论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0818-04

人类乳头瘤病毒16 E7真核表达载体构建及对A431皮肤鳞癌细胞增殖和侵袭的影响

李 颖,何 威,张 斌,吴 军,王儒鹏,林自华 (第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037)

摘 要:目的 构建HPV16 E7(E7)真核表达载体,观察E7过表达对A431细胞增殖和侵袭的影响。**方法** 从Caski细胞中抽提总RNA,针对E7序列设计特异引物,进行逆转录和聚合酶链式反应扩增得到E7 cDNA。应用基因工程方法将得到的PCR片段克隆至真核表达载体pEGFP-N1的多克隆位点。重组质粒经双酶切鉴定和测序后,使用Lipofectamine™ 2000转染A431细胞。Western blot检测E7在细胞中的表达。WST-1和Transwell系统分别检测细胞增殖和侵袭能力。流式细胞术检测转染前后细胞周期的变化。ELISA检测TGF-β分泌情况。**结果** 经酶切、测序鉴定,E7基因正确插入到pEGFP-N1多克隆位点,获得pEGFP- E7;Western blot检测结果显示:与未转染组相比,转染组E7蛋白高表达。过表达E7的A431细胞增殖和侵袭能力均显著增强,细胞周期中S期细胞数量增多,G_1期细胞数量相对减少。TGF-β分泌增多。**结论** E7过表达可改变细胞周期,提高皮肤鳞癌细胞的增殖和侵袭能力,而分泌增多的TGF-β并不能抑制肿瘤的增殖和侵袭。

关键词:HPV16 E7;A431皮肤鳞癌细胞;表达载体;增殖;侵袭;TGF-β

中图法分类号:R394-33;R730.23;R739.5 **文献标识码**:A

Construction of human papilloma virus 16 E7 eukaryotic expression vector and its effect on proliferation and invasion of A431 cells

LI Ying, HE Wei, ZHANG Bin, WU Jun, WANG Ru-peng, LIN Zi-hua (Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct an eukaryotic expression vector encoding human papilloma virus E7, and investigate the effect of E7 overexpression on the proliferation and invasion of human epithelial carcinoma cell line A431. **Methods** After total RNA from Caski cells was obtained by Tripurer, cDNA was amplified by RT-PCR and then cloned into pEGFP-N1 vector using gene engineering technology. Recombinant expression vector pEGFP-E7 was confirmed by restriction digestion and sequencing, and then transfected into A431 cells by liposome. Expression of E7 protein was detected by Western blotting. WST-1 assay and Transwell system were used to observe the growth and invasion of A431 cells. Cell cycle was measured by flow cytometry, and the expression of TGF-β in the supernatant was measured by ELISA. **Results** The recombinant expression vector pEGFP-E7 was successfully constructed. Western blotting indicated that E7 protein was overexpressed in A431 cells. Overexpression of E7 significantly increased cell proliferation and invasion. Flow cytometry showed there were more cells arresting in S phase and lesser in G_1 phase. Overexpression of E7 significantly improved the secretion of TGF-β in A431 cells. **Conclusion** Overexpression of E7 enhances tumor cell proliferation and invasion, although TGF-β secretion is increased at the same time.

Key words: human papilloma virus E7; human epithelial carcinoma cell line; expression vector; proliferation; TGF-β

人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是1种亲鳞状上皮无包膜的DNA病毒。HPV16除可引起外生殖器疣外,更重要的是可引起外生殖器癌。HPV16在头颈部鳞状细胞癌、膀胱癌和阴茎鳞状细胞癌(特别是疣状鳞癌)等中的检出率也显著高于对照组织[1,2]。HPV基因组分为3个功能区:早期转录区、晚期转录区和非转录区。早期转录区又称E区,其中

基金项目:第三军医大学新桥医院"1520"人才基金(2006)
Supported by the Foundation for the "1520" Talents of Xinqiao Hospital of Third Military Medical University (2006)

作者简介:李 颖,女,江西省九江市人,博士研究生,主要从事TGF β信号转导途径在皮肤肿瘤发病机制方面的研究。电话:(023)68755629,E-mail:liyingdoct@yahoo.com.cn

通信作者:何 威,电话:(023)68755629,E-mail:weiheskin@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-11-29;修回日期:2008-12-27

E7 区是发挥功能的主要结构。HPV16 E7 已被确认为重要的癌基因之一,可影响细胞周期的调控,被认为与细胞转化和肿瘤形成有关。本研究构建了 HPV16 E7 基因真核表达载体,旨在观察 HPV16 E7 过表达对皮肤鳞癌细胞即 A431 细胞株增殖和侵袭的影响,为进一步研究HPV16 E7在皮肤鳞癌发展过程中的作用提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

Caski 细胞和 A431 细胞(美国典型菌种保存中心),胎牛血清和高糖 DMEM(美国 Gibco 公司),质粒 pEGFP-N1(美国 Clontech 公司),Tripure 试剂(美国 Roche 公司),pMD19-T 载体、DNA 标准和限制性内切酶(日本 TaKaRa Bio 株式会社),Lipofectamine™2000(美国 Invitrogen 公司),胶回收试剂盒(美国 Omega 公司),质粒抽提试剂盒(北京博大泰克公司),PCR 引物合成及 DNA 测序(上海生工公司),鼠 HPV16 E7 单抗(美国 Neomarker 公司),鼠 β-actin 单抗(美国 Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司分装美国 Pierce 公司产品),ECL 化学发光试剂盒(美国 Pierce 公司),Transwell 小室(美国 Millipore 公司),Matrigel 胶(美国 Sigma 公司),WST-1 试剂盒(碧云天试剂公司),TGF-β ELISA 试剂盒(深圳晶美试剂公司)。其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　Caski 细胞和 A431 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基于 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度的孵箱中培养。当单层培养的细胞达到 70% ~80% 融合时,用 0.25% 胰蛋白酶液消化细胞,漂洗并离心收集细胞,进行传代或提取相应的蛋白。

1.2.2　RNA 抽提与逆转录　　孵箱中取出达到 70% ~80% 融合的 Caski 细胞,无菌预冷 PBS 冲洗 2 遍,加入 1 ml Tripure,参照试剂说明书要求抽提总 RNA。用紫外分光光度计测定浓度并检测 RNA 样品在 260 nm 与 280 nm 时的吸光度值,根据 $D(260)/D(280)$ 值判定 RNA 纯度。根据 RT-PCR 试剂盒说明书,利用 Oligo-dT 引物合成 cDNA。逆转录体系包括:5 × M-MLV buffer 4 μl, dNTP Mixture 1 μl, Oligo-dT mers 1 μl, M-MLV Rnase 0.5 μl, Rnase Inhibitor 0.5 μl, 总 RNA 1 μg, ddH_2O 补至总反应体系为 20 μl。42 ℃ 15 min 后,99 ℃ 5 min 使反转录酶失活,所得 cDNA 产物保存于 -20 ℃冰箱中待用。

1.2.3　PCR 扩增 HPV16 E7　　根据 GenBank 中的 HPV16 E7 序列(NC_001526)设计扩增 E7 基因全长编码区引物。上游引物:5′-ATGCATGGAGATACACCTACATTGC-3′, 下游引物 5′-TTATGGTTTCTGAGAACAGATGGGG-3′。全长 297 bp。以逆转录得到的 cDNA 为模板,使用 TaKaRa *LA Taq* 进行 PCR 扩增 HPV16 E7 基因。扩增条件为 94 ℃ 1 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 5 min。所获得的 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,对目的 DNA 片段切胶并回收纯化。

1.2.4　构建和鉴定 pEGFP-E7　　将胶回收的 PCR 产物和 pMD19-T 载体按适当比例 16 ℃连接过夜,次日将连接产物全量加入 100 μl DH5α 感受态细胞,热冲击后涂 LB/X-Gal/IPTG/Amp 平板,37 ℃过夜,挑取白色菌落的阳性克隆,接种至 LB/Amp 培养基内,恒温摇床 37 ℃ 180 r/min 振荡 14 h。取 3 ml 摇菌液抽提质粒 DNA,1.0% 琼脂糖凝胶电泳验证产物条带的正确性。pMD19T-E7 和 pEGFP-N1 分别用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切,1.0% 琼脂糖凝胶电泳,看到线性质粒和 DNA 片段,将目的 DNA 片段和 pEGFP-N1 线性质粒切胶回收纯化,16 ℃连接过夜,再次进行转化、摇菌和质粒的步骤,获得 pEGFP-E7 重组质粒,酶切鉴定后送上海生工公司测序。

1.2.5　基因转染　　根据 Invitrogen 公司试剂盒说明书操作。实验分为 3 组:对照组(未转染组)、pEGFP-N1 转染组和 pEGFP-E7 转染组。6 孔板内培养细胞至 60% 融合度时,用低血清培养基洗涤细胞,以 10 μl Lipofectamine™2000 转染 2.5 μg 质粒 DNA,6 h 后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,孵箱内继续孵育 72 h。

1.2.6　Western blot 检测转染后细胞 HPV16 E7 蛋白表达含量　　转染后 72 h 收集各组细胞,离心后使用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞,Brandforad 法测定蛋白浓度。每组各取 40 μg 蛋白进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳,半干转移至 NC 膜,5% 脱脂奶 TBST 液室温封闭 2 h,随后与 HPV16 E7 抗体(稀释度 1∶1 000)孵育过夜,次日洗膜后与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h,洗膜后使用 ECL 化学发光试剂盒显色,凝胶成像仪照相。Western blot 每步骤后均以 TBST 溶液进行漂洗 3 次,每次 10 min。

1.2.7　WST-1 实验检测细胞增殖　　WST-1 实验于 96 孔板内进行,实验分组同基因转染。计数细胞至 $1 \times 10^4\,ml^{-1}$,进行铺板,细胞至 70% 融合度时,PBS 轻洗涤,每孔加入 190 μl 新鲜 DMEM 培养基和 10 μl WST-1 溶液,继续培养 6 h。终止培养后,于酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度值[$D(490)$]。实验各组内均设 5 个复孔。

1.2.8　细胞体外迁移和侵袭能力实验　　选择孔径为 8 μm 的 Transwell 小室,小室内(上室)和 24 孔培养板(下室)之间建立起 Transwell 系统。用无血清 DMEM 培养基重悬细胞,计数调整至合适浓度后取 0.5 ml 接种于上室,下室加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基作为趋化因子,24 h 后取出小室,棉签擦去内表面的细胞,将小室置入 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min。将小室置于载玻片上,倒置相差显微镜下照相,计数迁移到小室外表面的细胞数目。每个样本计数 5 个高倍视野(×200)的细胞数。检测细胞侵袭能力与迁移能力实验唯一不同的是在小室上面铺 100 μl 无血清培养基稀释的 Matrigel 胶,其余步骤及结果分析均同迁移实验。

1.2.9　细胞周期实验　　应用流式细胞术检测转染前后 A431 细胞周期各时相变化。细胞培养及分组同 WST-1,不同之处是将 96 孔培养板改成 25 ml 培养瓶,培养结束后分别收集细胞,70% 冷乙醇固定,上机前过 40 目网,调整细胞数至 $1 \times 10^6\,ml^{-1}$,PI 染色,流式细胞仪检测。

1.2.10 ELISA 检测细胞培养上清中 TGF-β 浓度 细胞培养和实验分组同基因转染，转染后细胞于 72 h 收集培养上清。按 TGF-β ELISA 试剂盒说明书操作，同时测定标准品及各孔细胞培养上清液中 TGF-β 含量。抗人 TGF-β 单抗包被于酶标板上，标准品和样品中的 TGF-β 与单抗结合，形成免疫复合物连接在板上，底物显色，酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度值[$D(490)$]，与标准曲线对比测出标本中 TGF-β 含量。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，多组数据间用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 PCR 扩增 HPV16 E7

以 cDNA 为模板扩增得到 HPV16 E7 基因完整的编码区。1.0% 的琼脂糖凝胶电泳显示扩增的特异性片段在 300 bp 处，符合目的片段大小。

2.2 pEGFP-E7 克隆和鉴定

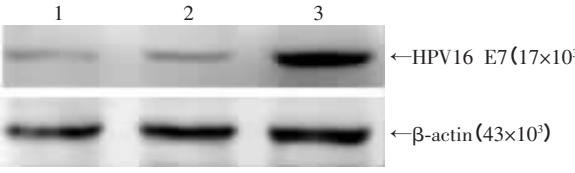
将胶回收得到的 HPV16 E7 PCR 产物和 pMD19-T 载体连接后进行筛选克隆，对菌液抽提得到的质粒 DNA 进行双酶切鉴定，1.0% 琼脂糖凝胶电泳可见在 2 700 bp 和 300 bp 处各有一亮带，与预期大小相符。而 *Eco*R Ⅰ单酶切仅在 3 000 bp 处有一亮带，与线性重组质粒大小一致。pMD19T-E7 和 pEGFP-N1 分别用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切，切胶纯化、连接、转化及质粒抽提后得到质粒 DNA。测序报告证实插入的 DNA 序列无突变，与 GenBank 中 HPV16 E7 序列完全一致。

2.3 HPV16 E7 在 A431 细胞中的表达

空质粒 pEGFP-N1 和重组质粒 pEGFP-E7 转染细胞 48 h 后，荧光显微镜观察到多数细胞表达绿色荧光。

2.4 Western blot 检测细胞转染前后 HPV16 E7 的表达

与未转染组比较，细胞转染 pEGFP-N1 后 HPV16 E7 表达无变化，但转染 pEGFP-E7 细胞 HPV16 E7 表达显著增加(图 1)。



1：未转染组；2：pEGPF-N1 转染组；3：pEGFP-E7 转染组

图 1 Western blot 检测 HPV16 E7 在 A431 细胞中的表达

2.5 细胞增殖、迁移和侵袭

WST-1 实验检测细胞增殖结果显示：与未转染组比较，pEGFP-N1 转染组细胞增殖无变化，pEGFP-E7 转染组细胞增殖较快(表 1)。无论是迁移实验还是铺 Matrigel 胶后的侵袭实验结果均显示：pEGFP-E7 转染的细胞穿过滤膜的细胞数明显增多($P<0.05$)。见表 1，图 2。

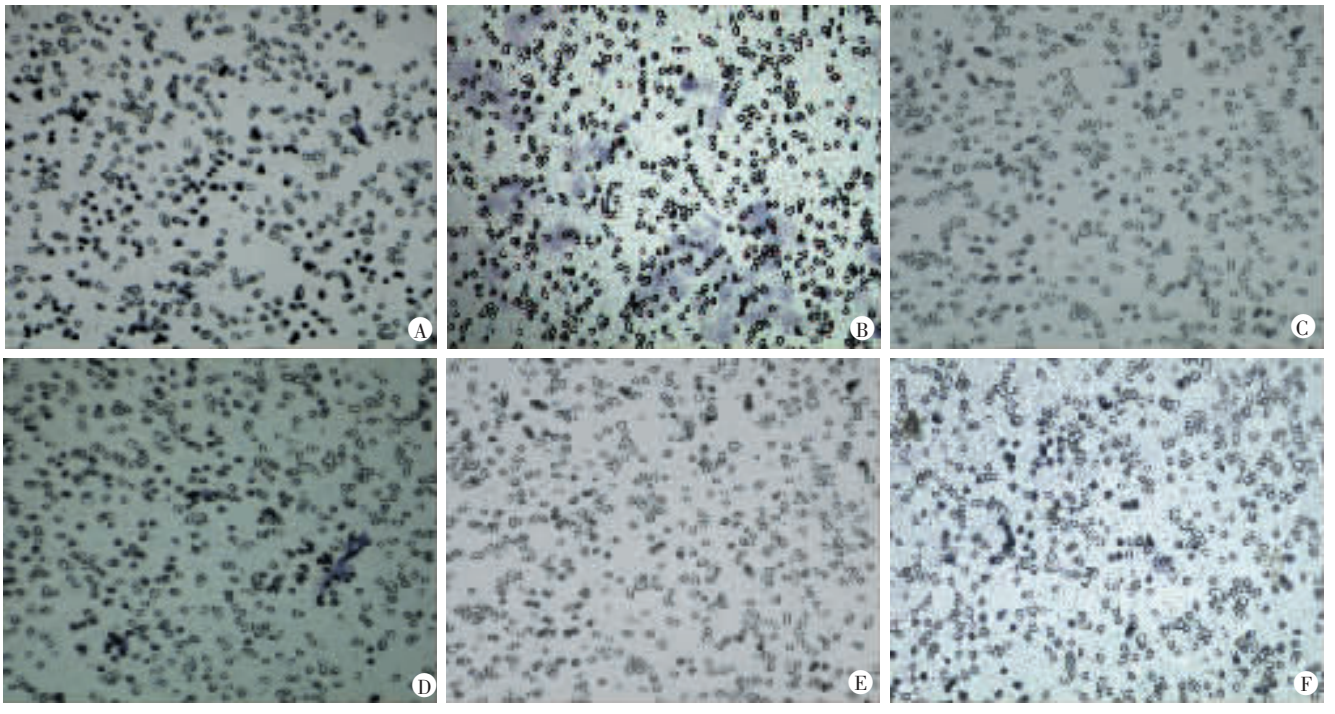
表 1 HPV16 E7 过表达 A431 细胞增殖、迁移和侵袭的影响
($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	$D(490)$	迁移细胞数	侵袭细胞数
未转染组	0.40 ± 0.08	41.4 ± 3.44	38.8 ± 6.83
pEGFP-N1 转染组	0.39 ± 0.06	42.4 ± 6.80	41.0 ± 5.39
pEGFP-E7 转染组	0.65 ± 0.07[a]	91.8 ± 9.36	86.4 ± 11.86[a]

a：$P<0.05$，与未转染组比较

2.6 细胞周期变化

流式细胞术结果显示，与未转染组比较，pEGFP-N1 转染组细胞周期无明显变化，而 pEGFP-E7 转染组细胞 S 期细胞数量增多，G_1期细胞数量减少(表 2)。



A、D：转染 pEGFP-E7 细胞；B、E：转染 pEGFP-N1 细胞；C、F：未转染细胞；A、B、C 为细胞迁移实验；D、E、F 为细胞侵袭实验

图 2 Transwell 实验检测转染 pEGFP-E7 细胞、pEGFP-N1 细胞和未转染细胞的迁移和侵袭能力 (HE×200)

表 2　HPV16 E7 过表达 A431 细胞周期的变化（$n=3$, $\bar{x}\pm s$）

组别	G_1	S
未转染组	44.83 ± 1.76	50.03 ± 3.50
pEGFP-N1 转染组	43.73 ± 1.56	50.46 ± 2.97
pEGFP-E7 转染组	37.40 ± 1.70[a]	60.10 ± 2.25[a]

a:$P<0.05$,与未转染组比较

2.7　TGF-β 含量检测结果

ELISA 结果显示,pEGFP-E7 转染组细胞 TGF-β 的分泌量显著高于转染 pEGFP-N1 转染组($P<0.01$)和未转染组($P<0.01$)。见表 3。

表 3　HPV16 E7 过表达 A431 细胞 TGF-β 含量的变化（$n=3$, $\bar{x}\pm s$）

组别	D(490)	TGF-β 含量(pg/ml)
未转染组	0.91 ± 0.04	48.01 ± 1.63
pEGFP-N1 转染组	0.90 ± 0.03	47.80 ± 1.08
pEGFP-E7 转染组	1.50 ± 0.24[a]	67.10 ± 7.09[a]

a: $P<0.01$,与未转染组比较

3　讨论

宫颈癌 Caski 细胞含有高拷贝(约 600 个拷贝)的 HPV16 病毒,我们从培养的 Caski 细胞中可以得到拷贝数高的 HPV16 E7 基因。通过构建表达 HPV16 E7 的绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-E7,转染 A431 细胞后,进行了荧光显微镜观察和 Western blot 实验,结果显示绿色荧光和 E7 在 A431 细胞中高表达。此外,本实验检测了过表达 HPV16 E7 在细胞增殖和侵袭中的作用,发现高表达 E7 的 A431 细胞中 TGF-β 自分泌增多,增殖和侵袭能力明显增强,提示 E7 过表达可增强 TGF-β 的分泌,促进 A431 细胞增殖和侵袭。

研究表明:HPV 能够增强鳞癌的易感性,甚至可与紫外线对皮肤的损伤形成叠加效应[3,4],诸多研究提示 HPV16 在鳞癌的发生和发展中发挥着重要的作用。高危型 HPV16 E7 编码的早期蛋白可影响细胞周期的调控,被认为与细胞转化和肿瘤形成有关[5]。本研究结果显示:过表达 HPV16 E7 可以促进鳞癌细胞进入 S 期,阻止细胞周期正常的停滞行为,肿瘤细胞增殖速度更快而且更具有侵袭性。

既往研究表明 TGF-β 是抑制表皮增殖主要的细胞因子,TGF-β 通过调节细胞周期蛋白和转录因子等途径实现其对细胞周期的阻滞作用,可令细胞周期停滞在 S 期,从而抑制细胞的生长[6]。部分感染 HPV 的皮肤肿瘤中出现 TGF-β 信号途径障碍,TGF-β 的表达并没有下降,反而升高。为什么高表达的 TGF-β 不能够发挥其固有的抑制细胞增殖的作用呢?

P16 通过调节细胞中活化的 cyclinD/CDK 表达水平间接调控细胞周期,正常情况下 P16 的表达由 TGF-β 直接调控。在高危型 HPV 感染的上皮中,E7 蛋白可竞争性抑制 P16 的表达,使得细胞顺利进入下一细胞周期,造成具有促增殖活性的 CDK 过度表达,细胞增殖失控[7]。通过分别被 HPV16 和 HPV18 转染的人包皮来源的角质形成细胞对 TGF-β1 反应性的研究显示,转染后的细胞存在 18q 和或 3p 位点的杂合性丢失,TGF-βR Ⅱ存在于 3p,Smad2 和 Smad4 存在于 18q。丢失了染色体的细胞获得永生化的表型,对 TGF-β1 的抑制作用产生抵抗。由此得出结论:HPV16 E7 可与细胞染色体整合,导致载有 TGF-β 信号转导途径重要基因的染色体丢失[8]。HPV16 E7 作用于 TGF-β 信号途径中的这些环节可能导致 TGF-β 抑制表皮增殖的作用不能发挥,因此出现了我们前期实验和本实验所观察到的 HPV16 感染的活体肿瘤中和体外培养的表皮鳞癌细胞中 TGF-β 表达没有下降,反而升高现象。本研究构建了 HPV16 E7 真核表达载体并成功转染人表皮鳞癌细胞,发现过表达 HPV16 E7 能够加剧皮肤鳞癌细胞过度增殖生长和转移的现象,为相关研究奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Iftner A, Klug S J, Garbe C, *et al*. The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors[J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7515 – 7519.

[2] Velazquez E F, Cubilla A L. Penile squamous cell carcinoma: anatomic, pathologic and viral studies in Paraguay (1993 – 2007)[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2007, 29(4): 185 – 198.

[3] Karagas M R, Nelson H H, Sehr P, *et al*. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin[J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(6): 389 – 395.

[4] Forslund O, Iftner T, Andersson K, *et al*. Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma[J]. J Infect Dis, 2007, 196(6): 876 – 883.

[5] 何清义, 李起鸿. 人乳头瘤病毒 16 E7(HPV16 E7)逆转录病毒载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 537 – 539.

[6] Yang Y, Pan X, Lei W, *et al*. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis *via* a cell cycle-dependent mechanism[J]. Oncogene, 2006, 25(55): 7235 – 7244.

[7] Nees M, Geoghegan J M, Munson P, *et al*. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes[J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4289 – 4298.

[8] Nindl I, Steenbergen R D, Schurek J O, *et al*. Assessment of TGF-beta1-mediated growth inhibition of HPV-16 and HPV-18-transfected foreskin keratinocytes during and following immortalization[J]. Arch Dermatol Res, 2003, 295(7): 297 – 304.

（编辑　王　红）