

# 特异性核酶对宫颈癌细胞系 CaSKi 增殖与凋亡的影响

郑燕芳 袁智国 袁积仁 (第一军医大学珠江医院肿瘤中心 广东 广州 510282)

**摘要** 目的 研究特异性抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌细胞增殖与凋亡的影响。方法 设计特异性切割 HPV16E6 基因的核酶,构建抗 HPV16E6 核酶的真核表达质粒。以脂质体法将抗 HPV16E6 核酶空载体质粒分别导入 CaSKi 细胞,命名为 CaSKi-R 和 CaSKi-P 细胞。点杂交检测核酶在细胞中的表达。Northern blotting 检测 CaSKi-R 和 CaSKi-P 3 种细胞中 E6 基因的表达。测定 3 种细胞的生长曲线和软琼脂克隆形成率,并以皮下接种法检测细胞在裸鼠体内的成瘤能力。流式细胞仪检测 3 种细胞的凋亡率,并测定 c-myc、bcl-2、p53、PCNA 和 C-erbB-2 等基因的表达。结果 点杂交证实该核酶能在 CaSKi-R 细胞中稳定表达。Northern blotting 证实 CaSKi-R 中表达 E6 较 CaSKi-P 和 CaSKi 明显降低。与 CaSKi 细胞相比, CaSKi-R 细胞生长速度,软琼脂克隆形成率明显降低。在裸鼠体内的致癌能力下降。凋亡率明显增高。出现凋亡峰。晚期 M 期细胞百分率下降。而 CaSKi-P 细胞无此改变。CaSKi-R 细胞表达 HPV16E6、c-myc、bcl-2、PCNA 和 C-erbB-2 蛋白明显减少。而 p53 表达明显增高。CaSKi 和 CaSKi-R 细胞中 Fas 蛋白的表达相近。CaSKi-P 细胞中各基因的表达与 CaSKi 细胞无显著差异。结论 抗 HPV16E6 核酶的导入能阻碍宫颈癌细胞增殖,诱导其凋亡。其原因可能在于病毒癌基因 E6 表达的降低,以及由此而引起的细胞内一系列基因表达的改变。

**关键词** 核糖核酸酶类;乳头状瘤病毒;宫颈肿瘤;吞噬作用;细胞分裂

中图分类号 R329.25;R341;R737.33 文献标识码 A 文章编号 000-2588(2002)06-0496-03

## Effects of anti-HPV16 E6-ribozyme on the proliferation and apoptosis of human cervical cancer cell line CaSKi

ZHENGYan-fang, RAOZhi-guo, ZHANGJi-ren

OncologyCenter, ZhujiangHospital, FirstMilitaryMedicalUniversity, Guangzhou510282, China

**Abstract:** Objective To study the characterization of anti-HPV16E6-ribozyme transfected into cultured human cervical cancer cell line, and to investigate the effect of ribozyme on the proliferation and apoptosis of the cells. Methods By way of lipofectin transfection, anti-HPV16E6-ribozyme, a ribozyme designed to specifically cleave the HPV16E6 gene, and empty vector expression plasmids were respectively transfected into CaSKi cells which were subsequently designated as CaSKi-R and CaSKi-P accordingly. The expression of ribozyme in the transfected cells was observed by RNA dot blot analysis, and E6 mRNA expression was detected by Northern blotting in the 3 kinds of cells whose growth curves and clone-forming ability on soft agar were studied, with their tumorigenicity observed by percutaneous inoculation of the cells in nude mice. Flow cytometry was employed to assess the apoptosis rates and the expression of the genes including c-myc, bcl-2, p53, and fas etc. Results Stable expression of anti-HPV16E6-ribozyme was observed in CaSKi-R cells that had less E6 mRNA expression than CaSKi had as shown by Northern blotting. When compared with those of CaSKi cells, the growth rate and clone-forming ability on soft agar of CaSKi-R were reduced, while those of CaSKi-P showed no significant changes. The tumorigenicity of CaSKi-R in nude mice was also comparatively decreased, with markedly elevated apoptosis rate. Anti-HPV16E6-ribozyme reduced the expression of E6, c-myc, bcl-2, PCNA and C-erbB2 genes but increased p53 expression in CaSKi-R cells, which, however, did not happen in CaSKi-P cells. The expression of Fas underwent no significant changes in response to the transfection. Conclusion Anti-HPV16E6-ribozyme inhibits proliferation and induces apoptosis in CaSKi cells, possibly due to the decrease of E6 gene expression that triggers a series of changes in the gene expressions of the cells.

**Key words:** ribonucleases; papillomavirus, human; cervix neoplasms; apoptosis; cell division

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 和 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。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。在本研究中,我们将抗 HPV16E6 核酶转染入宫颈癌细胞,研究核酶对肿瘤细胞增殖与凋亡的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

抗 HPV16E6 核酶由本室设计,基因序列为: 5'-TATCATGTACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGTTGTTTG-3'。体外切割实验证明它能特异性地切割

收稿日期 2001-10-25

基金项目 广东省自然科学基金 6058 号

作者简介 郑燕芳, 1974 年,女,江西上饶人,2000 年毕业于第一军医大学,主治医师,副主任医师。电话: 020-85143199, e-mail: zyfcn@yahoo.com

HPV16E6基因通pcDNA3 为无目的基因的真核表达质粒袁c16HRz 为抗 HPV16E6 核酶的真核表达质粒袁由本室构建保存遥CaSKi 细胞为 HPV16 阳性的人宫颈癌细胞株袁由本室传代培养遥

1.2 转染 CaSKi 细胞

以脂质体法将 pc16HRz尧cDNA3 分别转染 CaSKi 细胞袁通过 G418 渊00 滋/ml冤抗性筛选袁将阳性克隆细胞扩增并保存袁分别命名为 CaSKi-R尧CaSKi-P 细胞遥以 RNA 点杂交法检测抗 HPV16E6 核酶在 CaSKi-R尧CaSKi-P 细胞中的表达遥

1.3 Northernblotting 杂交

提取细胞的总 RNA袁以 <sup>32</sup>P 标记的 E6 探针和 茁肌动蛋白探针进行 Northernblotting 杂交袁具体方法参见文献咱咱杂交后对各条带进行密度灰度扫描袁对比分析其 RNA 表达量的差异遥

1.4 细胞生长曲线的测定

将对数生长期的细胞消化后袁加入培养液制成 1伊0<sup>4</sup>/ml 的细胞悬液袁接种到 6 孔培养板袁每孔 2ml袁于 37 益尧% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养遥从次日起袁每天取 3 孔细胞袁消化后计数袁取 3 孔细胞的平均数袁以细胞培养天数对每瓶内的细胞数绘制细胞生长曲线遥

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袁每个直径 60mm 的培养皿中接种 1.5伊0<sup>4</sup> 个细胞,于 37 益尧% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 2~3 周遥每种细胞在每次实验中接种 3 块平皿袁并进行 3 次实验遥计数细胞集落袁取其平均值遥

1.6 裸鼠体内致瘤性检测

收集对数生长期的细胞袁调整浓度至 1伊0<sup>7</sup>/ml袁取 0.1ml 接种于裸鼠皮下遥裸鼠由第一军医大学实验动物中心提供袁5 只裸鼠分 3 组袁分别接种 CaSKi尧CaSKi-R 和 CaSKi-P 细胞遥观察 8 周袁每周测量肿瘤平均直径遥

1.7 流式细胞术分析 DNA 和凋亡率

70%冷乙醇 40 益固定 1 h 以上袁DNA 酶 A37 益处理 30min袁碘化丙啶 4 益染色 30min袁上机检测遥

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 尧c-myc 尧cl-2 尧p53 尧as 尧增殖细胞核抗原 渊CNA冤 尧C-erbB-2 蛋白的表达遥抗 HPV16E6 尧-myc 尧cl-2 尧p53 尧as 单抗购自武汉博士德公司袁ITC 标记的二抗购自北京中山公司遥

1.9 统计学处理

采用 OneWayANOVA 法袁两两比较用 SNK 法遥

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袁与 <sup>32</sup>P 标记的抗 HPV16E6 核酶探针进行点杂交袁以体外转录的核酶作为阳性对照袁以 CaSKi-P 细胞 RNA 作为阴性对照遥结果证实抗 HPV16E6 核酶在 CaSKi-R 细胞中能稳定表达渊图 1冤遥

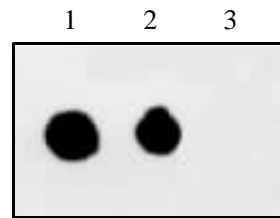


图 1 细胞总 RNA 点杂交图 Fig.1 Dot blot analysis of the total RNA of the 3 cell lines 1:Positivecontrol;2:CaSKi-Rcells; 3:CaSKi-Pcells

2.2 Northernblotting 结果

如图 2 所示袁在 CaSKi尧CaSKi-R尧CaSKi-P 3 种细胞中 茁肌动蛋白 RNA 表达量相近袁灰度扫描值分别为 269 448尧76 513尧66 694袁说明总 RNA 量相当袁而 CaSKi 尧CaSKi-R尧CaSKi-P 中 E6 杂交带的灰度扫描值分别为 333422尧37204尧50011袁说明 CaSKi-R 中表达较 CaSKi-P尧CaSKi 明显降低渊<0.01冤遥

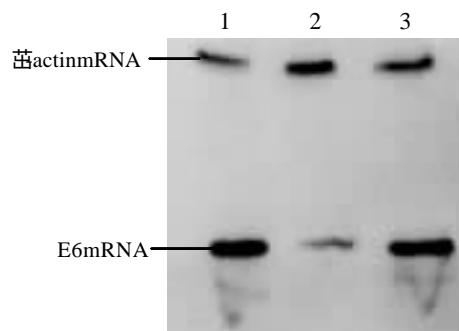


图 2 细胞总 RNA 的 Northernblotting Fig.2 Northern blotting of the total RNA of the 3 cell lines 1:CaSKicells;2:CaSKi-Rcells;3:CaSKi-Pcells

2.3 细胞生长曲线

由所绘制的生长曲线图渊图 3冤可知袁CaSKi-P 和 CaSKi 细胞的生长速率相近袁而 CaSKi-R 细胞的生长速度明显降低袁表明抗 HPV16E6 核酶的导入影响了细胞的生长遥

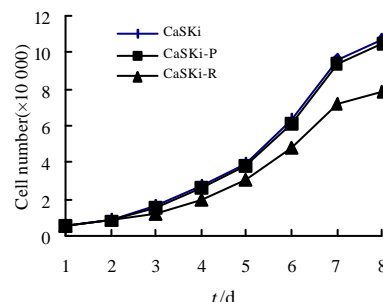


图 3 3 种宫颈癌细胞的生长曲线图 Fig.3 Growth curves of the 3 cervical cancer cell lines

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表 CaSKi-R 细胞克隆形成率为 0.5% 袁CaSKi-P 细胞为 1.1%袁CaSKi 细胞为 1.2%遥以 CaSKi 细胞作为对照袁可见 CaSKi-R 细胞软琼脂克隆形成率显著降低渊<0.05冤

2.5 致瘤性检测

接种 CaSKi尧CaSKi-P 的裸鼠袁约 2 周时在接种部位能摸到有肿块形成袁第 3 周时形成肉眼可见的肿块袁第 8 周末肿块平均直径分别为 2.1 和 1.9cm遥接种 CaSKi-R 的裸鼠袁第 3 周时才能摸到有肿块形成袁第 4 周时形成肉眼可见的肿块袁最终平均直径为 1cm遥统计分析发现袁CaSKi 和 CaSKi-P 致瘤性无显著差异袁而 CaSKi-R 成瘤性显著低于 CaSKi遥

2.6 DNA 含量和凋亡率的变化

CaSKi尧CaSKi-P 和 CaSKi-R 的凋亡率分别为 5.2% 尧5.5%和 22.2%遥CaSKi-R 细胞出现凋亡峰袁期尧M 期细胞百分率下降遥

2.7 HPV16E6 蛋白的表达

流式细胞术测得 CaSKi尧CaSKi-P 和 CaSKi-R 中 HPV16E6 的平均表达率分别为 63.7% 尧1.5%和13.4%遥统计分析发现袁CaSKi尧CaSKi-P 细胞 HPV16E6 蛋白的表达量无明显差异袁而 CaSKi-R 细胞 HPV16E6 蛋白表达显著减弱渊<0.05冤

2.8 流式细胞术检测蛋白表达

与 CaSKi 细胞相比袁CaSKi-R 细胞表达 c-myc尧Bcl-2 尧PCNA 尧-erbB-2 蛋白显著减少 袁而表达 p53 显著增高曰两者中 Fas 蛋白的表达相近遥CaSKi-P 细胞中各蛋白的表达与 CaSKi 细胞无显著差异渊图 4冤

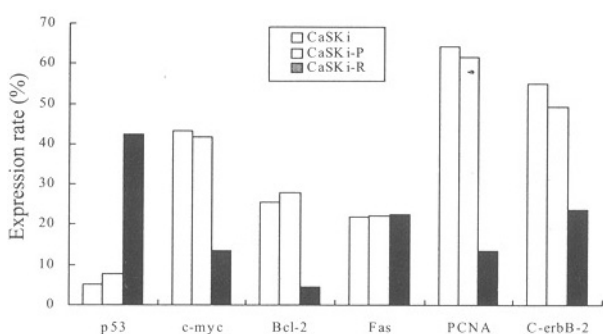


图 4 3 种细胞中各种蛋白的表达

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

3 讨论

HPV 在宫颈癌发生尧发展及恶性表型的维持中起重要作用袁约 90%的宫颈癌组织和宫颈癌细胞系中可以检测到 HPV DNA 袁以 HPV16 最常见遥体外实验表明袁IPVE6 尧7 能使人上皮细胞如宫颈上皮尧阴茎包皮尧腺上皮等细胞永生遥在宫颈癌细胞株

和 HPV 转化的细胞中袁当 E6 尧7 的表达降低时袁细胞的表型特征均有向正常细胞表型逆转的趋势袁不同宫颈癌细胞系的有丝分裂活性与 E6 尧7 基因的表达水平密切相关 遥由此可见袁IPV 早期基因 E6 尧7 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遥HPVE6 蛋白与 p53 结合袁使 p53 降解袁导致细胞无法在 G<sub>1</sub> 期进行 DNA 损伤修复袁从而发生癌变 遥而 pRb 对 DNA 合成起负调节作用袁IPVE7 蛋白能与 pRb 结合袁从而诱发细胞 DNA 突变 遥

癌基因在细胞的生长和分化调节中起重要作用袁一旦癌基因被激活袁将导致肿瘤发生遥C-erbB-2 是重要的癌基因袁编码蛋白具有酪氨酸激酶的活性袁能促进细胞生长和分化遥研究表明袁该蛋白高表达可发生于乳腺癌尧肺癌尧胃癌尧卵巢癌及内分泌系统肿瘤中遥C-erbB-2 高表达的病例大多分化程度低袁淋巴结转移率高袁复发早袁预后差 遥在 HPV16 阳性的宫颈癌细胞中袁IPV16E6 蛋白可结合 p53 蛋白并降解袁而野生型 p53 蛋白能通过 p21 蛋白抑制 PCNA 的表达遥因此袁E6 蛋白阻断了野生型 p53 的表达袁引起 PCNA 表达作用的增强 遥

细胞凋亡是组织发育和功能维持的必需生理现象袁当其出现反常调控时袁可促使肿瘤等多种疾病发生 遥核酶是一类具有催化活性的 RNA 分子袁因其能特异性结合并切割靶 RNA 袁且易于人工设计 尧合成袁因此常用于抗病毒尧抗肿瘤基因治疗研究 遥体外切割实验证实袁抗 HPV16E6 核酶能特异性切割 HPV16E6 mRNA 遥本研究将 HPV16E6 核酶导入 HPV16 阳性的宫颈癌 CaSKi 细胞株中袁发现其能阻碍宫颈癌细胞增殖袁诱导凋亡遥我们推测袁在 HPV16 诱发肿瘤的过程中袁E6 基因的高表达引起细胞内一系列基因表达的变化袁包括 p53 表达降低袁-myc 尧bcl-2 尧-erbB-2 表达增高袁细胞正常凋亡受到抑制袁增殖加速袁这可能是 E6 基因的致癌机制之一遥由于抗 HPV16E6 核酶的特异性切割袁导致 HPV16E6 基因表达水平降低袁从而使 p53 的表达增高袁-myc 尧bcl-2 尧C-erbB-2 的表达降低袁细胞的凋亡率增高袁恶性程度降低遥

综上所述袁抗 HPV16E6 核酶的导入能诱导宫颈癌细胞凋亡袁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遥

参考文献

Alani RM, Munger K. Human papillomavirus and associated malignancies. Clin Oncol, 1998, 16(1):330-7.  
郑燕芳, 张积仁, 屈良鸽, 等. 抗 HPV16E6 核酶的原核表达与体外活性研究. 中华微生物与免疫学杂志, 2000, 20(1):79-82.

3个扩增片段经序列测定后分别与已发表的冈比亚按蚊和埃及伊蚊的序列相比表同源性都比较低表推衍出的氨基酸序列也不具备防御素特征性氨基酸序列渊端的6个半胱氨酸冤因此断定其不是防御素的编码基因序列袁为非特异扩增遥

2.5 蚊防御素基因的 RT-PCR 扩增

埃及伊蚊尧白纹伊蚊以及中华按蚊的 RT-PCR 的结果均未能扩增出特异性的预期片段遥

3 讨论

迄今克隆的蚊防御素基因均具有内含子袁不同种属蚊虫防御素基因的内含子长度不同袁冈比亚按蚊的防御素基因由两个分别长为 127 和 179bp 的外显子和一个 105bp 的内含子构成遥而本研究中克隆的埃及伊蚊和白纹伊蚊的防御素基因则由两个分别长为 115 和 185bp 的外显子及一个 61bp 的内含子构成遥按蚊防御素基因为单拷贝袁伊蚊的防御素基因则为双拷贝遥比较不同昆虫的防御素基因序列可以看出袁其序列相似程度与分类位置的远近有一定的平行关系遥同一属内蚊虫袁埃及伊蚊和白纹伊蚊袁其防御素基因序列的同源性非常高渊8%冤不同属的蚊虫袁如按蚊与伊蚊的防御素基因的同源性相差较大渊8%冤而蚊与果蝇则相差非常显著遥这可能是根据埃及伊蚊和冈比亚按蚊防御素序列设计合成的引物袁未能从致乏库蚊中调出防御素基因的原因遥尽管不同种属昆虫的防御素基因序列有很大不同袁但其 C 末端的氨基酸序列却很相似袁都具有 6 个半胱氨酸袁从本研究克隆的埃及伊蚊和白纹伊蚊的防御素基因推衍的氨基酸序列中也得到了证明遥

防御素是蚊虫免疫防御体系中的重要一环袁外来病原入侵时就会在脂肪体中大量表达遥克隆防御

素的 cDNA 序列袁国外学者往往会在蚊胸腔内注射大肠杆菌袁以诱导防御素基因的表达袁并在注射后 24h 提取总 RNA 遥由于蚊胸腔内显微注射需要一定的技术与设备袁本研究试图将大肠杆菌直接放到饲水中袁以诱导防御素基因的表达遥尽管我们尝试了许多实验方法和条件袁但 RT-PCR 结果并未能调出防御素基因的 cDNA 序列袁说明这种方法并不能有效诱导防御素基因的表达遥

参考文献院

咱暂 CollinsFH, Sakai RK, VernickKD, et al. Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*咱暂 Science, 1986, 234: 607-9.

咱暂 VernickKD. Mechanisms of immunity and refractoriness in insect vectors of eukaryotic parasites 咱暂 In: Molecular mechanisms of immuneresponses in insects 咱暂 London: Chapman & Hall, 1998. 261-309.

咱暂 Matsuyama K, Natori S. Purification of three anti-bacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*咱暂 Biol Chem, 1988, 263(30): 17112-6.

咱暂 Lambert J, Keppi E, Dimarcq JL, et al. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *phormia terranova* of two insect anti-bacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides 咱暂 Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 86(1): 262-6.

咱暂 Dimarcq JL, Hoffmann D, Meister M, et al. Characterization and transcriptional profiles of a drosophila gene encoding an insect defensin. A study in insect defensin咱暂 Eur J Biochem, 1994, 221(1): 201-9.

咱暂 Chalk R, Townson H, Natori S, et al. Purification of an insect defensin from the mosquito *aedes aegypti* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1994, 24(4): 403-10.

咱暂 Eggleston P, Lu W, Zhao Y. Genomic organization and immune regulation of the defensin gene from the mosquito 咱暂 *Insect Mol Biol*, 2000, 9(5): 481-90.

咱暂 Cho W L, Fu T F, Chiou J Y, et al. Molecular characterization of a defensin gene from the mosquito 咱暂 *Insect Biochem Mol Biol*, 1997, 27(5): 351-8.

渊上接 498 页冤

Zheng YF, Zhang JR, Qu LH, et al. The study of prokaryotic expression and character of anti-HPV16 E6-ribozyme in vitro 咱暂 Chin J Microbiol Immunol, 2000, 20(1): 79-82.

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

咱暂 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 咱暂 Jpn J Cancer Res, 1993, 84(10): 1043-9.

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

咱暂 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 咱暂 Chin J Dent Res, 1998, 1(3): 35-41.

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

咱暂 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 咱暂 Oncogene, 1993, 8(10): 2645-55.

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

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