

文章编号:1004 - 616X(2002)02 - 0067 - 04

·论著·

人乳头瘤病毒 16 E6 与食管癌细胞核基质的关系

陈海滨^{1,2}, 陈玲¹, 张锦堃¹, 沈忠英¹, 苏中静¹, S.B. Cheng³, E. C. Chew⁴

(1. 肿瘤病理研究室, 2. 组织学与胚胎学教研室, 汕头大学医学院, 广东 汕头 515031; 3. 生理学系, 4. 解剖学系, 香港中文大学, 香港 新界 沙田)

【摘要】目的: 观察 HPV-16 E6 和食管癌细胞核基质的关系, 以探讨 HPV 感染在食管癌变中的作用。方法: 2 株食管癌细胞系, EC/ CUHK1 和 EC/ CUHK2, 用于本实验。PCR 扩增核基质相关的 HPV-16 E6 亚基因片段, RT-PCR 和免疫细胞化学染色观察了 E6 亚基因在癌细胞内的表达。结果: EC/ CUHK2 细胞的 HPV-16 E6 亚基因片段存在于核基质相关 DNA 中, E6 癌蛋白位于核基质组分内; 而 EC/ CUHK1 细胞的结果均为阴性。结论: HPV-16 E6 和核基质的相互作用有助于病毒导致的食管癌发生。

【关键词】食管癌; 核基质; 人乳头瘤病毒

中图分类号: R735.1, R730.231⁺.3 文献标识码: A

THE RELATION BETWEEN HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 E6 AND NUCLEAR MATRIX OF ESOPHAGEAL CARCINOMA CELLS

CHEN Hai-bin^{1,2}, CHEN Ling¹, ZHANG Jin-kun¹, SHEN Zhong-ying¹, SU Zhong-jing¹, CHENG SB³, CHEW EC⁴

(1. Tumor Pathology Laboratory; 2. Department of Histology and Embryology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China; 3. Department of Physiology; 4. Department of Anatomy, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong, China)

【Abstract】 Purpose : To explore the etiologic role of HPV infection in esophageal carcinoma, the association of HPV-16 E6 with the nuclear matrix of carcinoma cells was investigated. **Methods :** Two esophageal carcinoma cell lines, EC/ CUHK1 and EC/ CUHK2, were tested for HPV-16 E6 subgenic fragment by using polymerase chain reaction amplification of virus DNA associated nuclear matrix. RT-PCR and immunocytochemistry were used to visualize the expression of E6 subgene in the cells. **Results :** The HPV-16 E6 subgenic fragment were found to be present in nuclear matrix-associated DNA, E6 oncoprotein localized in the nucleus where it tightly associate with nuclear matrix after sequential extraction in EC/ CUHK2 cells. This phenomenon was not detected, however, in EC/ CUHK1 cells. **Conclusion :** The interaction between HPV-16 E6 and nuclear matrix may contribute to the viral induced carcinogenesis in esophageal carcinoma cell line EC/ CUHK2.

【Key words】 esophageal carcinoma; nuclear matrix; human papillomavirus

食管癌是世界上最常见的食管上皮恶性肿瘤, 世界卫生组织报道的食管癌发病率在过去 20 年已增加了许多倍, 且仍在继续升高。该病的发病率有明显的地区差异, 在某些地区包括中国北部、伊朗、南非明显高发, 而在西欧、北美明显低发。食管癌发病率的这种地区差异, 说明环境因素与之有关。人乳头瘤病毒

收稿日期: 2001-09-29; 修订日期: 2001-12-03
基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (No. 990799) 和广东省医学科学基金资助项目 (No. B1997083)
作者简介: 陈海滨 (1963-), 男, 安徽人, 副教授, 硕士, 研究方向: 肿瘤细胞生物学。

(human papillomavirus, HPV)近年被认为是高发区食管癌发生的一个重要病因^{1,2}。在高发区,食管鳞状细胞癌中 HPV DNA 序列的检出率是 24% 到 60%。HPV 是小 DNA 病毒,根据其与肿瘤的关系可划分为高危组和低危组,HPV-16 和 HPV-18 是高危组中最常见的型别。在大部分 HPV 感染的细胞内,病毒基因组中的 E6、E7 基因片段保留并整合在宿主细胞染色体上³;体外和体内实验均证明病毒的转化特性需有这两个基因的参与。E6 通过与肿瘤抑制蛋白 P53 相互作用,引起 P53 蛋白快速降解^{4,5};因此,表达 E6 的细胞不能表达有效水平的 P53 蛋白,引起正常 P53 功能丧失。由于 p53 基因的改变是目前大多数人类肿瘤中最常见的遗传改变,高危型 HPV 干扰 P53 正常功能对于其致癌性有特别意义。E6 也将其他蛋白作为靶子,如焦点桩蛋白 paxillin 和干扰素调节因子 3。这些资料均表明病毒癌蛋白在多环节影响细胞的多种功能。

核基质是细胞核用非离子去垢剂、核酸酶和高盐溶液抽提后的非染色质组分,它包括残留的核膜和结合少量 DNA 的内层纤维网架⁶。核基质在核酸代谢中起着十分重要的作用^{7,8}。研究发现核基质是 DNA 复制、转录、RNA 加工和类固醇激素发挥作用的场所;此外,原癌基因产物和数种病毒癌蛋白如 EB 病毒核抗原引导蛋白⁹、腺病毒 E1A 蛋白、SV40 大 T 抗原和 HPV E7 蛋白^{10,11}也和核基质相关。

本研究通过 PCR、RT-PCR 和免疫细胞化学染色,研究了 HPV-16 阳性食管癌细胞中 HPV-16 E6 基因和 E6 蛋白与核基质的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 2 株食管癌细胞系 EC/ CUHK1 和 EC/ CUHK2 用于本实验。EC/ CUHK1 从食管高分化鳞癌建株,HPV 阴性;EC/ CUHK2 从食管低分化鳞癌建株,细胞内含有 HPV-16 DNA。两株细胞均培养于含 100 ml/L 胎牛血清、10⁵ IU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM(Gibco)中,置 5% CO₂, 37℃ 饱和培养。

1.2 核基质相关 DNA 抽提 按 Fey 等的方法并加以改良¹²。简言之,将培养细胞消化,置于细胞骨架缓冲液(100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF, 10 mmol/L PIPES pH 6.8, 300 mmol/L sucrose 和 5 ml/L Triton X-100)中 4℃ 处理 15 min,细胞沉淀用含不同浓度的 DNase (50 mg/L 或 100 mg/L)和 RNase (100

mg/L)的消化缓冲液(除用 50 mmol/L NaCl 代替 KCl 外,其余成分与细胞骨架缓冲液相同)室温消化 30 min。然后加入终浓度为 0.25 mol/L 的冷硫酸铵终止消化,离心沉淀后获得核基质,用蛋白酶 K 55℃ 过夜消化,酚-氯仿提取 DNA,加入不含 DNase 的 RNase 37℃ 作用 1 h 去除 RNA,酚-氯仿法重新抽提,醋酸铵和乙醇沉淀 DNA,Tris-EDTA 缓冲液溶解,4℃ 保存备用。

1.3 PCR 根据病毒 DNA 序列设计 HPV-16 E6 特异性引物。引物的核苷位置为 82~559,扩增产物为 477 bp。引物序列如下:5'-ATGCACCAAAA GAGAACTGC-3' 和 5'-TTACAGCTGCGTTTCTCTAC-3',反应体系为 1.0 mmol/L MgCl₂,4 × dNTPs、引物和标本 DNA,总反应体积为 25 μl。反应以 94℃ 热启动以减少非特异性反应,扩增反应置 95℃ 1 min, 55℃ 1 min,72℃ 1.5 min,循环 30 次。以 HPV-16 质粒 DNA 作阳性对照,扩增产物溴化乙锭染色后,1% 的琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

1.4 总 RNA 提取和 RT-PCR Trizol-氯仿法提取总 RNA,异丙醇沉淀,75% 冷乙醇洗涤,晾干,DEPC 处理水重新溶解,测 OD260 和 OD280 定量 RNA,逆转录反应体系包括随机六核苷引物、逆转录酶、RNase 抑制剂、dNTPs 和 1.5 mmol/L MgCl₂ (Perkin Elmen)。反应置 42℃,45 min。cDNA 产物用于 HPV-16 E6 PCR 扩增,反应条件同 PCR。

1.5 原位核基质制备及免疫细胞化学染色 根据 Staufenbiel 等的方法,原位制备核基质样品。细胞接种于盖玻片上培养 2 天,4℃ PBS 漂洗 3 次,用含有 4 mmol/L 氧矾核苷复合物的细胞骨架缓冲液 4℃ 作用 15 min,再置于网状细胞标准缓冲液(42.5 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 8.5 mmol/L NaCl, 2.6 mmol/L MgCl₂, 1.2 mmol/L PMSF, 10 ml/L Tween 40, 12 mmol/L sodium deoxycholate, 2 mmol/L ribonucleoside vanadyl complexes)中 4℃,作用 10 min, DNase (100 mg/L)室温 20 min 消化去除染色质,加入终浓度为 0.25 mol/L 的冷硫酸铵终止消化。核基质样品用 10% 缓冲福尔马林固定 10 min,阻断非特异性染色后,用抗 HPV-16 E6 抗体孵育,ABC 法染色,DAB 显色。阴性对照片省略一抗。

2 结果

2.1 PCR 用 HPV-16 E6 引物扩增 EC/ CUHK2 细胞核基质相关 DNA,获得 477 bp 的产物。而 EC/ CUHK1 细胞核基质相关 DNA 的扩增反应为阴性,

阳性对照 HPV-16 质粒 DNA 的扩增反应证实 PCR 系统的特异性和可行性(图 1)。EC/ CUHK2 细胞核基质 DNA 制备过程中,分别使用 50 mg/L 和 100 mg/L 不同浓度的 DNase ,保留的核基质相关 DNA 用于 PCR。如图 1 所示,经 50 mg/L DNase 消化组显示 477 bp PCR 扩增信号,而经 100 mg/L DNase 消化组,扩增信号明显减弱。

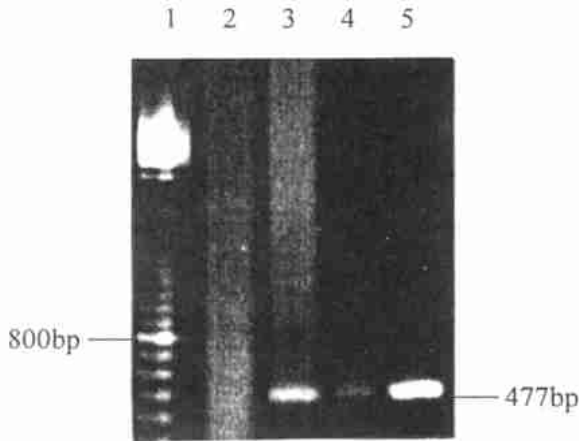


图 1. PCR 扩增 HPV-16 E6 的结果

Figure 1. Results of PCR amplification with HPV-16 E6 primers.

1. 100 bp DNA ladder marker. 2. nuclear matrix associated DNA of EC/ CUHK1 cells, with 50 mg/L DNase digestion. 3. nuclear matrix associated DNA of EC/ CUHK2 cells, with 50 mg/L DNase digestion. 4. nuclear matrix associated DNA of EC/ CUHK2 cells, with 100 mg/L DNase digestion. 5. HPV-16 plasmid DNA.

2.2 RT-PCR 为从总 RNA 中检测 EC/ CUHK1 和 EC/ CUHK2 细胞中 HPV-16 E6 的表达,应用 HPV-16 E6 引物,RT-PCR 检测 477 bp HPV-16 E6 的表达,EC/ CUHK2 细胞显示 477 bp 的特异性扩增产物,而 EC/ CUHK1 为阴性反应(图 2)。

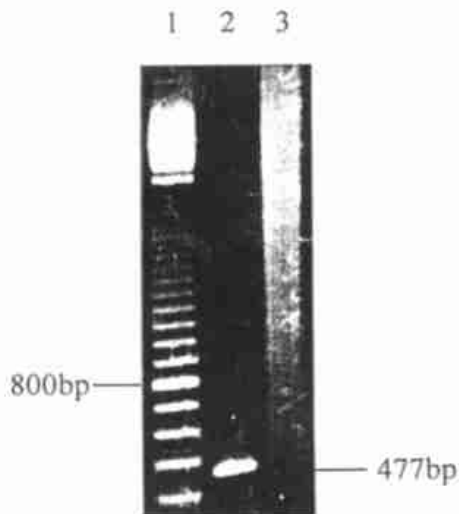


图 2. RT-PCR 扩增 HPV-16 E6 的结果

Figure 2. Results of RT-PCR amplification with HPV-16 E6 primers.

1. 100 bp DNA ladder marker. 2. EC/ CUHK2 cells. 3. EC/ CUHK1 cells.

2.3 免疫细胞化学染色 用抗 HPV-16 E6 癌蛋白抗体检测 HPV 的活性。EC/ CUHK2 细胞染色阳性,染色集中于细胞核,弥散分布于核内纤维状结构和核纤层周围,与核基质密切相关(图 3)。EC/ CUHK1 细胞 E6 染色阴性(结果未显示)。

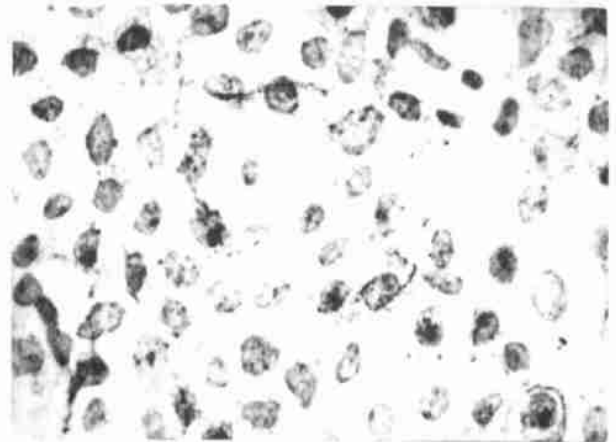


图 3. EC/ CUHK2 细胞核基质 HPV-16 E6 蛋白免疫细胞化学染色

Figure 3. Immunocytochemical staining of anti-HPV-16 E6 protein in nuclear matrix of EC/ CUHK2 cells (ABC, ×400)

3 讨论

目前,HPV 作为食管癌的致病因素之一已得到共识。对食管癌中 HPV 的检测表明,不同实验室和不同地区阳性率相差较大,从 0 至 67 % 不等。最近的报道显示,在中国和南非的阳性率相对较高,分别为 34.9 % 和 26.4 %²。一般认为,HPV-16 和 HPV-18 型在食管癌高发区的发病中起重要作用^{2,13},对 HPV 基因组和病毒转录模式的早期观察还发现,病毒 DNA 多整合进宿主细胞,其早期基因 E6、E7 继续表达。E6、E7 基因片段是 HPV 导致各种人体细胞永生化的必需因素^{4,14},E6、E7 基因片段整合进宿主细胞基因组是引起和加强病毒致癌的关键。大量研究已经反复显示核基质是 DNA 复制和转录的位点,活跃表达的基因与核基质紧密结合,而未转录基因则否。核基质也是病毒和宿主细胞相互作用的重要位点¹⁵,病毒活动如病毒复制和组装也与宿主细胞核基质密切相关。以前,我们已经确认 HPV-16 基因和宫颈癌细胞的核基质相关^{11,16,17},本文的结果也支持核基质在 HPV 整合中的作用。经低浓度和中等浓度 DNase 处理,制备核基质,PCR 扩增从中提取的 DNA,获得了 HPV-16 E6 DNA 片段,这提示某些核基质 DNA 或基质结合元件与 HPV-16 E6 DNA 相联系,不仅表明 E6 DNA 片段整

合在 EC/ CUHK2 细胞的基因组中,也表明 E6 片段和活跃转录复制位点之间的密切联系。

本研究中 RT-PCR 和原位制备核基质后免疫细胞化学染色的结果显示 EC/ CUHK2 细胞中 HPV-16 E6 基因的转录和 E6 蛋白位于细胞核内,并与核基质密切相关。在体外实验中,有 E6 癌蛋白和 P53 相互作用的大量研究。E6 和 P53 的结合引起泛素依赖的蛋白酶解系统降解 P53^{4,5,18},因此表达 E6 的细胞可以消除内源性 P53 表达。细胞 DNA 损伤后,细胞内无 P53 累积,失去 P53 对细胞生长的负性调节作用。E6 引起的 P53 降解,取决于蛋白间的结合,但 P53 自身不能形成同源寡聚体复合物。E6 和 P53 作用后,P53 的降解取决于另一种细胞蛋白——E6 相关蛋白(E6-AP)。E6/E6-AP 复合物如同泛素-蛋白连接酶,等同于泛素通路中的 E3,允许泛素结合酶 E2 催化泛素和 P53 赖氨酸残基结合¹⁸⁻²⁰;而泛素和 P53 的结合是泛素通路中某些特异性蛋白酶作用的识别信号。由于 E6 蛋白结合到核基质,我们推测 E6-AP 可能也是一种核基质蛋白,这有待于进一步研究。

鉴于 HPV-16 E6 基因片段和癌蛋白与食管癌细胞核基质的相关性,进一步研究这些核基质蛋白的结构和功能,可以为明确 HPV 和食管癌的关系提供更多的资料,这将有助于对食管癌的诊断、治疗和致病机制的研究。

参考文献:

- 1 Chang F, Syrjanen S, Shen Q, et al. Human papillomavirus involvement in esophageal carcinogenesis in the high-incidence area of China. A study of 700 cases by screening and type-specific *in situ* hybridization J. *Scand J Gastroenterol*, 2000, 35 (2): 123 ~ 130.
- 2 Lavergne D, de-Villiers EM. Papillomavirus in esophageal papillomas and carcinomas J. *Int J Cancer*, 1999, 80 (5): 681 ~ 684.
- 3 zur-Hausen H. Papillomaviruses in human cancers J. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999, 111 (6): 581 ~ 587.
- 4 Liu Y, Chen JJ, Gao Q, et al. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells J. *J Virol*, 1999, 73 (9): 7 297 ~ 7 307.
- 5 Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, et al. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (3): 1 218 ~ 1 223.
- 6 Nickerson J. Experimental observations of a nuclear matrix J. *J*

- Cell Sci*, 2001, 114 (Pt 3): 463 ~ 474.
- 7 Cremer T, Kreth G, Koester H, et al. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture J. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2000, 10 (2): 179 ~ 212.
- 8 Hancock R. A new look at the nuclear matrix J. *Chromosoma*, 2000, 109 (4): 219 ~ 225.
- 9 Yokoyama A, Kawaguchi Y, Kitabayashi I, et al. The conserved domain CR2 of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein is responsible not only for nuclear matrix association but also for nuclear localization J. *Virology*, 2001, 279 (2): 401 ~ 413.
- 10 Greenfield I, Nickerson J, Penman S, et al. Human papillomavirus 16 E7 proteins are associated with the nuclear matrix J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88 (24): 11 217 ~ 11 221.
- 11 Yam HF, Wang ZH, Or PC, et al. Effect of glucocorticoid hormone on nuclear matrix in cervical cancer cells *in vitro* J. *Anticancer Res*, 1998, 18 (1A): 209 ~ 216.
- 12 陈海滨, 邱殷庆, 张锦堃, 等. 人食管癌细胞核基质的研究 J. *解剖学报*, 2000, 31 (1): 65 ~ 68.
- 13 Li T, Lu ZM, Chen KN, et al. Human papillomavirus type 16 is an important infectious factor in the high incidence of esophageal cancer in Anyang area of China J. *Carcinogenesis*, 2001, 22 (6): 929 ~ 934.
- 14 Wazer DE, Liu XL, Chu Q, et al. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papillomavirus 16 E6 or E7 J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (9): 3 687 ~ 3 691.
- 15 Deppert W. The nuclear matrix as a target for viral and cellular oncogenes J. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2000, 10 (1): 45 ~ 61.
- 16 Yam HF, Chen HB, Yang L, et al. Human papillomavirus 16 E6 and E7 are associated with the nuclear matrix of cervical carcinoma cells J. *Oncol Rep*, 1997, 4 (3): 543 ~ 547.
- 17 Yang L, Yam HF, Cheng-Chew SB, et al. The association of HPV 16 DNA with specific nuclear matrix proteins of normal and cervical carcinoma cell J. *Anticancer Res*, 1997, 17 (1A): 343 ~ 347.
- 18 Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53 J. *Cell*, 1993, 75 (3): 495 ~ 505.
- 19 Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells J. *J Biol Chem*, 1998, 273 (11): 6 439 ~ 6 445.
- 20 Huang L, Kinnucan E, Wang G, et al. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade J. *Science*, 1999, 286 (5 443): 1 321 ~ 1 326.