文章编号:1000-5404(2009)09-0835-04

论著

pcDNA3 转染 HPV16E6 基因对人宫颈癌细胞 C33A 细胞生长及周期的影响

杨秀坤[1],陈宣男[2],姜 铮[3] ([1]吉林省通化市人民医院妇产科,吉林 通化 134001;[2]吉林大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室,长春 130021;[3]中国人民解放军疾病预防控制所军队传染病控制中心,北京 100071)

摘 要:目的 探讨 HPV16E6 对宫颈癌 C33A 细胞生长增殖的影响。**方法** 通过脂质体法将 HPV16E6 基因稳定转染宫颈癌 C33A 细胞,RT-PCR 及 Western blot 分别检测转染细胞中 HPV16E6 mRNA 和蛋白表达水平,流式细胞仪检测 HPV16E6 基因转染对 C33A 细胞生长增殖与细胞周期的影响。**结果** 稳定转染获得了稳定表达 pcDNA3-HPV16E6 质粒的 C33A 细胞克隆(C33A-E6 细胞,即 pcDNA3/HPV16E6/C33A 组)及稳定复制空载体质粒的细胞克隆(C33A-P 细胞,即 pcDNA3/C33A 组),并将未转染的 C33A 细胞作为对照组。pcDNA3/HPV16E6/C33A 组细胞的生长速度比 pcDNA3/C33A 组和对照组明显加快($P<0.05$)。在转染了 HPV16E6 基因的 C33A 细胞中,其 DNA 合成前期 G_1 和静止期 G_0(G_0/G_1 期)细胞百分率(39.3%)明显低于 pcDNA3/C33A 组(53.7%)和对照组(55.4%)($P<0.01$);而处于 S 期细胞的百分率(38.3%)、DNA 合成后期 G_2 及分裂期 M 的细胞百分率(G_2/M:32.9%),均明显高于 pcDNA3/C33A 组(S:29.4%;G_2/M:17.0%)和对照组(S:28.0%;G_2/M:16.6%)($P<0.01$)。pcDNA3/C33A 组和对照组细胞周期的各期分布无明显差异($P>0.05$)。**结论** HPV16E6 可能通过某种途径参与了 C33A 细胞的周期调控,促进细胞分裂,从而促进 C33A 细胞的增殖。

关键词: 人乳头瘤病毒;宫颈癌细胞;增殖;细胞周期
中图法分类号: R394.2; R730.23; R737.33 **文献标识码:** A

HPV16E6 transfection improves growth and cell division of cervical carcinoma cell line C33A

YANG Xiu-kun[1], CHEN Xuan-nan[2], JIANG Zheng[3] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital of Tonghua City, Tonghua 134001, Jilin Province; [2]Department of Epidemiology and Health Statistics, College of Public Health, Jilin University, Changchun 130021; [3]Center for Disease Control and Prevention for Troops, Institute for Infectious Disease Prevention and Control of PLA, Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To investigate the transfection of human papilloma virus types 16E6 gene on the proliferation and apoptosis of cervical carcinoma cell line C33A. **Methods** Plasmid pcDNA3-HPV16E6 was stably transfected into C33A cells by liposome, and the expression of HPV16E6 mRNA and protein in the transfected cells, the cells transfected with blank vector and the cells without transfection were identified by RT-PCR and Western blot analysis. The growth, proliferation and cell cycles of the 3 kinds of C33A cells were by cell growth curve plotting and flow cytometry analysis. **Results** C33A cells were transfected stably by liposome with plasmid pcDNA3-HPV16E6 (C33A-E6 cells) and plasmid pcDNA3 (C33A-P cells). The growth of C33A-E6 cells was more rapid than those of C33A-P and C33A cells ($P<0.05$), indicating that HPV16E6 promoted the growth and proliferation of C33A cells. In C33A-E6 cells, the percentage of the cells at G_0/G_1 phase (39.3%) were significantly lower than those of C33A-P cells (53.7%) and C33A cells (55.4%) ($P<0.01$). But the percentage of the cells at S phase (38.3%) and at G_2/M phase (32.9%) were distinctly higher than those of C33A-P cells (29.4% and 17.0%) and C33A cells (28.0% and 16.6%) ($P<0.01$). However, there was significantly difference between C33A-P cells and C33A cells ($P>0.05$). **Conclusion** HPV16E6 is involved in the cell cycle probably through some signal pathways, and promotes cell division and proliferation of C33A cells.

Key words: human papilloma virus; cervical carcinoma cells; proliferation; cell cycles

作者简介: 杨秀坤,女,吉林省通化市人,副主任医师,主要从事妇产科临床和基础方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:13944596885
通信作者: 姜 铮,E-mail:kirk004@163.com
收稿日期: 2008-12-08;**修回日期:** 2009-02-16

人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)已经被证实与人宫颈癌密切关联,90%以上的宫颈癌中含有HPVDNA,其中最常见的致癌亚型是HPV16型和HPV18型[1],而HPVE6癌基因是宫颈癌发病机制研究的热点。E6蛋白是HPV病毒编码的6个早期表达蛋白之一,不同型的HPVE6蛋白共同特征是具有2个结构域,每个结构域含2个Cys-x-x-CyS组成的锌指结构,这些锌指结构是E6原癌蛋白功能的物质基础[2]。E6基因的作用方式主要是进入宿主DNA[3],破坏DNA结构及表达相应蛋白,干扰细胞的正常运转程序。E6癌蛋白的生物学功能包括细胞永生化、转化、肿瘤形成及凋亡等[4]。人宫颈癌细胞C33A是p53基因突变且HPV阴性的癌细胞株,英国学者Hampson等[5]将HPVE6、E7基因分别单独转染该细胞系,结果发现转染E6的C33A细胞生长速度要快于转染E7的C33A细胞,后者又快于空载体转染细胞。而且发现无论是在体外培养条件下还是移植肿瘤,转染E6基因的C33A细胞对电离辐射的抗性显著增加,而转染E7基因者对细胞的辐射敏感性无明显影响,表明尽管缺乏p53基因产物的参与,E6蛋白仍然能改变癌细胞的增殖能力和对辐射等基因毒作用的敏感性。

本研究通过体外实验建立稳定表达HPV16E6基因的C33A(p53突变型)宫颈癌转染细胞系(简称C33A-E6)及空载体转染的C33A细胞(简称C33A-P)。RT-PCR与Western blot验证转染细胞中HPV16E6基因的表达情况,并通过测定细胞生长曲线、流式细胞术等了解转染HPV16E6基因对C33A细胞生长增殖及细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及质粒 宫颈癌C33A细胞(p53基因突变型HPVE6表达阴性)由中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心提供。pcDNA3质粒为无目的基因的真核表达质粒,具有筛选标志G418的抗性基因。pcDNA3质粒与HPV16E6蛋白的真核表达质粒pcDNA3-HPV16E6均由军事医学科学院提供。

1.1.2 酶类、抗体及试剂盒 *Taq*酶购自美国Promega公司,蛋白酶K和RNA酶为美国GIBCOL/BRL公司产品。生物素标记的浓缩型羊抗人多克隆抗体HPV16E6(N-17)(sc-1584)和鼠抗人单克隆抗体P53(Pab240)(sc99)的一抗为SantaCruz产Pan,抗山羊和抗鼠的二抗购自北京生物制品公司。内参β-actin抗体为Upstate产品。逆转录试剂盒、PCR产物纯化试剂盒购自美国Promega公司,Trizol™ Reagent试剂购自美国GIBCOL/BRL公司。Lipofectamine2000转染试剂盒购自Invitrogen公司。流式细胞术双染Annexin V-FITC/pl试剂盒为BD公司产品。

1.1.3 PCR引物 引物序列通过Primer Premier软件设计,引物由大连宝生物工程有限公司合成。HPV16E6基因的引物:正义链:5′-TGACTTTGCTTTTCGGGATT-3′,反义链5′-TCAGGACACAGTGGCTTTTG-3′,产物大小210 bp;内参照GAPDH的引物:正义链:5′-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3′,反义链:5′-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3′,产物大小395 bp。

1.1.4 主要仪器 CO_2培养箱(购自Forma,美国),流式细胞仪(购自BD,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养与传代 C33A细胞用细胞完全培养液(DMEM培养基+10%胎牛血清+青、链霉素各100 U/ml),在37 ℃,100%湿度,5% CO_2培养箱中培养,在细胞生长达到对数生长期时,加入0.3~0.5 ml 0.125%~0.25%胰酶消化液,显微镜下观察,见到细胞变圆即将脱离瓶底时,即加入5 ml培养基终止消化,再加入适量培养基,分别接种,置于37 ℃,5% CO_2培养箱中培养。

1.2.2 pcDNA3/HPV16E6、pcDNA3稳定转染(脂质体法)宫颈癌C33A细胞 待细胞长至50%~80%融合度时开始转染,将A溶液(1~2 μg DNA+100 μl无血清培养液);B溶液(2~25 μl Lipofectamine 2000+100 μl无血清无双抗的DMEM培养液)两种溶液混匀,室温15~45 min,再用2 ml无血清培养液洗涤细胞2次,加入0.8 ml无血清DMEM培养液(不含抗生素)至Lipofectamine 2000-DNA混合液中,37 ℃,5% CO_2培养12 h。转染24 h后弃除转染液,换成完全培养基。48 h后细胞按1∶3~1∶5传代,待细胞贴壁长到50%融合时,更换含有筛选剂G418的培养液中筛选至第4周。最终获得稳定表达pcDNA3-HPV16E6质粒的C33A细胞克隆(C33A-E6细胞)及稳定复制空载体质粒的细胞克隆(C33A-P细胞),分别作为pcDNA3/HPV16E6/C33A组和pcDNA/C33A组,同时将未转染的C33A细胞作为对照组。

1.2.3 差异RT-PCR检测转染细胞中HPV16E6 mRNA水平 按Trizol™试剂盒操作程序提取细胞总RNA。按Promega公司的Reverse Transcription System操作程序进行逆转录反应,反应结束后,95 ℃,5 min灭活逆转录酶,冰上放置5 min。反应体系50 μl:TaKaRa *LA Taq*(5 μg/μl)0.5 μl,10×LA PCR Buffer(Mg^{2+} plus)5 μl,dNTP mixture 2 μl,cDNA模板1 μl,Primer(Forward)1 μl,Primer(Reverse)1 μl,去离子水39.5 μl。采用下列参数进行差异PCR:4 ℃,60 s;94 ℃,10 min,1个循环;94 ℃,40 s,54 ℃,40 s;72 ℃,45 s;30个循环,在第5个循环后加入5 mmol/L GAPDH上、下游引物混合物1 μl,继续进行25个循环,72 ℃,10 min,1个循环后终止。

1.2.4 Western b1ot检测转染细胞中HPV16E6蛋白表达水平 按照《分子克隆实验指南》第3版[6]进行。

1.2.5 生长曲线绘制 将pcDNA3/HPV16E6阳性克隆细胞C33A-E6、空白质粒对照C33A-P细胞及未转染的C33A细胞,调整细胞数约为$2\times10^4\ ml^{-1}$,接种到24孔培养板,1 ml/孔,于37 ℃,5% CO_2孵箱中培养。每隔24 h消化细胞计数,每次每种细胞计数3孔,取3孔细胞的平均数,共检测7 d,以细胞数为纵坐标,培养间隔天数为横坐标绘出生长曲线,计算对数生长期细胞的倍增时间。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,细胞增殖的比较用重复测量的方差分析。

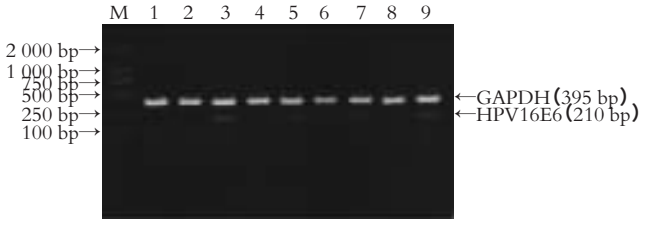
2　结果

2.1　HPV16E6 基因重组体的脂质体转染和克隆筛选鉴定

用脂质体转染的方法把含 HPV16E6 基因的真核表达载体导入 C33A 细胞中,建立和鉴定有 HPV16E6 基因表达的能稳定传代的转染细胞系,经 G418 进行筛选,在转染 pcDNA3/HPV16E6 重组体和 pcDNA3 空白载体质粒的 C33A 细胞中,约 2 周后可见典型的抗性克隆。挑选 8 个 pcDNA3/HPV16E6 重组体的抗性克隆扩大培养建立稳定的转染细胞系 pcDNA3/HPV16E6/C33A,挑选 4 个克隆扩大培养建立稳定的转染细胞系 pcDNA3/C33A。

2.2　RT-PCR 检测细胞 HPV16E6 mRNA 表达

RT-PCR 鉴定抗性克隆中 HPV16E6 的表达水平,采用设计的 HPV16E6 编码区的 1 对引物,产物大小为 210 bp,结果显示 8 个抗性克隆中 5 个克隆 HPV16E6 的表达为阳性(图 1)。

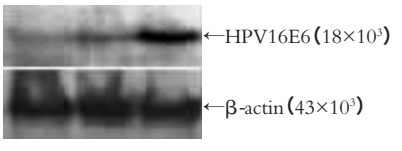


M:DNA 标准(DL 2000);1:对照组;2:pcDNA3/C33A 组;3-9:pcDNA3/HPV16E6/C33A 组

图 1　RT-PCR 检测细胞 HPV16E6 mRNA 表达水平

2.3　Western blot 检测转染细胞 HPV16E6 蛋白的表达

用 HPV16E6 多克隆抗体检测转染细胞系中 HPV16E6 的表达水平(图 2),结果显示转染 pcDNA3/HPV16E6 基因的细胞中可以看到一条约为 18×10^3 的条带,而在转染 pcDNA3 空载体及未转染的 C33A 细胞中,未检测到 HPV16E6 的表达,该结果证实了我们鉴定的稳定转染 HPV16E6 的阳性克隆细胞是正确的,并与 RT-PCR 检测结果的一致。

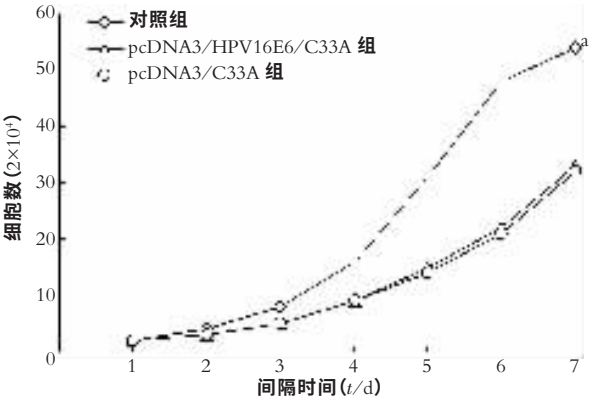


1:对照组;2:pcDNA3/C33A 组;3:pcDNA3/HPV16E6/C33A 组

图 2　Western blot 检测 HPV16E6 蛋白的表达

2.4　转染细胞生长曲线的绘制

分别将 pcDNA3/HPV16E6/C33A 阳性克隆细胞、pcDNA3/C33A 空白质粒转染的 C33A 细胞及未转染的 C33A 细胞,调整细胞数为 2×10^4 个细胞数接种于 24 孔板内,1 ml/孔,每隔 24 h 消化细胞计数,每次每种细胞计数 3 孔,取 3 孔细胞的平均数,共检测 7 d,以细胞数为纵坐标,培养间隔时间为横坐标,绘制生长曲线,计算对数生长期细胞的倍增时间(图 3)。pcDNA3/HPV16E6/C33A 组、pcDNA3/C33A 组和对照组的倍增时间分别是 24、32 h 和 33 h。用方差分析比较每组细胞每天的细胞计数均值,结果表明:转染 HPV16E6 基因的 C33A 细胞的生长速度比 pcDNA3/C33A 组和对照组明显加快($P<0.05$)。



a:$P<0.05$,与对照组和 pcDNA3/C33A 组比较

图 3　HPV16E6 基因转染对 C33A 细胞生长的影响

2.5　HPV16E6 基因转染对 C33A 细胞周期的影响

为探讨 HPV16E6 基因对 C33A 细胞生长周期的影响,采用流式细胞术检测上述 3 组细胞的细胞周期分布状况。在避光条件下,分别取生长状态良好、融合至 70% ~80% 的转染 HPV16E6、转染空白载体和未转染的 C33A 细胞各 3 瓶,PBS 洗涤后,70% 的乙醇固定,上机检测。用方差分析比较 3 组细胞的不同周期时相的细胞百分率,结果表明:pcDNA3/C33A 组和对照组细胞周期的各期分布无明显差异($P>0.05$)。在转染了 HPV16E6 基因的 C33A 细胞中,其 DNA 合成前期 G_1 和静止期 G_0(G_0/G_1期)细胞百分率明显低于 pcDNA3/C33A 组和对照组($P<0.01$);而处于 S 期细胞的百分率、DNA 合成后期 G_2 及分裂期 M 的细胞百分率,均明显高于 pcDNA3/C33A 组和对照组($P<0.01$,表 1)。提示 HPV16E6 可能通过某种途径参与了细胞周期的调控,促进细胞分裂,从而促进 C33A 细胞的增殖。

表 1　流式细胞仪检测 HPV16E6 基因转染细胞的细胞周期分布

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	55.4	28.0	16.6
pcDNA3/C33A 组	53.7	29.4	17.0
pcDNA3/HPV16E6/C33A 组	39.3[a]	38.3[a]	32.9[a]

a:$P<0.01$,与对照组和 pcDNA3/C33A 组比较

3　讨论

宫颈癌的死亡率在全球妇女恶性肿瘤死亡率中居第 2 位,发病率仅次于乳腺癌。高危型人乳头瘤状病毒(human papilloma virus,HPV)16、18、31、45 型在宫颈癌发生、发展及恶性表型的维持中起重要作用[7]。其中最常见的致癌亚型是 HPV16 型,约占感染者中 50% 以上的比例,它能诱发正常细胞永生化并恶变,参

与癌细胞的免疫逃避及放化疗耐受等[4]。研究表明，HPV16E6 基因通过其编码的 E6 蛋白使宿主细胞中抑癌基因 p53 降解失活[8]，失去对细胞的正常调控作用而引起细胞的无限制增殖并向恶性转化[9]，从而影响宫颈癌发生、发展及临床治疗效果。

本研究为了解 HPV16E6 基因在 p53 突变的 C33A 宫颈癌细胞生长影响，将 HPV16E6 基因稳定转染至 HPV 表达阴性且 p53 为突变型的宫颈癌细胞系 C33A 细胞中，生长曲线显示转染了 HPV16E6 基因的 C33A 细胞生长速度比未转染组及空白质粒对照组明显加快，提示 HPV16E6 对 C33A 细胞生长增殖有促进作用。本研究流式细胞术检测结果发现：在转染了 HPV16E6 基因的 C33A 细胞中，其 DNA 合成前期 G_1 和静止期 G_0（G_0/G_1 期）细胞百分率明显低于空载体转染组和未处理的 C33A 细胞（$P<0.01$）；而处于 S 期细胞的百分率、DNA 合成后期 G_2 及分裂期 M 的细胞百分率明显高于空载体转染组。提示 HPV16E6 不仅促进宫颈癌细胞的生长增殖，并参与了细胞的周期调控。

本实验通过体外实验从分子生物学角度揭示了 HPV16E6 蛋白影响宫颈癌细胞 C33A 的增殖现象，为深入利用该细胞模型探讨 HPV16E6 对不同 p53 基因型（突变型和野生型）宫颈癌细胞增殖分子机制提供了基础，对于揭示 HPV 致瘤机制及对 HPV 致瘤的预防和治疗都是非常有意义的。但是，在宫颈癌的化疗受到人们足够的重视却仍然处于研究探索阶段的背景下，是否用不同的化疗药物干预后 HPVE6 在宫颈癌中的作用机制及影响因素会有所不同？在不同 p53 基因状态情况下，HPVE6 对宫颈癌细胞增殖和化疗敏感性的影响及机制是否有所差别？尚需要更加全面深入的体内、体外实验的验证。本研究为进一步研究治疗宫颈癌的不同化疗药物的选择、使用剂量、干预时间以及联合用药的敏感性的影响提供了良好的模型。

参考文献：

[1] Yamato K, Fen J, Kobuchi H, *et al*. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(3): 234－241.

[2] Nomine Y, Msson M, Charbonnier S, *et al*. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis[J]. Mol Cell, 2006, 21(5): 665－678.

[3] Frazer I H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(1): 46－54.

[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] Hampson L, Hady E S, Moore J V, *et al*. The HPV16 E6 and E7 proteins and the radiation resistance of cervical carcinoma[J]. FASEB J, 2001, 15(8): 1445－1447.

[6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂，王嘉玺，朱厚础，等译. 第 3 版. 北京：科学出版社，2002：1713－1726.

[7] Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, *et al*. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to P53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006, 15(7): 1262－1267.

[8] Stewart D, Ghosh A, Matlashewski G. Involvement of nuclear export in human papillomavirus type 18 E6-mediated ubiquitination and degradation of p53[J]. J Virol, 2005, 79(14): 8773－8783.

[9] Stoler M H. The impact of human papillomavirus biology on the clinical practice of cervical pathology[J]. Pathol Case Rev, 2005, 10(3): 119－127.

（编辑　汪勤俭）

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的适用性，每篇文章或资料应标识 1 个文献标识码。一般设置以下 5 种标准。

A：理论与应用研究学术论文（包括综述报告）

B：实用性技术成果报告（科技）、理论学习与社会实践总结（社科）

C：业务指导与技术管理性文章（包括领导讲话、特约评论等）

D：一般动态性信息（通讯、报道、会议活动、专访等）

E：文件、资料（包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等）

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部