

HPV16E7 基因沉默对宫颈癌细胞系 CaSki 细胞增殖的影响

李军果¹, 李 力²

(1.北京军区总医院生殖医学中心,北京 100700;

2.第三军医大学野战外科研究所,重庆 400042)

摘 要: [目的] 探讨脂质体转染 HPV16E7 siRNA 对宫颈癌 CaSki 细胞增殖的影响。 [方法] 人工合成抑制 HPV16E7 基因的 siRNA 片段,通过脂质体转染到 CaSki 细胞内,显微镜下观察其形态学变化;流式细胞术检测各组细胞周期变化;RT-PCR 检测 HPV16E7 mRNA 的表达;Western blot 检测 HPV16E7 蛋白表达。 [结果] 转染 siRNA 后的 CaSki 细胞,细胞增殖受到显著抑制,HPV16E7 mRNA 表达显著下降,HPV16E7 蛋白水平显著下降。 [结论] 应用 RNA 干扰靶向抑制 HPV16E7 基因可以显著抑制 CaSki 细胞增殖。

关键词: HPV16E7;siRNA;宫颈肿瘤

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)01-0029-05

The Effect of HPV16E7 Gene Silencing on the Proliferation of Cervical Cancer Cell Line CaSki

LI Jun-guo¹, LI Li²

(1.Center of Reproductive Medicine and Genetics, General Hospital of Beijing Army, Beijing 100700, China; 2.Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of liposomal transfection of HPV16E7 siRNA on the proliferation of cervical carcinoma cell line CaSki. [Methods] HPV16E7 siRNA was synthesized and transfected into CaSki cell by liposome. Cell morphological change was observed with microscopy, and cell proliferation index was detected by flowcytometry. HPV16E7 mRNA expression was determined by RT-PCR and protein level of HPV16E7 was determined by Western blot. [Results] For the CaSki cell transfected with siRNA, cell proliferation was inhibited significantly, the expression of HPV16E7 mRNA and protein level of HPV16E7 was significantly decreased. [Conclusion] HPV16E7 siRNA can inhibit the proliferation of cervical carcinoma cell line CaSki.

Subject words: HPV16E7;siRNA;cervical neoplasms

人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染是宫颈癌发生的必要条件,其中 50% 以上是 HPV16 型。HPV 的 E6 和 E7 基因整合到宫颈上皮细胞并持续表达是引发宫颈癌的主要原因,同时也是维持宫颈癌恶性表型的必要条件。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是目前较为先进的技术,抑制目的基因表达能达到近似于基因敲除的效果 (基因静止, gene silence)。本研究拟用化学合成的针对 HPV16E7 的 siRNA 干扰 CaSki 细胞,检测 HPV16E7 基因静止后 CaSki 细胞 HPV16E7 表达的变化,与未转染 CaSki 细胞对比,观察 HPV16E7 mRNA 和蛋白

收稿日期:2011-08-30

表达的差异,明确 RNAi 对靶基因 HPV16E7 的抑制作用,及其对宫颈癌细胞凋亡、增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人宫颈癌 CaSki 细胞株购自武汉大学典型细胞保藏中心。兔抗人 HPV16E7 抗体购自美国 Chemicon 公司,羊抗兔 IgG-HRP 购自北京 Tiangen 公司。脂质体 (Lipofectamine™ 2000) 购自 Invitrogen 公司, RPMI-1640 培养基、标准胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, HPV16E7 上下游引物由上海生工合成, RT-

PCR 相关试剂盒购自日本 TOYOBO 公司, Trizol RNA 提取液购自北京鼎国生物技术有限公司, RIPA 细胞蛋白裂解液购自申能博彩生物公司。

1.2 细胞株培养

人宫颈癌 CaSki 细胞用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI 1640 培养液培养。置于 CO₂ 孵箱中, 恒温 37℃, 5%CO₂, 21%O₂, 饱和湿度。细胞培养密度 0.1×10⁶/cm²~1×10⁶/cm², 每 2~4d 传代一次, 取对数增殖期细胞用于实验。

1.3 HPV16E7 siRNA 分子的设计与合成

HPV16E7 siRNA 分子由广州市锐博生物科技有限公司设计并合成, 该序列在 GenBank 表达序列标签 (EST) 数据库中用 BLAST 检索, 确认为 HPV16E7 特异性序列, 排除与其它基因同源。阴性对照为由广州市锐博生物科技有限公司提供的乱序序列。

1.4 细胞分组与转染

取对数生长期的 CaSki 细胞, 传代接种于 6 孔培养板中, 调整细胞浓度, 使每孔细胞数为 4×10⁵ 个, 常规条件下培养 24 h, 在显微镜下观察, 细胞融合达到 60% 时开始实验。设置: ①未干扰组(Non-transfection); ②无义干扰对照组(siNControl): 转染阴性对照乱序 siRNA 序列; ③siRNA 转染组(siH-HPV16E7): 转染特异性 siRNA 序列; 方法: 按广州市锐博生物科技有限公司提供的转染试剂手册操作。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

将收获的各組细胞进行消化、离心, 使细胞数在 1×10⁶ 左右, 50% 酒精固定, 4℃ 保存, 送至第三军医大学新桥医院呼吸研究所行 FCM 检测, 检测细胞增殖周期分布。

1.6 RT-PCR 术检测 HPV16E7 mRNA 水平

收集培养细胞, 调整细胞浓度为 5×10⁶ 个/孔~1×10⁷ 个/孔, 采用 Trizol 法提取总 RNA。采用 20μl 反应体系(含待测 RNA 1μg, RNase Inhibitor 1μl, Reverse Tra Ace 1μl, 及适当浓度的 Oligod T 和 dNTP) 65℃ 反应 5 min, 42℃ 反应 60 min, 85℃ 反应 5 min, 4℃ 反应 5 min 以合成 cDNA。PCR 反应体系采用 50μl 反应体系 (10×PCR Buffer 5μl, KOD Plus 5μl, cDNA 5μl, 引物各 1.5μl, 及适当浓度的 MgSO₄ 和 dNTP), PCR 反应条件为 94℃ 反应 2 min, 后 98℃ 反应 10s, 48℃ 反应 30s, 68℃ 反应 17s, 共 35 个循环。HPV16E7 引物序列: 上游为 5'-ATGCATGGAGAT-

ACACCT-3'; 下游为 5'-TTATGGTTTCTGAGAACA-3'; 产物为 279bp。同时以 GAPDH 作为内参照, 其引物序列: 上游为 5'-TTTGGTATCGTGAAGGAC-3', 下游为 5'-AAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'; 产物为 384bp。扩增产物经含 EB 的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外线下观察并应用 Labworks 软件分析计算各条带的积分光密度 (integrate optical density, IOD), 以 HPV16E7 与 GAPDH 的 IOD 比值表示 HPV16E7 mRNA 的相对含量。

1.7 Western blot 法检测 HPV16E7 蛋白水平

收集培养细胞, 应用细胞蛋白提取液及 PMSF (两者比例 1000:1) 提取蛋白, 将蛋白定量后, 转到 PVDF 膜, 膜经 5% 脱脂奶粉封闭 1h 后, 分别加 HPV16E7 和 GAPDH 鼠抗人抗体 4℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1h, 将 PVDF 膜置于 Bio-Rad 扫描仪中照相。Quantity one 4.4 软件分析计算各条带的 IOD, 以 HPV16E7 与 GAPDH 的 IOD 比值表示 HPV16E7 蛋白的相对含量。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件, 数据采用均数±标准差表示, 进行单因素方差分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察

倒置显微镜观察转染前后细胞形态变化: 转染前, 细胞贴壁较好, 呈扁平多角形, 中间有圆形的核, 核内有 1 至多个核仁; 转染后 48h, 细胞体积收缩, 贴壁不佳, 细胞突起消失。

2.2 细胞周期分布

HPV16E7 干扰 CaSki 细胞 24h、48h、72h 后, G₀~G₁ 期细胞百分数较未干扰组分别增加了 8.7%、12.7%、15.6%, 进入 S 期的细胞百分数较未干扰组分别减少了 1.3%、4.3%、14.9%。提示通过 siHPV16E7 干扰能将更多的细胞阻滞在 G₀~G₁ 期。见图 1。

2.3 HPV16E7 siRNA 转染对 CaSki 细胞 HPV16E7 mRNA 的影响

通过 RT-PCR 可获得 279bp(HPV16E7)和 384bp (GAPDH) 两条带 (图 2), GAPDH 在各组中表达相似、条带清晰, siRNA 转染组 HPV16E7 表达的条带

亮度低于其余各组，经 Labworks 软件分析系统鉴定电泳结果后，得出 HPV16E7/ GAPDH 吸光度比值：未干扰组为 1.1733 ± 0.0667 ，无义干扰对照组为 1.3933 ± 0.1667 ，两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；siRNA 转染组为 0.4033 ± 0.0328 ，与未干扰组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明 HPV16E7 siRNA 作用于 CaSki 细胞后 HPV16E7 mRNA 表达明显下调，而未干扰组、无义干扰对照组 HPV16E7 mRNA 水平无明显变化。提示 HPV16E7 siRNA 能显著且特异地抑制 HPV16E7 mRNA 表达。

2.4 HPV16E7 siRNA 转染对 CaSki 细胞 HPV16E7 蛋白水平的影响

通过 Western blot 可获得 10kD (HPV16E7) 和 45kD (β -actin) 两条带 (见图 3)， β -actin 在各组中

表 1 RNAi 对 CaSki 细胞表达 HPV16E7 mRNA 的影响(n=3)

组别	IOD
siRNA 转染组	0.4033 ± 0.0328
无义干扰对照组	1.3933 ± 0.1667
未干扰组	1.1733 ± 0.0667

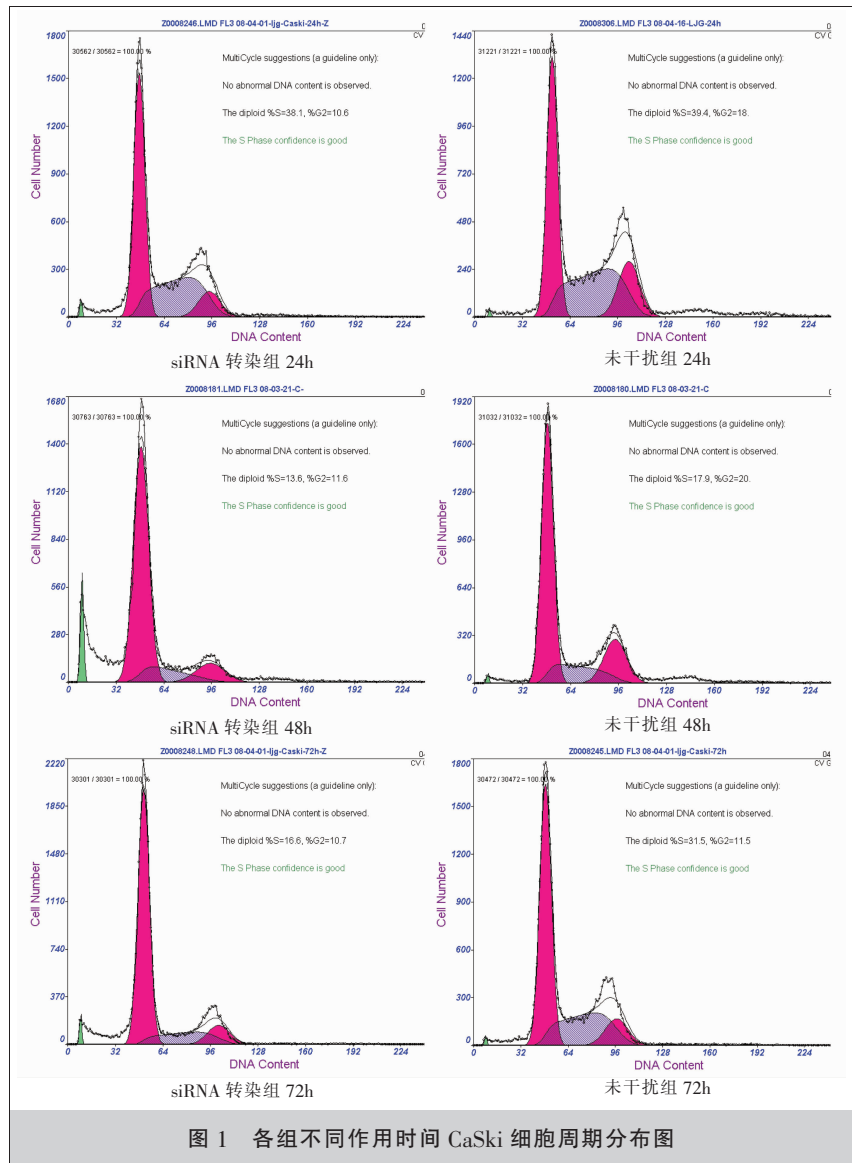


图 1 各组不同作用时间 CaSki 细胞周期分布图

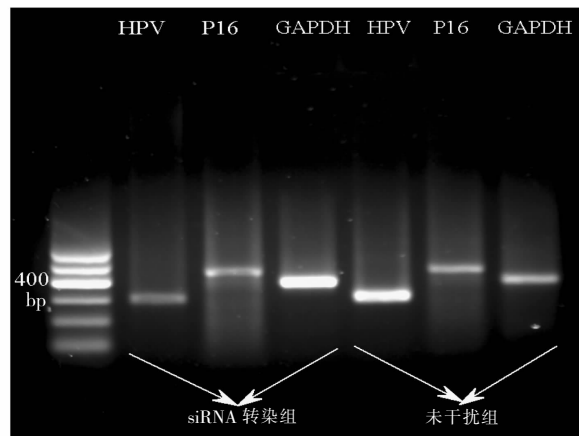
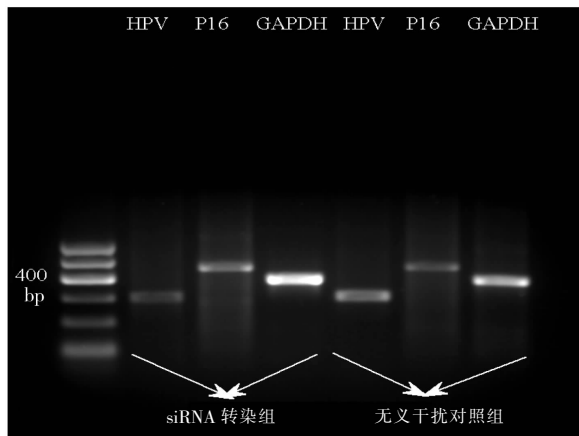


图 2 RNAi 对 CaSki 细胞表达 HPV16E7 mRNA 的影响

表达相似、条带清晰,siRNA 转染组 HPV16E7 表达的条带亮度低于其余各组,经 Labworks 软件分析系统鉴定结果后,得出 HPV16E7/ β -actin 吸光度比值:未干扰组为 1.9061 ± 0.1612 ,无义干扰对照组为 2.2164 ± 0.0756 ,两组差异无统计学意义 ($P>0.05$);siRNA 转染组为 1.1550 ± 0.1274 ,与未干扰组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 2。表明 HPV16E7 siRNA 作用于 CaSki 细胞后 HPV16E7 蛋白表达明显下调,而未干扰组、无义干扰对照组 HPV16E7 蛋白水平无明显变化。提示 HPV16E7 siRNA 能显著且特异地抑制 HPV16E7 蛋白表达。

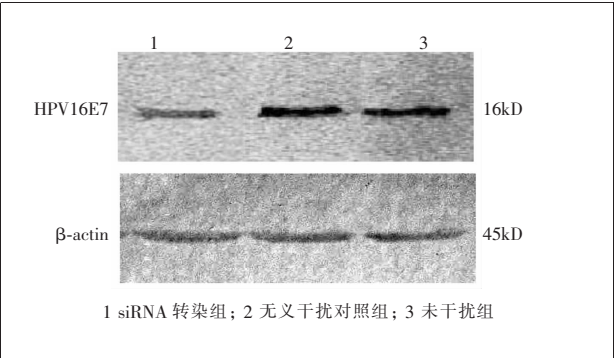


图 3 RNAi 对 CaSki 细胞 HPV16E7 蛋白表达的影响

表 2 RNAi 对 CaSki 细胞表达 HPV16E7 蛋白的影响(n=3)

组别	IOD
siRNA 转染组	1.1550 ± 0.1274
无义干扰对照组	2.2164 ± 0.0756
未干扰组	1.9061 ± 0.1612

3 讨论

宫颈癌是发生在全球妇女中第二位最常见的恶性肿瘤,其死亡率已跃居各类妇科恶性肿瘤之首^[1]。HPV 感染是宫颈癌的主要病因,通过 E6、E7 癌基因蛋白来实现,高达 90%以上的宫颈癌患者伴有 HPV 感染。宫颈 HPV 感染是宫颈癌发生的必要条件,但仅有部分感染患者最终发展为宫颈癌^[2,3],提示宫颈 HPV 感染并非充分条件。癌基因的激活、抑癌基因的失活以及宿主的免疫学和遗传背景与 HPV 相关疾病的转归密切相关^[4],而且目前尚无有效治疗药物及可靠治疗方案。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物

体内抑制特定基因表达的一种现象,是指当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的由正义 RNA 和反义 RNA 组成双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA)时,该 mRNA 发生特异性降解而导致相应的基因表达沉默的现象。这种现象发生在转录后水平,又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[5]。RNAi 抑制目的基因的表达具有特异性和高效性,近年越来越受到重视,已经成为一种研究基因功能的重要方法。

目前 siRNA 作用靶序列的选择还处于探索阶段,都带有一定的随机性。一般认为应避开 UTRs,最好位于起始密码子 75~100 个碱基以后,终止密码子 100 个碱基以前的区域,寻找“AA”二连序列及其 3'端的 19 个碱基序列,作为潜在的 siRNA 靶位点;有研究显示 GC 含量在 45%~55%左右的 siRNA 要比那些 GC 含量偏高的更为有效;其序列经 Blaster 等检索应该与其它 mRNA 无同源性,同一个 mRNA 可选取不同的位点来设计 siRNA,并筛选出作用最佳的 siRNA 序列^[6]。因此本实验设计中,使用的三条 siRNA 分别靶向 E7 基因序列的不同部位,以寻找最佳的作用靶位。并通过 RT-PCR 筛选出有效序列,从而起到 RNA 干扰作用。

siRNA 的制备^[7]目前有两种方法:细胞外合成 siRNA 和细胞内合成 siRNA。前者包括化学合成、体外转录、长片段 dsRNAs 经 Rnase III 降解体外制备 siRNA;后者包括通过 siRNA 表达框架或通过 siRNA 表达载体(质粒或者病毒载体)在细胞中表达产生 siRNA。本研究采用化学合成 siRNA 干扰宫颈癌 CaSki 细胞。并通过 RT-PCR 检测,发现在 CaSki 未干扰组和无义干扰对照组细胞样品中,存在较多的 HPV16E7 模板,两者无显著差异,但 RNAi 转染组细胞样品中,HPV16E7 模板显著减少,提示 HPV16E7 siRNA 转染特异且高效地抑制了 CaSki 细胞的 HPV16E7 mRNA 表达。

蛋白质是生命活动的最终执行者。我们进一步通过 Western blot 检测了 HPV16E7 的表达情况。在 Western blot 检测中,为了校正系统误差,我们引入了内参照 β -actin, β -actin 系管家基因,在各种细胞内表达一致且表达量大,被广泛用于传统 RT-PCR 和 Western blot 检测的内参照。检测结果表明,在未干扰组和无义干扰对照组细胞样品中,存在较多的

HPV16E7 蛋白,两者无显著差异,但 RNAi 转染组细胞样品中,HPV16E7 蛋白显著减少,提示 HPV16E7 siRNA 转染特异且高效地抑制了 CaSki 细胞的 HPV16E7 蛋白表达。

细胞增殖过程由细胞周期来完成,细胞周期调控由信号传导通路来实现,并决定细胞的分裂、分化和凋亡等过程。本实验细胞周期分析结果表明: HPV16E7 干扰 CaSki 细胞 24h、48h、72h 后, $G_0 \sim G_1$ 期细胞百分数较未干扰组分别增加了 8.7%、12.7%、15.6%,进入 S 期的细胞百分数较未干扰组分别减少了 1.3%、4.3%、14.9%。提示通过 HPV16E7 siRNA 转染能将更多的细胞阻滞在 $G_0 \sim G_1$ 期。

提示 HPV 为宫颈癌发生的最主要生物学病因,进行 HPV 疫苗预防是降低宫颈癌发生的重要措施^[7-9]。由于 HPV 至今尚未体外培养成功,且无理想的 HPV 感染的动物模型,使疫苗的研制和开发受到极大限制,但国内目前已研制出一些疫苗并已进入临床试验阶段^[8],少数已进入 III 期临床试验。由于 HPV 型别繁多、变异及地区分布的差异,影响了疫苗的效果。随着分子生物学和基因工程技术的飞速发展,针对 HPV16E7 的 RNA 干扰将成为宫颈癌治疗特异而有效的手段。

参考文献:

- [1] Denny L. The prevention of cervical cancer in developing countries[J]. BJOG, 2005, 112(9):1204-1212.
- [2] Santin AD, Zhan F, Bignotti E, et al. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy[J]. Virology, 2005, 331(2): 269-291.
- [3] Unger ER, Barr E. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(11):2031-2032.
- [4] Dallenbach-Hellweg G, Trunk MJ, von Knebel Doeberitz M. Traditional and new molecular methods for early detection of cervical cancer[J]. Arkh Patol, 2004, 66(5):35-39.
- [5] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, et al. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs[J]. Curr Opin Struct Biol, 2005, 15(3):331-341.
- [6] Veress G, Murvai M, Szarka K, et al. Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(15):1946-1952.
- [7] Billich A. HPV vaccine Medimmune/GlaxoSmithKline[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2003, 4(2):210-213.
- [8] Moniz M, Ling M, Hung CF, et al. HPV DNA vaccines [J]. Front Biosci, 2003, 8:D55-D68.
- [9] Plummer M, Franceschi S. Strategies for HPV prevention [J]. Virus Res, 2002, 89 (2):285-293.