

## 特异性核酶对宫颈癌细胞系CaSKi增殖与凋亡的影响

人乳头瘤病毒(HPV)与多种常见肿瘤密切相关,包括宫颈癌、口腔癌、喉癌等。HPV中最常见的致癌亚型是HPV16型,其中E6、E7基因是致癌基因,在引起细胞恶性转化及恶性表型的维持中起重要作用[1]。我们在前期研究中,设计、克隆了抗HPV16E6 mRNA核酶,并在体外鉴定了其活性[2]。在本研究中,我们将抗HPV16E6核酶转入宫颈癌细胞,研究核酶对肿瘤细胞增殖与凋亡的影响。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

抗HPV16E6核酶由本室设计,基因序列为:TATCATGTACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGTTGTTTG。体外切割实验证明它能特异性地切割HPV16E6基因。pcDNA3为无目的基因的真核表达质粒,pc16HRz为抗HPV16E6核酶的真核表达质粒,由本室构建保存。CaSKi细胞为HPV16阳性的人宫颈癌细胞株,由本室传代培养。

#### 1.2 转染CaSKi细胞

以脂质体法将pc16HRz、pcDNA3分别转染CaSKi细胞,通过G418(800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )抗性筛选,将阳性克隆细胞扩增并保存,分别命名为CaSKi-R、CaSKi-P细胞。以RNA点杂交法检测抗HPV16E6核酶在CaSKi-R、CaSKi-P细胞中的表达。

#### 1.3 Northern blotting杂交

提取细胞的总RNA,以 $^{32}\text{P}$ 标记的E6探针和 $\beta$ -肌动蛋白探针进行Northern blotting杂交,具体方法参见文献[3]。杂交后对各条带进行密度灰度扫描,对比分析其RNA表达量的差异。

#### 1.4 细胞生长曲线的测定

将对数生长期的细胞消化后,加入培养液制成 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液,接种到6孔培养板,每孔2 ml,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵育箱中培养。从次日起,每天取3孔细胞,消化后计数,取3孔细胞的平均数。以细胞培养天数对每瓶内的细胞数绘制细胞生长曲线。

#### 1.5 细胞软琼脂培养

用含10% FBS的DMEM培养液制成0.6%和0.35%的双层琼脂作细胞培养,每个直径60 mm的培养皿中接种 $1.5 \times 10^4$ 个细胞,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵育箱中培养2~3周。每种细胞在每次实验中接种3块平皿,并进行3次实验。计数细胞集落,取其平均值。

#### 1.6 裸鼠体内致瘤性检测

收集对数生长期的细胞,调整浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$ ,取0.1 ml接种于裸鼠皮下。裸鼠由第一军医大学实验动物中心提供,15只裸鼠分3组,分别接种CaSKi、CaSKi-R和CaSKi-P细胞。观察8周,每周测量肿瘤平均直径。

#### 1.7 流式细胞术分析DNA和凋亡率

70%冷乙醇 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 固定1 h以上, RNA酶A  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 处理30 min,碘化丙啶 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 染色30 min,上机检测。

### 1.8 流式细胞术检测蛋白表达

流式细胞术常规法检测3种细胞中HPV16E6、c-myc、Bcl-2、p53、Fas、增殖细胞核抗原(PCNA)、C-erbB-2蛋白的表达。抗HPV16E6、c-myc、Bcl-2、p53、Fas单抗购自武汉博士德公司，FITC标记的二抗购自北京中山公司。

### 1.9 统计学处理

采用One Way ANOVA法，两两比较用SNK法。

## 2 结果

### 2.1 抗HPV16E6核酶在CaSKi-R细胞中的稳定表达

抽提CaSKi-R细胞总RNA，与<sup>32</sup>P标记的抗HPV16E6核酶探针进行点杂交，以体外转录的核酶作为阳性对照，以CaSKi-P细胞RNA作为阴性对照。结果证实抗HPV16E6核酶在CaSKi-R细胞中能稳定表达(图1)。

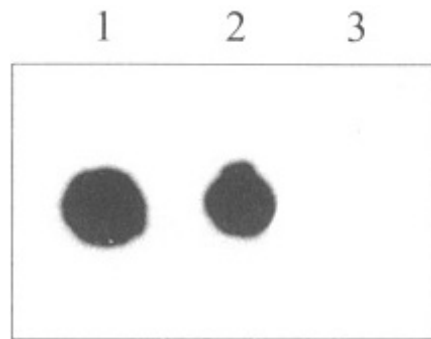


图1 细胞总RNA点杂交图

Fig.1 Dot blot analysis of the total RNA of the 3 cell lines  
1: Positive control; 2: CaSKi-R cells; 3: CaSKi-P cells

### 2.2 Northern blotting结果

如图2所示，在CaSKi、CaSKi-R、CaSKi-P 3种细胞中 $\beta$ -肌动蛋白 RNA表达量相近，灰度扫描值分别为269 448、276 513、266 694，说明总RNA量相当；而CaSKi、CaSKi-R、CaSKi-P中E6杂交带的灰度扫描值分别为333 422、137 204、350 011，说明CaSKi-R中表达较CaSKi-P、CaSKi明显降低( $P < 0.01$ )。

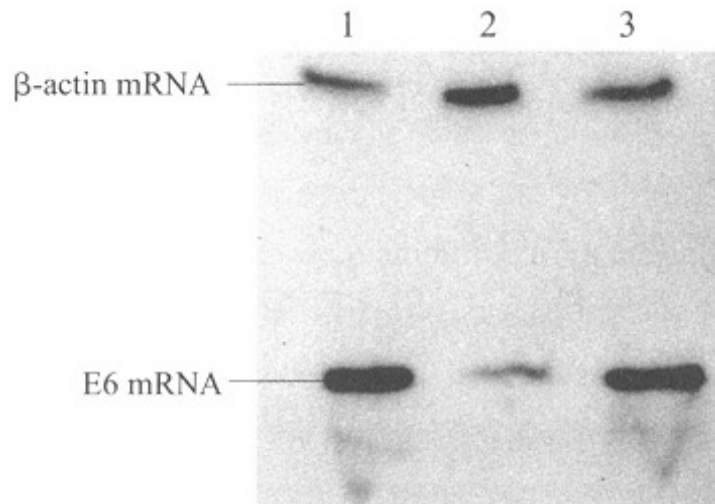


图2 细胞总RNA的Northern blotting

Fig.2 Northern blotting of the total RNA of the 3 cell lines  
1: CaSKi cells; 2: CaSKi-R cells; 3: CaSKi-P cells

### 2.3 细胞生长曲线

由所绘制的生长曲线图(图3)可知, CaSKi-P和CaSKi细胞的生长速率相近, 而CaSKi-R细胞的生长速度明显降低, 表明抗HPV16E6核酶的导入影响了细胞的生长。

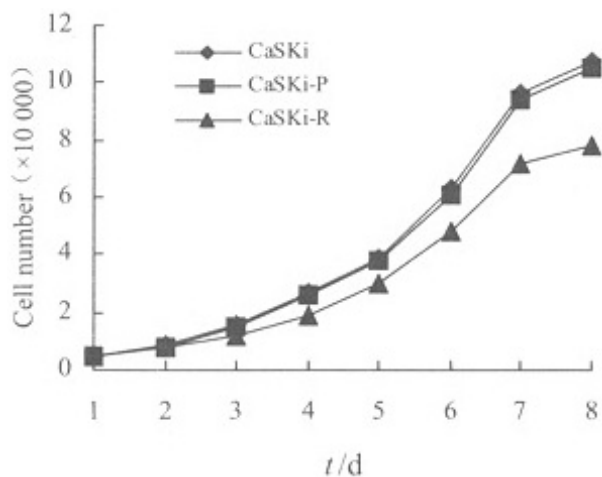


图3 3种宫颈癌细胞的生长曲线图

Fig.3 Growth curves of the 3 cervical cancer cell lines

### 2.4 细胞软琼脂克隆形成率

在0.3%软琼脂培养基内可见细胞克隆形成, CaSKi-R细胞克隆形成率为0.5%, CaSKi-P细胞为1.1%, CaSKi细胞为1.2%。以CaSKi细胞作为对照, 可见CaSKi-R细胞软琼脂克隆形成率显著降低( $P < 0.05$ )。

### 2.5 致瘤性检测

接种CaSKi、CaSKi-P的裸鼠, 约2周时在接种部位能摸到有肿块形成, 第3周时形成肉眼可见的肿块, 第8周末肿块平均直径分别为2.1和1.9 cm。接种 CaSKi-R的裸鼠, 第3周时才能摸到有肿块形成, 第4周时形成肉眼可见的肿块, 最终平均直径为1 cm。统计分析发现, CaSKi和CaSKi-P致瘤性无显著差异, 而CaSKi-R成瘤性显著低于CaSKi。

### 2.6 DNA含量和凋亡率的变化

CaSKi、CaSKi-P和 CaSKi-R的凋亡率分别为5.2%、5.5%和22.2%。CaSKi-R细胞出现凋亡峰, S期、G<sub>2</sub>M期细胞百分率下降。

### 2.7 HPV16E6蛋白的表达

流式细胞术测得CaSKi、CaSKi-P和 CaSKi-R中HPV16E6的平均表达率分别为63.7%、61.5%和13.4%。统计分析发现, CaSKi、CaSKi-P细胞HPV16E6蛋白的表达量无明显差异, 而CaSKi-R细胞HPV16E6蛋白表达显著减弱( $P < 0.05$ )。

### 2.8 流式细胞术检测蛋白表达

与CaSKi细胞相比, CaSKi-R细胞表达c-myc、Bcl-2、PCNA、C-erbB-2蛋白显著减少, 而表达p53显著增高; 两者中Fas 蛋白的表达相近。CaSKi-P细胞中各蛋白的表达与CaSKi细胞无显著差异(图4)。

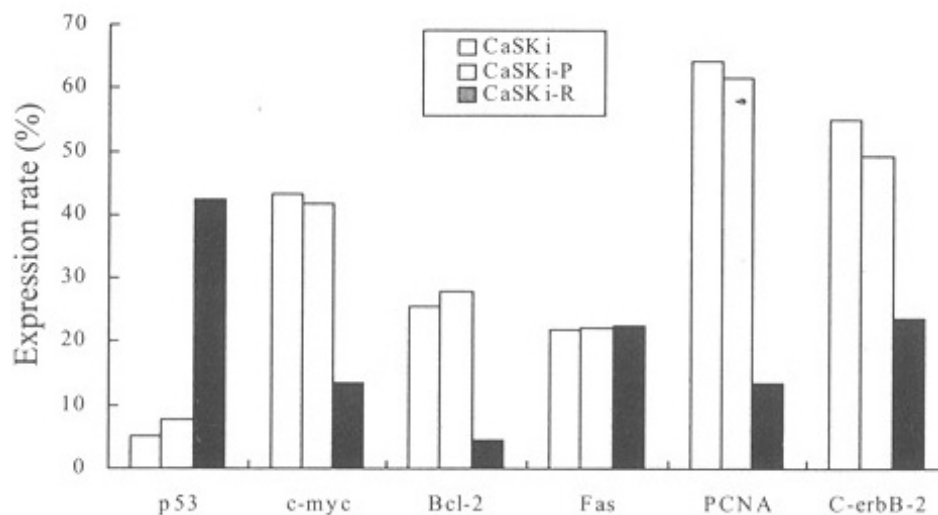


图4 3种细胞中各种蛋白的表达

Fig.4 Expression of different proteins in the 3 cell lines

### 3 讨论

HPV在宫颈癌发生、发展及恶性表型的维持中起重要作用，约90%的宫颈癌组织和宫颈癌细胞系中可以检测到HPV DNA，尤以HPV16最常见。体外实验表明，HPV E6、E7能使人上皮细胞如宫颈上皮、阴茎包皮、乳腺上皮等细胞永生。在宫颈癌细胞株和HPV转化的细胞中，当E6、E7的表达降低时，细胞的表型特征均有向正常细胞表型逆转的趋势，不同宫颈癌细胞系的有丝分裂活性与E6、E7基因的表达水平密切相关[4]。由此可见，HPV早期基因E6、E7的表达在细胞癌变进程和维持细胞恶性表型方面起重要作用。HPVE6蛋白与p53结合，使p53降解，导致细胞无法在G1期进行DNA损伤修复，从而发生癌变[5]。而pRb对DNA合成起负调节作用，HPVE7蛋白能与pRb结合，从而诱发细胞DNA突变[6]。

癌基因在细胞的生长和分化调节中起重要作用，一旦癌基因被激活，将导致肿瘤发生。C-erbB-2是重要的癌基因，编码蛋白具有酪氨酸激酶的活性，能促进细胞生长和分化。研究表明，该蛋白高表达可发生于乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌及内分泌系统肿瘤中。C-erbB-2高表达的病例大多分化程度低，淋巴结转移率高，复发早，预后差[7]。在HPV16阳性的宫颈癌细胞中，HPV16E6蛋白可结合p53蛋白并降解，而野生型p53蛋白能通过p21蛋白抑制PCNA的表达。因此，E6蛋白阻断了野生型p53的表达，引起PCNA表达作用的增强[8]。

细胞凋亡是组织发育和功能维持的必需生理现象，当其出现反常调控时，可促使肿瘤等多种疾病发生[9]。核酶是一类具有催化活性的RNA分子，因其能特异性结合并切割靶RNA，且易于人工设计、合成，因此常用于抗病毒、抗肿瘤的基因治疗研究[10]。体外切割实验证实，抗HPV16E6核酶能特异性切割HPV16E6 mRNA。本研究将HPV16E6核酶导入HPV16阳性的宫颈癌CaSKi细胞株中，发现其能阻碍宫颈癌细胞增殖，诱导凋亡。我们推测，在HPV16诱发肿瘤的过程中，E6基因的高表达引起细胞内一系列基因表达的变化，包括p53表达降低，c-myc、bcl-2、C-erbB-2表达增高，细胞正常凋亡受到抑制，增殖加速，这可能是E6基因的致癌机制之一。由于抗HPV16E6核酶的特异性切割，导致HPV16E6基因表达水平降低，从而使p53的表达增高，c-myc、bcl-2、C-erbB-2的表达降低，细胞的凋亡率增高，恶性程度降低。

综上所述，抗HPV16E6核酶的导入能诱导宫颈癌细胞凋亡，其原因可能在于病毒癌基因E6表达的降低以及由此而引起细胞内一系列基因表达的改变。

参考文献：

[1]Alani RM, Munger K. Human papillomavirus and associated malignancies[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(1): 330-7.

[2]郑燕芳, 张积仁, 屈良鹤, 等. 抗HPV16E6核酶的原核表达与体外活性研究[J]. 中华微生物与免疫学杂志, 2000, 20(1): 79-82.

Zheng YF, Zhang JR, Qu LH, et al. The study of prokaryotic expression and character of anti-HPV16E6-ribozyme in vitro[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2000, 20(1): 79-82.

[3]Ausubel FM, Kingston RE, Seidman JG, 等. 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 120-45.

[4]Watanabe S, Kanda T, Yoshiike K. Growth dependence of human papillomavirus 16 DNA positive cervical cancer cell lines and human papillomavirus 16 transformed human and rat cells on the viral oncoproteins[J]. Jpn J Cancer Res, 1993, 84(10): 1043-9.

[5]Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals[J]. J Virol, 1999, 73(7): 5887-92.

[6]Wang J, Li J, Huang H, et al. Detection of the E7 transform gene of human papilloma virus type 16 in human oral squamous cell carcinoma[J]. Chin J Dent Res, 1998, 1(3): 35-41.

[7]Ignatoski KM, Lapointe AJ, Radany EH, et al. ErbB-2 overexpression in human mammary epithelial cells confers growth factor independence[J]. Endocrinology, 1999, 140(8): 3615-22.

[8]Liang XH, Volkmann M, Klein R, et al. Co-localization of the tumor-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical carcinoma cell lines [J]. Oncogene, 1993, 8(10): 2645-55.

[9]Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2[J]. Science, 1999, 285(5428): 736-9.

[10]Chen Z, Kamath P, Zhang S, et al. Effectiveness of three ribozymes for cleavage of an RNA transcript from human papillomavirus type 18[J]. Cancer Gene Ther, 1995, 2(4): 263-71.

#### 参考文献:

[1]Alani RM, Munger K. Human papillomavirus and associated malignancies[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(1): 330-7.

[2]郑燕芳, 张积仁, 屈良鹤, 等. 抗HPV16E6核酶的原核表达与体外活性研究[J]. 中华微生物与免疫学杂志, 2000, 20(1): 79-82.

Zheng YF, Zhang JR, Qu LH, et al. The study of prokaryotic expression and character of anti-HPV16E6-ribozyme in vitro[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2000, 20(1): 79-82.

[3]Ausubel FM, Kingston RE, Seidman JG, 等. 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 120-45.

[4]Watanabe S, Kanda T, Yoshiike K. Growth dependence of human papillomavirus 16 DNA positive cervical cancer cell lines and human papillomavirus 16 transformed human and rat cells on the viral oncoproteins[J]. Jpn J Cancer Res, 1993, 84(10): 1043-9.

[5]Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals[J]. J Virol, 1999, 73(7): 5887-92.

[6]Wang J, Li J, Huang H, et al. Detection of the E7 transform gene of human papilloma virus type 16 in human oral squamous cell carcinoma[J]. Chin J Dent Res, 1998, 1(3): 35-41.

[7]Ignatoski KM, Lapointe AJ, Radany EH, et al. ErbB-2 overexpression in human mammary

epithelial cells confers growth factor independence[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(8): 3615-22.

[8]Liang XH, Volkmann M, Klein R, et al. Co-localization of the tumor-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical carcinoma cell lines [J]. *Oncogene*, 1993, 8(10): 2645-55.

[9]Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2[J]. *Science*, 1999, 285(5428): 736-9.

[10]Chen Z, Kamath P, Zhang S, et al. Effectiveness of three ribozymes for cleavage of an RNA transcript from human papillomavirus type 18[J]. *Cancer Gene Ther*, 1995, 2(4): 263-71.

---

[回结果列表](#)