文章编号:1000-5404(2009)18-1757-04

论著

人乳头瘤病毒16 *E6* 基因沉默对鼻咽癌细胞侵袭转移能力及细胞周期的影响

沈 娜,张潜英,余晓燕,叶 琳,陈鸿雁 (重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

摘 要:目的 观察针对人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)16 *E6* 基因的RNA干扰(RNA interfering, RNAi)对人鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC) HNE-1细胞侵袭转移能力及细胞周期的影响,探讨HPV16 *E6* 基因作为鼻咽癌基因治疗标靶的可行性。**方法** 根据基因库上的HPV16 *E6* mRNA序列,设计合成针对HPV16 *E6* 的siRNA,转染HNE-1细胞,采用RT-PCR及Western blot分析 *E6* 基因的表达,利用侵袭实验检测细胞的侵袭能力,MTT法检测细胞的生长增殖,流式细胞术检测细胞周期。**结果** 针对HPV16 *E6* 的siRNA下调鼻咽癌HNE-1细胞株 *E6* mRNA和蛋白表达水平,分别下调66.3%、56.7%($P<0.05$);侵袭实验结果显示,siRNA转染组的穿膜细胞数为(45.3±4.0),显著低于阴性对照组[(147.7±4.7),$P<0.05$];转染组细胞的增殖受到抑制,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$);流式细胞术显示细胞阻滞于G_0/G_1期。**结论** siRNA可以有效干扰鼻咽癌HNE-1细胞内HPV16 *E6* 基因的表达,进而影响HNE-1细胞的侵袭转移能力,并抑制肿瘤细胞的生长增殖,使细胞周期重新分布。

关键词: 小干扰RNA;人乳头瘤病毒16 *E6*;侵袭;增殖;细胞周期
中图法分类号: R73-36;R730.23;R739.63 **文献标识码:** A

Human papillomavirus 16 *E6* gene silencing suppresses invasion and cell cycle of nasopharyngeal carcinoma cells *in vitro*

SHEN Na, ZHANG Qian-ying, YU Xiao-yan, YE Lin, CHEN Hong-yan (Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effect of HPV16 *E6*-targeted RNA interference (RNAi) on the invasion, metastasis ability and cell cycle of human nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line HNE-1 and investigate the feasibility of using HPV16 *E6* gene as therapeutic target for treatment of NPC. **Methods** According to HPV16 mRNA sequence in the Genbank, the siRNA against HPV16 *E6* were designed, synthesized and transfected into HNE-1 cells. The mRNA and protein expression of HPV16 *E6* were confirmed by RT-PCR and Western blotting, respectively. The invasion ability was determined by Transwell chamber. The cellular proliferation and cell cycle phase were examined respectively by MTT assay and flow cytometry analysis (FCM). **Results** The siRNA against HPV16 *E6* downregulated the expression of mRNA and protein dramatically in HNE-1 cells, with a rate of 66.3% and 56.7% respectively ($P<0.05$). The invasion assay demonstrated that the number of HNE-1 cells which crossed the membrane in siRNA transfection group (45.3±4.0) was significantly lower than that in negative control group (147.7±4.7) ($P<0.05$). After transfection, the proliferation of HNE-1 cells were inhibited and there was a remarkable difference compared with the control group ($P<0.05$). FCM showed that the cell cycle was arrested in the G_0/G_1 phase. **Conclusion** siRNA against HPV16 *E6* gene effectively inhibits the specific gene expression, and then restrain the invasion and metastasis ability of HNE-1 cells, inhibits cell proliferation, and induces cell cycle to redistribute.

Key words: siRNA; human papillomavirus 16 *E6*; invasion; proliferation; cell cycle

鼻咽癌是我国南方常见的头颈部恶性肿瘤。早期鼻咽癌患者对放射治疗敏感,但晚期患者放射治疗疗效欠佳,易出现复发和转移。因此,开展鼻咽癌基因治疗的研究具有特殊意义。新近研究发现,人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与头颈部恶性肿瘤有

基金项目:重庆市卫生局资助项目(07-1-021)
Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (07-1-021)
作者简介:沈 娜,女,四川省汉源县人,硕士,医师,主要从事头颈部肿瘤方面的研究。E-mail:dazhunnana@sohu.com
通信作者:陈鸿雁,E-mail:cchhyy787@sohu.com
收稿日期:2009-04-11;修回日期:2009-05-11

密切关系,其中 HPV16 的 E6 蛋白表达水平是维持癌症恶性表型的必要条件[1]。*E6* 基因可抑制 HPV 阳性细胞的凋亡效应,使细胞异常生长,最终导致基因异常的细胞生长失控[2],还能结合感染的宿主细胞 DNA,与细胞内抑癌基因 p53 结合,降低 p53 的抑癌功能,促进细胞的转化和癌细胞的发生[3]。我们先前的研究表明,HPV16 *E6* 在鼻咽癌组织石蜡切片及 HNE-1 细胞株中呈阳性表达,而在鼻咽部慢性炎症中未见表达,提示 HPV16 *E6* 可能与鼻咽癌的发生密切相关[4]。本实验在前期实验的基础上,拟采用 siRNA 沉默鼻咽癌 HNE-1 细胞株 HPV16 *E6* 基因,观察其对鼻咽癌细胞侵袭转移能力及细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人鼻咽癌细胞株(HNE-1)由重庆医科大学医学超声工程研究所惠赠,转染试剂 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司,RNAiso Reagent 和 RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,HPV16 E6 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,Western blot 相关试剂购自碧云天生物技术公司,DAB 试剂盒购自北京中杉公司,Transwell 小室及 Matrigel 购自 BD 公司,小牛血清、0.25% 胰蛋白酶和二甲基亚砜(DMSO)均购于北方同正生物制品公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒购自南京凯基生物制品公司。根据 GenBank 中 HPV16 *E6* 基因已知序列,按 siRNA 序列设计原则设计针对 HPV16 *E6* 的 siRNA,由上海吉玛制药技术有限公司合成特异性的 siRNA-1 和阴性对照 siRNA-2。siRNA-1 正义链:5′-CCGUUGUGUGAUUUGUUAAdtdt-3′,反义链:5′-UUAACAAAUCACACAACGGdtdt-3′;siRNA-2 正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′,反义链:5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′。

1.2 细胞培养和转染

人鼻咽癌 HNE-1 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中常规培养。实验分 3 组,空白对照组:加入无血清 RPMI1640 培养液;siRNA 转染组(siRNA-1);阴性对照组:加入阴性对照序列 siRNA-2。选取状态好的细胞,于转染前 12 ~ 24 h 将 HNE-1 细胞以 $(1 \sim 2) \times 10^5$ 接种于 6 孔培养板中,每孔加入无双抗的 RPMI1640 培养基,待细胞生长至覆盖培养板底面 70% ~ 80% 时进行转染。具体步骤参照脂质体 Lipofectamine™2000 转染说明书进行,siRNA 的终浓度为 2×10^{-7} mol/L。

1.3 RNA 提取及 RT-PCR 检测

收集转染后 48 h 细胞,按 RNAiso Reagent 试剂盒说明提取总 RNA,进行 RT-PCR 反应。HPV16 *E6* 引物上游:5′-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA-3′,下游:5′-CTGCAACAAGACATACATCGACCG-3′,扩增产物大小 407 bp;内参 GAPDH 引物上游:5′-TGGACCTGACCTGCCGTCTA-3′,下游:5′-GGAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3′,扩增产物大小 149 bp。PCR 条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min(循环 30 次)。PCR 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳后 EB 染色,在凝胶成像分析系统下成像分析,测定条带的光密度值,计算抑制率。

抑制率(%) = (1 − *E6*/GAPDH 光密度值) × 100%

1.4 Western blot 检测

收集转染后 48 h 细胞,提取转染前后细胞总蛋白。定量后取等量蛋白经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至硝酸纤维素滤膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗为 1∶50 稀释的鼠单克隆 HPV16 E6 抗体,37 ℃ 1 h 孵育后,加辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,37 ℃孵育 1 h 后用 DAB 显色。用 Quantity One 进行分析,比较条带的灰度值后进行半定量分析。

抑制率(%) = (1 − E6/β-actin 灰度值) × 100%

1.5 Transwell 实验

将 Transwell 小室放入 6 孔板中,将含有 Matrigel 的无血清培养基 1640 加在上层小室的滤膜上,37 ℃ 放置 4 ~ 5 h,同时下室加入含血清培养基。将转染后的细胞,胰酶消化后以含 0.1% 牛血清白蛋白的培养基重悬,调整细胞数为 2×10^5 接种入小室,37 ℃,5% 的 CO_2 培养箱中温育 12 h 后取出小室。用棉签小心擦除上层未穿膜的细胞与 Matrigel,冰甲醛固定滤膜后进行染色。剥离滤膜后正面朝下固定于载玻片上,光镜下计数滤膜下表面侵袭了基底膜的细胞数,随机计数 5 个高倍镜(×200)视野的细胞数目,并计数每个视野的平均穿膜细胞数,穿过的细胞越多,提示细胞的侵袭能力越强。

1.6 MTT 测定细胞的生长增殖

收集对数生长期的细胞,消化后以无双抗的 RPMI1640 培养基调整细胞数为 2×10^4/ml,接种于 96 孔板中,每孔 100 μl,常规培养 12 ~ 24 h 后按转染步骤转染。于转染后 24、48、72 h,在酶标仪上 490 nm 波长处检测细胞的光密度值[D(490)],每组设定 3 个复孔,取平均值。计算抑制率。

抑制率(%) = [1 − siRNA 转染组 D(490)值/阴性对照组 D(490)值] × 100%

1.7 流式细胞仪检测细胞周期的分布

于转染后 48 h 进行检测。收集以 PBS 洗涤 3 次后的细胞,制成单细胞悬液,调整细胞数为 2×10^6/ml,快速加入到 4 ℃预冷的 950 ml/L 乙醇中(终浓度为 70%)固定 24 h,送检。计算细胞的增殖指数 PI。

$$PI(\%) = (S + G_2 - M)/(G_0 - G_1 + S + G_2 - M) \times 100\%$$

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较用 t 检验。

2 结果

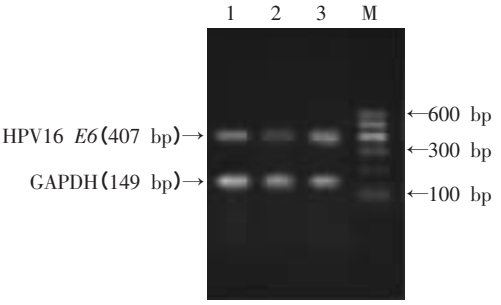
2.1 siRNA 对 HNE-1 细胞 HPV16 *E6* mRNA 表达的影响

siRNA 转染细胞株 48 h 后,siRNA-1 转染组的 HPV16 *E6* mRNA 表达水平较阴性对照组明显下调($P < 0.05$),其抑制率分别为 66.3%、7.3%,而空白对照组和阴性对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。

2.2 siRNA 对 HNE-1 细胞 HPV16 E6 蛋白表达的影响

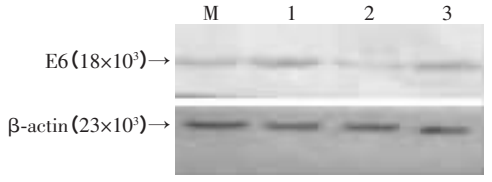
siRNA 转染细胞株 48 h 后,siRNA-1 转染组与阴性对照组

相比,E6 蛋白表达水平明显下调($P<0.05$),抑制率为分别 56.7%、18.9%,而空白对照组和阴性对照组间差异无统计学意义($P>0.05$,图 2)。



1:空白对照组;2:siRNA-1 转染组;3:阴性对照组;M: DNA标准

图 1　RT-PCR 检测转染 48 h 后 HNE-1 细胞株 *E6* mRNA 的表达



M:蛋白标准; 1:空白对照组; 2: siRNA-1 转染组; 3:阴性对照组

图 2　Western blot 检测转染 48 h 后 HNE-1 细胞株 E6 蛋白的表达

2.3　Transwell 实验检测细胞的侵袭力

侵袭实验的结果表明,HNE-1 细胞在 siRNA-1 转染后,其侵袭基质胶的能力较阴性对照组有明显下降,其穿膜细胞数为(45.3±4.0),而阴性对照组及空白对照组分别为(147.7±4.7)和(146.7±5.5)($P<0.05$,图 3)。

2.4　MTT 测定细胞的生长增殖情况

MTT 法结果显示,转染后 24、48、72 h,HPV16 *E6* siRNA-1 转染组的抑制率分别为 24%、23%、30%,与阴性对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

表 1　MTT 法检测 siRNA 转染对 HNE-1 细胞增殖抑制的影响

[$D(490),\bar{x}\pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.901±0.048	0.972±0.062	0.877±0.018
siRNA-1 转染组	0.686±0.028[a]	0.748±0.037[a]	0.614±0.040[a]
阴性对照组	0.909±0.039	0.980±0.055	0.869±0.039

a: $P<0.05$,与阴性对照组比较

2.5　转染后细胞周期分布的变化

siRNA-1 作用后 48 h,细胞周期分布情况见表 2,可见 siRNA-1 转染组 G_0/G_1 期细胞周期分布与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。siRNA-1 转染组细胞的增殖指数 PI 为 19.53%,明显低于阴性对照组(34.45%,$P<0.05$),说明转染组细胞的增殖受到抑制。

表 2　转染 siRNA 48 h 后 HNE-1 细胞周期的分布(%)

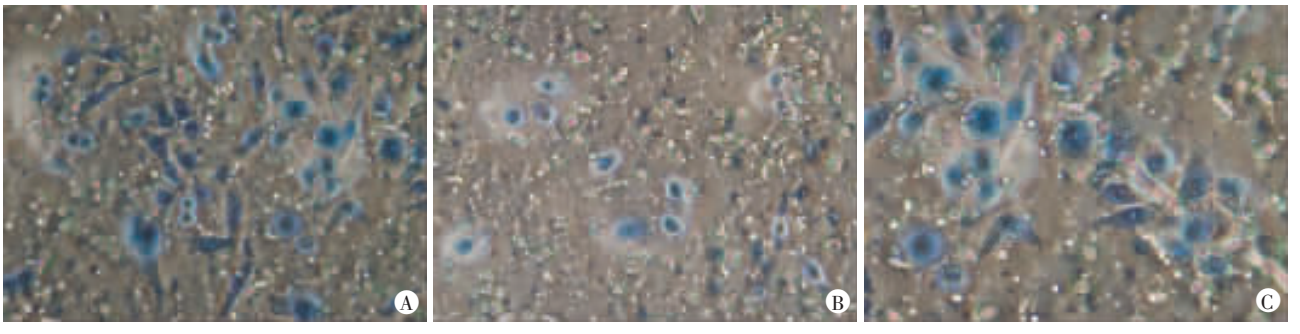
组别	G_0/G_1	G_2/M	S	PI
空白对照组	66.25±1.36	11.43±1.73	22.32±1.15	33.75
siRNA-1 转染组	80.46±1.47[a]	7.42±2.33[a]	12.11±1.48[a]	19.53[a]
阴性对照组	65.55±1.32	10.24±3.38	24.22±4.34	34.45

a: $P<0.05$,与阴性对照组比较

3　讨论

RNAi 为 1998 年发现的逆转基因功能的强大工具,它是内源性或外源性双链 RNA 诱发的 mRNA 水平上的基因沉默机制,具有高效性、高度特异性和作用迅速等优点[5,6]。在肿瘤基因治疗中,利用 RNAi 技术,通过人工合成特定癌基因靶向的 siRNA,或构建上述 siRNA 的表达载体,将其导入肿瘤细胞中,可以特异性地抑制目的基因的表达。siRNA 的设计和合成方法有多种,本实验在体外直接合成针对 HPV16 *E6* 的 siRNA,将其转染鼻咽癌 HNE-1 细胞株,观察 siRNA 对 HPV16 *E6* 基因的影响。结果发现体外合成的 siRNA 可以有效抑制 HPV16 的 *E6* mRNA 和蛋白水平的表达。恶性肿瘤具有侵袭转移的特征,由于 HPV16 *E6* 与鼻咽癌的发生密切相关,我们试图探讨 HPV16 *E6* 对鼻咽癌细胞侵袭转移相关生物学行为的影响。我们利用 Transwell 小室进行实验,结果提示抑制 HPV16 *E6* 的表达可显著降低 HNE-1 细胞侵袭力,提示 HPV16 *E6* 的表达可能与鼻咽癌细胞的侵袭转移能力有关。

HPV 病毒常存在于人体各部,为嗜上皮性病毒,人们根据 HPV 引起病变性质及预后把 HPV 分为高危和低危两大类。高危 HPV 易引起恶性肿瘤,其中最常见的类型是 HPV16 和 HPV18。HPV 的编码功能尤其



A:空白对照组; B: siRNA-1 转染组; C:阴性对照组

图 3　侵袭实验检测 siRNA 转染后 HNE-1 细胞侵袭力的变化(×400)

是 HPV16 型的编码功能被广泛的研究。研究显示,感染 HPV 的肿瘤及其来源的细胞系中 E6、E7 蛋白持续表达,提示 *E6*、*E7* 是发生致癌作用的主要基因[7]。其可能的机制是:*E6*、*E7* 基因在细胞的转化过程中相互协作,*E6* 癌基因编码合成的 E6 蛋白能结合细胞内野生型抑癌基因 P53 蛋白,并通过泛素依赖的蛋白裂解途径促进 P53 的降解,使 P53 对细胞增殖周期相关因子 P21、PCNA、Cyclins、Cdks 的调节作用丧失,改变 G_1 期进入 S 期的调控点,使细胞中 DNA 损伤累积,而且 P53 的降解还导致抑癌基因的功能降低,同时启动细胞周期,抑制细胞凋亡[8];而 E7 蛋白则可与 Rb 结合,使转录因子 E2F/Rb 复合体解离,导致游离 E2F 成比例增加,使 G_1/S 期转换所需的基因得以转录,致细胞生长失控[9],引起癌变。目前,利用 siRNA 已成功抑制了许多与肿瘤发生密切相关的基因的表达,从而达到了有效抑制肿瘤细胞生长的目的。本研究利用针对 HPV16 *E6* 的 siRNA 进行实验,发现经 siRNA 转染后的 HNE-1 细胞生长增殖明显受到抑制,细胞周期阻滞,提示这与致癌基因 *E6* 的表达受到抑制有关。

综上,利用 RNAi 技术抑制鼻咽癌 HNE-1 细胞中 HPV16 *E6* 基因的表达,可降低肿瘤细胞的侵袭力,但其在侵袭转移过程中的具体机制不清楚,有待进一步研究。细胞的增殖和凋亡是生物体正常生存的关键环节,而细胞的增殖是通过细胞周期实现的。白丽霞等[10]发现 HPV16 *E6* siRNA 能有效抑制宫颈癌 SiHa 细胞生长,我们的研究与之相符,提示将 siRNA 用于 HPV 感染相关肿瘤的基因治疗有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Cheng Y W, Wu M F, Wang J, *et al*. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation[J]. Cancer Res, 2007, 67(22): 10686 – 10693.

[2] Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, *et al*. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells[J]. Oncogene, 2003, 22(38): 5938 – 5945.

[3] 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.

[4] 吕彩凤. HPV16/18 E6、cyclinD_1、hTERT 在鼻咽癌、喉癌中的表达及临床意义[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2007.

[5] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806 – 811.

[6] 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.

[7] Rosty C, Sheffer M, Tsafrir D, *et al*. Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma[J]. Oncogene, 2005, 24(47): 7094 – 7104.

[8] Huibregtse J M, Scheffner M, Howley P M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with P53, and ubiquitination of associated proteins[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(8): 4918 – 4927.

[9] Daly N L, Arvanitis D A, Fairley J A, *et al*. Deregulation of RNA polymerase Ⅲ transcription in cervical epithelium in response to high-risk human papillomavirus[J]. Oncogene, 2005, 24(5): 880 – 888.

[10] 白丽霞, 赵 超, 李小平, 等. siRNA 对宫颈癌细胞系 HPV16 E6 基因的作用[J]. 中国妇产科临床杂志, 2005, 6(4): 284 – 288.

(编辑 龙 亮)

(上接 1748 页)

化系统疾病。有时出现剧烈上腹痛,近端和远端剥离均可出现后背疼痛,伴有血管迷走神经功能障碍表现,如大汗淋漓、不安、恶心、呕吐等。孕期出现上述情况极易误诊,常常在未明确诊断前就因动脉瘤破裂死亡[1,2]。诊断此病的手段有超声心动图、CT、MRI。有怀疑者应尽早做超声心动图检查[3],一旦诊断明确,需急诊手术,有心衰者需积极治疗,病情稳定后再手术。

妊娠期合并主动脉夹层对母子都是一个致命的危险。但若能及早发现并做出诊断,及时进行手术治疗就可以挽救患者和胎儿的生命。妊娠合并夹层动脉瘤需急诊行心脏手术,先处理心脏疾病,再考虑产科处理。如果患者为晚期妊娠合并夹层动脉瘤,可在心脏手术完成后立即行剖宫产术[3,4]。如果孕周尚早,胎儿离开母体不能存活,术后心功能恢复良好,完全可以期待至 37 周再终止妊娠。该例患者主动脉夹层分离从主动脉根部延至髂总动脉,术中处理了升主动脉根部夹层动脉瘤,余下动脉夹层中的血液需 4 周左右时间形成血栓并机化。所以在术后 1 个月终止妊娠对母亲较为安全。术后对胎儿的处理尚有争议,有作者认为不论胎儿死活,均应剖宫取胎,我们提供了夹层动脉瘤术后经阴道分娩的先例(该例患者经阴道分娩的有利条件是患者系经产妇、术后心功能Ⅱ级)。国外有学者报道 4 例晚期妊娠合并夹层动脉瘤患者,2 例心脏手术结束立即行剖宫产;1 例入院后因宫口已开大,经产妇阴道分娩后再行心脏手术;1 例心脏术后继续妊娠[4]。因此,产科医师当遇有剧烈腹痛伴恶心、呕吐,或伴高血压时,除考虑产科情况外,也应想到主动脉夹层动脉瘤的可能,及时做超声心动图或 CT、MRI,做到早发现、早治疗。

关键词: 妊娠;夹层动脉瘤;马凡综合征

中图法分类号: R714.252 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 牟 楠, 萧美茹. 晚期妊娠主动脉夹层动脉瘤破裂死亡 1 例[J]. 中国医药导报, 2008, 5(1): 122.

[2] 罗锦花, 齐荣义. 马凡综合征合并晚期妊娠猝死 1 例[J]. 实用妇产科杂志, 2007, 23(7): 447.

[3] 黑飞龙, 李春华, 杨天宇, 等. 妊娠 8 个月合并Ⅰ型夹层动脉瘤体外循环一例[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2002, 9(4): 250.

[4] Sakaguchi M, Kitahara H, Seto T, *et al*. Surgery for acute type A aortic dissection in pregnant patients with Marfan syndrome[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2005, 28(2): 280 – 285.

(编辑 王小寒)