

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )03-0183-03

## 抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌细胞恶性表型的影响

郑燕芳, 饶智国, 张积仁 ( 第一军医大学珠江医院肿瘤中心, 广州 510282 )

**[ 摘要 ]** 目的: 研究特异性抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌细胞恶性表型的影响。方法: 以脂质体法将抗 HPV16E6 核酶、空载体质粒分别导入 CaSKi 细胞, 命名为 CaSKi-R, CaSKi-P 细胞。测定 CaSKi, CaSKi-R, CaSKi-P 3 种细胞的生长曲线和软琼脂克隆形成率, 流式细胞仪检测 3 种细胞中 HPV16E6, PCNA, C-erbB-2 蛋白的表达。将裸鼠分为 3 组, 分别在皮下接种 CaSKi, CaSKi-R, CaSKi-P 细胞, 检测细胞在裸鼠体内的成瘤能力; 另取一组裸鼠, 每只在右侧接种 CaSKi 细胞, 左侧接种 CaSKi-R 细胞, 对比这两种细胞的致瘤性。分析特异性抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌细胞恶性表型的影响。结果: CaSKi-P, CaSKi 细胞生长速率相近, CaSKi-R 细胞的生长速度明显降低。CaSKi-R 细胞的软琼脂克隆形成率明显低于 CaSKi 和 CaSKi-P 细胞。与 CaSKi 细胞相比, CaSKi-R 细胞表达 HPV16E6, PCNA, C-erbB-2 蛋白明显减少, 而 CaSKi-P 细胞无此改变。CaSKi 和 CaSKi-P 在裸鼠体内的致瘤性无显著差异, 而 CaSKi-R 的成瘤性显著低于 CaSKi。结论: 抗 HPV16E6 核酶的导入能部分逆转宫颈癌 CaSKi 细胞株的恶性表型, 其原因可能在于病毒癌基因 E6 表达的降低, 以及由此而引起的 PCNA, C-erbB-2 基因表达的降低。

**[ 关键词 ]** 核酶; 人乳头瘤病毒; 子宫颈肿瘤; 基因治疗

[ 中图分类号 ] R737.33 [ 文献标识码 ] A

## The Effect of Anti-HPV16 E6-Ribozyme on Malignant Phenotypes of Cervical Carcinoma Cell Line

ZHENG Yan-fang, RAO Zhi-guo, ZHANG Ji-ren ( The Oncology Center, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282, China )

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the characteristics of the cultured cervical cancer cell line transfected with anti-HPV16E6-ribozyme, and to investigate the possibility and practicality of ribozyme in treatment of cervical cancer. **Methods:** The anti-HPV16E6-ribozyme and empty eucaryotic expressing plasmids were transfected by lipofectin transfection into CaSKi cell, which named as CaSKi-R, CaSKi-P respectively. The morphology and the soft agar forming ability were studied. The expression of E6, PCNA and C-erbB-2 genes was studied through Flow Cytometry. The tumorigenicity of each cell was detected by injecting cells into the nude mice skin. Three groups of nude mice were injected by CaSKi, CaSKi-R and CaSKi-P cell separately. Another group of mice was injected by CaSKi cell on right side and CaSKi-R cell on left side. **Results:** There is no distinct difference of the morphology and growth rate between CaSKi and CaSKi-P, but the growth rate of CaSKi-R decreased. The soft agar-forming rate of CaSKi-P was similar with that of CaSKi cells, while that of CaSKi-R was found decreased. The result of flow cytometric analysis showed that anti-HPV16E6-ribozyme could reduce the expression of E6, PCNA and C-erbB-2 genes on CaSKi-R cells, while this phenomenon was not found on the CaSKi-P cells. The tumorigenicity of CaSKi-R in nude mice was decreased compared with CaSKi and CaSKi-P cells. **Conclusion:** Anti-HPVE6-ribozyme could partly reverse the malignant phenotypes of CaSKi cells. The reason may be the decrease of E6 gene expression, and the succeeding decrease of the PCNA and C-erbB-2 genes' expression.

**[ Key words ]** ribozyme; human papillomavirus; cervical cancer; gene therapy

\*<sup>1</sup> 研究表明,全世界发生的肿瘤中有 10% 与人乳头瘤病毒( human papillomavirus, HPV )有关,其中包括宫颈癌、口腔癌、喉癌等常见肿瘤。HPV 中最常见的致癌亚型是 HPV16 型,其中致癌基因 E6, E7 在细胞恶性转化及恶性表型的维持中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。核酶

( Ribozyme )是具有催化功能 RNA 分子,其研究为肿瘤

\* [ 基金项目 ] 本课题为广东省自然科学基金( 96058 )资助项目

[ 作者简介 ] 郑燕芳( 1974- ), 女, 江西上饶人, 博士、主治医师, 主要从事肿瘤的基因治疗和肿瘤相关病毒的研究。

基因治疗提供了有利的工具。本研究探讨了抗 HPV16E6 核酶转染对宫颈癌细胞表型的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

抗 HPV16E6 核酶由本室设计、克隆,基因序列为 TATCATGTACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGTTGTT-TG。体外切割实验证明它能特异性地切割 HPV16E6 基因<sup>[2]</sup>。pcDNA3 为无目的基因的真核表达质粒,pc16HRz 为抗 HPV16E6 核酶的真核表达质粒,由本室构建保存。感受态细菌为 JM105。CaSKi 细胞为 HPV16 阳性的人宫颈癌细胞株,本室传代培养。在前期研究中,本室以脂质体法将 pc16HRz 和 pcDNA3 分别转染 CaSKi 细胞,通过 G418(1 mg/ml)抗性筛选,扩增并保存阳性克隆细胞,分别命名为 CaSKi-R 和 CaSKi-P 细胞<sup>[3]</sup>。

### 1.2 细胞生长曲线的测定

分别取对数生长期的 CaSKi, CaSKi-R, CaSKi-P 细胞消化后,加入培养液制成  $10^4$ /ml 的细胞悬液,接种到 6 孔培养板,每孔 2 ml,于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。从次日起,每天取 3 孔细胞,消化后计数,取 3 孔细胞的平均数;以细胞培养天数对每瓶内的细胞数绘制细胞生长曲线。

### 1.3 细胞软琼脂培养

称取 1.0 g 和 0.6 g 琼脂,分别加入 112 ml 三蒸水,高压灭菌,即分别为 0.5% 和 0.3% 琼脂储存液,均置 4℃ 备用。在 50℃ 水浴下,取 0.5% 琼脂储存液 14 ml 加 11 ml 含 20% 小牛血清的 2 × DMEM 培养液,混匀,按每孔 1.0 ml 加入 24 孔培养板中,室温下凝固。在 50℃ 水浴下,取 0.3% 琼脂储存液 14 ml 加 11 ml 含 20% 小牛血清的 2 × DMEM 培养液,混匀。将对数生长期细胞制成细胞数为  $2 \times 10^5$ /ml 的悬液,置 4℃ 水浴。取之 0.1 ml 加入上述 25 ml 琼脂培养液中,混匀后,按 1.0 ml/孔加入已铺好下层琼脂的 24 孔培养板中,即为琼脂细胞上层。按上述方法分别接种 CaSKi, CaSKi-R 和 CaSKi-P 3 种细胞,于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的孵箱中培养 14 d,在倒置显微镜下观察。将细胞数大于 50 个细胞团作为克隆计数,取平均克隆数计算克隆形成率。每种细胞在每次实验中接种 3 块平皿,并进行 3 次实验。计数细胞集落,取其平均值。

$$\text{软琼脂克隆形成率}(\%) = \frac{\text{平均克隆数}}{\text{每孔加入的单细胞数}} \times 100\%$$

### 1.4 流式细胞术检测蛋白表达

检测 CaSKi, CaSKi-R, CaSKi-P 细胞中 HPV16E6, PCNA, C-erbB-2 蛋白的表达,抗 HPV16E6, PCNA 和 C-erbB-2 单抗购自武汉博士德公司;FITC 标记的二抗购

自北京中山公司;流式细胞仪由本校中心实验室提供。流式细胞术常规法检测 3 种细胞中蛋白的表达。每项检测重复 3 次以上,取平均值。

### 1.5 裸鼠体内致瘤性检测

收集对数生长期的细胞,调整浓度至  $1 \times 10^7$ /ml,取 0.1 ml 接种于裸鼠皮下。15 只裸鼠分 3 组,分别接种 CaSKi, CaSKi-R 和 CaSKi-P 细胞。观察 8 周,每周测量肿瘤平均直径,对比这 3 种细胞的致瘤性。另取 5 只裸鼠,每只在右侧接种 CaSKi 细胞,左侧接种 CaSKi-R 细胞。观察 8 周,每周测量肿瘤平均直径,对比这两种细胞的致瘤性。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长曲线的变化

CaSKi-R, CaSKi-P, CaSKi 细胞均是长梭形,贴壁生长,形态无显著差异。由所绘制的生长曲线图可知, CaSKi-P 和 CaSKi 细胞的生长速率相近,而 CaSKi-R 细胞的生长速度明显降低。表明抗 HPV16E6-Ribozyme 的导入影响了细胞的生长(见图 1)。

图 1 3 种宫颈癌细胞的生长曲线图

Fig. 1 Cell curve of three cervical cancer cells

### 2.2 细胞软琼脂克隆形成率

在 0.3% 软琼脂培养基内可见细胞克隆形成,克隆形成率 CaSKi-R 细胞为 0.5%, CaSKi-P 细胞为 1.1%, CaSKi 细胞为 1.2%;以 CaSKi 细胞为对照,可见 CaSKi-R 细胞克隆形成率显著降低( $P < 0.05$ )。

### 2.3 HPV16E6 蛋白的表达

流式细胞术测得 CaSKi, CaSKi-P 和 CaSKi-R 中 HPV16E6 的平均表达率分别为 63.7%, 61.5% 和 13.4%,统计分析发现, CaSKi, CaSKi-P 细胞 HPV16E6 蛋白的表达量无明显差异,而 CaSKi-R 细胞 HPV16E6 蛋白表达明显减弱( $P < 0.01$ ,见图 2)。

### 2.4 PCNA, C-erbB-2 蛋白的表达

流式细胞术测得 CaSKi, CaSKi-P 和 CaSKi-R 中 PCNA 的平均表达率分别为 64.3%, 62.9% 和 33.1%,

C-erbB-2 表达率分别为 55.1%、49.2% 和 23.8%。统计分析发现, CaSKi, CaSKi-P 细胞 PCNA, C-erbB-2 蛋白的表达量无明显差异, 而 CaSKi-R 细胞 PCNA, C-erbB-2 表达明显减弱 ( $P < 0.01$ , 见图 2)。

图 2 3 种宫颈癌细胞中蛋白的表达

Fig. 2 The expression of some proteins in three kinds of cells

### 2.5 致瘤性检测

接种 CaSKi, CaSKi-P 的裸鼠, 约 2 周后在接种部位能摸到有肿块形成, 第 3 周形成肉眼可见的肿块, 第 8 周末肿块平均直径分别为 2.1 和 1.9 cm。接种 CaSKi-R 的裸鼠, 第 3 周才能摸到有肿块形成, 第 4 周形成肉眼可见的肿块, 最终平均直径为 1 cm。统计分析发现, CaSKi 和 CaSKi-P 致瘤性无显著差异, 而 CaSKi-R 致瘤性显著低于 CaSKi。裸鼠左侧接种 CaSKi-R 细胞, 右侧接种 CaSKi 细胞。右侧第 3 周形成肉眼可见的肿块, 第 8 周末肿块平均直径为 1.8 cm。左侧第 4 周形成肉眼可见的肿块, 第 8 周末肿块平均直径为 0.8 cm。

### 3 讨论

研究表明, HPV 在宫颈癌的发生、发展及恶性表型的维持中起着重要的作用, 80% 的宫颈癌与 HPV16 相关, 其 E6, E7 基因异常表达是关键。核酶是一类具有催化活性的 RNA 分子, 因其能特异性结合并切割靶 RNA, 且易于人工设计、合成, 因此用于抗病毒、抗肿瘤的基因治疗研究<sup>[4]</sup>。体外切割实验证实抗 HPV16E6 核酶能特异性切割 HPV16E6 mRNA<sup>[5]</sup>。本研究将抗 HPV16E6 核酶导入 HPV16 阳性的宫颈癌 CaSKi 细胞株中, 部分逆转了 CaSKi 细胞的恶性表型。这可能是由于抗 HPV16E6 核酶的特异性切割, 导致 HPV16E6 癌基因表达水平降低所致, 说明 HPV16E6 癌基因的表达水平对维持宫颈癌细胞的恶性表型起着重要作用<sup>[6]</sup>。国内外类似的研究较少, Chen 等<sup>[4]</sup>将抗 HPV18E7 的核酶导入 HPV18 阳性的宫颈癌细胞中, 其恶性表型得到部分逆转。

癌基因是指在细胞内或病毒内存在的, 能诱导支

持细胞发生转化, 使正常细胞获得一个或更多的新生物特性的基因。癌基因在细胞的生长和分化调节中起重要作用。癌基因激活引起细胞与生长信号的脱节, 导致了肿瘤的发生。C-erbB-2 是重要的癌基因, 又称 HER-2 或 neu 基因, 编码蛋白分子量为 185 kD, 该蛋白具有酪氨酸激酶的活性, 能促进细胞生长和分化。研究表明, 其蛋白高表达可发生于多种肿瘤中, C-erbB-2 高表达的病例大多分化程度低, 淋巴结转移率高, 复发早, 预后差<sup>[7]</sup>。PCNA 增殖核细胞抗原积聚于 S 期复制细胞核内的细胞周期蛋白, 是重要的细胞周期调控物质。它反映了细胞的增殖活性。在 HPV16 阳性的宫颈癌细胞中, HPV16E6 蛋白可在一种细胞蛋白 E6AP 的辅助下结合 P53 蛋白, 并造成野生型 P53 蛋白降解, 而野生型 P53 蛋白能通过 P21 蛋白抑制 PCNA 的表达。因此, E6 蛋白阻断了野生型 P53 的表达, 引起 PCNA 表达作用的增强<sup>[8]</sup>。本研究发现, 伴随着核酶的导入和 HPV16E6 基因表达的降低, PCNA, C-erbB-2 等基因的表达也降低。由此我们推测, 在 HPV16 诱发肿瘤的过程中, E6 基因的高表达引起 PCNA, C-erbB-2 表达增高, 可能是 E6 基因的致癌机制之一。

综上所述, 本研究显示, 抗 HPV16E6-Ribozyme 的导入能部分逆转宫颈癌 CaSKi 细胞株的恶性表型, 其原因可能在于病毒癌基因 E6 表达的降低, 以及由此而引起的 PCNA, C-erbB-2 等基因表达的降低。

### [参考文献]

- [1] Alani RM, Munger K. Human Papillomavirus and associated malignancies[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(1): 330-337.
- [2] 郑燕芳, 张积仁, 屈良鹄, 等. 两种抗 HPV 核酶的设计、表达与活性鉴定[J]. 中华实验与临床病毒学杂志, 1999, 13(2): 238-242.
- [3] 郑燕芳, 张积仁. 特异性核酶诱导宫颈癌细胞凋亡的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(3): 178-182.
- [4] Chen Z, Kamath P, Zhang S, et al. Effects on tumor cells of ribozymes that cleave the RNA transcripts of human papillomavirus type 18[J]. Cancer Gene Ther, 1996, 3(1): 18-23.
- [5] Zheng YF, Zhang JR, Qu LH, et al. Effectiveness of a ribozyme for cleavage of an RNA transcript from human papillomavirus type 16[J]. Int J Modern Cancer Ther, 1998, 1(1): 134-138.
- [6] Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals[J]. J Virol, 1999, 73(7): 5887-5891.
- [7] Ignatoski KM, Lapointe AJ, Radany EH, et al. ErbB-2 overexpression in human mammary epithelial cells confers growth factor independence[J]. Endocrinology, 1999, 140(8): 3615-3624.
- [8] Lu S, Tiekso J, Hietanen S, et al. Expression of cell-cycle proteins p53, p21 (WAF-1), PCNA and Ki-67 in benign, premalignant and malignant skin lesions with implicated HPV involvement[J]. Acta Derm Venereol, 1999, 79(4): 268-272.

[收稿日期] 2002-04-27

[修回日期] 2002-06-25