论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1280-03

pIRES2-HPV18E2-EGFP质粒重组及其在HeLa细胞中的表达

汪 云[1],李 力[1],李元朝[2],吕凤林[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]妇产科;[2]第一研究室,创伤、烧伤与复合伤研究室,重庆 400042)

提 要:目的 构建人乳头瘤病毒18型E2基因片段(HPV18E2)重组表达质粒并予以表达,为进一步研制HPV18相关疾病提供材料。**方法** 以重组质粒(pBR322-HPV18)为模板,PCR方法扩增HPV18E2DNA片段,将HPV18E2DNA与加强绿色荧光质粒(pIRES2-EGFP)重组构建重组质粒(pIRES2-HPV18E2- EGFP)。用酶切电泳及测序检查质粒重组后序列正确性。重组质粒转染Hela细胞。RT-PCR鉴定转染细胞中E2基因。**结果** PCR扩增DNA片段约为1 kb,与预期结果相同。克隆重组质粒pIRES2-HPV18E2- EGFP酶切后显示的酶切图谱与预期相同,而且测序验证插入片段全序列无改变。转染并用G418筛选后,在荧光显微镜下可见绿色荧光细胞的表达。转染细胞RT-PCR出现特异性条带。**结论** 成功构建表达HPV18 E2蛋白的靶细胞模型。

关键词: 人乳头瘤病毒18型;E2基因;基因重组;转染

中图法分类号: R394-33;R394.2;R730.261 **文献标识码:** A

Construction of recombinant plasmid PIRES2-HPV18-EGFP and its expression in HeLa cells

WANG Yun[1], LI Li[1], LI Yuan-chao[2], LU Feng-lin[2] ([1]Department of Gynaecology and Obstetrics, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant plasmid for expressing the HPV18 E2 gene and develop some materials for HPV18 related disease. Methods The E2 gene of HPV18 was amplified by PCR from PBR322-HPV18 and cloned into PIRES2-EGFP. The sequence of cloned HPV18E2 was confirmed by restriction analysis and DNA sequencing, then transfected into HeLa cells. E2 gene was detected by RT-PCR. Results HPV18 E2 gene fragment was amplified by PCR and ligated to PIRES2-EGFP, then transfected into HeLa cells successfully. The expression of green fluorescence cells was observed by fluorescence microscopy. Specific band could be seen in transfected cells by RT-PCR. Conclusion Recombinant plasmid PIRES2-EGFP is effectively expressed after being transfected into HeLa cells *in vitro*.

Key words: human papillomavirus type 18; E2 gene; plasmid construction; gene transfection

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤。宫颈癌的发生可能与性生活紊乱、过早性生活、早年分娩、多产、地理环境等因素有关。分子生物学研究结果显示90%以上的宫颈癌伴有高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染。宫颈癌以鳞状细胞癌最为多见,其次为腺癌和腺鳞癌等。HPV的感染是诱发宫颈癌的必要条件,尤其是HPV16型和18型。本实验是以加强绿色荧光质粒 $pIRES_2$-EGFP为载体,构建了HPV18E2蛋白的真核表达质粒 $pIRES_2$-HPV18E2-EGFP,为治疗HPV18相关疾病提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 菌株:*E. coli.* $DH_{5\alpha}$(由本实验室保存)。质粒:①pBR322/HPV18:含目的基因的重组质粒,由德国癌症研究中心(DKFZ)E-M de Villiers教授惠赠;②pIRES2-EGFP:含绿色荧光蛋白报告基因的真核表达载体,Clontech公司,由Professor Roger Y. Tsien, University of California, San Diego, USA惠赠,含有 Kan^+ 抗性基因。Hela细胞株,购自协和医科大学基础医学研究所。

作者简介:汪 云(1980-),女,四川省成都市人,硕士研究生,医师,主要从事宫颈癌方面的研究。电话:(023)68719554

通讯作者:吕凤林,电话:(023)68757811,E-mail: Lufenglin@hotmail.com

收稿日期:2005-12-12;修回日期:2006-04-12

1.1.2　主要试剂　　pfu 高保真 DNA 聚合酶（上海生物工程公司）。质粒抽提试剂盒（Omega 公司，美国）。DNA 凝胶回收试剂盒（上海华舜生物有限公司）。*Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ内切酶（大连 TaKaRa 公司）。T_4DNA 连接酶试剂盒（大连 TaKaRa 公司）。DL-2000 Marker（大连 TaKaRa 公司）。DL15000 Maker（大连 TaKaRa 公司）。PCR 克隆引物（上海生物工程公司），上游引物：5′-CGGAATTCATGGAGACTCTTTGCC-3′；（下划线部分为 *Bam*H Ⅰ酶切位点，5′端为保护性碱基），下游引物：5′-CGGAATTCATGCAGACACCGAAGC-3′（下划线部分为 *Eco*R Ⅰ酶切位点，5′端为保护性碱基）。GeneJammerTransfection Reage（Stratagene 公司，美国）。质粒中量抽提试剂盒（Omega 公司，美国）。DMEM 培养基（Hyclone，美国）。胎牛血清（四季青公司，中国）。HEPES（GIBCO，美国）。胰蛋白酶（Sigma 公司，美国）。逆转录酶，Trizol RNA 提取试剂（Promega 公司，美国）。

1.2　实验方法

1.2.1　pIRES2-HPV18E2-EGFP 重组质粒的构建及鉴定　　目的基因的扩增，反应完毕后取 4 μl 反应产物，在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析。PCR 纯化产物及 pIRES2-EGFP 质粒载体的酶切。酶切产物的纯化（琼脂糖凝胶回收法）。然后进行连接反应。置 16 ℃水浴中反应过夜。连接产物的转化 *E. coil* $DH_{5\alpha}$感受态菌的制备。连接产物的转化。重组子的筛选与初步鉴定。

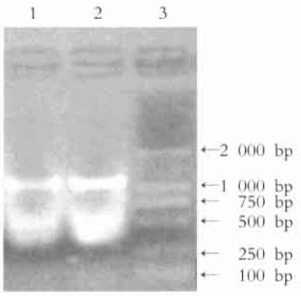
1.2.2　质粒 DNA 转染 Hela 细胞　　细胞准备收获处于指数生长期细胞约 1×10^5 个细胞接种于 6 孔细胞培养板中，使细胞达到 40% ~60% 融合，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中，无血清培养 24 h。转染试剂-质粒混合物的配制（在转染前即时配制）：多聚管中加入 300 μl 无血清 1640 培养基（加入 Gene Jammer 转染试剂，轻轻摇晃→室温静置 6 min→加入质粒 6 μg（30 μl）→静置 6 min 后备用。转染步骤：换液，每孔加入 900 μl 含血清培养基→每孔加入 16 μl 转染混合物→37 ℃孵育 3 h→每孔加入 1 ml 含血清培养基→37 ℃孵育 48 h 后观察。观察到部分细胞有绿色荧光蛋白表达后进行细胞传代，传代第 2 天加入 G418 进行阳性克隆的筛选，终浓度从 200 mg/L，逐渐加到 600 mg/L，在 G418 终浓度为 600 mg/L 时，细胞大量死亡，仅余少量成活贴壁细胞，置于荧光显微镜下观察，成活的贴壁细胞中，带有荧光的明显增多，维持此筛选浓度，培养基血清浓度改为 20%，继续培养与筛选。

1.2.3　逆转录-多聚酶链式反应（RT-PCR）　　用 Trizol 从 HeLa 细胞提取的总 RNA 为扩增模板；TR-PCT 反应系统中模板约为 100 ng，引物为 100 ng，Oligo（dt）0.1 μg，逆转录酶 5 U，37 ℃水浴 60 min；取 cDNA 100 ng，加 dNTP 各 200 μmol/L，*Taq* DNA 聚合酶 4U，94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，30 个循环，最后 72 ℃ 600 s 延伸，产物经 1% 低熔点琼脂糖电泳（80 V，20 min），EB 染色后放在紫外反射投射仪观察结果。

2　结果

2.1　HPV18E2 基因片段的获得

取 PCR 产物 4 μl，于 1% 琼脂糖凝胶电泳，90 V，电泳 30 min 后在紫外线灯下观察，在 DL2000 Marker 的 1 000 bp 条带稍靠后（约 1 100 bp）与处出现一特异性条带，其大小与理论（1 095 bp）相符（图 1）。

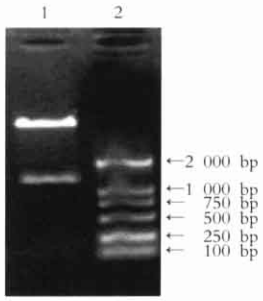


1，2：E_2 基因；3：分子质量 2000 标准

图 1　HPV18E2 基因片段 PCR 产物电泳结果

2.2　重组质粒酶切鉴定结果

质粒 $pIRES_2$-HPV18E2-EGFP 经 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切后，1% 琼脂糖凝胶电泳。重组质粒双酶切在 DL 2000 Marker 1 000 bp条带稍靠后处出现两条特异性条带，应分别为载体片段和目的片段，初步证明构建正确（图 2）。



1：酶切质粒；2：分子质量 2000 标准

图 2　重组质粒 $pIRES_2$-HPV18E2-EGFP 酶切产物电泳结果

2.3　重组质粒 DNA 序列测定

质粒 $pIRES_2$-HPV18E2-EGFP 交由重医分子生物学实验室测序，经过对比测序结果与 NCBI 公布的 HPV18E2 基因表明，插入的 HPV18E2 基因序列与 NCBI 公布的相应基因序列正确吻合，表明重组质粒成功，命名为 $pIRES_2$- HPV18E2-EGFP。

2.4　Hela 细胞 pIRES2-HPV18 E2-EGFP 绿色荧光蛋白的表达

转染后第 4 天加入 G418 进行筛选，在 G418 终浓度为 600 mg/L 时，细胞大量死亡，仅余少量贴壁细胞成活。维持此筛选浓度，培养基血清浓度改为 20%，再筛选 7 d 后，荧光显微镜下见成活的贴壁细胞中，带有荧光的明显增多，约占细胞总数的 50%（图 3）。由于表达报告基因的细胞必然同时表达目的基因，转染成功的同时已成功构建表达 HPV18 E2 蛋白的靶细胞模型。

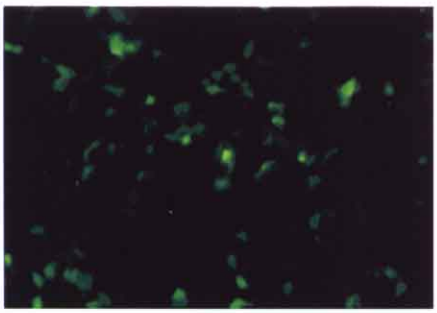
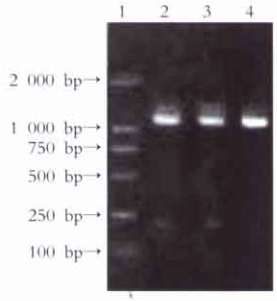


图3 pIRES2-HPV18 E2-EGFP 绿色荧光蛋白在 Hela 细胞中的表达 （荧光显微镜×200）

2.5 转染细胞 E2 mRNA 的检测

提取转染后的 Hela 细胞总 RNA，做 RT-PCR 检测 HPV18E2，检出特异性扩增带，即有特异性 E2 mRNA 的转录（图4）。



1～3：E_2 基因；4：分子质量2000 标准

图4 RT-PCR 检测转染细胞 HPV18E2 mRNA

3 讨论

HPV18E2 蛋白编码基因序列位于 HPV18 基因组第2 817～3 914 位，其蛋白由 365 个氨基酸构成。E2 是一种反式激活蛋白，涉及病毒 DNA 转录的反式激活。而且 E2 能延缓染色体有丝分裂的进程[1]。在 HPV 相关的恶性肿瘤中，病毒 DNA 常整合到宿主染色体中。相比之下，在癌前病变及宫颈上皮内瘤样变中却很少有整合。整合形式的 HPV 才具有恶性转化能力，因为 HPV-DNA 控制了宿主基因物质而产生 HPV 编码的蛋白。因此，整合常被认为是癌前病变转变为癌的激活机制之一。HPV 中的 16 型和 18 型是引发宫颈癌的主要型别。有研究报道 HPV18 感染在腺癌及腺鳞癌中更常见[2]。而且更易发生骨盆淋巴结转移和间质浸润，复发率也相对较高[3]。整合 HPV18 基因到宿主细胞后对癌的发生发展起决定性作用，其基因编码两种蛋白 E1 及 E2。E2 能结合 HPV 的早期启动子从而抑制 E6/E7 转录，高危型 HPV 感染宫颈上皮后，病毒组 DNA 整合到染色体中，其 E6 和 E7 基因产物的持续表达，是诱发宫颈癌的主要原因[4]。因此 E2 失去表达后将导致病毒癌基因的激活。在 HPV18 感染的细胞株中 E2 处于灭活状态，E2 的功能即是抑制癌的发展[5]。将 E2 导入 HPV 感染的癌细胞中将抑制细胞生长，使其细胞周期停在 G_1 期，衰老及凋亡。E2 蛋白作为病毒 DNA 复制和基因表达的主要调控蛋白，在感染早期的病毒复制阶段和宫颈上皮内瘤变Ⅰ期（CINⅠ）高表达。这是因为在宫颈上皮瘤后期病变和高恶性度的宫颈癌中，病毒基因组线性化整合入人基因组中的时候，E2 基因已经发生了断裂。最近也有研究表明：机体针对 HPV16 之 E6、E7 蛋白的细胞免疫在有些时候并不能彻底清除 HPV 感染的细胞，也就是说机体对高危型 HPV 病毒（HPV16、HPV18）E6、E7 蛋白的反应与病变的自行消退没有必然联系。

Brandsma[6] 发现在兔乳头瘤（cottontail rabbit papillomavirus，CRPV）模型中，表达 HPV E2 的腺病毒疫苗能清除 HPV 的感染。由此我们确信，E2 蛋白将是一个新的治疗性靶蛋白。HeLa 细胞是宫颈癌细胞株系，因整合 HPV18 E2 基因而永生化。而转染了质粒 pIRES2-HPV18 E2-EGFP 的细胞将成为理想的表达 E2 蛋白的靶细胞模型，模拟体外 CIN 早期阶段。如若我们能够获得针对 HPV18 之 E2 蛋白的治疗性多肽或者疫苗，则能够在宫颈上皮瘤发生之前清除 HPV18 病毒感染细胞，有望降低宫颈癌发生率。

参考文献：

[1] THIERRY F, BENOTMANE M A, DEMERET C, *et al*. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2004, 64(3): 895－903.

[2] HUANG L W, CHAO S L, CHEN P H, *et al*. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues[J]. J Clin Virol, 2004, 29(4): 271－276.

[3] IM S S, WILCZYNSKI S P, BURGER RA, *et al*. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(11): 4145－4150.

[4] DEFILIPPIS R A, GOODWIN E C, WU L, *et al*. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells[J]. J Virol, 2003, 77(2): 1551－1563.

[5] DEMERET C, GARCIA-CARRANCA A, THIERRY F. Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein[J]. Oncogene, 2003, 22(2): 168－175.

[6] BRANDSMA J L, SHLYANKEVICH M, ZHANG L, *et al*. Vaccination of rabbits with an adenovirus vector expressing the papillomavirus E2 protein leads to clearance of papillomas and infection[J]. J Virol, 2004, 78(1): 116－123.

（编辑 薛国文）