

HPV38E6/E7 对 HaCaT 细胞增殖和凋亡的影响

李鹏飞 杨阳 徐亚楠 范巍 马翠玲

【摘要】 目的 明确 HPV38E6/E7 感染对 HaCaT 细胞增殖和凋亡的影响。方法 通过构建 pGCMV 和 pGCMV-HPV38E6/E7 质粒, 建立 HaCaT 稳定转染细胞系并进行鉴定; CCK-8 检测细胞增殖; 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡。结果 与对照组相比, 转染 HPV38E6/E7 的 HaCaT 细胞增殖明显增加, S 期细胞增多, 凋亡减少, 以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 HPV38E6/E7 对角质形成细胞增殖及凋亡的影响, 可能是 β -HPV 引起非黑素瘤性皮肤癌发生的重要病理生理学基础。

【关键词】 DNA 病毒; 细胞增殖; 细胞凋亡

Impact of HPV38E6/E7 on proliferation and apoptosis of HaCaT cells LI Peng-fei, YANG Yang, XU Ya-nan, FAN Wei, MA Cui-ling. Department of Dermatology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: MA Cui-ling, Email: macuiling@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective On the basis of cell proliferation and apoptosis, to determine the effect of HPV38E6/E7 infection on HaCaT cell line. **Methods** We established and indentified HPV38E6/E7 stable expression cell strain by constructing the pGCMV and pGCMV-HPV38E6/E7 plasmids; cell proliferation was measured by CCK-8; cell cycle and apoptosis were determined through flow cytometry analysis. **Results** Compared with control group, after transfected with plasmids HPV38E6/E7, the HaCaT cells show the significantly increase of cell proliferation, S phase and reduce of cells apoptotic, the above differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** HPV38E6/E7 had a certain effect on the proliferation and apoptosis of keratinocytes, probably due to the fact that β -HPV is an important basis of pathophysiological which causes the non-melanoma skin cancer.

【Key words】 DNA viruses; Cell proliferation; Apoptosis

HPV 是一类侵犯皮肤和黏膜上皮的小 DNA 病毒, 迄今已发现约 130 种亚型, 16 个种属 (如 α 、 β 、 γ 、 μ -HPV 等)^[1]。目前已经明确 α -HPV 高危型持续感染可导致宫颈癌发生。 β -HPV 与非黑素瘤性皮肤癌 (nonmelanoma skin cancer, NMSC) 的发生密切相关^[2-4]。然而, 尽管 β -HPV 是 NMSC 发生的重要危险因素, 但其致病机制如何目前仍不清楚, 是否也存在致病的高危亚型仍有争议。近期文献报道对 β -HPV 研究发现, 大约 50% 的 NMSC 患者皮损中可以检测到 HPV38 DNA, 而正常皮肤检出率仅为 10%^[5]。我们课题组前期研究发现, 在光线性角化病皮损中, HPV 感染以 HPV38 型最为多见, 约占 36.4%^[6]。HPV38 可能是 β -HPV 重要致病亚型, 关于 HPV38 对角质形成细胞生物学行为的研究报道较少,

本实验采用 CCK-8、流式细胞术等方法对细胞增殖、周期和凋亡进行研究, 为进一步探讨其在 NMSC 致病机制奠定基础。

材料与方法

一、实验材料

1. 细胞系、质粒: 人角质形成细胞系 HaCaT 细胞由本实验室保存和提供, 常规培养于含 10% FBS 血清 DMEM 中。pGCMV 及 pGCMV-HPV38E6/E7 质粒 (E6E7 基因长度 729 bp): 由上海吉玛制药技术有限公司构建。

2. 主要试剂、设备: 质粒 DNA 大提试剂盒购自 QIAGEN 生物技术公司。DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司。G418 及 Lipofectamine 2000 购自 Gibco 公司。CCK-8 购自碧云天生物公司。稳转细胞 PCR 鉴定引物 (终产物为 531 bp) 由上海生工生物有限公司合成, 引物序列: 上游: 5'-CAGTTTCCTCACG

TACATTG-3'; 下游: 5'-CACACGTATAGTTTTAGCCT TAC-3'。CO₂细胞培养箱(美国 Thermo 公司); PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司); 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统(日本 Alpha inn-otech 公司); 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

二、实验方法

1. 质粒扩增、抽提及酶切鉴定: 携带目的载体的大肠杆菌于卡那霉素平板中划线, 挑取克隆, 经含有卡那霉素(100 mg/ml) LB 液培养后, 以 QIAGEN 公司生产的无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒, 取 1 μl 稀释 50 倍用紫外分光光度计定量, 计算质粒浓度, 余置于 -20 °C 保存备用; Xba I、Bam H I 双酶切鉴定提取质粒; 配制 1% 琼脂糖凝胶, 取酶切产物 10 μl, 加入加样孔中, 同时加入 DNA Marker DL2000, 120 V 恒压 20 min, 观察结果并拍照。

2. 基因转染: 细胞培养和筛选 G418 工作浓度: 胰蛋白酶将 HaCaT 细胞消化后按 0.8×10^4 细胞/孔接种于 24 孔培养板内, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养, 当细胞生长达 70%~80% 时, 将 G418 分别以 0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 mg/L 加入 24 孔板中, 每浓度各设 3 个复孔; 常规培养 10~14 d, 观察细胞死亡情况, 以细胞全部死亡的最低浓度作为筛选浓度。

细胞转染: 将对数生长期 HaCaT 细胞接种于 24 孔板中, 达到 70%~80% 融合时备用; 分别以 Lipofectamine 2000 介导重组质粒 pGCMV 和 pGCMV-HPV38 E6/E7 转染 HaCaT 细胞, 用已确定筛选浓度的 G418 培养液进行筛选, 每周换液 2~3 次, 并观察细胞生长情况; 将已形成克隆的 24 孔板置于镜下观察并做好标记, 弃去培养基, 在标记处用高压消毒的小片滤纸点上少量胰酶, 轻轻消化。将消化下来的细胞依次接种于 24 孔板、50 ml、100 ml 培养瓶扩大培养。将转染的 pGCMV 及 pGCMV-HPV38 的 HaCaT 细胞称为转染细胞, 分别命名为 HaCaT-pGCMV 和 HaCaT-HPV38 E6/E7。

稳转细胞的鉴定: 采用 TIANamp Genomic DNA Kit 法, 依据说明书步骤提取两组细胞基因组 DNA, 经 PCR 鉴定。反应体系: 2×Mix Taq 酶 12.5 μl、DNA 模板 1.5 μl, 上下游引物各 1 μl, ddH₂O 补足 25 μl。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 4 min, 然后按 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min 行 30 个循环, 72 °C 10 min, 最后 12 °C Forever。PCR 终产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶扫描系统扫描成像。

3. CCK-8 检测细胞活力: 将对数生长期的两组细胞接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μl 细胞悬液含 0.7×10^4 细胞, 每组设 5 个复孔, 48 h 后向每孔加入

10 μl CCK-8 溶液, 继续于培养箱内孵育 1~1.5 h; 酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度 (OD 值)。

4. 细胞的周期检测: 将对数生长期的两组细胞按 3×10^5 孔接种于 60 mm 培养皿内, 48 h 后用胰蛋白酶将细胞从 60 mm 培养皿内消化, 转入 10 ml 离心管; 常温用 1×PBS 洗涤细胞两次, 加入预冷的 70% 无水乙醇 4 °C 冰箱内固定细胞 1~2 h; 1000 r/min 离心后弃无水酒精, 用 1×PBS: PI (50 μg/ml) 1:1 混匀; 4 °C 避光染色 30 min 后加入 300 μl PBS, 转入流式管, 流式细胞仪计数检测细胞周期。

5. 细胞凋亡检测: 将对数生长期的两种细胞悬液以 3×10^5 孔接种 60 mm 细胞培养皿中, 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养, 48 h 后用胰蛋白酶将细胞从 60 mm 细胞培养皿消化, 离心; 用 4 °C 预冷的 1×PBS 洗细胞两次后, 250 μl 1×binding buffer 重悬细胞, 吸取 195 μl 细胞悬液加入 5 μl Annexin V, 间隔 3 min 后加入 10 μl 浓度为 20 μl/ml 碘化丙锭溶液; 室温避光孵育 15 min 后加入 300 μl 1×binding buffer, 流式细胞仪检测。

6. 统计学分析: 应用 SPSS 16.0 统计学软件进行处理, 检测结果以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验组与对照组比较采用两样本 *t* 检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 质粒酶切鉴定: 质粒经扩增后, 提取质粒并进行浓度检测, 用 Xba I/Bam H I 双酶切鉴定提取质粒, 配制 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 将结果拍照。泳道 1 为 pGCMV-HPV38 E6/E7 质粒可见约 729 bp 左右阳性条带, 大小与预期相符, 证明构建的质粒确实含有 HPV38 E6/E7 片段。泳道 2 为 pGCMV 空载质粒, 未见阳性条带 (图 1)。

2. 稳定转染细胞株的鉴定: HaCaT 细胞用含不同浓度的 G418 培养基培养, 12 d 后发现 G418 浓度为 600 mg/L 时细胞全部死亡, 故 G418 的筛选浓度为 600 mg/L。转染 pGCMV 和 pGCMV-HPV38 E6/E7 的 HaCaT 细胞用已确定筛选浓度的 G418 培养基进行筛选并培养。取两组转染细胞计数大约 1×10^6 个细胞, 提取基因组 DNA 经 PCR 鉴定 (图 2)。结果显示泳道 1 和泳道 2 可见 531 bp 阳性条带, 与预期目的条带大小相等, 而泳道 3 未显影。

3. 细胞活力检测: 细胞酶标仪分别测定 HaCaT-pGCMV 和 HaCaT-HPV38E6/E7 在 450 nm 处的吸光度值。HaCaT-pGCMV 组吸光值 (0.40 ± 0.039), HaCaT-HPV38E6/E7 组 (0.56 ± 0.043), 两者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果显示与对照组相比,

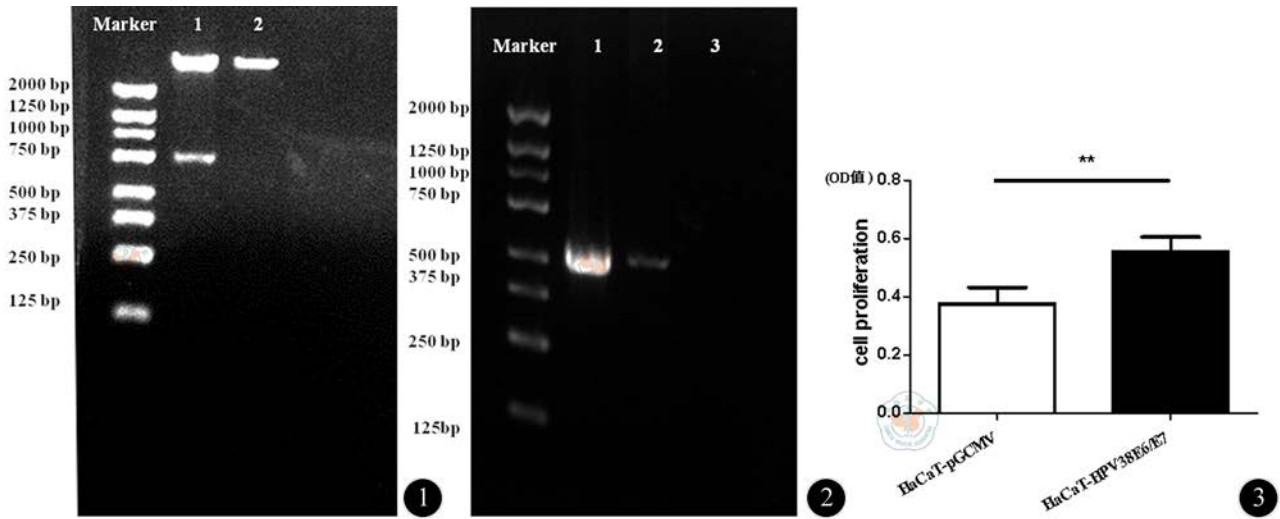


图1 质粒扩增后酶切鉴定结果 图2 质粒稳转细胞株鉴定图。泳道1: HPV38E6/E7质粒, 设为阳性对照; 泳道2: HaCaT- HPV38E6/E7基因组DNA; 泳道3: HaCaT-pGCMV基因组DNA 图3 CCK-8检测细胞增殖结果

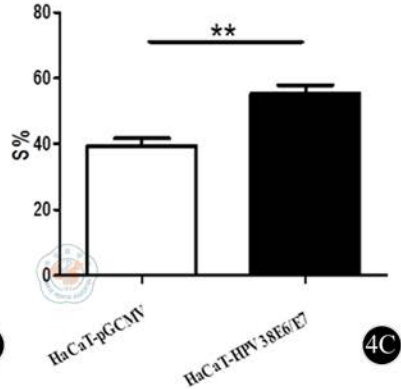
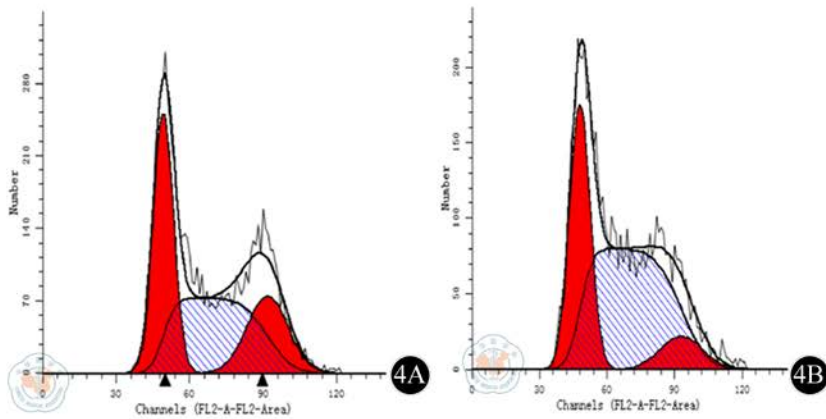
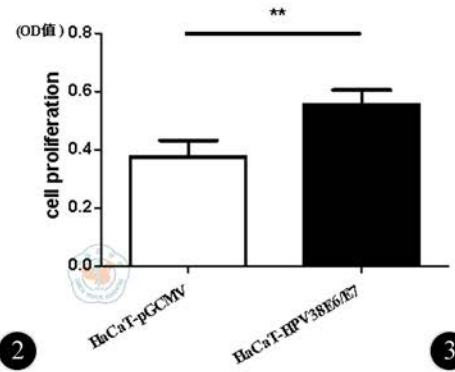


图4 流式细胞仪检测细胞周期结果。4A: HaCaT-pGCMV组处于细胞周期S期细胞比例为40.72%; 4B: HaCaT-HPV38E6/E7组处于细胞周期S期细胞比例为59.12%; 4C: 重复3次提示转染HPV38E6/E7质粒后细胞周期S期细胞比例高于空载对照组, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$)

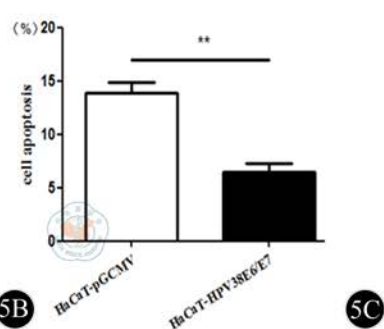
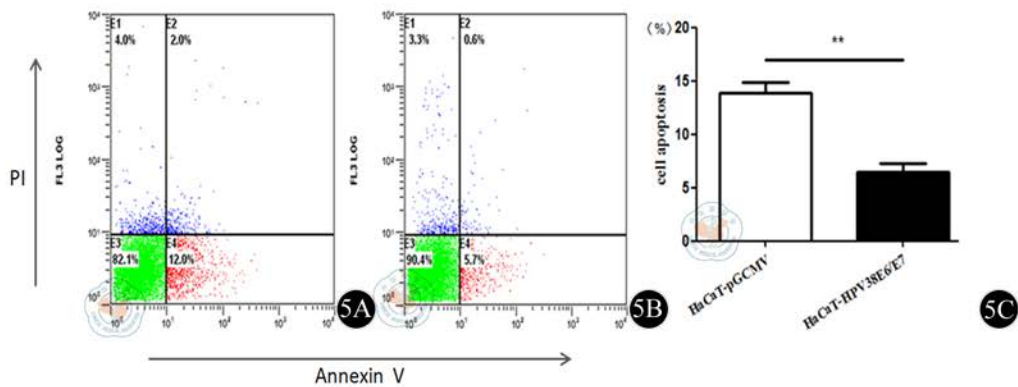


图5 流式细胞仪检测细胞凋亡结果。5A: HaCaT-pGCMV细胞凋亡率约为14%; 5B: HaCaT-HPV38E6/E7细胞凋亡率约为6.3%; 5C: 结果重复3次发现转染HPV38E6/E7质粒后细胞凋亡水平低于空载对照组, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$)

HaCaT-HPV38E6/E7 组增殖活性明显高于对照组。见图 3。

4. 细胞周期检测: HaCaT-pGCMV 组和 HaCaT-HPV38E6/E7 组经过胰蛋白酶消化、 $1 \times$ PBS 洗涤细胞、70%无水乙醇固定、PI 染色, 流式细胞术计数检测细胞周

期, HaCaT-pGCMV 组 S 期细胞比例 (39.35 ± 2.27)%, HaCaT-HPV38 E6/E7 组 S 期细胞比例 (57.36 ± 3.01)%。结果具有统计学差异 ($P < 0.05$), 提示与对照组相比, HaCaT-HPV38 E6/E7 组 S 期细胞比例明显增多。见图 4。

5. 细胞凋亡检测: HaCaT-pGCMV 组和 HaCaT-HPV38E6/E7 组按照 Annexin V/PI 操作说明, 流式细胞术检测细胞凋亡, 结果发现 HaCaT-pGCMV 组凋亡率 (14.36 ± 1.31)%, HaCaT-HPV38 E6/E7 组凋亡率 (6.53 ± 2.10)%, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。结果提示与对照组相比, HPV38E6/E7 抑制 HaCaT 细胞凋亡。见图 5。

讨 论

近来研究表明持续的 HPV 感染、紫外线等环境致癌因素的暴露、机体免疫功能的抑制之间的协同作用可能是 NMSC 发生的基础^[7]。感染皮肤的 HPV 绝大部分为 β -HPV, β -HPV 与 NMSC 尤其是与皮肤鳞状细胞癌的发生密切相关^[8]。有关 α -HPV 致癌机制研究报道较多, α -HPV 发挥致癌作用主要通过 E6、E7 等癌蛋白在细胞转化及有丝分裂周期的调节中发挥重要作用。与 α -HPV 不同, β -HPV 的致病机制尚不清楚。同时 β -HPV 不同亚型之间生物学行为有很大的差异, 是否存在高危亚型也存在争议。有研究认为, β -HPV 某些亚型的 E6 和 E7 可能存在类似 α -HPV 高危型的特性^[9-10]。Cordano 等^[11]在对 β -HPV 转化特性的研究中发现 HPV38 E6 和 E7 蛋白均具有转化活性, 而 HPV10 和 HPV20 的 E6、E7 蛋白无任何转化活性。体外的动物实验显示感染 HPV38E6/E7 的细胞对 UV、化学致癌剂更加敏感, 提示 HPV38 在皮肤癌发病中的起着重要作用^[12]。HPV38E6/E7 还可以通过 NF- κ B 途径抑制 UVB 及 TNF- α 对 HaCaT 细胞的损伤, 逃避细胞凋亡, 维持增殖^[13]。由此, HPV38 可能是 β -HPV 重要致病亚型。

HaCaT 细胞可以作为研究 HPV 感染及相关编码蛋生物学功能的良好模型^[14]。为此, 本研究首先构建了携带 HPV 基因序列的质粒, 然后转染 HaCaT 细胞并成功进行了筛选和鉴定, 为体外研究 HPV 的致病机制提供了可能性。随后比较了 HPV38E6/E7 对 HaCaT 细胞活力、周期及凋亡等生物学行为的影响。结果显示: 转染 HPV38E6/E7 的 HaCaT 细胞增殖能力提高, S 期细胞数增多, 并抑制细胞凋亡。HPV38E6/E7 对细胞活力的影响是细胞过度增殖的结果, 肿瘤的发生与细胞过度增殖密切相关。HPV38E6/E7 导致 S 期细胞数增多, 引起细胞周期的紊乱, 干预细胞周期的正常调控可能是其致癌的机制之一。同时, 细胞凋亡的减少提示病毒感染细胞能够抑制凋亡相关途径和逃避自身免疫监视系统清除, 因此有利于病毒的复制和扩散, 为恶变提供基础。HPV38E6/E7 以上生物学行为与 α -HPV 高危亚型相似。

HPV38E6/E7 在 NMSC 发生的过程中充当着推动者的角色^[15]。其对细胞增殖、周期和凋亡的影响, 可能是联合 UV、化学致癌剂等导致皮肤癌发生的病理生理学基础。HPV38E6/E7 对 HaCaT 细胞增殖、诱导凋亡的分子机制尚不完全清楚。对其进一步深入研究, 对于阐明 HPV38 及 β -HPV 在 NMSC 发生发展中的作用具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Howie HL, Koop JI, Weese J, et al. Beta-HPV 5 and 8 E6 promote p300 degradation by blocking AKT/p300 association. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1002211.
- [2] Patel RV, Frankel A, Goldenberg G. An update on nonmelanoma skin cancer. *J Clin Aesthet Dermatol*, 2011, 4: 20-27.
- [3] Adinarayan M, Krishnamurthy SP. Clinicopathological evaluation of nonmelanoma skin cancer. *Indian J Dermatol*, 2011, 56: 670-672.
- [4] Feltkamp MC, Broer R, di Summa FM, et al. Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res*, 2003, 63: 2695-2700.
- [5] Caldeira S, Zehbe I, Accardi R, et al. The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol*, 2003, 77: 2195-2206.
- [6] 徐亚楠, 杨阳, 李鹏飞, 等. 光线性角化病皮损中 β 型人乳头瘤病毒检测及分型. *中华皮肤科杂志*, 2013, 46: 56-58.
- [7] Jenson HB. Human papillomavirus vaccine: a paradigm shift for pediatricians. *Curr Opin Pediatr*, 2009, 21: 112-121.
- [8] Karagas MR, Nelson HH, Sehr P, et al. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98: 389-395.
- [9] Muench P, Probst S, Schuetz J, et al. Cutaneous papillomavirus E6 proteins must interact with p300 and block p53-mediated apoptosis for cellular immortalization and tumorigenesis. *Cancer Res*, 2010, 70: 6913-6924.
- [10] Muschik D, Braspenning-Wesch I, Stockfleth E, et al. Cutaneous HPV23 E6 prevents p53 phosphorylation through interaction with HIPK2. *PLoS One*, 2011, 6: e27655.
- [11] Cordano P, Gillan V, Bratlie S, et al. The E6/E7 oncoproteins of cutaneous human papillomavirus type 38 interfere with the interferon pathway. *Virology*, 2008, 377: 408-418.
- [12] Dong W, Klotz U, Accardi R, et al. Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38. *J Virol*, 2005, 79: 14899-14908.
- [13] Hussain I, Fathallah I, Accardi R, et al. NF- κ B protects human papillomavirus type 38 E6/E7-immortalized human keratinocytes against tumor necrosis factor alpha and UV-mediated apoptosis. *J Virol*, 2011, 85: 9013-9022.
- [14] Severino A, Abbruzzese C, Manente L, et al. Human papillomavirus 16 E7 interacts with Siva1 and modulates apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes. *J Cell Physiol*, 2007, 212: 118-125.
- [15] Viarisis D, Decker KM, Aengeneyndt B, et al. Human papillomavirus type 38 E6 and E7 act as tumour promoters during chemically induced skin carcinogenesis. *J Gen Virol*, 2013, 94: 749-752.

(收稿日期: 2013-10-08)

(本文编辑: 吴莹)