

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)24-2264-03

宫颈癌与 HLA 等位基因 DQB1 * 03、DR15 的相关性研究

夏琳 张菊 陈中灿 白玉杰 罗进 杨浩 阎小君

(第四军医大学科研部全军基因诊断技术研究所 陕西 西安 710033)

Study on relationship between cervical cancer and HLA-DQB1 * 03 and DR15 alleles

XIA Lin ,ZHANG Ju ,CHEN Zhong-Chan ,BAI Yu-Jie ,LUO Jin ,
YANG Hao ,YAN Xiao-JunPLA Institute of Genetic Diagnosis ,Administration of Scientific
Research ,Fourth Military Medical University ,Xi'an 710033 ,China

【 Abstract 】AIM : To investigate the relationship between the susceptibility to cervical cancer and HLA-DQB1 * 03 and DR15 alleles in Shaanxi Province. **METHODS :** The target DNA fragments of HLA-DQB1 * 03 and DR15 alleles (79 and 197bp respectively) were amplified by using polymerase chain reaction of sequence specific primers(PCR - SSP) in cervical cancer patients and healthy control in Shaanxi Province. **RESULTS :** The frequency of the DQB1 * 03 allele was significantly higher in cervical cancer patients than that in normal controls , while no significant difference was found in the frequency of the DR15 allele between the patient group and the control group. **CONCLUSION :** There may be some correlation between the development of cervical cancer and HLA - DQB1 * 03 , and no correlation between the development of cervical cancer and HLA - DR15.

【 Keywords 】 cervix neoplasms ;HLA antigens

【 摘 要 】目的 : 探讨我国陕西地区宫颈癌的发生与人类白细胞抗原(HLA)-DQB1 * 03、DR15 等位基因的相关性. 方法 : 采用序列特异性引物的聚合酶链式反应(PCR-SSP)方法 , 扩增 HLA 等位基因 DQB1 * 03、DR15 的目的 DNA 片段(分别为 79、197 bp) , 分析两对等位基因在陕西地区宫颈癌患者和正常人中分布频率的差异. 结果 : 45 名宫颈癌患者组中 DQB1 * 03 等位基因频率显著高于 50 名健康对照组 , DR15 等位基因频率在两组中的分布无显著差异. 结论 : HLA 等位基因 DQB1 * 03 可能与宫颈癌的发生具有相关性 , DR15 可能与宫颈癌的发生不存在关联.

【 关键词 】 宫颈肿瘤 ;HLA 抗原

收稿日期 2004-06-25 ; 修回日期 2004-10-19

通讯作者 阎小君. Tel. (029) 83374769 Email. Xiaojuny@fmmu.edu.cn
作者简介 夏琳(1980-) , 女(汉族) , 湖北省大冶市人. 硕士生(导师
阎小君) , Tel. (029) 83374771 Email. Shinning100@hotmail.com

【中图分类号】R737.33

【文献标识码】A

0 引言

宫颈癌在全世界范围内已成为威胁女性生命的第二大恶性疾病 , 仅次于乳腺癌. 已证实人乳头瘤病毒(human papillomavirus , HPV) 的感染是宫颈癌的重要致病原因 , 但并非所有感染 HPV 的妇女都发展为宫颈癌 , 因此认为其他因素在宫颈癌的发生、发展过程中也可能起着促进作用. 因此我们选择 HLA 等位基因 DQB1 * 03、DR15 进行研究 , 探讨其在陕西地区妇女中的分布特征及对宫颈癌易感性的影响.

1 对象和方法

1.1 对象 宫颈癌患者组为西京医院妇产科经病理学检查确诊的宫颈癌患者 45 例 , 年龄 30 ~ 74(平均 46.4) 岁 ; 正常对照组为西京医院住院治疗的非宫颈癌患者 50 例 , 年龄 32 ~ 71(平均 42.1) 岁.

1.2 方法

1.2.1 基因组的提取 酚-氯仿三步法抽提研究对象外周血白细胞基因组 DNA.

1.2.2 序列特异性引物(SSP) 参照 Olerup 等^[1,2] 文献设计合成 DQB1 * 03、DR15 等位基因序列特异性引物 , 引物序列如下 : DQB1 * 03 : 上游引物 5'-GAG AGG ACC CGG GCG GAG T-3' , 下游引物 5'-CTC GCC GCT GCA AGG TCG T-3' , 扩增片段大小为 79 bp ; DR15 : 上游引物 5'-TCC TGT GGC AGC CTA AGA G-3' , 下游引物 5'-CCG CGC CTG CTC CAG GAT-3' ; 扩增片段大小为 197 bp.

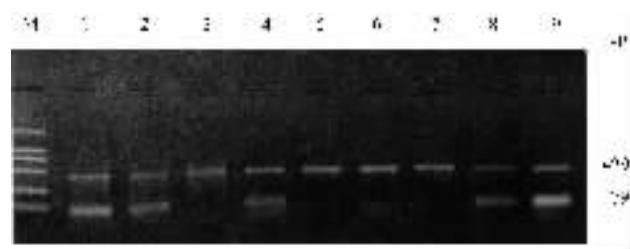
1.2.3 特异性 PCR 扩增 选人生长激素(hGH) 的保护序列 , 扩增作内对照引物. 引物序列为 : 上游引物 5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3' , 下游引物 5'-TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C-3' . 扩增片段大小为 429 bp. PCR 反应总体积为 25 μ L , 2.5 mmol/L dNTP 1.5 μ L , 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L , Taq 酶 1.5 U , 10 \times Buffer 2.5 μ L , 等位基因序列特异的及内参上下游引物各 10 pmol/L , DNA 模板 2.0 μ L , 去离子水 13.2 μ L . 混匀、瞬时离心 , 按如下程序扩增 : DQB1 * 03 反应体系 :

94℃预变性 5 min 后,94℃变性 45 s,68℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,循环 30 次后于 72℃过延伸 10 min. DR15 反应体系:94℃预变性 5 min 后,94℃变性 45 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,循环 30 次后于 72℃过延伸 10 min.

1.2.4 特异性扩增产物的检测 PCR 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,电压 10 V/cm 时间 20 min,电泳结束后,在紫外灯下观察并拍摄扩增产物电泳照片.

2 结果

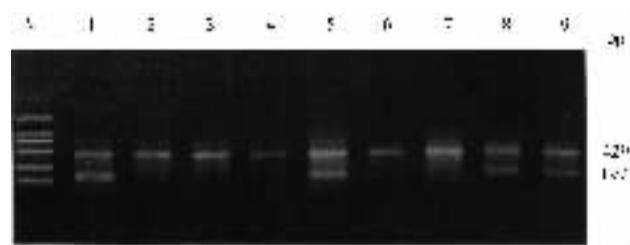
检测样本 HLA-DQB1*03 和 DR15 等位基因扩增产物电泳照片如图 1、2. 45 例宫颈癌患者组 HLA-DQB1*03 基因频率为 68.9%(62/90),50 例正常对照组 HLA-DQB1*03 基因频率为 34.0%(34/100),提示 HLA-DQB1*03 等位基因可能增加对宫颈癌的易感性,与宫颈癌的发生具有关联性;宫颈癌患者组



M:DL2000 marker;1,2,4,8,9:HLA-DQB1*03 positive;3,5~7:HLA-DQB1*03 negative;internal positive control(429 bp)is amplified in all 9 samples.

Fig 1 PCR-SSP products of HLA-DQB1*03 allele in 9 samples

图 1 部分样本 HLA-DQB1*03 等位基因 PCR-SSP 结果



M:DL2000 marker;1,5,8,9:HLA-DR15 positive;2~4,6,7:HLA-DR15 negative;internal positive control(429 bp)is amplified in all 9 samples.

Fig 2 PCR-SSP products of HLA-DR15 allele in 9 samples

图 2 部分样本 HLA-DR15 等位基因 PCR-SSP 结果

HLA-DR15 基因频率为 35.6%(32/90),对照组为 31.0%(31/100),两组之间差异不大,提示 DR15 等位基因与宫颈癌之间可能不存在关联.

3 讨论

HLA-II 类基因与宫颈癌关系的研究目前主要集中于以下 3 组 HLA-II 类等位基因/单体型:①

DQB1*03 等位基因(DQB1*0301,DQB1*0302 和 DQB1*0303);② DRB1*1501 和 DQB1*0602 等位基因(这两等位基因存在连锁不平衡现象,因此常出现于同一单体型中);③ DRB1*13(由 DRB1*1301-5 等位基因组成)和 DQB1*0603(DRB1*1301 和 DQB1*0603 也存在连锁不平衡).各种研究结果最一致的发现是 DRB1*13 和/或 DQB1*0603 对宫颈癌的保护性作用^[3].对 DQB1*03 和 DRB1*1501/DQB1*0602 等位基因与宫颈癌关系的研究结果则显示出一定的差异,不同种族人群甚至同一种族的研究结果可能不相同.Madeleine 等^[4]对美国妇女,Cuzick 等^[5]对英国妇女进行的研究报道了 DQB1*03 与宫颈癌呈正相关,但也有些研究未发现有关联性^[6-8].对 DRB1*1501/DQB1*0602 的研究也未达成定论.这些不一致的研究结果可能是由于不同国家和种族的妇女的遗传特征不一样或患者选择标准不一致,检测方法等因素存在差异而造成的.

本研究对陕西地区妇女 HLA-DQB1*03、DR15 等位基因的分布特征作了初步探索,频率数值与欧美国家相比有差异,说明了 HLA 等位基因分布的种群多态性.研究结果支持 HLA-DQB1*03 等位基因与宫颈癌的发生具有相关性这一结论,而未发现 DR15 等位基因与宫颈癌之间存在关联.但由于样本数量有限,结论仅具有参考意义.国外也有一些研究发现特定的 HLA II 类等位基因与 HPV 感染阳性的宫颈癌呈正相关^[9-11],提示特定的 HLA II 类等位基因通过影响机体对 HPV 抗原的免疫应答而增加宫颈癌患病的风险性.宫颈癌的发生是一个多因素多步骤作用的过程,高危 HPV 的感染在宫颈癌的发生过程中起着不可忽视的作用,而宿主自身的遗传因素对疾病的进展也有着决定性的影响.目前各种研究报告的结果不尽相同,说明影响宫颈癌发生发展的因素的复杂性,因此值得进一步对 HLA II 类基因多态性和 HPV 感染在宫颈癌发生中的联合作用进行深入探讨.

【参考文献】

- [1] Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours [J]. *Tis Antigens*, 1993; 1(1): 119-134.
- [2] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation [J]. *Tis Antigens*, 1992; 39(2): 225-235.
- [3] Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: A review [J]. *Virus Res*, 2002; 89(2): 229-240.
- [4] Madeleine MM, Brumback B, Cushing-Haugen KL, et al. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: A population-

- based study [J]. *Infect Dis*, 2002 186(11) 1565-1574.
- [5] Cuzick J, Terry G, Ho L, et al. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1* and DQB1* alleles and cervical cancer in British women [J]. *Br J Cancer*, 2000 82(7) 1348-1352.
- [6] Wang SS, Wheeler CM, Hildesheim A, et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia: Results from a population-based study in Costa Rica [J]. *Infect Dis*, 2001; 184(10) 1310-1314.
- [7] Krul ET, Schipper RF, Schreuder GT, et al. HLA and susceptibility to cervical neoplasia [J]. *Hum Immunol*, 2000 60(3) 337-342.
- [8] Beskow AH, Josefsson AM, Gyllensten UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer *in situ* [J]. *Int*

- J Cancer*, 2001 93(6) 817-822.
- [9] de Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil [J]. *Mutat Res*, 2003 544(2-3) 375-383.
- [10] Odunsi K, Ganesan T. Motif analysis of HLA class II molecules that determine the HPV associated risk of cervical carcinogenesis [J]. *Int J Mol Med* 2001; 8(4) 405-412.
- [11] Beskow AH, Josefsson AM, Gyllensten UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer *in situ* [J]. *Int J Cancer*, 2001 93(6) 817-822.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)24-2266-01

人源抗 HBs 基因工程抗体在 *E. coli* 中的高效表达与折叠

刘雪林^{1,2}, 唐晓敏¹, 宋宏彬¹, 李申龙¹, 徐德忠²(¹军事医学科学院疾病预防控制中心, 北京 100039, ²第四军医大学预防医学系流行病学教研室)【关键词】HbsAg Fab 段 表达 复性
【中图分类号】Q784 【文献标识码】B

1 材料和方法

1.1 表达质粒的构建 从含有人源性抗 HBsAg 抗体 Fab 段基因的噬菌体^[1]中扩增出重链 Fd 片段, 上游引物 5'cggaattcatatggt(G)aaactgctg(C)gaa(G)cagctctg'cggaattcattaa(T)g(C)ag(A)gtc(T)ttgtcacag(A)gac(T)ttt(G)gg t(C)t(C)caacttc3', 从上述噬菌体中扩增出轻链基因, 上游引物 5'cggaattcatatgga(G)ctg(C)gtt(G)atgac(C)cagctctcagacacc3'和下游引物 5'cggaattcattacaat(C)tca(T)cc t(C)ct gttgaa gctcttc3'。为便于亚克隆和满足表达的要求, 在上游引物的 5'端引入 NdeI 酶切位点(下划线处, 并含起始密码子 ATG), 下游引物引入 2 个终止密码子(TAA TGA)和 EcoRI 酶切位点。将 PCR 产物分别克隆于 pGEM-T 载体(Promega 公司), 再以 NdeI 和 EcoRI 酶切, 与相应酶切的表达载体 pET-20b(Novagen 公司)连接, 构建成表达质粒 pETFd 和 pETL。上述质粒均经酶切鉴定, 并经序列分析证明构建正确。

1.2 Fd 片段链和 L 链表达 将表达质粒 pETFd 和 pETL 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)挑单菌落接种于 2 mL LB 培养液(羧苄青霉素 100 mg/L) 37°C 振荡过夜。第 2 日分别取 30(L 菌液)转种于 2 mL LB 培养液(羧苄青霉素 100 mg/L)中 37°C 振荡培养 3~4 h 至 A_{600nm} 为 0.6~1.0, 加 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L 继续培养 3 h 以诱导外源程序蛋白的表达。诱导后的菌液 6000 r/min 离心 10 min, 上清加等量 2×上样缓冲液, 沉淀(菌体)加适量 1×上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 6000 g 离心 1 min。取上清 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 脱色后观察结果。SDS-PAGE 凝胶在双薄层扫描仪(Shimadzu, CS-930)检测蛋白表达含量。

1.3 包涵体蛋白的分离和复性 取 50 mL 诱导表达的菌液 6000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 5 mL 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 2 mmol/L EDTA 悬浮, 加溶菌酶至 100 mg/L 及

0.5 mL 10 mL/L Triton X-100 30°C 水浴 15 min。置冰上, 超声液粉碎细胞 4°C 6000 g 离心 15 min。上清为可溶性蛋白, 取 50 μL 加等量 2×上样缓冲液, 沉淀为不可溶蛋白, 加 100 μL 1×上样缓冲液, SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 脱色后观察结果。包涵体蛋白复性参照文献 [2] 报道的方法进行。

1.4 免疫印迹 取 25 μL 初步纯化浓缩的蛋白溶液与等量的 2×上样液混合(加 β-巯基乙醇), SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜(NCM) 30 g/L 脱脂奶封闭, 加兔抗人 Fab 段抗体, 再与碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 抗体反应, BCIP-NBT 显色。

1.5 活性检测 取 25 μL 初步纯化浓缩的蛋白溶液及其稀释液与等量的碳酸盐缓冲液混合, 包被 ELISA 板孔(每样品包被 4 孔) 4°C 过夜, 30 g/LBSA 封闭, 加入适当工作浓度的 HRP-HBsAg, 以底物邻苯二胺显色, 测 A_{490nm} 值, 并计算 4 个孔的平均值。

2 结果

2.1 Fd 段和 L 链蛋白的表达 SDS-PAGE 检测可见, Fd 段和 L 链表达质粒转达化 BL21(DE3)后, 均能够表达外源蛋白, 其表观分子量约 25 ku(Fd)和 27 ku(L), 并且都是以包涵体形式表达, 密度扫描检测 Fd 段和 L 链蛋白的表达量分别约为 48% 和 53%。免疫印迹实验显示, 两种蛋白均可与抗人 Fab 段抗体反应, 证明为人源抗体。

2.2 Fab 蛋白复性 Fd 段和 L 链包涵体经 GuHCl 溶解后, 等量混合加入复性缓冲液中于 10°C 折叠 36 h。SDS-PAGE 检测可见 Fd 段和 L 链蛋白在 50 ku 处折叠形成一个新的蛋白, 该蛋白带经 β-巯基乙醇处理则重新消失。薄层扫描显示 50 ku 的复性蛋白占总蛋白的 28%。

2.3 复性蛋白具有结合 HBsAg 的活性 复性的蛋白溶液与酶标 HBsAg 反应后 A_{490nm} 平均为 0.712, 说明表达蛋白复性后对 HBsAg 有一定抗原结合活性。

3 讨论 我们将抗 HBs 抗体的轻链和 Fd 段基因分别置于 pET-20 b 质粒中, 转化大肠杆菌后, 获得了高效表达, 表达产量分别为 48% 和 53%。Fd 段和 L 链蛋白在折叠液中复性, 形成的复性蛋白对 HBsAg 有一定结合活性, 说明基因工程抗体大肠杆菌包涵体表达的技术路线是可行的。但是复性效率比较低, 需要进一步研究改进复性条件, 提高复性比例。

【参考文献】

- [1] 邓宁, 粟宽源, 王恂章, 等. 人源性抗 HBsAg 抗体 Fab 段在酵母中的表达 [J]. 生物工程学报 2002 18(5) 546-550.
- [2] Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, et al. Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody fab fragment against hepatitis B surface antigen [J]. *J Med Virol*, 1999 58(4) 338-345.

编辑 王睿

收稿日期 2004-11-05; 修回日期 2004-12-01

作者简介: 刘雪林(1963-), 男(汉族), 河南省辉县人, 副主任医师, Tel. (010) 66933342 Email. lxuelin@sohu.com