞”。同时,E4 蛋白的表达降低了 E2 蛋白的表达^[14],进而导致了 E6、E7 蛋白过表达。

4. E5 蛋白是一种由 84 个氨基酸组成的疏水膜蛋白,主要分布在内质网及高尔基体中,主要功能是上调细胞生长因子的受体。其通过空包型质子泵抑制内吞泡酸化,促进内皮生长因子受体再循环,增强 EGF/EGF-R(表皮生长因子/表皮生长因子受体),促进细胞增殖。E5 蛋白能编码疏水短肽,推动了 HPV E5 基因潜在的转化活性。E5 基因具有组织 DNA 损伤细胞凋亡的作用,但不是主要的转化基因。它不能单独使人的原代角质细胞无限增殖,但能与 E6 和 E7 协同作用抑制 p53 和 pRb 表达,从而发挥重要的补充作用^[15]。在宫颈细胞癌变后期 HPV 随机整合到染色体上,导致 E5 编码基因丢失,因此在大多数 HPV 阳性的肿瘤中不表达。推测 E5 基因不能在体内刺激细胞增殖,很可能仅在良性肿瘤发挥作用而在恶性肿瘤中不起作用;或者可能在致癌的起始过程发挥作用或与 HPV 感染致病

doi: 10.3969/j.issn.1672-1861.2012.01.027

作者单位: 100026 首都医科大学附属北京妇产医院

通信作者: 张为远 Email: zhangwy9921@hotmail.com

相关的病毒-宿主细胞间存在相互作用。

5. E6 基因位于感染细胞的核基质及非核膜片段上, 分子量 2.99×10^{-22} kg, 含 151 个氨基酸, 包含了 4 个 Cys-X-X-Cys 保守序列, 构成两个锌指结构 (PDZ 结构)。这种锌指结构在转录、转化、永生化和与细胞蛋白结合等过程中都起着重要作用。高危型和低危型 HPV E6 蛋白都有相似的转录活性, 但高危型 HPV E6 蛋白可与 P53 蛋白结合形成复合物, 这种性质是低危型 HPV E6 蛋白所不具有的。E6 蛋白诱导宿主细胞出现多倍体, 可能通过 P53 依赖和非 P53 依赖两种途径影响细胞有丝分裂的正常进行, 最终导致肿瘤的发生。

P53 的调节作用是通过泛素-蛋白酶系统进行的, 而 E6 相关蛋白 (E6-AP) 具有泛素连接酶作用, 与 P53 泛素结合酶 (E3) 有相似的结构。E6、E6-AP 和 P53 三者可以形成三聚体, 促进 P53 的泛素化降解, 使细胞绕过 G1/S 和 G2/M 的检查点进入 S 期, 导致恶性增殖^[16]。Kranjec 等^[17]证明, HR-HPV E6 能够与含 PDZ 结构域的底物结合, 促进其泛素化降解, 而这类底物与细胞增值、黏附、细胞极化有关, 通过干扰细胞周期调节而导致细胞恶性转化。E6 通过与 P53 基因作用而阻断了 P53, 激活了 P53 应答启动子的转录功能。E6 抗凋亡活性的同时也干扰 P53 对阳性细胞周期的调节功能。在含有 E6 表达的细胞中, P53 的半衰期急剧下降, 当细胞受到病毒的侵袭时, E6 又阻止 P53 的增加。

HPV16 E6 的一个非 P53 依赖活性是在角质细胞中激活端粒酶, 端粒酶长度的维持是细胞永生化和转化的关键。研究发现在大多数的肿瘤中存在人端粒酶 (hTERT) 的活性, 其中包括 HPV 阳性的宫颈癌^[18]。而 E6 即是通过转录上调限速催化 hTERT 的亚单位来维持 hTERT 的长度, 进而在细胞永生化作中起重要作用。E6 的另一个非 P53 依赖性途径是结合转录 CBP/p300 (共价化合物 p300/CREB 结合蛋白)。该蛋白也是裂解型腺病毒-E1A 基因 (Ad-E1A) 和猿猴空泡病毒 (SV40, Simian virus 40) Tag 的靶点, 能下调 P53 对下游分子的激活作用, 使细胞绕过 G1/S 检查点, 进入 S 期引起细胞增殖^[19]。E6 蛋白也能够通过 E6-AP 介导类胆固醇受体辅助激活蛋白激酶 (SRC) 家族的降解, 提高有丝分裂的活性^[20]。

6. E7 蛋白是由 98 个氨基酸残基组成的核蛋白, 是 HPV 主要的转化基因。E7 蛋白的主要功能是与细胞蛋白相互作用而影响细胞周期 G1 期到 S 期的过度。E7 可以与视网膜细胞肿瘤抑制蛋白家族 (pRb)、组氨酸酰化酶 (HDAC)、AP-1 转录因子、细胞周期素、细胞周期素依赖激酶 (cdks) 和细胞周期素依赖激酶抑制产物相互作用, 参与诱导细胞增殖、永生化和转化等过程。E7 蛋白与低磷酸化的 Rb 集合, 破坏 Rb-E2f 复合物, 诱导细胞进入 S 期。高危型的 HPV 与 Rb 结合的效率要比低危型的高 10 倍, 而且高危型 HPV E7 蛋白细胞转化和被酪蛋白激酶 II (Case-

in kinase II, CK II) 磷酸化的效率明显高于低危型 HPV E7 蛋白的转化效率。研究发现, 在低危型 HPV E7 蛋白永生 CR2 结构区域的第 21 位是甘氨酸 (Gly), 而在高危型 HPV E7 蛋白相同区域位点为天冬氨酸 (Asp), 这可以用来解释高危型和低危型 HPV E7 蛋白功能的生物学差异。

二、晚期转录区 (late region, LR)

晚期转录区含两个 ORF, 分别编码合成病毒的主要 (L1) 和次要 (L2) 衣壳蛋白。它们仅在接近上皮表层的分化细胞中表达, 是 HPV 表面蛋白的构象抗原, 可诱导机体产生对 HPV 的中和抗体。病毒衣壳蛋白保护病毒 DNA 不被降解, 在病毒基因组复制起始后开始表达, 决定病毒与宿主细胞有效结合。

1. L1 蛋白的相对分子量为 $9.0 \sim 9.6 \times 10^{-22}$ kg。病毒处于增殖状态时, E6/E7 基因未与宿主细胞整合, 此时细胞正常分化, L1 不表达; 当病毒处于整合状态时, 细胞不能正常分化, L1 蛋白无法表达。因此 L1 壳蛋白的存在意味着进展性的病变, 而缺失则是与 HPV 相关的病变恶化的分子学基础之一^[21]。因此, Griesser 等^[22]根据 L1 的表达特点对宫颈病变进行随访和预后评估, 认为 L1 (+) 患者反映了 HPV 增殖感染, 有低度恶性潜能, 需进行定期随访; L1 (-) 患者反映了非增殖性感染或癌前病变, 有较高的恶性潜能, 需要进行阴道镜检查及病理学诊断。L1 蛋白不仅可以自我组装形成具有良好抗原性和免疫原性的病毒颗粒, 还有 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的免疫识别位点, 因此, 是研究 HPV 疫苗的主要切入蛋白。

2. L2 蛋白的分子量为 $1.1 \sim 1.3 \times 10^{-22}$ kg。L2 与 DNA 病毒以及 L1 结合, 通过病毒 DNA 和壳粒以及通过帮助壳粒在病毒衣壳结构完成前积聚而促成病毒体的形成。在病毒感染的复制期, L2 的表达和进入核是优先于 L1 完成的。牛乳头状病毒 1 (BPV1) 假病毒体包含野生型 L1 而没有 L2 蛋白或有变异的 L2 蛋白 (缺少 N 端或 C 端正电荷区域), 虽然病毒已经结合到细胞表面, 但没有传染性。说明 L2 的 N 端或 C 端在病毒感染过程中起了很关键的作用^[23]。另外研究报道, L2 与热休克相关蛋白 70 (Hsc70) 有很复杂的相互作用关系, 这种相互作用需要在完整细胞核的 L2 中进行转录; 在缺乏 Hsc70 时, L2 很可能通过与其他细胞质蛋白相互作用而被固定在细胞质中^[24], 因此 Hsc70 是 L2 整合进入病毒衣壳必不可少的蛋白。

三、非编码区又称长控制区 (long control region, LCR) 或上游编码区 (upstream regulatory region, URR)

位于 L1 和 E6 之间, 长约 1 000 bp。含有一些 AT 丰富区, 含有内含子、增强子序列。在 HPV 基因 LCR 区与 E2 结合的同源位点可以影响病毒启动子活性的改变, E6、E7 分别在它们各自的基因组的 LCR 处起始转录。不同的型别核酸表达的 LCR 不同, 同一型的 HPV 也可能因为个体差异不同而表现出 LCR 活性水平的不同^[25]。Ottinger

等^[26]的实验强调了病毒宿主与 LCR 的相互影响, E2 的水平、染色体的状态、宿主基因的顺式调节元素都可能成为整合的 LCR 激活的重要决定因素。

综上所述, HPV DNA 基因组的结构功能及它们之间的相互作用对宫颈病变的发生、发展起着很重要的作用。因此, 对这些基因及其表达的蛋白产物的检测, 为临床工作中预测评估宫颈病变的转归, 指导治疗和了解预后提供了良好的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127: 2893-2917.
- [2] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999, 189: 12-19.
- [3] Tiews S, Steinberg W, Schneider W, et al. Determination of the diagnostic accuracy of testing for high-risk (HR) human papillomavirus (HPV) types 16, 18 and 45 in precancerous cervical lesions: preliminary data. *J Clin Virol*, 2009, 46 (Suppl 3): S11-S15.
- [4] Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 2006, 110: 525-541.
- [5] Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*, 2006, 16: 83-97.
- [6] Berg M, Stenlund A. Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol*, 1997, 71: 3853-3863.
- [7] Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, et al. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000397.
- [8] You J. Papillomavirus interaction with cellular chromatin. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799: 192-199.
- [9] Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*, 2009, 384: 375-379.
- [10] Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol*, 2007, 212: 356-367.
- [11] Roberts S, Kingsbury SR, Stoeber K, et al. Identification of an arginine-rich motif in human papillomavirus type 1 E1; E4 protein necessary for E4-mediated inhibition of cellular DNA synthesis in vitro and in cells. *J Virol*, 2008, 82: 9056-9064.
- [12] Raj K, Berguerand S, Southern S, et al. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol*, 2004, 78: 7199-7207.
- [13] Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 2005, 32 (Suppl 1): S7-S15.
- [14] Davy C, McIntosh P, Jackson DJ, et al. A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1-E4 proteins leads to stabilization of E2. *Virology*, 2009, 394: 266-275.
- [15] Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R. Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J Virol*, 2005, 79: 5839-5846.
- [16] Boulet G, Horvath C, Vanden BD, et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 2006-2011.
- [17] Kranjec C, Banks L. A systematic analysis of human papillomavirus (HPV) E6 PDZ substrates identifies MAGI-1 as a major target of HPV type 16 (HPV-16) and HPV-18 whose loss accompanies disruption of tight junctions. *J Virol*, 2011, 85: 1757-1764.
- [18] Katzenellenbogen RA, Vliet-Gregg P, Xu M, et al. NFx1-123 increases hTERT expression and telomerase activity posttranscriptionally in human papillomavirus type 16 E6 keratinocytes. *J Virol*, 2009, 83: 6446-6456.
- [19] Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol*, 1999, 73: 6209-6219.
- [20] Yasmeen A, Alachkar A, Dekhil H, et al. Locking Src/Abl Tyrosine Kinase Activities Regulate Cell Differentiation and Invasion of Human Cervical Cancer Cells Expressing E6/E7 Oncoproteins of High-Risk HPV. *J Oncol*, 2010, 2010: 1-10.
- [21] 卞美璐, 郝敏. 人乳头瘤病毒 L1 蛋白功能及临床应用. *中国实用妇科与产科杂志*, 2010, 26: 352-355.
- [22] Griesser H, Sander H, Walczak C, et al. HPV vaccine protein L1 predicts disease outcome of high-risk HPV+ early squamous dysplastic lesions. *Am J Clin Pathol*, 2009, 132: 840-845.
- [23] Roden RB, Day PM, Bronzo BK, et al. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol*, 2001, 75: 10493-10497.
- [24] Florin L, Becker KA, Sapp C, et al. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol*, 2004, 78: 5546-5553.
- [25] Lace MJ, Isacson C, Anson JR, et al. Upstream regulatory region alterations found in human papillomavirus type 16 (HPV-16) isolates from cervical carcinomas increase transcription, ori function, and HPV immortalization capacity in culture. *J Virol*, 2009, 83: 7457-7466.
- [26] Ottinger M, Smith JA, Schweiger MR, et al. Cell-type specific transcriptional activities among different papillomavirus long control regions and their regulation by E2. *Virology*, 2009, 395: 161-171.

(收稿日期: 2011-10-09)