论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1218-03

慢病毒携带shRNA对宫颈癌细胞中HPV16型E6表达的抑制作用

郭建新[1],李 力[1],白 垚[2],程小星[3],邓少丽[3],郑秀惠[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042,[3]基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038;[2]重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016)

提 要:目的 研究慢病毒携带的短发夹状干扰RNA(short hairpin RNA, shRNA)对宫颈癌Caski细胞中人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)16型E6表达的抑制作用。**方法** 将靶向HPV16型E6的shRNA表达序列克隆到改建的慢病毒表达载体PLL3.7中,经限制性酶切鉴定和测序后,与3种包装质粒混合,以Lipofectamine 2000包裹后转染293FT细胞,72 h后收取含病毒的上清液并感染宫颈癌Caski细胞,感染48 h后加入G418筛选阳性克隆。每天对阳性细胞克隆进行细胞计数;提取细胞总mRNA,进行RT-PCR反应。**结果** 与对照组相比HPV16型E6的表达降低70%,宫颈癌Caski细胞生长速度减慢50%。**结论** 慢病毒携带的短发夹状干扰RNA能干扰宫颈癌细胞中HPV16型E6的表达并有抑制癌细胞生长的作用。

关键词: 宫颈癌;慢病毒;RNA干扰;人乳头瘤病毒
中图法分类号: R373; R73-362; R737.33 **文献标识码:** A

Inhibition of HPV16 E6 expression in cervical cancer cells by lentivirus mediated shRNA

GUO Jian-xin[1], LI Li[1], BAI Yao[2], CHENG Xiao-xing[3], DENG Shao-li[3], ZHENG Xiu-hui[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [3]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Medical Laboratory, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate if lentivirus mediated short hairpin RNA (shRNA) could constantly inhibit HPV16 E6 expression in cervical cancer Caski cells. **Methods** Short hairpin RNA targeting to HPV16 E6 was cloned to lentivirus work vector (lentilox RNAi vector PLL3.7). The recombined vector was identified by restriction enzyme analysis and sequencing. Work vector and three package plasmids were cotransfected to 293FT cells with the help of lipofectamine2000. Lentivirus was collected after 72 h, and was added to cultured Caski cells. Caski cells were screened by G418 at 48 h after infection. Cells were counted every day and total mRNA was extracted and underwent RT-PCR. **Results** Expression level of HPV16 E6 in Caski cells decreased by 70% as compared with controls. Cells growth velocity was reduced to 50% of controls. **Conclusion** Short hairpin RNA mediated by lentivirus can inhibit expression of HPV16 E6 and growth velocity of cervical cancer cells.

Key words: cervical cancer; lentivirus; RNA interfering; human papilloma virus HPV

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染宫颈上皮细胞并整合进细胞染色体是引发宫颈癌的主要原因[1],同时HPV的E6和E7蛋白在维持宫颈癌恶性表型中起重要作用。60%以上的宫颈癌是由HPV中16型和18型引发的,由于HPV编码的蛋白与人体自身基因无同源性,HPV成为宫颈癌生物治疗独特的靶标[2]。为此我们设计靶向HPV16型E6的短发夹状干扰RNA(short hairpin RNA, shRNA)[3],构建了表达shRNA的慢病毒,研究了慢病毒感染后宫颈细胞中HPV16型E6的表达及癌细胞生长的变化,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Xba Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Hpa* Ⅰ内切酶和T_4连接酶为New England公司产品,质粒小抽试剂盒、DNA胶回收试剂盒、无内毒质粒小抽试剂盒为天为时代公司产品,1640和DMEM细胞培养基及LB细菌培养基购自Sigma公司,293FT包装细胞、脂质体Lipofectamine 2000、慢病毒混合包装质粒购自Invitrogen,PLL 3.7工作质粒由Luk Van Parijs博士惠赠,胎牛血清(FCS)为成都生物

基金项目:第三军医大学青年科研基金资助项目(2003)
Supported by the Scientific Funds for Young Scholars by Third Military Medical University (2003)

作者简介:郭建新(1969-),男,湖北省武汉市人,博士研究生,讲师,主要从事宫颈肿瘤早期诊断和治疗方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68757249, E-mail: guobai@cta.cq.cn

收稿日期:2005-12-23;修回日期:2006-03-17

技术公司产品，核酸标准为 MBI 公司产品。HPV16 E6 扩增上游引物：5′-ATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGA，下游引物：5′-TTACAGCTGGGTTTCTCTACGTG；β-actin 扩增上游引物：5′-GTCGCCCTGGACTTCGAGCAAGAG，下游引物：5′-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACG。测序引物序列为 5′-TCTATAAGAGATACAAATACTA，测序引物及寡核苷核酸序列由三博远志公司合成。宫颈癌 Caski 细胞株购自武汉大学细胞保藏中心，RT-PCR 试剂购自 Takala 公司。$DH_{5\alpha}$ 工程菌为本室保存。

1.2　质粒构建

由 Luk Van Parijs 赠送的慢病毒工作质粒 PLL3.7 携带绿色荧光蛋白（EGFP）基因（PLL3.7-EGFP），为便于细胞克隆的筛选，我们对质粒进行了改建，用新霉素抗性基因 Neo 基因代替了绿色荧光蛋白基因（命名为 PLL3.7-neo）。在进行病毒包装时，以 PLL3.7-EGFP 作为阳性对照。干扰序列为：5′-GAATGTGTGTACTGCAAGC，CTTACACACATGACGTTCGAA-3′。将上述序列乱序重排，得到无义序列 5′-GTAGTACGCTGTGATCAGA，CATCATGCGACACTAGTCT-3′。插入序列的构建：在正义链 5′端加 T 重建 U6 启动子-1 位的 T，在 3 端加上 Loop 环，加入反转互补序列，加入终止信号 TTTTTT，再加上 *Xho* Ⅰ的粘性末端，由此构建出插入序列。干扰插入序列正义链：5′-TGAATGTGTGTACTG CAAGCTTCAAGAGAGCTTGCAGTACACACATTCTTTTTTTC，干扰序列反义链：5′-TCGAGAAAAAAGAATGTGTGTACTGCAAGCTCTCTTGAAGCTTGCAGT ACACACATTCA。无义插入序列正义链：5′-TGTAGTACGCTGTGATCAGA TTCAAGAGATCTGATCACAGCGTACTACTTTTTTC，无义序列反义链：5′-TCGAGAAAAAAGTAGTACGCTGTGATCAGATCTCTTGAATCTGATCACAGCGTACTACA。

PLL3.7-Neo 工作质粒经 *Hpa* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切过夜，以 0.8% 琼脂糖电泳 45 min，用 DNA 胶回收试剂盒回收线性质粒，线性质粒与插入序列用 T_4 DNA 连接酶 16 ℃连接 16 h，连接产物转化 DH5α 工程菌，挑选单菌落测序。提取质粒，以 *Xba* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定，将双酶切鉴定确认后的质粒送公司测序。

1.3　病毒包装

将 1.5 μg 混合包装质粒和 0.5 μg 表达质粒与 6 μl 脂质体 2000 室温孵育 20 min。在 6 孔组织培养板中加入 1 ml 含血清的生长培养基，再加入 DNA-脂质体复合物，最后将 1 ml 共 1.2×10^6 个 293FT 细胞加入到培养平板中；37 ℃ CO_2 孵箱中孵育过夜。第 2 天将含有 DNA-脂质体复合物的培养基移除，代之以含非必须氨基酸和丙酮酸钠的 DMEM 培养液。转染后 72 h 收获含病毒的上清，3 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀。

1.4　慢病毒感染细胞

宫颈癌 Caski 细胞以胰酶消化计数后种于 24 孔板中，每孔 4×10^5 个细胞，共 12 孔。分为 3 组：空白阴性对照及 PLL3.7-EGFP 慢病毒对照各 2 孔，均用作阴性对照；干扰慢病毒及无义干扰慢病毒各 4 孔。24 h 后去除培养液，空白阴性对照组每孔加入 1640 培养液 0.5 ml，其作各孔加入相应病毒液（10^6TU/ml，TU：transducing units）0.5 ml，加入终浓度为 8 μg/ml 多季铵。次日以 1640 培养液换液，于感染后 48 h 加入终浓度 600 μg/ml 的 G418 进行筛选。

1.5　RT-PCR

取未处理 Caski、干扰组筛选后的 Caski 和无义干扰组筛选后的 Caski 各 3 瓶，用 Trizol 裂解细胞，抽提总 RNA，以 Oligo-dT 作引物进行逆转录。PCR 结束后以 2% 琼脂糖电泳鉴定。凝胶成像系统摄像并分析，表达强度用 HPV16 E6 mRNA 与 β-actin 扩增条带的比值表示，取 3 个样品的平均值。HPV16 E6 mRNA 表达抑制率 =（1 - 观察组 HPV16 E6 mRNA 表达强度/空白对照组 mRNA 表达强度）×100%。

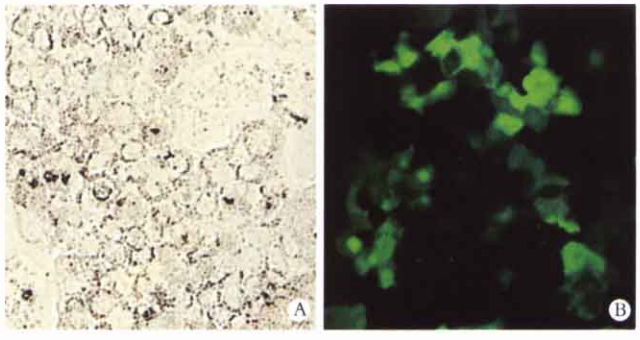
1.6　细胞生长曲线

取未处理 Caski、干扰组筛选后的 Caski 和无义干扰组筛选后的 Caski 3 组细胞，配成 10^4 细胞/ml 的细胞悬液，接种到 24 孔培养板中，每组接种 14 孔，每孔 0.5 ml；于次日起每天每组取 2 孔细胞消化后计数，取 2 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。

2　结果

2.1　慢病毒的感染效率

以 PLL3.7-EGFP 包装出来的慢病毒原液感染 Caski 细胞，48 h 后在荧光显微镜下观察，约有 20% 的细胞发出绿色荧光（图 1）；流式细胞仪检测荧光细胞的比率为 19.8%。



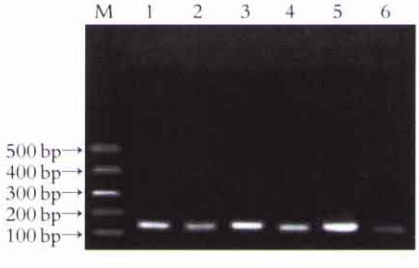
A：光镜；B：荧光显微镜

图 1　慢病毒感染后的 Caksi 细胞病理观察　（×250）

PLL3.7-neo 包装出来的病毒感染 Caski 细胞，经过 G418 筛选，大部分细胞死亡，在第 5 天以后细胞形成稳定克隆，未加病毒液的细胞和 PLL3.7-EGFP 感染细胞在第 5 天完全死亡。

2.2　HPV16 型 E6 mRNA 表达的变化

干扰组 Caski 细胞中 HPV16 E6 mRNA 的表达强度为（0.72 ± 0.25），无义干扰组为（2.4 ± 0.35）。与无义组相比，干扰组 Caski 细胞中 HPV16 E6 mRNA 的表达强度显著下降，其表达的抑率为 70%。无义组与照组 E6 的表达强度无明显差别，见图 2。



M：标准；1：对照组 β-actin；2：对照组 E6；3：无义干扰组 β-actin；4：无义干扰组 E6；5：干扰组 β-actin；6：干扰组 E6

图 2　3 组细胞经 RT-PCR 后的电泳图

2.3 细胞生长的变化

慢病毒感染后，干扰组 Caski 细胞的生长速度较无义组 Caski 和对照组 Caski 明显变慢，到第 7 天，细胞生长的抑制率为 50%，见图 3。3 种细胞在形态上无明显差别。

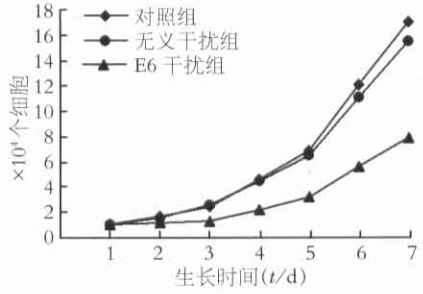


图3 3组 Caski 细胞的生长曲线

3 讨论

人乳头瘤病毒感染是诱发宫颈癌的主要原因。HPV E6 蛋白结合并降解 P53 是细胞转化的关键步骤之一，高危 HPV 的 E6 蛋白与 P53 结合后，使 P53 降解或失活，对细胞增殖周期相关因子的调节作用丧失，细胞中 DNA 损伤积累造成细胞癌变。由于 HPV 编码的蛋白与人体自身基因无同源性，因此以 HPV 为靶标的抗肿瘤研究成为宫颈癌生物治疗的主要途径。目前基于 HPV 抗宫颈癌的策略有 2 种：基于 HPV 的肿瘤疫苗研究和干扰 HPV 致癌环节的研究[4]。预防性 HPV 疫苗已取得了很大的进展，但治疗性疫苗仍未能取得重大突破[5]。因此进行阻断 HPV 致癌环节的研究具有重要意义。这方面研究最多的是反义核酸技术和靶向性核酶技术，体外研究表明这两种方法都能抑制宫颈癌细胞 HPV 致癌蛋白的表达，但体内给药时其效能不高。为此我们应用了小干扰 RNA 来阻断宫颈癌细胞中 HPV16 型 E6 的表达。

RNA 干扰技术是通过双链 RNA（double-sranded RNA，dsRNA）来阻断目的基因的表达。Yoshinouchi 等[6]针对 E6 基因合成 siRNA（short interfering RNA），作用于宫颈癌细胞后，观察到 E6 的表达被抑制。化学合成的 siRNA 在细胞内起作用的时间较短，不能长时间抑制 E6 的表达。以质粒为载体导入到细胞内，经转录后形成的 shRNA 能有效地对抗细胞内核酸酶的降解，可以发挥持续的抑制作用[7]；如果以病毒为载体则能进一步提高转染效率[8]，同时很便于进行实验动物的体内研究。本研究发现，应用慢病毒为载体的 shRNA 能有效地干扰宫颈癌细胞内 HPV16 型 E6 的表达，这为进一步探讨 HPV 诱发宫颈癌的机制及宫颈癌的生物治疗提供了新的方法。

慢病毒（lentivirus）载体是由人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）改建而来[9]，慢病毒系统由 2 部分组成：即包装成分和载体成分。包装成分由 HIV-1 基因组去除了包装、逆转录和整合所需的顺式作用序列而构建。为了最大限度降低其通过重组产生有复制能力野生病毒的可能性，我们的重组病毒生产采用了四质粒包装系统。由于慢病毒的感染效率高、激发免疫反应的作用弱，因此成为携带干扰 RNA 理想载体，目前还没有证据表明它对宿主细胞有毒性作用或对宿主细胞的活力有影响。本研究发现，慢病毒感染 Caski 后细胞的生长和增殖能力并无明显变化，这表明应用慢病毒进行生物治疗是可行的。

我们发现慢病毒感染后，细胞 Caski 细胞中 E6 的表达即被抑制，细胞的生长能力也明显被抑制。其原因可能是由于阻断 E6 使细胞恶性程度降低、细胞凋亡增加所致。筛选出来的细胞在培养到 1 个月时，E6 表达及细胞生长变化的结果均可重复；到 2 个月时，结果不能重复。这提示由慢病毒介导的 shRNA 对 HPV16 E6 表达及细胞生长的抑制作用可持续 1 个月以上，也提示慢病毒介导的 shRNA 对于进一步了解宫颈癌的发病机制和应用于生物治疗具有潜在的应用前景[10]。我们也在进行宫颈癌裸鼠动物模型实验以进一步研究。

参考文献：

[1] SCHEFFNER M, WHITAKER N J. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system[J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(1): 59-67.

[2] 郭建新，李 力. HPV 与宫颈癌疫苗研究进展[J]. 国外医学：妇幼保健分册，2004,15(6): 395-398.

[3] ELBASHIR S M, HARBORTH J, WEBER K, *et al*. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods, 2002, 26(2): 199-213.

[4] BRANTL S. Antisense-RNA regulation and RNA interference[J]. Biochim Biophys Acta, 2002,1575(1-3): 15-25.

[5] ANDERSON S M. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Clin Microbiol Newslett, 2002, 24(15):113-118.

[6] YOSHINOUCHI M, YAMADA T, KIZAKI M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA[J]. Mol Ther, 2003, 8(5): 762-768.

[7] BRUMMELKAMP T R, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.

[8] LIU C M, LIU D P, DONG W J, *et al*. Retrovirus vector-mediated stable gene silencing in human cell[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(3): 716-720.

[9] NISHITSUJI H, IKEDA T, MIYOSHI H, *et al*. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells[J]. Microbes Infect, 2004, 6(1): 76-85.

[10] OIKAWA K, OHBAYASHI T, KIYONO T, *et al*. Expression of a novel human gene, human wings apart-like (hWAPL), is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression[J]. Cancer Res, 2004, 64(10): 3545-3549.

（编辑 龙 亮）