

抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌 CaSKi 细胞化疗的影响

饶智国¹, 张积仁¹, 郑燕芳¹, 周惠², 屈良鹄² (¹第一军医大学珠江医院肿瘤中心, 广东 广州 510282; ²中山大学生命科学学院真核生物学实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 目的 研究抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌 CaSKi 细胞化疗敏感性的影响。方法 以脂质体法将抗 HPV16E6-Ribozyme、空载体质粒分别导入 CaSKi 细胞, 命名为 CaSKi-R、CaSKi-P 细胞。点杂交检测核酶在细胞中的表达, Northern 杂交检测三种细胞中 E6 基因的表达。用克隆形成试验检测 3 种细胞对化疗的敏感性, Annexine/PI 双标法检测细胞凋亡率。结果 点杂交证实核酶能在 CaSKi-R 细胞中稳定表达, Northern 杂交证实 CaSKi-R 中表达 E6 较 CaSKi-P、CaSKi 明显降低。CaSKi-R 细胞的生长速率较 CaSKi-P、CaSKi 明显减慢, 泰素作用后相对克隆形成率和凋亡率在 3 种细胞间亦无差异 ($P>0.05$); 顺铂作用后 CaSKi-R 细胞的相对克隆形成率较 CaSKi-P、CaSKi 明显下降 ($P<0.01$), 而凋亡率明显增加 ($P<0.01$)。结论 转染抗 HPV16E6-ribozyme 的 CaSKi-R 细胞出现一定程度的生长抑制, 且对顺铂的敏感性增加, 而对泰素的敏感性没有发生改变。

关键词: 核酶; 人乳头瘤病毒; 化疗; 药物敏感性; 子宫颈肿瘤

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)04-0316-04

Effect of anti-HPV16 E6-ribozyme on the sensitivity of cervical carcinoma cell line to chemotherapy

RAO Zhi-guo¹, ZHANG Ji-ren¹, ZHENG Yan-fang¹, ZHOU Hui², QU Liang-gu²

¹Oncology Center, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Laboratory of Eukaryotic Biology, School of Life Sciences, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To study the role of anti-HPV16 E6-ribozyme in modulating the sensitivity of cervical carcinoma cell line to chemotherapy. **Methods** By way of lipofectin transfection, anti-HPV16E6-ribozyme antibody and empty eukaryotic expression plasmids were respectively transfected into CaSKi cells that were designated as CaSKi-R and CaSKi-P cells accordingly. Ribozyme expression in the transfected cells was subsequently observed with RNA dot blot, and the amount of E6 mRNA expression detected by Northern blotting. Cell count was performed for determining the growth rate of the non-transfected and transfected CaSKi cells and colony formation test was employed to examine the sensitivity of the cells to chemotherapy. PI/Annexin V staining was conducted to determine the apoptosis rates of each cell line in response to chemotherapy. **Results** As shown by dot blot analysis, stable expression of anti-HPV16E6-ribozyme was achieved in CaSKi-R cells, in which lower E6 mRNA expression level was observed by means of Northern blotting in comparison with those in CaSKi-P and CaSKi cells. Significant slow-down of the growth rate occurred in CaSKi-R cells as compared with the growth rate of the other 2 cell lines, but no differences in relative cloning efficiency and apoptosis rates of the 3 cell lines were observed in response to taxol treatment ($P>0.05$), while cis-platinum treatment produced comparatively decreased relative cloning efficiency and increased apoptosis rate in CaSKi-R ($P<0.01$). **Conclusion** Transfection by anti-HPVE6-ribozyme may inhibit the growth of CaSKi cells and increase their sensitivity to cis-platinum but not to taxol.

Key words: ribozyme; human papillomavirus; chemotherapy; drug sensitivity; cervical cancer

宫颈癌的死亡率在妇女癌症死亡率中居世界第二位, 每年新诊断的宫颈癌患者估计有 50 万人, 20 余种人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 已被证实与人类的宫颈肿瘤相关联, 其中最常见致癌亚型是 HPV16 型, E6、E7 基因是致癌基因^[1]。宫颈癌的治疗以手术治疗和放疗为主, 而化疗作为一种辅助治疗, 近年来逐渐受到重视^[2]。为此, 我们将抗 HPV16E6

核酶导入宫颈癌 CaSKi 细胞, 探讨其对宫颈癌 CaSKi 细胞生长及对化疗药物泰素 (Taxol)、顺铂 (DDP) 敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源

抗 HPV16E6 核酶由本室设计、克隆并在体外鉴定了其活性。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。将其转化 JM105 受体菌, 大量制备并纯化。CaSKi 细胞为 HPV16 阳性的人宫颈癌细胞

收稿日期: 2001-12-11

基金项目: 广东省自然科学基金 (96058)

作者简介: 饶智国 (1965-), 男, 湖北咸宁人, 1995 年毕业于同济医科大学, 在读博士研究生, 主治医师, 电话: 020-85143202

株,本室传代培养。泰素为美国百时施贵宝公司产品,顺铂(DDP)(生产批号:0005022)为齐鲁制药厂产品。脂质体 lipfectin 购自 Gibco 公司。

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(400~1 000 $\mu\text{g/ml}$)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

提取细胞的总 RNA,以 ^{32}P 标记的 E6 探针和 β -肌动蛋白探针(探针均在上海生化所合成)进行 Northern blotting,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

三种细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基制成 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液,接种到 24 孔培养板,每孔 1 ml,于 37°C 5% CO_2 孵箱中培养。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孔内的细胞数绘制细胞生长曲线。

1.5 克隆形成试验

将对数生长期的 CaSKi-R、CaSKi-P 和 CaSKi 细胞用 0.25%的胰酶消化,细胞悬液反复吹打,使细胞充分分散,单个细胞百分率应在 95%以上;细胞立即接种于含 10%胎牛血清预温的 DMEM 培养基中,十字形轻轻晃动培养皿,使细胞分散均匀;在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后加入一定浓度的泰素或顺铂培养 24 h,再换为不含泰素和顺铂的 10%胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 7~14 d,中间根据培养液 pH 值变化,适时更换新鲜培养液,终止培养,弃去培养液,用 PBS 小心浸洗 2 次,空气干燥;甲醇固定 15 min,弃甲醇后空气干燥;用 Giemsa 应用液染色 15 min,流水缓慢洗去染液,空气干燥;显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数,然后按下式计算克隆形成率:

克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$

相对克隆形成率(%)=(给药组克隆形成率/对照组克隆形成率) $\times 100\%$ 。

1.6 Annexine/PI 双标法检测细胞凋亡率

收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$,采用 Annexine/PI 染色,上机检测细胞凋亡率。

1.7 流式细胞仪分析

流式细胞仪 FACScan(美国 BECKMAN COULTER 公司)的发射光为氩离子激光器,发射波长为

488 nm。每管测定 10 000 个细胞,设同型对照,Lysis II 软件分析处理数据,记录阳性细胞百分数。

1.8 统计学分析

统计用 SPSS8.0 软件完成。各数据以方差分析。

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 ^{32}P 标记的抗 HPV16E6-Ribozyme 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 抗 HPV16E6 核酶的点杂交分析

Fig.1 Dot blot analysis of anti-HPV16E6 ribozyme expression

1: Positive control; 2: CaSKi-R cell; 3: CaSKi-P cell

2.2 三种细胞 HPV16E6 RNA 表达水平变化

图 2 所示,在 CaSKi、CaSKi-R、CaSKi-P 三种细胞中 β -肌动蛋白 RNA 表达量相近,密度值分别为 269 448、276 513、266 694,说明总 RNA 量相当。而 CaSKi、CaSKi-R、CaSKi-P 中 E6 杂交带的密度值分别为 333 422、137 204、350 011,CaSKi-R 中表达较 CaSKi-P、CaSKi 明显降低。

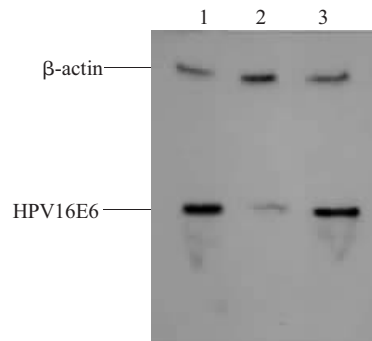


图 2 三种细胞 HPV16E6 Northern 杂交图

Fig.2 Northern blotting of HPV16E6 expression in 3 cervical cancer cells

1: CaSKi cell; 2: CaSKi-R cell; 3: CaSKi-P cell

2.3 三种细胞生长曲线的测定

转染抗 HPV16E6 核酶的 CaSKi-R 生长速度较 CaSKi-P、CaSKi 明显变慢,抑制率为 24.2%,而三种细胞形态无明显差异(图 3)。

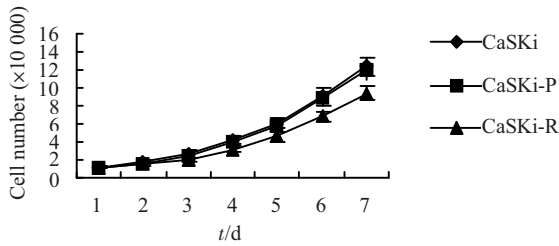


图 3 三种宫颈癌细胞的生长曲线

Fig.3 Growth curve of 3 cervical cancer cell lines

2.4 三种细胞对化疗敏感性的检测

如表 1,2 所示,CaSKi-R 细胞对泰素的敏感性与 CaSKi-P、CaSKi 细胞比较没有明显的变化,7 nmol/L 和 70 nmol/L 作用后的相对克隆形成率在三种细胞间没有明显差异($P>0.05$);CaSKi-R 细胞对顺铂的敏

感性较 CaSKi-P、CaSKi 细胞明显增加,20 nmol/L 和 200 nmol/L 作用后的相对克隆形成率与 CaSKi-P、CaSKi 细胞比较明显减少 ($P<0.05$), 而 CaSKi-P 和 CaSKi 细胞比较,相对克隆形成率没有差异($P>0.05$)。2.5 三种细胞经化疗药物泰素、顺铂作用 24 h 后凋亡率的变化

如表 3,4 所示,化疗药物泰素和顺铂作用前 CaSKi-R 细胞的凋亡率较 CaSKi-P、CaSKi 细胞明显增加 ($P<0.01$), 而 CaSKi-P 和 CaSKi 细胞的凋亡率没有明显差异($P>0.05$);泰素作用后 CaSKi-R、CaSKi-P 和 CaSKi 细胞的凋亡率比较没有明显差异($P>0.05$), 而顺铂作用后 CaSKi-R 的凋亡率较 CaSKi-P 和 CaSKi 细胞的凋亡率明显增加($P<0.01$)。

表 1 不同浓度的泰素作用三种细胞后的相对克隆形成率 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tab.1 Relative cloning efficiency of 3 cervical cells treated with taxol ($n=3, Mean\pm SD$)

	7 nmol/L			70 nmol/L		
	CaSKi	CaSKi-P	CaSKi-R	CaSKi	CaSKi-P	CaSKi-R
Relative cloning efficiency (%)	49.3±5.3	47.2±5.5*	49.7±4.4*	7.5±1.8	8.1±1.6*	7.7±2.0*

* $P>0.05$ vs CaSKi

表 2 不同浓度的顺铂作用三种细胞后的相对克隆形成率 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tab.2 Relative cloning efficiency of 3 cervical cells treated with DDP ($n=3, Mean\pm SD$)

	20 nmol/L			200 nmol/L		
	CaSKi	CaSKi-P	CaSKi-R	CaSKi	CaSKi-P	CaSKi-R
Relative cloning efficiency (%)	60.3±3.7	63.2±3.8**	47.7±5.4*	12.5±1.8	12.3±1.7**	8.4±1.4*

* $P<0.05$ vs CaSKi, ** $P>0.05$ vs CaSKi

表 3 泰素作用三种细胞后的凋亡率 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tab.3 Apoptosis rates of 3 cervical cells treated with taxol ($n=3, Mean\pm SD$)

	0 μ mol/L			8 μ mol/L		
	CaSKi	CaSKi-P	CaSKi-R	CaSKi	CaSKi-P	CaSKi-R
Relative cloning efficiency (%)	4.5±1.4	4.7±1.0**	12.8±2.3*	21.6±2.9	23.4±4.6**	27.4±5.4**

* $P<0.01$ vs CaSKi, ** $P>0.05$ vs CaSKi

表 4 顺铂作用三种细胞后的凋亡率 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tab.4 Apoptosis rates of 3 cervical cells treated with DDP ($n=3, Mean\pm SD$)

Cells	0 μ mol			20 μ mol		
	CaSKi	CaSKi-P	CaSKi-R	CaSKi	CaSKi-P	CaSKi-R
Relative cloning efficiency (%)	4.5±1.4	4.7±1.0**	12.8±2.3*	18.9±3.5	19.7±4.8**	40.4±4.5*

* $P<0.01$ vs CaSKi, ** $P>0.05$ vs CaSKi

3 讨论

HPV 在宫颈癌的发生、发展及恶性表型的维持中起着重要的作用,50%~80%的宫颈癌与 HPV16 相关,E6、E7 是其癌基因。核酶是一类具有酶活性 RNA 分子,可以序列特异地与靶 RNA 分子配对,对底物进行切割,降解 mRNA,使其失去生物学功能。与反义 RNA 相比,核酶不仅具有封闭 mRNA 的功能,而且具有切割 mRNA 的功能。

我们前期的研究已证实抗 HPV16E6 核酶在体外能有效切割 HPV16E6 基因^[4]。本研究通过脂质体法将抗 HPV16E6-核酶、空载体质粒分别导入 CaSKi 细胞,通过点杂交检测证实核酶在细胞中能够稳定表达,Northern 杂交证实转染核酶的 CaSKi-R 细胞 E6 基因的表达明显减少。研究还发现,转染了抗 HPV16E6 核酶 CaSKi-R 细胞的生长速度较 CaSKi-P 和 CaSKi 细胞明显减缓,细胞的生长抑制率为 24.2%。用泰素

作用后 CaSKi-R 细胞的相对克隆形成率与 CaSKi-P 和 CaSKi 细胞比较无明显差异 ($P>0.05$), 而顺铂作用后 CaSKi-R 细胞的相对克隆形成率较 CaSKi-P 和 CaSKi 细胞明显减少 ($P<0.01$); 泰素作用后 CaSKi-R 细胞的凋亡率与 CaSKi-P 和 CaSKi 细胞比较无明显差异 ($P>0.05$), 顺铂作用后 CaSKi-R 细胞的凋亡率明显增加 ($P<0.01$), 结果证实 CaSKi-R 细胞对化疗药物顺铂的敏感性明显增强, 而对泰素的敏感性无明显增强。

抗 HPV16E6 核酶导入 CaSKi 细胞对不同机制的化疗药物产生不同效果的机制尚不清楚。我们知道, HPV E6 蛋白通过与 p53 蛋白结合经泛素途径使其降解, 从而使 p53 不能发挥其正常的抑癌作用^[5]。抗 HPV16E6 核酶导入 CaSKi 细胞能有效切割 HPV16E6 RNA, 使 CaSKi-R 细胞 E6 基因的表达明显减少, 从而使 CaSKi-R 细胞的 p53 蛋白降解减少, 细胞内的 p53 蛋白含量增加, 发挥抑制细胞生长的作用, 这可能与 CaSKi-R 细胞生长速度明显减缓有关; 而国内外有大量研究证实, p53 功能的缺失增加各种肿瘤细胞对化疗药物的耐受性, 而将野生型 p53 转染至含有突变型 p53 的癌细胞株, 可明显增强对各种化疗药物的敏感性^[6,7]。由此推测, 本研究 CaSKi-R 细胞对顺铂的敏感性明显增加可能与 p53 蛋白增加有关, 而没有增加泰素的敏感性没有增强说明泰素对 CaSKi 的细胞毒作用与 p53 蛋白无关, 它导致的细胞毒作用是非 p53 依赖性的, 与 Zhang^[8]和 Das^[9]的研究一致。

综上所述, 抗 HPV16E6-核酶的导入能延缓宫颈癌 CaSKi 细胞的生长, 可增强 CaSKi 细胞对某些化疗药物的敏感性, 为临床上开展基因治疗与化疗相结

合提供了一定的理论依据, 但增加化疗药物的敏感性的具体机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Segawa T, Sasagawa T, Yamazaki H, *et al.* Fragile histidine triad transcription abnormalities and human papillomavirus E6-E7 mRNA expression in the development of cervical carcinoma [J]. *Cancer*, 1999, 85(9): 2001-10.
- [2] Umesaki N, Izumi R, Fushiki H, *et al.* Cervical adenocarcinoma, a novel combination chemotherapy with mitomycin C, etoposide, and cisplatin for advanced or recurrent disease [J]. *Gynecol Oncol*, 1999, 75(1): 142-4.
- [3] Ausubel FM, Kingston RE, Seidman JG, 等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 120-45.
- [4] 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 anti-HPV16E6 ribozyme, sexpression and cleavage *in vitro* [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2000, 20(1): 79-82.
- [5] Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(12): 2008-18.
- [6] Nevins JR. A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins [J]. *Science*, 1992, 258(5081): 424-9.
- [7] Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, *et al.* p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer drugs [J]. *Cell*, 1993, 74(7): 957-67.
- [8] Zhang Z, Liu Q, Lantry LE, *et al.* A germ-line p53 mutation accelerates pulmonary tumorigenesis: p53-independent efficacy of chemopreventive agents green tea or dexamethasone/myo-inositol and chemotherapeutic agents taxol or adriamycin [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 901-7.
- [9] Das GC, Holiday D, Gallardo R, *et al.* Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic conditions [J]. *Cancer Lett*, 2001, 165(2): 147-53.

新型单纯疱疹病毒防止癌细胞扩散

目前, 用细菌或病毒来控制肿瘤扩散的生物治疗药剂已在细胞或动物模型中得到检验, 但大多数药物还处于临床前的检测阶段。Nakamura 等描述了单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 的第二代衍生物, 他们认为这种新病毒有望扫清这一障碍。

第二代 HSV 病毒——Myb34.5 与第一代病毒一样, 缺失编码核糖核苷酸还原酶的病毒基因, 能够在肝脏肿瘤细胞中优先复制, 癌细胞分裂迅速。Myb34.5 并含有一个经过改造的 g134.5 基因, 该基因编码的产物能够使病毒避过宿主细胞的防御系统, 否则防御系统就会关闭感染细胞中的蛋白质合成。在 Myb34.5 中, g134.5 的表达受 Myb 启动子的控制, 而 Myb 启动子在分裂期的细胞中是有活性的, 这就使得病毒在宿主健康组织中的增殖极度受限。研究证明, 将 Myb34.5 注入到携带有大量转移肝脏癌细胞的体内能够大大减低小鼠的病情, 延长它们的存活时间。

研究人员还发现, 即使在注入 Myb34.5 的剂量比正常野生型 HSV-1 高 10 倍的情况下, Myb34.5 也不会杀死或麻痹小鼠。但无论是小鼠还是其它任何动物, 现在都没有完全合适的 HSV-1 感染模型, 因此, 病毒在人体中仍然有具毒性的可能。