

慢病毒介导的 *HPV16-E7* 基因 RNAi 细胞模型的建立

阿比达·阿不都卡德尔¹, 阿仙姑·哈斯木², 赛米热·艾尼瓦尔², 阿布力孜·阿布杜拉³, 盛磊³

1. 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学新疆地方病分子生物学重点实验室, 乌鲁木齐 830011

摘要 建立 *HPV16-E7* 基因的 RNAi 细胞模型, 可为进一步研究 *HPV16-E7* 蛋白作用及致癌机制提供物质前提。选择 *HPV16-E7* 基因特异的 siRNA 片段, 构建慢病毒 siRNA 重组表达载体, 经 293FT 病毒包装细胞转染产生重组病毒, 并以此感染 *HPV16* 阳性 SiHa 宫颈癌细胞、抗菌素筛选和分子生物学鉴定, 建立了稳定表达 *HPV16-E7*-siRNA 的 RNAi 细胞模型。该细胞模型, 对目标基因 (*E7*) 表达的抑制效率, 也以蛋白免疫印迹和 RT-PCR 确证。由此得出, 利用慢病毒载体和 *HPV16-E7* 基因特异的 siRNA 片段, 可以建立一种稳定、有效和可行的 RNAi 细胞模型, 为进一步研究 *E7* 蛋白的作用及致癌机制奠定了重要的物质基础。

关键词 RNAi; 慢病毒; 宫颈癌; *HPV16*; *E7* 基因

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.35.011

Construction of Lentivirus-mediated *HPV16-E7* Gene RNAi Cell Model

ABUDUKADEER Abida¹, HASIMU Axiangu², AINIWAER Saimire², ABULIZI Abudula³, SHENG Lei³

1. The First Afiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract The *HPV16-E7* gene RNAi cell model was constructed. A recombinant lentiviral siRNA expression vector was constructed using a *HPV16-E7* oncogene specific siRNA fragment, and an RNAi cell model stably expressing the *HPV16-E7*-siRNA was established by transfection of 293FT virus-packaging cells with the viral vector followed by infection of *HPV16*-positive SiHa carcinoma cells with recombinant virus, antibiotic selection and molecular biological characterization. RNAi cell model was successfully established, stably transcribing the *HPV16-E7*-siRNA fragment, and the inhibitory effect on target gene (*E7*) was also characterized by western blotting and RT-PCR. The RNAi cell model expressing the *HPV16-E7* gene-specific siRNA fragment using lentiviral vector was stable, effective and feasible, which lays the foundation for the role study and carcinogenic mechanism of *E7* protein.

Keywords RNAi; lentivirus; cervical cancer; *HPV16*; *E7* gene

0 引言

每年宫颈癌夺取近 27 万妇女的生命, 占妇女癌症死亡率的 9%, 成为严重威胁妇女健康的恶性肿瘤^[1-4]。在中国, 妇女宫颈癌死亡比仅次于胃癌^[5]。人乳头瘤病毒 (Human Papilloma Virus, HPV) 是宫颈癌发生的首要因素^[6], 根据其致

病程度与癌症转化能力分为高、中和低危型等 3 种类型, 其中高危型 HPV (如 *HPV16* 或 *18*) 在宫颈癌的检出率达到 80% 以上^[7-9]。宫颈癌病例中, 宫颈鳞癌约占 80%, 其余为宫颈腺癌, 而且 *HPV16* 感染可能与宫颈鳞癌关系最为密切, 其在 HPV 阳性患者中的检出率高达 95%, 而 *HPV18* 是宫颈腺癌

收稿日期: 2013-06-28; 修回日期: 2013-11-05

基金项目: 新疆医科大学第一附属医院科研奖励基金项目 (2011YFY12)

作者简介: 阿比达·阿不都卡德尔, 副主任医师, 研究方向为妇科肿瘤, 电子信箱: abida0724@126.com; 盛磊 (通信作者), 实验师, 研究方向为宫颈癌的发病机制与早期预警, 电子信箱: shenglei950505@163.com

的主要感染型别^[9]。随着 HPV 的深入研究,E7 蛋白被认为是 HPV 主要的致癌蛋白。本研究以 *HPV16-E7* 基因为对象,利用 RNA 干扰技术建立 *HPV16-E7* 基因的 RNAi 细胞模型,是进一步研究 E7 蛋白的作用及致癌机制的前提。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

在慢病毒表达载体构建中,实验主要使用了 BLOCK-iT U6 RNAi Entry Vector Kit (Invitrogen 公司),在 RNAi 细胞模型建立中主要使用了 BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System(Invitrogen 公司)。在 Western Blot 检测鉴定过程中使用的 *HPV16-E7* 的一抗(鼠来源)来自于 SANTA CRUZ 公司, β -actin 的一抗(兔来源)及二抗(山羊抗鼠及山羊抗兔)均来自于北京中杉金桥生物技术有限公司,实验中使用的 SiHa 细胞株来自于中国科学院上海生物化学研究所细胞库。

1.2 方法

1.2.1 *HPV16-E7* 基因慢病毒 RNAi 表达载体的构建

经文献查询获得了比较公认的 *HPV16-E7* 基因特异性 siRNA 序列^[10],结合慢病毒 siRNA 载体表达的设计要求,最终设计了适合慢病毒表达载体的特异性 *HPV16-E7* 片段,其序列与片段大小见表 1。然后将该片段克隆到 pENTR/U6-siRNA 载体上,构建了 pENTR/U6-E7-siRNA 载体(克隆载体),通过测序鉴定。通过 Gateway 技术将克隆载体中的 *E7*siRNA 片段转克隆到 pLenti6-siRNA 载体的多克隆位点上,构建了 pLenti6-E7-siRNA 载体(表达载体),测序确认。

表 1 *HPV16-E7*-siRNA 寡聚核苷酸(oligo)序列
Table 1 Oligo of *HPV16-E7*-siRNA

名称	片段序列	大小/bp
正链	CACCGAAAGGAGGATGAAATAGATGGC-GAACCATCTATTTTCATCTCCTTT	51
反链	AAAAAAGGAGGATGAAATAGATG-GTTCGCCATCTATTTTCATCTCCTTT	51

1.2.2 *HPV16-E7* 基因的 RNAi 细胞模型的建立

用构建好的 *HPV16-E7* 基因慢病毒 RNAi 表达载体(经测序确认)转染病毒包装细胞(293FT),产生重组病毒,再使用该重组病毒感染 HPV16 阳性的 SiHa 宫颈癌细胞,Blasticidin 进行抗生素筛选(8 μ g/mL)10~12d,从而得到表达 *HPV16-E7*-siRNA 的阳性克隆细胞,对所获得的 SiHa-E7-siRNA 细胞进行培养繁殖(给予 Blasticidin 维持量 4 μ g/mL)。

1.2.3 *HPV16-E7* 基因的 RNAi 细胞模型的鉴定

转录水平鉴定:TRIzol 法提取 SiHa 及 SiHa-E7-siRNA 细胞的总 RNA,以细胞总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板扩增 *E7* 基因,管家基因 β actin 为参照,比较分析 RNAi 干扰前后 *HPV16-E7* 基因转录水平的变化情况。其中 *E7* 基因的引物序列:上游引物 5'CACCATGCATGGAGATACACCTACATTG3',

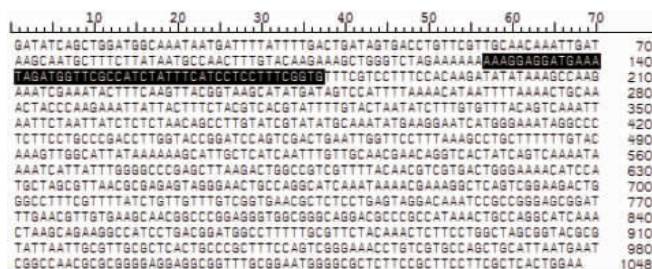
下游引物 5'AGATTATGGTTTCTGAGAACAGATG 3',产物大小 296bp; β -actin 的引物序列为:上游引物 5'CCATCTACG-AGGGCTACGC3',下游引物 5'CGGCTGTGGTCACGAAGG 3',产物大小 397bp。

蛋白水平鉴定:细胞裂解法提取 SiHa 及 SiHa-E7-siRNA 细胞的总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。取两种细胞总蛋白各 20 μ g,1:1 加入 2 \times 载样缓冲液混匀,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min,上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。最后运用蛋白免疫印迹(Western blot)方法检测并比较分析 RNAi 干扰前后 *HPV16-E7* 蛋白表达的变化情况。

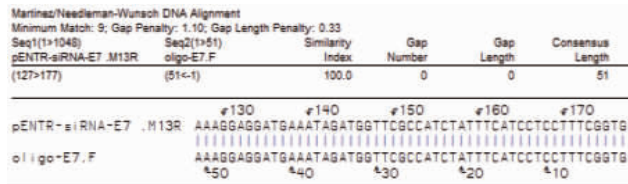
2 结果

2.1 pENTR/U6-E7 siRNA(克隆载体)的鉴定

将所构建的 pENTR/U6-E7-siRNA 克隆载体测序(Invitrogen 公司),并使用 DNA Star 专业软件将所得的测序结果与特异性 *HPV16-E7*-siRNA 片段序列进行比对分析,结果显示特异性 *HPV16-E7*-siRNA 片段正确地克隆到载体的相应位置(图 1)。



(a) pENTR-E7-siRNA (克隆载体)测序可见黑色部分为 *E7* siRNA 序列,其余部分为 pENTR 载体序列
(a) By sequencing of pENTR-E7-siRNA (Cloning vector), the black part is sequence of *E7* siRNA, the rest is sequence of pENTR vector



(b) pENTR/U6-E7-siRNA 克隆载体序列与特异性 *HPV16-E7*-siRNA 片段序列比对
(b) Sequence comparison between pENTR/U6-E7 siRNA cloning vector and *HPV16-E7*-siRNA fragment

图 1 pENTR-E7-siRNA(克隆载体)的鉴定

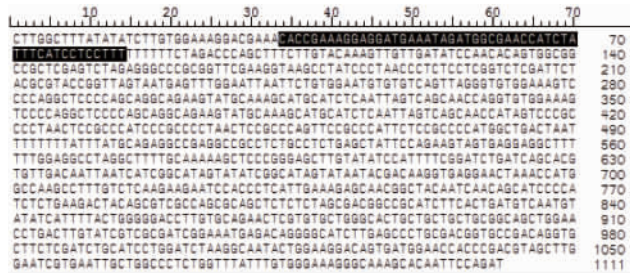
Fig. 1 Identification of pENTR-E7-siRNA (cloning vector)

2.2 pLenti6-E7 siRNA(表达载体)的鉴定

将所构建的 pLenti6-E7-siRNA 表达载体测序(Invitrogen 公司),并使用 DNA Star 专业软件将所得的测序结果与特异性 *HPV16-E7*-siRNA 片段序列进行比对分析,结果显示,特异

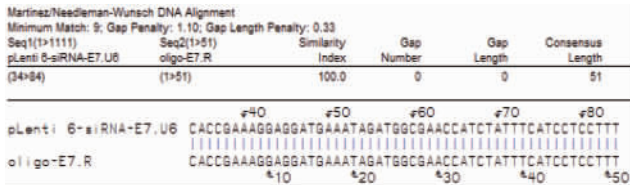


性 HPV16-E7-siRNA 片段正确地转克隆到载体的相应位置 (图 2)。



(a) pLenti 6-E7-siRNA (表达载体) 测序可见黑色部分为 E7 siRNA 序列,其余部分为 pLenti 6 载体序列

(a) By sequencing of pLenti 6-E7-siRNA (expression vector), the black part is sequence of E7 siRNA, the rest is sequence of pLenti 6 vector



(b) pLenti6-E7-siRNA 表达载体序列与特异性 HPV16-E7-siRNA 片段序列比对

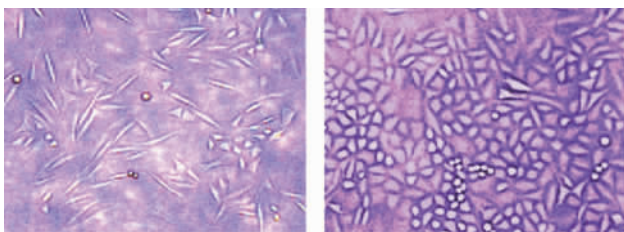
(b) sequence comparison between pLenti6-E7-siRNA Expression vector and HPV16-E7-siRNA fragment

图 2 pLenti6-E7-siRNA 表达载体的鉴定

Fig. 2 Identification of pLenti6-E7-siRNA (expression vector)

2.3 细胞形态学观察

在 RNAi 细胞模型的建立过程中,在抗菌素筛选初级阶段,细胞密度骤然下降,而筛选 12d 后基本稳定下来,细胞开始生长与繁殖。但是与 SiHa 细胞相比,其细胞生长速度明显下降,细胞形态从梭形逐渐回缩成圆形,并在 4μg/mL 抗菌素维持阶段也保持不变(图 3)。



(a) SiHa 细胞细胞形态为梭形 (a) SiHa cell is spindle
(b) SiHa-E7-siRNA 细胞由梭形变为圆球形 (b) SiHa-E7-siRNA cell range from spindle to spherical

图 3 RNA 干扰前后细胞形态学观察

Fig. 3 Cell morphology observation before and after RNA interference

2.4 RNAi 干扰前后 HPV E7 基因转录水平的变化

研究制备 SiHa 细胞及其 RNAi 模型的 RNA, 利用 RT-PCR 鉴定 E7 基因的转录水平变化差异, 发现与非干预的 SiHa 细胞相比, RNAi 干扰的细胞模型中, E7 基因的 mRNA 表达水平明显下降, 证明 siRNA 表达已经产生干扰作用, 但是并非完全抑制目标基因转录(图 4)。

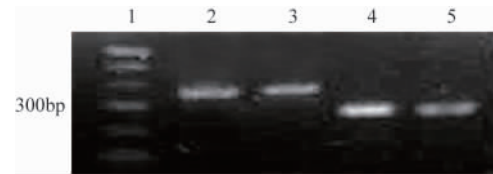


图 4 E7 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of E7 gene RT-PCR product

注: 1 为 marker, 2、3 为 SiHa, SiHa-E7 siRNA 细胞的 β-actin (397bp), 4、5 为 SiHa, SiHa-E7-siRNA 细胞的 E7 基因 (296bp)。

Notes: 1, marker; 2 and 3, β-actin (397bp) of SiHa, SiHa-E7 siRNA cell; 4 and 5, E7 gene (296bp) of SiHa, SiHa-E7-siRNA cell.

2.5 RNAi 干扰前后 HPV16-E7 蛋白表达的变化

为了鉴定 RNA 干扰的效果, 对 RNAi 干扰前后细胞内 E7 蛋白的表达情况进行 Western Blot 检测, 结果如图 5 所示, 可以看出经过 RNAi 干扰后, HPV16-E7 的表达量明显下降。

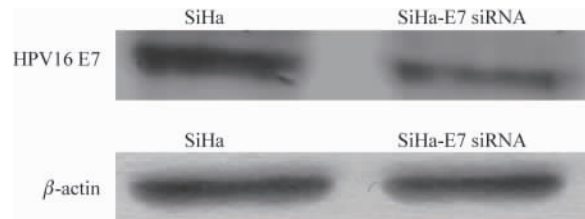


图 5 RNAi 干扰前后 HPV16-E7 蛋白在细胞中的表达变化

Fig. 5 HPV16-E7 Protein expression changes in the cells before and after RNA interference

3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤, 在全球女性恶性肿瘤发病率中位居第 2, 仅次于乳腺癌^[2]。人乳头瘤病毒 (HPV) 是宫颈癌发生的首要因素, 其中高危型 HPV16 感染与宫颈鳞癌关系最为密切, 根据以往报道显示其与 TK1、SP1、HLA-I、Smad4、Runx3、CALCA 等宫颈癌相关的生物标记物的表达变化有着密切的关系^[3-4]。随着近年来人们对 HPV 不断地研究, 已初步揭示了 HPV 致癌的分子机制, 其中 E7 蛋白被认为是 HPV 的致癌的关键分子^[7]。HPV 的基因与宿主细胞基因整合后, E7 基因与细胞基因之间的复杂联系有待于进一步研究。因此, 通过构建 HPV16-E7 基因的 siRNA 慢病毒重组表达载体, 建立稳定靶向干扰 HPV16-E7 基因表达的宫颈癌

细胞株, 将为研究 *HPV 16-E7* 基因在宫颈癌发生发展中的作用提供可靠的细胞模型。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年来发现的研究生物基因表达、调控、功能和基因治疗的一项新技术, 它是针对转录后 mRNA 水平的相关基因的沉默。基于 RNAi 技术的特异性与高效性, 现已成为基因功能研究, 人类疾病模型以及基因治疗研究的新热点^[18,19]。

慢病毒 (Lentivirus) 载体是以 HIV-1 (人类免疫缺陷 I 型病毒) 为基础发展起来的基因治疗载体。它是首先在体外构建能够表达的 siRNA 载体, 然后再将 siRNA 载体转移到细胞内, 通过细胞内转录而产生 siRNA。慢病毒载体不但使脂质体有效转染的细胞种类增加, 而且对基因表达抑制效果也明显高于体外合成 siRNA 的方法, 并且在长期稳定表达载体的细胞中, 可以长期发挥阻断基因表达的作用, 这就为 RNAi 和 cDNA 克隆以提供了一个高效并且有利的途径。

在 siRNA 表达载体中, 构成 siRNA 的正义和反义链, 可由各自的启动子分别转录, 然后两条链互补结合形成 siRNA; 也可由载体直接表达小发卡状 RNA (shRNA), 在细胞内进一步剪切加工最终形成 siRNA。本研究中所使用的 BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System 就是利用在细胞内先表达成 shRNA 再剪切成 siRNA 的方法发挥其作用的。

本研究选择了针对 *HPV16-E7* 基因 mRNA 的特异的 siRNA 片段, 构建慢病毒 siRNA 重组表达载体, 经 293FT 病毒包装细胞转染产生重组病毒, 并以此感染 HPV16 阳性 SiHa 宫颈癌细胞。由于该载体系统携带有抗 Blasticidin 的基因, 用 Blasticidin 筛选感染后的细胞, 获得稳定表达 *HPV 16-E7-siRNA* 的阳性克隆细胞株, 用含有维持剂量 Blasticidin 的培养基进行培养繁殖。最终通过 RT-PCR 及 Western Blot 的方法对细胞株进行转录水平及蛋白水平的鉴定。RT-PCR 结果显示, 与非干预的 SiHa 细胞相比, RNAi 干扰的细胞模型中, *E7* 基因的 mRNA 表达水平明显下降, 说明 siRNA 表达已经产生干扰作用, 但是并非完全抑制目标基因转录。Western Blot 结果显示, RNAi 干扰的细胞模型中 *HPV16-E7* 的表达量明显下降, 说明 RNAi 影响了 *E7* 基因的蛋白表达水平, 但是没有引起完全缺失, 同时进一步验证了以上 RT-PCR 鉴定得出的结果。

4 结论

以 *HPV16-E7* 基因为对象, 利用重组慢病毒真核表达载体建立了稳定表达 *HPV 16-E7-siRNA* 片段的 RNAi 细胞模型。获得稳定表达 *HPV16-E7-siRNA* 的细胞株是进一步研究 *HPV16-E7* 蛋白作用及致癌机制的前提, 因此该模型的成功建立对深入探讨 *HPV16-E7* 基因的致癌机制和宫颈癌的预防与治疗具有重要意义。

参考文献 (References)

- [1] Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *International Journal of Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [2] Thierry F, Benotmane M A, Demeret C, et al. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(3): 895-903.
- [3] Ferlay J, Bray F, Pisani P, et al. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC Cancer Base [M]. 2nd ed. Lyon: IARC Press, 2004.
- [4] Yang B, Bray F, Parkin D, et al. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost [J]. *International Journal of Cancer*, 2004, 109(3): 418-424.
- [5] 马丁, 奚玲. 宫颈癌流行病学及病因学研究进展 [J]. *实用妇产科杂志*, 2001, 17(2): 61-63.
Ma Ding, Xi Ling. *Journal of Practical Obstetrics and Gynecology*, 2001, 17(2): 61-63.
- [6] 拉莱·苏祖克, 彭玉华, 周康, 等. 新疆不同民族宫颈癌发病趋势分析 [J]. *新疆医科大学学报*, 2006, 29(7): 569-571.
Suzuke Lalai, Peng Yuhua, Zhou Kang, et al. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(7): 569-571.
- [7] Monsonego J, Bosch F, Coursaget P, et al. HPV infections and cervical cancer prevention. Priorities and new directions [J]. *International Journal of Cancer*, 2004, 108(3): 329-333.
- [8] Wiley D, Masongsong E. Human papillomavirus: The burden of infection [J]. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 2006, 61(S1): S3-S14.
- [9] Munoz N, Bosch F X, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348(6): 518-527.
- [10] Andersson S, Rylander E, Larson B, et al. Types of human papillomavirus revealed in cervical adenocarcinomas after DNA sequencing [J]. *Oncology Reports*, 2003, 10(1): 175-179.
- [11] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference [J]. *Oncogene*, 2002, 21(39): 6041-6048.
- [12] Thierry F, Benotmane M A, Demeret C, et al. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(3): 895-903.
- [13] 阿娜古丽·阿巴白克力, 哈尼克孜·吐尔逊, 阿布力孜·阿布杜拉, 等. 维吾尔族妇女宫颈癌及 HPV 感染与多种基因表达上调的关系 [J]. *科技导报*, 2012, 30(19): 50-54.
Anaguli Ababaikeli, Tuexun Hankiz, Abudula Abulizi, et al. *Science & Technology Review*, 2012, 30(19): 50-54.
- [14] 阿仙姑·哈斯木, 李巧稚, 马俊旗, 等. 维吾尔族患者宫颈病变中内质网分子伴侣和 HLA-I 类分子表达与 HPV16 感染的关系研究 [J]. *实用妇产科杂志*, 2011, 27(2): 102-105.
Ayshangul Hasimu, Li Qiaozhi, Ma Junqi, et al. *Journal of Practical Obstetrics and Gynecology*, 2011, 27(2): 102-105.
- [15] 李巧稚, 阿提开姆·阿布都克热木, 王燕, 等. 子宫颈癌中 Smad4 和 Runx3 表达与 HPV16 感染的关系 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(10): 1112-1115.
Li Qiaozhi, Abudurehemu Atikaimu, Wang Yan, et al. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2012, 28(10): 1112-1115.
- [16] 盛磊, 阿仙姑·哈斯木, 刘开江, 等. 维吾尔族妇女宫颈病变病理进程与降钙素相关肽 α 表达的关系 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2011, 23(4): 287-290.
Sheng Lei, Hasimu Axiangu, Liu Kaijiang, et al. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*, 2011, 23(4): 287-290.
- [17] 卞继峰, 孔北华. 人乳头瘤病毒感染的致癌机制 [J]. *实用妇产科杂志*, 2004, 20(2): 66-67.
Bian Jifeng, Kong Beihua. *Journal of Practical Obstetrics and Gynecology*, 2004, 20(2): 66-67.
- [18] Hannon G J. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- [19] Wiznerowicz M, Triron S J. Tuning silence: Conditional systems for RNA interference [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(9): 682-688.

(责任编辑 吴晓丽)