

HPV16 E5、E6 和 E7 基因重组 慢病毒载体的构建及其感染口腔上皮细胞

项先旺¹ 江 彤² 陈传俊^{1,3}

摘要 目的 分别构建 HPV16 E5、E6 和 E7 癌基因的重组慢病毒载体感染口腔上皮细胞,为研究 E5 基因对口腔上皮细胞的致癌机制奠定基础。方法 克隆 HPV16 E5、E6 和 E7 基因,分别构建 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和 pLVX-AcGFP-E7 重组慢病毒载体,与包装质粒共转染 293T 细胞。收集 3 种慢病毒上清液,分别感染口腔上皮细胞、腺嘌呤筛选感染细胞,RT-PCR 和 Western blot 法检测目的基因的表达。结果 成功构建 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和 pLVX-AcGFP-E7 重组慢病毒载体,获得 3 种慢病毒上清液,筛选得到 3 个稳定的细胞株。RT-PCR 和 Western blot 均可检测到 HPV16 E5、E6 和 E7 基因在口腔上皮细胞内表达。结论 本研究构建的 3 个重组慢病毒载体能成功感染口腔上皮细胞。

关键词 人乳头状瘤病毒; HPV16 癌基因; 慢病毒载体; 口腔上皮细胞

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0940-05

人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是宫颈癌发生的主要致病因子。大量的流行病学调查资料显示,HPV 也与口腔癌的发生密切相关^[1-2]。目前关于 HPV 与口腔癌关系的研究主要集中于对高危型 HPV E6 和 E7 基因的研究,它们都可与肿瘤抑制物结合并使其失活^[3]。实际上,HPV E5 基因有其特殊的生物活性,与肿瘤的发生关系同样非常密切。E5 基因可抑制细胞的凋亡,导致细胞周期异常,甚至还能增强 E6 和 E7 基因对细胞的恶性转化作用^[4-5]。Schiffman et al^[6]比较不同型别 HPV 全基因组序列发现,有生物活性的 E5 基因总是存在于引起恶性肿瘤的高危型 HPV 基因组中,说

明 E5 基因在 HPV 致癌过程中可能发挥着至关重要的作用。因此,深入研究 HPV E5 基因的功能及其致癌性,可能是进一步了解 HPV 致癌机制的重要突破口。该研究拟构建 HPV16 E5、E6 和 E7 基因重组慢病毒载体,感染口腔上皮细胞,以期为研究高危型 HPV E5 基因在口腔上皮细胞癌的致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 感染 HPV16 的口腔癌病理标本由本实验室保存,取自临床肿瘤组织;无菌口腔黏膜标本则取自安徽医科大学第三附属医院小儿唇腭裂术中多余上皮。

1.1.2 菌种及载体 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存;克隆载体 pGEM-Teasy Vector 购自美国 Promega 公司;慢病毒核心质粒 pLVX-AcGFP-N1 购自上海吉凯公司;慢病毒包装质粒 psPAX2、pMD2G 购自美国 Addgen 公司。

1.1.3 酶与试剂 反转录试剂盒、各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、Prime Script TM RT reagent Kit with gDNA Eraser 等工具酶均购自日本 TaKaRa 公司;脂质体 Lipofectamine 2000、无血清培养基 Defined Keratinocyte-SFM、分散酶 Dispase II、嘌呤霉素购自美国 Life Technologies 公司;293T 细胞购自美国 ATCC 公司;质粒抽提试剂盒购自美国 OMEGA 公司;一抗(Mouse Anti-GFP)、二抗(Goat Anti Mouse)、hexadimethrine bromide、DMEM、胎牛血清购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 HPV16 E5、E6 和 E7 基因的克隆及 3 个慢病毒载体的构建 根据本实验室已报道的 HPV16 (GenBank 登录号: KC935953) 序列,分别设计扩增 E5、E6 和 E7 特异性引物,见表 1。上游引物 5'端引入 EcoR I 位点,下游引物 5'端引入 BamH I 位点。提取感染 HPV16 肿瘤标本的总 DNA,PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 30 s、57 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 14 s,30 个循环。

2016-03-08 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81172574);皖南医学院人才引进科研启动基金资助

作者单位:¹安徽医科大学第三附属医院,合肥 230061

²安徽农业大学植物保护学院,合肥 230036

³皖南医学院口腔医学院,芜湖 241002

作者简介:项先旺 男 硕士研究生;

陈传俊 教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: ccj6318@ sina.com

PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的 DNA 片段。EcoR I 和 BamH I 双酶切纯化的目的片段与同样双酶切的慢病毒载体 pLVX-AcGFP-N1 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。PCR 筛选阳性克隆,测序验证重组慢病毒载体 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和 pLVX-AcGFP-E7 携带的 E5、E6 和 E7 基因序列是否发生突变。

表 1 引物序列

基因	引物序列
E5	F: 5'-CCGGAATTCATGACAAATCTTGATACTGC-3' R: 5'-CCGGATCCCGTGAATTAATAAGCGTG-3'
E6	F: 5'-CCGGAATTCATGCACCAAAAGAGAACTG-3' R: 5'-CCGGATCCCGCAGCTGGGTTTCTCTA-3'
E7	F: 5'-CCGGAATTCATGCATGGAGATACACCT-3' R: 5'-CCGGATCCCGTGGTTTCTGGGAACAG-3'

1.2.2 重组慢病毒的包装 分别将 3 个重组质粒与包装质粒 psPAX2 和 pMD2G 共转染 293T 细胞,48 h 后收集病毒上清液,浓缩后分装保存于 -80 °C 冰箱。

1.2.3 3 种慢病毒滴度测定 逐步稀释法测定 3 种慢病毒滴度,分别在 96 孔板中接种 293T 细胞,第 2 天用完全培养基按(1 ~ 10⁻⁹) 10 个梯度稀释病毒液,每孔加入 100 μ l 稀释后的病毒液,每个梯度设置 3 个重复;48 h 后观察细胞中 GFP 的表达,若 10⁻⁸ 梯度孔中分别有 2、3 和 4 个细胞 GFP(+),则取平均值,此病毒滴度为 3 \times 10⁸ TU/ml。

1.2.4 口腔上皮细胞的原代及传代培养 将无菌口腔黏膜标本置于 2 mg/ml Dispase II 中 4 °C 消化过夜。次日,用眼科镊分离获取上皮层并用剪刀将其剪成 1 mm \times 1 mm 大小,胰酶消化 10 min,含 10% 胎牛血清的 DMEM 中止消化。1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 Defined Keratinocyte-SFM 培养基重悬细胞。以 1 \times 10⁴ 个/cm² 接种到 35 mm 的培养皿中,37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,当细胞铺满瓶底的 70% ~ 80% 时,按 1 : 3 的比例进行传代培养。

1.2.5 获得稳定感染的细胞株 取 P1 代口腔上皮细胞接种至 6 孔板,待细胞融合度约 70% 时,换液,每孔分别加入 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和 pLVX-AcGFP-E7 慢病毒 100 μ l,并在每孔中加入终浓度为 8 μ g/ml 的 polybrene,隔天换液,加入终浓度为 2 μ g/ml 嘌呤霉素,培养 2 周,即可得到稳定感染的细胞株。

1.2.6 RT-PCR 检测 E5、E6 和 E7 基因 mRNA 表达水平 分别取 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和

pLVX-AcGFP-E7 慢病毒稳定感染的口腔上皮细胞株。各提取细胞总 RNA,反转录 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板,RT-PCR 检测 E5、E6 和 E7。

1.2.7 Western blot 检测 E5、E6 和 E7 蛋白表达水平 收集稳定感染 HPV16 E5、E6 和 E7 基因的口腔上皮细胞株,PBS 洗 3 次,加入细胞裂解液 200 μ l,冰上孵育 3 min;将细胞收集到 500 μ l EP 管中,置于冰上继续裂解 20 min,12 000 r/min、4 °C 离心 30 min;加入 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,100 °C 变性 5 min;取 30 μ g 样品总蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,蛋白电转至 PVDF 膜上;5% 脱脂奶粉液封闭 2 h,加入 Anti-GFP 一抗,室温孵育 2 h;TBST 洗膜 4 次,再加入二抗,室温孵育 1.5 h;TBST 洗膜 10 次,加入新配置的 Western blot 化学显色剂进行显色,5 min 后拍照分析。

2 结果

2.1 目的基因的扩增 以感染 HPV16 肿瘤组织的总 DNA 为模板,分别用 3 对特异性引物进行 PCR 扩增,可以扩增出 3 条约 250、500、300 bp 的特异性条带,条带大小与预期结果相符。见图 1。

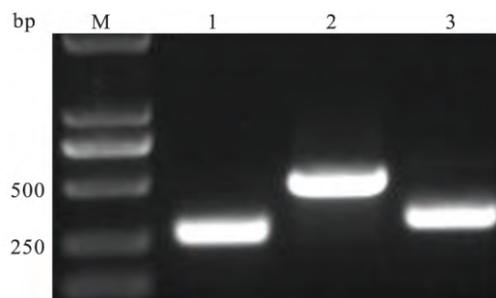


图 1 HPV16 E5、E6 和 E7 基因的 PCR 产物
M: DNA 分子量标准; 1: E5; 2: E6; 3: E7

2.2 重组慢病毒载体酶切和测序验证 重组慢病毒载体 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和 pLVX-AcGFP-E7 经双酶切体系验证,酶切片段大小符合理论值。说明插入的 E5、E6 和 E7 基因读码框正确。测序进一步验证插入的基因序列未发生突变。见图 2。

2.3 重组慢病毒滴度的测定 3 种慢病毒 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和 pLVX-AcGFP-E7 分别感染 293T 细胞,逐步稀释法测定滴度,分别为 3 \times 10⁸、2 \times 10⁸、2 \times 10⁸ TU/ml。

2.4 口腔上皮细胞的原代及传代培养 原代培养 6 ~ 7 d,上皮细胞开始增殖,15 ~ 20 d 细胞开始融

合 融合的口腔上皮细胞为不规则多边形 ,呈铺路石样结构排列。见图 3。

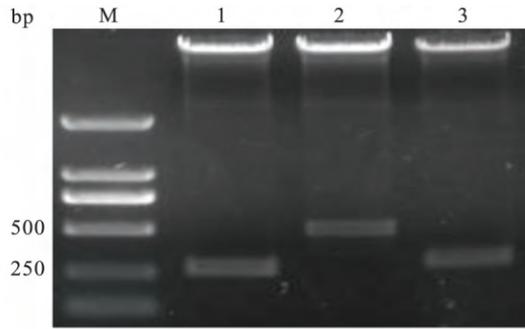


图 2 重组慢病毒质粒的 EcoR I 和 BamH I 双酶切鉴定

M: DNA 分子量标准; 1: pLVX-AcGFP-E5; 2: pLVX-AcGFP-E6; 3: pLVX-AcGFP-E7

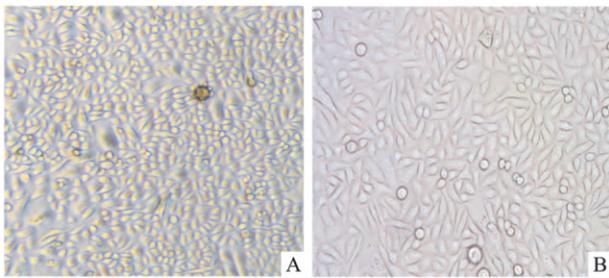


图 3 P1 代口腔上皮细胞形态

A: ×50; B: ×100

2.5 RT-PCR 和 Western blot 检测目的基因的表达 倒置显微镜下观察显示 ,慢病毒 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和 pLVX-AcGFP-E7 转染的口腔上皮细胞均有绿色荧光蛋白表达 ,说明 3 种慢病毒均可转染口腔上皮细胞。见图 4。RT-PCR 检测表明 ,在转染 3 种慢病毒的口腔上皮细胞中 ,均可扩增出特异性条带 ,大小分别约为 250、500、300 bp。见图 5。Western blot 检测显示 ,在转染 3 种慢病毒的口腔上皮细胞中 ,均检测出特异性条带 ,大小分别

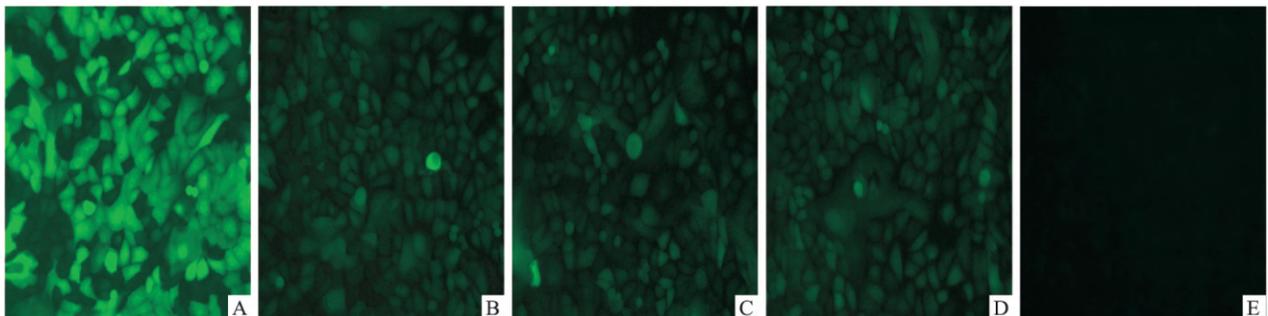


图 4 稳定转染慢病毒的口腔上皮细胞 ×100

A: 空载体转染; B: pLVX-AcGFP-E5 转染; C: pLVX-AcGFP-E6 转染; D: pLVX-AcGFP-E7 转染; E: 未转染

约为 37、46、39 kDa ,与理论大小相符。上述检测结果表明 ,E5、E6 和 E7 蛋白在口腔上皮细胞中均能成功表达 ,见图 6。

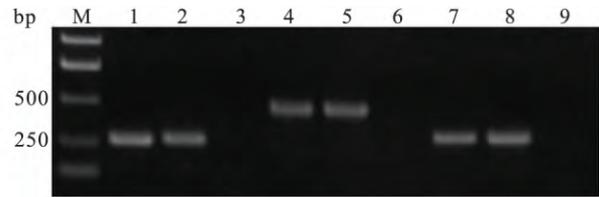


图 5 稳定转染慢病毒口腔上皮细胞总 RNA 反转录产物 PCR 检测

M: DNA 分子量标准; 1: pLVX-AcGFP-E5 转染; 4: pLVX-AcGFP-E6 转染; 7: pLVX-AcGFP-E7 转染; 2、5、8: 阳性对照; 3、6、9: 阴性对照

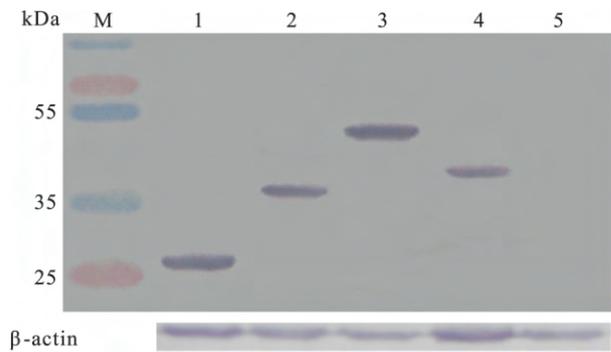


图 6 稳定转染慢病毒的口腔上皮细胞 Western blot 检测 GFP 表达

M: 蛋白分子量标准; 1: 空载体转染; 2: pLVX-AcGFP-E5 转染; 3: pLVX-AcGFP-E6 转染; 4: pLVX-AcGFP-E7 转染; 5: 对照组

3 讨论

Sdek et al^[7] 利用 HPV16 E6 和 E7 基因转染人正常口腔上皮细胞引起永生化和 HPV16 在宫颈癌的致病机制不同是他检测到肿瘤抑制物 p53 上调 ,提示高危型 HPV 引起口腔癌的机制可能与宫颈癌不同 ,但其未做进一步研究 ,尤其缺乏对 HPV16 致癌基因 E5 的研究。本课题组前期研究^[8] 显示 HPV16 E5 基因可在一定程度上促进人永生化和口腔

上皮细胞增殖,并对 E6 和 E7 基因 mRNA 表达量有一定的间接上调作用。值得注意的是,HPV16 E5 蛋白分子量为 10 ku,是由 83 个氨基酸构成的疏水性膜联合蛋白,随着后期病毒 DNA 的整合,E5 基因会发生缺失,提示在相关肿瘤形成的早期阶段发挥重要作用^[9]。E5 蛋白可以与各种膜蛋白发生相互作用,主要与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)结合并增强其活性,诱导细胞过度增生和抑制细胞凋亡,使一系列原癌基因过度表达^[10]。动物实验^[11]表明注射重组腺病毒 HPV16 E5 疫苗或细胞毒性 T 淋巴细胞 E5 肽和 CpG 寡核苷酸可显著降低肿瘤的生长。Hu et al^[12]证实 HPV16 E5 蛋白能介导细胞融合,而细胞融合可充分诱导染色体不稳定,从而使癌基因表达和细胞周期异常,导致肿瘤,HPV16 E5 与 E6 和 E7 共表达时能促进这些双核细胞繁殖,也能增加双核细胞的形成率。研究高危型 HPV E5 基因对口腔上皮致癌性对口腔癌的防治有重要的指导价值和实践意义。

本实验选用的口腔上皮样本材料来自于小儿唇腭裂术中多余口腔上皮,增殖能力较好,原代口腔上皮细胞可传代培养 4~5 代。文献^[13]显示随着年龄的增加,口腔上皮细胞传代次数减少,成人的口腔上皮细胞只能传至 2~3 代。同时本研究也表明 P1 代和 P2 代口腔上皮细胞与原代细胞生物学性状接近,后随着传代次数增加,部分细胞形态发生改变,细胞增殖减慢,融合时间延迟,细胞逐渐凋亡。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷 I 型病毒为基础发展起来的病毒载体^[14-15]。慢病毒核蛋白质前整合复合物有噬核特性,从而使慢病毒对分裂细胞和非分裂细胞均有感染能力,对于一些较难转染的细胞,如原代细胞、干细胞、不分化的细胞等,可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上,从而达到稳定持久性表达。其次,慢病毒还有初次感染后即丧失继续感染的能力,有安全性好、不易诱发宿主免疫反应、感染效率高等特点。在体外实验及体内实验的研究中,慢病毒已经成为表达外源基因或外源 shRNA 的常用载体形式之一,并且正在获得越来越广泛的应用。

本研究选择慢病毒载体,应用分子生物学技术,成功构建了慢病毒载体 pLVX-AcGFP-E5、pLVX-AcGFP-E6 和 pLVX-AcGFP-E7,均能感染口腔上皮细胞,RT-PCR 和 Western blot 均能检测 E5、E6 和 E7 蛋白在口腔上皮细胞中表达,为后续 3 种慢病毒单独感染或共感染口腔上皮细胞,阐明 HPV16 E5

基因与口腔癌的相关性奠定基础。

参考文献

- [1] Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the international agency for research on cancer multicenter study [J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(23): 1172-83.
- [2] Smith E M, Ritchie J M, Summersgill K F, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cell and risk of head and neck cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(6): 449-55.
- [3] Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, et al. E6 and E7 gene silencing and cancer cells [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(6): 412-23.
- [4] Kim M K, Kim H S, Kim S H, et al. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(12): 1930-5.
- [5] Ganguly N. Human papillomavirus-16 E5 protein: oncogenic role and therapeutic value [J]. Cell Oncol (Dordr), 2012, 35(2): 67-76.
- [6] Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution [J]. Virology, 2005, 337(1): 76-84.
- [7] Sdek P, Zhang Z Y, Cao J, et al. Alteration of cell-cycle regulatory proteins in human oral epithelial cells immortalized by HPV16 E6 and E7 [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2006, 35: 653-7.
- [8] 候潇潇,江彤,蒋欣泉,等. HPV16 型 E5 基因对人永生口腔上皮细胞 E6、E7 基因表达的影响 [J]. 上海口腔医学杂志, 2011, 20(4): 368-72.
- [9] Conrad M, Bubb V J, Schlegel R, et al. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein [J]. J Virol, 1993, 67(10): 6170-8.
- [10] Maufort J P, Williams S M, Pitot H C, et al. Human papillomavirus 16 E5 oncoprotein contributes to two stages of skin carcinogenesis [J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6106-12.
- [11] Liao S J, Deng D R, Zeng D, et al. HPV16 E5 peptide vaccine in treatment of cervical cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2013, 33(5): 735-42.
- [12] Hu L, Platker K, Vorozhko V, et al. Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion [J]. Virology, 2009, 384(1): 125-34.
- [13] 丁桂聪,毛天球,杨维东,等. 人口腔黏膜上皮细胞的培养及生物学特性的研究 [J]. 实用口腔医学杂志, 2000, 16(4): 288-90.
- [14] Blomer U, Naldini L, Kafri T, et al. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector [J]. J Virol, 1997, 71(9): 6641-9.
- [15] Zufferey R, Nagy D, Mandel R J, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo* [J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(9): 871-5.

川陈皮素后处理减轻心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡

陈 才¹ 吴继雄¹ 王 靓² 何 非¹

摘要 目的 研究川陈皮素后处理对小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制。方法 选择健康雄性 C57BL/6 小鼠 48 只 随机均等分为 4 组: 假手术组(Sham 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、川陈皮素后处理组(NOB 组)、川陈皮素后处理 + PI3K 特异性抑制剂 LY294002 组(NL 组)。通过结扎小鼠左冠状动脉前降支 30 min, 再灌注 120 min, 制作小鼠心肌缺血再灌注模型。采用 Evans Blue 和 TTC 双重染色法测量心肌缺血危险区及梗死区面积; TUNEL 染色法检测各组小鼠心肌细胞凋亡指数; 硫代巴比妥酸(TBA) 法测定丙二醛

(MDA) 浓度, 黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD) 活性; Western blot 检测各组心肌的 Akt、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达量, 计算 Bcl-2/Bax 比值。结果 与 Sham 组相比, I/R 组心肌梗死面积及心肌细胞凋亡显著增加, 心肌 Akt、Bcl-2 下调, Bax、Caspase-3 上调, Bcl-2/Bax 下降, MDA 显著升高, SOD 显著降低($P < 0.001$)。与 I/R 相比, NOB 组心肌梗死面积、心肌细胞凋亡显著减少, 心肌 Akt、Bcl-2 上调, Bax、Caspase-3 下调, Bcl-2/Bax 升高, MDA 显著降低, SOD 显著升高($P < 0.001$)。与 NOB 组相比, NL 组心肌梗死面积及凋亡显著升高, 心肌 Akt、Bcl-2 下调, Bax 和 Caspase-3 上调, Bcl-2/Bax 下降, MDA 显著升高, SOD 显著降低($P < 0.001$)。结论 川陈皮素可减轻心肌缺血再灌注损伤, 减少心肌细胞凋亡, 其机制与 PI3K-Akt 通路激活降低氧化应激有关。

关键词 川陈皮素; PI3K/Akt; 心肌缺血再灌注; 凋亡

中图分类号 R 541.4; R 961.1

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2016) 07 - 0944 - 07

2016 - 03 - 23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81202631)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院心血管内科, 合肥 230601

² 安徽中医药大学药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 陈 才, 男, 硕士研究生;

吴继雄, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wjx8261@163.com

Construction of three lentiviral vectors expressing HPV16 E5 , E6 or E7 oncogene and respective infection of oral epithelial cells with the vectors

Xiang Xianwang¹ , Jiang Tong² , Chen Chuanjun^{1,3}

(¹Dept of Oral and Maxillofacial Surgery ,The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230061;

²College of Plant Protection , Anhui Agricultural University , Hefei 230036;

³Dept of Stomatology , Wannan Medical College , Wuhu 241002)

Abstract Objective To provide the basis for the study of HPV16 E5 gene in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma by constructing three lentiviral vectors expressing HPV16 E5 , E6 or E7 oncogene and transfecting oral epithelial cells with the vectors. **Methods** HPV16 E5 , E6 or E7 oncogene was amplified using PCR and ligated into the lentiviral vector pLVX-AcGFP-N1 respectively to construct vectors pLVX-AcGFP-E5 , pLVX-AcGFP-E6 and pLVX-AcGFP-E7 , then respectively cotransfected 293T cells with packaging plasmids , viral supernatant was collected to respectively transfect oral epithelial cells. After puromycin screening , oral epithelial cells with HPV 16 E5 , E6 or E7 oncogene transfection were constructed , then reverse transcription PCR and western blot assays were performed for verifying HPV16 E5 , E6 or E7 expression. **Results** pLVX-AcGFP-E5 , pLVX-AcGFP-E6 and pLVX-AcGFP-E7 were successfully constructed , oral epithelial cells expressing HPV 16 E5 , E6 or E7 oncogene were acquired , HPV16 E5 , E6 or E7 expression was confirmed in oral epithelial cells through reverse transcription PCR and western blot assays. **Conclusion** Three lentiviral vectors expressing HPV16 E5 , E6 or E7 oncogene can successfully infect oral epithelial cells.

Key words human papillomavirus; HPV16 oncogene; lentiviral vector; oral epithelial cells