维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0927-04

siRNA 抑制鼻咽癌 HNE-1 细胞株 HPV16 E6 的表达和细胞增殖

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:探讨小干扰 RNA(Small interferirng RNA,siRNA)对鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma,NPC)HNE-1 细胞株 HPV16 E6 基因表达的抑制作用,观察 HPV16 E6 基因沉默对鼻咽癌细胞生长的影响。方法:体外合成 4 条针对 HPV16 E6 基因的 siRNA,通过脂质体转染导入鼻咽癌 HNE-1 细胞。用 MTT 检测转染后癌细胞的生长增殖情况,用半定量逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)检测转染后 HPV16 E6 mRNA 的表达水平,用免疫组化技术检测鼻咽癌细胞中 HPV16 E6 蛋白的表达水平。结果:导入有效 siRNA 后,MTT 实验显示细胞的生长增殖受到明显抑制,抑制率可达 32%;PT-PCR 及免疫组化结果显示 RNA 干扰(RNA interfering,RNAi)可使 HNE-1 细胞中 HPV16 E6 mRNA 水平及蛋白表达水平下降。结论:siRNA 可以有效抑制 HNE-1 细胞株中 HPV16 E6 的表达,降低鼻咽癌细胞的增殖能力。RNAi 技术作为一种新的基因治疗技术在鼻咽癌治疗方面有着巨大的应用潜力。

【关键词】siRNA;HPV16 E6;RNA 干扰;鼻咽癌;基因沉默;逆转录聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】R766.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-01

siRNA inhibits HPV16 E6 expression and cell proliferation in HNE-1 cell line

SHEN Na,et al

(*Department of Otolaryngology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To evaluate the inhibitory effect of Small interferirng RNA(siRNA) on human papilloma vinus(HPV)16 E6 oncogenes in nasopharyngeal carcinoma(NPC) cell line HNE-1,and observe the effects of HPV16 E6 silencing on NPC cell growth. *Methods*:Four siRNA against the HPV16 E6 gene were designed and transfected into HNE-1 cell respectively using RNAi-Mate transfection reagent. MTT was used to investigate the cellular proliferation after the transfection. RT-PCR was used to detect the expression of HPV16 E6 and protein level of HPV16 E6 was measured by Immunohistochemical staining. *Results*:After the most effective siRNA was transfected into HNE-1cell,the result of MTT indicated that the cellular proliferation was restrained remarkably,and the highest inhibitory rate was 32%. Meanwhile,RT-PCR and immunohistochemical staining showed that there was a significant decrease in HPV16 E6 mRNA and protein level. *Conclusion*:These results demonstrated that siRNA against HPV16 E6 could effectively downregulate HPV16 E6 expression in HNE-1 cell line,and inhibit the cellular proliferation. RNAi has great potential in the treatment of nasopharyngeal carcinoma as a new gene therapy.

【Key words】 siRNA;HPV16 E6;RNAi;Nasopharyngeal carcinoma;Gene silence;Reverse transcription polymerase chain reaction

NPC 是我国南方常见的头颈部恶性肿瘤之一,我国每年约有 3 万例新发现的 NPC 患者。放射治疗是目前对鼻咽癌最有效的治疗手段,但放疗后复发及放疗后各种并发症,都要求我们寻找更好的治疗手段来解决。现陆续有研究提出并证实 HPV 与头颈部恶性肿瘤如扁桃体癌、鼻腔鼻窦癌及鼻咽癌有密切关系。研究表明,与头颈部鳞癌关系密切的 HPV 感染主要为高危的 16 和 18 型[1,2],HPV16、18 型的 E6/E7 蛋白已被确认为癌基因蛋白,是 HPV 主要的转化和致永生化蛋白,它们分别与细胞内肿瘤抑制物 p53、pRb 结合,干扰细胞周期的调节使细胞永生化,而 HPV16 的 E6 蛋白表达水平是维持癌症恶性表型的必要条件。

新近发现的 RNAi 是一种抑制特定基因产物表达的有效方法,他是通过双链 RNA 的介导特异地

作者介绍:沈 娜(1981-),女,硕士,研究方向:头颈部肿瘤。

通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:yanbbww128@163.com。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(项目编号:07-1-021)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

降解相应序列的 mRNA，从而阻断相应基因表达的转录后水平的基因沉默机制。本研究采用 RNA 干扰技术抑制 HPV16 E6 基因在鼻咽癌细胞中的表达，开展了 RNA 干扰治疗鼻咽癌的实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料

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，常规培养，取对数生长期的细胞实验。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)：购于南京凯基生物制品公司。RNAiso Reagent、RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。HPV16 E6 一抗 (Santa Cruz 公司)，通用型 SP kit 及 DAB 试剂盒(北京中杉公司)，RNAi-Mate 转染试剂(上海吉玛公司)，引物由重庆升博公司合成。

1.2 siRNA 的设计

查找出 HPV16 E6 mRNA 序列 (Gene Bank No.C001526)，由上海吉玛公司分别在不同区域选取了 4 个干扰位点，进行同源性分析以保证序列作用的特异性，最后相应设计了 4 条 siRNA，siRNA-5 为阴性对照(见表 1)。

1.3 细胞培养和转染

细胞株接种于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液，置于 37℃、5%的 CO_2 培养箱中常规培养。将细胞按 5×10^4 个接种于 6 孔板内，24h 内待细胞汇合达 60%后即可进行转染。操作按吉玛公司 RNAi-Mate 转染手册进行。收集转染后 48h 细胞备用。

1.4 MTT 测定细胞的生长增殖

选用对数生长期的细胞，以 2×10^4 个接种于 96 孔板中，24h 后按转染步骤转染 siRNA，继续培养。分别于 24、48、72h 后加 MTT 溶液 20μl /孔，培养 4h 后弃上清液，加二甲基亚砜 150μl/孔，振荡 10min 后在酶标仪上测定每孔的 OD_{570} 值。计算抑制率 =1- 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值。

1.5 转染前后 HPV16 E6 mRNA 的变化测定

从未转染和转染后的细胞中抽取总 RNA，按试剂盒说明书进行。HPV16 E6 引物：Sense:5'-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCA-3'；Antisense:5'-CTGCAACAAGACATACATCGACCG-3'，产物大小 407bp。内参 GAPDH 引物：Sense:5'-TGGACCTGACCTGCCGTCTA-3'；Antisense:5'-GGAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3'，产物大小 149bp。PCR 反应条件：94℃ 2min，94℃变性 30s，59℃退火 30s，72℃延伸 1min，30 个循环，末次延伸 10min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后，在紫外灯下拍照并进行扫描分析，以HPV16 E6 与 GAPDH 平均光密度值的比值来半定量反映 HPV16 E6 mRNA 的表达水平。

1.6 转染前后 HPV 蛋白在鼻咽癌细胞中的表达

将细胞用 0.25%的胰酶消化后，在 6 孔板里做细胞爬片，其中 3 孔进行转染。待细胞长到 60%融合时，用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次，4%甲醛室温固定 15min。按试剂盒说明书 SP 法进行免疫细胞化学染色(一抗浓度为 1∶50)，DAB 显色，最后用苏木素复染胞核，盐酸酒精分化后拍照，常规封片。

1.7 统计学处理

本实验所得数据采用 SPSS13.0 for Windows 统计软件进行分析。

2 结 果

2.1 siRNA 对细胞生长增殖的作用

MTT 显色后，在 570nm 波长条件下测定各孔的吸光度值(OD 值)，借此判定干扰后对细胞生长增殖的抑制作用。结果显示，HPV16 E6 siRNA-3 作用组的 OD 值较阴性对照组(siRNA-5)明显降低，其差异有显著的统计学意义($P<0.05$)；其余各组与阴

表 1 5 条 siRNA 模板序列

siRNA	序列
HPV16 E6 siRNA-1(正义链)	5'-ACUGCGACGUGAGGUAUAUdtdt-3'
siRNA-1(反义链)	5'-AUAUACCUCACGUCGCAGUdtdt-3'
HPV16 E6 siRNA-2(正义链)	5'-GUAUGGAACAACAUUAGAAdtdt-3'
siRNA-2(反义链)	5'-UUCUAAUGUUGUUCCAUACdtdt-3'
HPV16 E6 siRNA-3(正义链)	5'-CCGUUGUGUGAUUUGUUAAdtdt-3'
siRNA-3(反义链)	5'-UUAACAAAUCACACAACGGdtdt-3'
HPV16 E6 siRNA-4(正义链)	5'-GGUCGAUGUAUGUCUUGUUdtdt-3'
siRNA-4(反义链)	5'-AACAAGACAUACAUCGACCdtdt-3'
HPV16 E6 siRNA-5(正义链)	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
siRNA-5(反义链)	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

维普资讯 http://www.cqvip.com

性对照组相比，差异无显著的统计学意义（$P>0.05$）。siRNA-3 作用组抑制率在 3 个时间点分别为 24%、24%、32%（见表 2）。

2.2 siRNA 抑制 HPV16 E6 mRNA 的表达

细胞株经 siRNA 作用 48h 后，siRNA-3 实验组的 HPV16 E6 mRNA 表达水平较 siRNA-5 阴性对照组明显下调（$P<0.05$），最高抑制率可达 71%，其余各组 HPV16 E6 mRNA 表达水平无明显下降（$P>0.05$）（见图 1）。

2.3 转染 siRNA 后 HPV16 蛋白表达的变化

免疫细胞化学染色发现未转染细胞及 siRNA-5 阴性对照组细胞胞浆中有大量棕黄色阳性颗粒，提示细胞内有大量 HPV 表达；siRNA-3 转染后细胞浆内阳性颗粒几乎完全消失，提示 HPV 蛋白表达几乎完全被抑制（见图 2）。

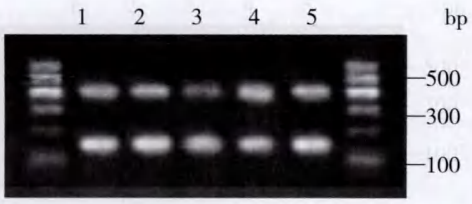


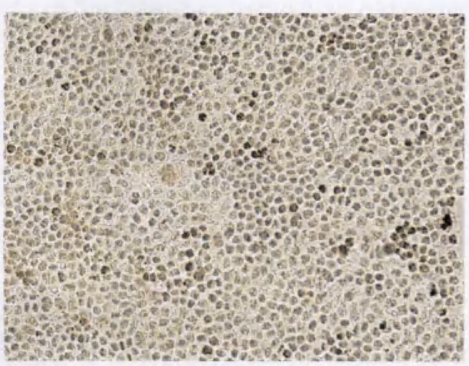
图 1 siRNA 转染鼻咽癌细胞 48h 后 RT-PCR 琼脂糖电泳结果

3 讨 论

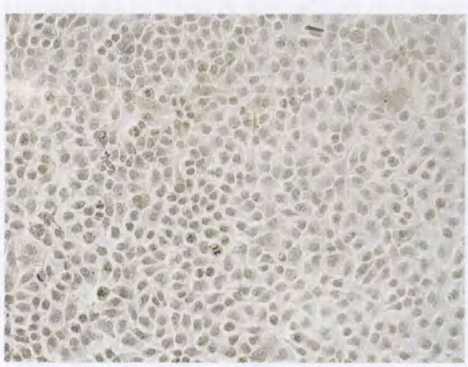
RNA 干扰是一种双链 RNA（Double-standed RNA，dsRNA）分子在 mRNA 水平上关闭相应序列的基因表达或使其沉默的过程，即序列特异性的转录后基因沉默（Posttranscription gene silencing，PTGS）。其作用机制现已初步阐明：即长的 dsRNA 被称为“Dicer”的核酸内切酶切割成 21~25nt 的短双链片段（siRNA）。“Dicer”是一种 ATP 依赖性核酸内切酶，属于 RnaseⅢ家族。siRNA 带有 3’端单链尾巴及磷酸化的 5’端，是 RNAi 的启始诱导物。siRNA 与 Dicer 形成沉默复合物（RNA induced silencing complex，RISC）。siRNA 作为引导序列引导 RISC 与同源性的 mRNA 结合，随后 siRNA 与 mRNA 在复合体中换位，核酸酶 Dicer 将 mRNA 切割成 21~25nt 的片段，从而可以降解特定目的基因转录产生的 mRNA，使其功能沉默。降解的 mRNA 被释放后，siRNA 双链重新形成，可以继续降解同源 mRNA[3,4]。RNAi 具有以下特点：（1）基因序列特异性：只抑制同源的 mRNA，对其他基因无作用。（2）稳定性：不容易被降解。（3）高效性：存在级联放大作用。（4）抑制作用迅速。正是由于这些特点，RNAi 技术近年来作为一个重要工具被用

表 2 MTT 法检测 siRNA 对人鼻咽癌细胞生长增殖的影响（OD 值）

分组	24h	48h	72h
siRNA-1	0.889 ± 0.038	1.004 ± 0.049	0.898 ± 0.087
siRNA-2	0.914 ± 0.015	1.013 ± 0.041	0.892 ± 0.025
siRNA-3	0.709 ± 0.019	0.772 ± 0.030	0.571 ± 0.037
siRNA-4	0.894 ± 0.073	0.979 ± 0.026	0.883 ± 0.052
siRNA-5	0.935 ± 0.041	1.017 ± 0.049	0.844 ± 0.051



SiRNA-5 转染后



siRNA-3 转染后

图 2 siRNA 转染鼻咽癌细胞前后免疫细胞化学染色结果

维普资讯 http://www.cqvip.com

于人类肿瘤的研究和治疗。

鼻咽癌是我国常见的肿瘤之一，国内外一系列研究表明 EB 病毒(Epstein-Barr Virus，EBV)在鼻咽癌的发生发展中起重要作用，其中缺失变异研究较多的是 LMP1、EBNA1 等基因[5]。现陆续有研究提出并证实 HPV 与头颈部鳞状上皮细胞癌如鼻腔鼻窦癌、鼻咽癌等密切相关，主要是 HPV16、18 型。HPV16、18 型的 E6/E7 蛋白已被确认为癌基因蛋白，分别与细胞内肿瘤抑制物 P53、Rb 结合，干扰细胞周期的调节使细胞永生化[6]，其中 HPV16 的 E6 蛋白表达水平在维持肿瘤恶性表型中具有重要意义。人类肿瘤的发生和发展大多由于基因的改变，通过 RNAi 的序列特异性来抑制或灭活这些基因异常的表达，就可以研究这些基因在肿瘤中的作用或抑制肿瘤的发生、发展[7,8]。但对于与 HPV 感染有关的肿瘤，利用 RNA 干扰技术造成 HPV 的主要致癌蛋白如 E6、E7 的表达抑制的研究报道，目前多见于宫颈癌。如牛晓宇等[9]研究证实，宫颈癌 CaSki 细胞中确实有 RNA 干扰现象存在，对外源性的 HPV16 病毒 E6 基因的干扰具有基因特异性和高效性。但在头颈部肿瘤方面报道甚少。我们用 4 条不同的 siRNA 作用于鼻咽癌细胞株 HNE-1，检测 HPV16 E6 的表达。结果发现其中一条 siRNA 能抑制 HPV16 E6 的表达，从而抑制细胞生长增殖。研究发现，针对同一基因不同靶序列的 siRNA 对基因表达的抑制能力差异很大[10,11]，这与我们的实验相符，但具体机制还不清楚，有待进一步研究。

本研究提示 RNA 干扰 HPV16 E6 能有效抑制鼻咽癌细胞的生长增殖，揭示了 RNA 干扰在鼻咽癌基因治疗上的潜在应用价值，为今后应用该技术治疗鼻咽癌提供了一定的实验室依据。

参 考 文 献

[1] Krishna SM, James S, Kattoor J, et al. Human papilloma virus infection in Indian nasopharyngeal carcinomas in relation to the histology of tumour[J]. Indian J Pathol Microhiol, 2004; 47(2): 181-185.

[2] Mineta H, Oqino T, Amano HM, et al. Human papilloma virus (HPV)type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 1998; 18(6B): 4765-4768.

[3] Elhashir SM, Lendecked W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes, 2001; 15(2): 188-200.

[4] Bernstein E, LCaudy AA, Hammond SM, et al. Role for a hidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001; 409(6818): 363-366.

[5] 杨玉成，王祎琴，钱 迪，等.重庆地区鼻咽癌患者血浆 EB 病毒 LMP1 基因检测及 N 端 *Xho* Ⅰ酶切位点变异分析[J].重庆医科大学学报，2007; 32(5): 464-466.

[6] Cheng YW, Wu MF, 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.

[7] Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, et al. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis hy activating NF-kappaB[J]. Nature, 2003; 424(6956): 797-801.

[8] Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, et al. RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumer cell signaling and survival[J]. Cancer Research, 2004; 64(21): 7962-7970.

[9] 牛晓宇，彭芝兰，王 和.RNA 干涉抑制宫颈癌 CaSki 细胞株 HPV16 E6 基因的研究[J]. 癌症，2004; 23(11): 1257-1262.

[10] Holen T, Amarzquioui M, Wiiger MT, et al. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor[J]. Nucleic Acids Res, 2002; 30(8): 1757-1766.

[11] Harborth J, Elhashir SM, Bechert K, et al.Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs[J]. J Cell Sci, 2001; 114(Pt 24): 4557-4565.

(责任编辑：关蕴良)

(上接第 926 页)

[8] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying methanism[J]. Diabeties, 2005; 54(6): 1615-1625.

[9] Aragno M, Mastrocola R, Bringnardello E, et al. Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of dianetic rats[J]. Endocrinology, 2002; 143: 3250-3258.

[10] Feldman EL. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem [J]. J Clin Invest, 2003; 11(4): 431-433.

[11] Szabo C. Roles of poly (ADP-ribose)polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications[J]. Pharmacological Research, 2005; 25(1): 60-71.

[12] Ametov AS, Barinov A, Dyck PJ, et al. The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial[J]. Diabetes Care, 2003; 26(7): 770-776.

(责任编辑：冉明会)