

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.13.005

HPC2 蛋白在 HPV16 感染的宫颈癌细胞中调控作用初探*

刘玲¹, 杜海虹², 范凌晔¹, 聂丹¹, 毛熙光^{1△}

(1. 西南医科大学附属医院妇产科, 四川泸州 646000; 2. 四川省眉山市人民医院产科 620010)

[摘要] **目的** 探讨人多梳蛋白 2 (HPC2) 对宫颈癌细胞 siha 生长的影响及其与 E7 基因的调控关系。**方法** 设计 siRNA 干扰序列, 分别沉默 siha 细胞中 E7 基因和 HPC2 基因。检测 E7 基因沉默后的 siha 细胞株中 HPC2 基因及蛋白表达情况, 并检测细胞增殖和细胞凋亡率。**结果** siha 细胞 E7 基因沉默后, HPC2 mRNA 和蛋白的表达降低, 细胞增殖受抑制, 凋亡增加, 与 HPC2 基因沉默后的效应相似。**结论** HPC2 可能在 siha 细胞中参与了增殖、凋亡的调控, 其表达可能与 E7 基因密切相关。

[关键词] 宫颈肿瘤; siha 细胞; E7; HPC2**[中图分类号]** R711.7; R737.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1720-03

Preliminary study on the role of protein HPC2 in the regulation of HPV16 infected cervical cancer cells*

LIU Ling¹, DU Haihong², FAN Lingye¹, NIE Dan¹, MAO Xiguang^{1△}

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Obstetrics, Meishan People's Hospital, Meishan, Sichuan 620010, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of human homologue of polycomb 2 (HPC2) on the growth of cervical cancer cells siha and the regulation of E7 gene. **Methods** HPC2 and E7 genes of siha cells were silenced by siRNAs respectively. Detected the expression of HPC2 gene and protein in siha cell lines after E7 gene silencing, cell proliferation activity and the rate of cell apoptosis. **Results** The expressions of HPC2 mRNA and protein were decreased in siha cells with E7 gene silencing, cell proliferation was inhibited, and apoptosis was increased, which was similar to HPC2 gene silencing. **Conclusion** HPC2 may be involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis, and its expression may be closely related to E7 gene in SiHa cells.

[Key words] cervical neoplasm; siha cell; E7; HPC2

宫颈癌是全球排名第 3 的妇女恶性肿瘤^[1], 人乳头瘤病毒 (HPV) 感染宫颈后, 病毒基因整合到宫颈上皮细胞, 与其他促癌因素共同作用促成癌症的发生。E7 基因是 HPV 的主要致癌基因之一, 其编码的 E7 蛋白可使细胞周期失控而发生永生化。人多梳蛋白 2 (HPC2) 即染色盒同源物 4 (chrombox homolog 4, CBX4), 在肿瘤细胞株和组织中表达上调, CBX4 过表达与肿瘤分期和恶性程度密切相关^[2], HPC2 对靶基因的抑制作用的异常可能导致宫颈癌的发生^[3]。为探索 HPC2 与宫颈癌发生的机制, 本课题组研究了 HPC2 与 HPV16 的原癌基因 E7 之间的关系及其对细胞增殖、凋亡的作用, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 siha 细胞 (由西南医科大学附属医院中心实验室惠赠); Trizol、RNA 提取试剂盒和 cDNA 试剂盒 (北京天根生物科技有限公司), HPC2

siRNA (广州锐博生物科技有限公司), HPV16E7 siRNA (上海吉玛制药技术有限公司), lipofectamine 2000 reagent (美国 Invitrogen 公司), CBX4 兔抗单克隆抗体 (英国 Abcam 公司), β -actin 兔抗单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), CCK-8 试剂盒 (日本同仁公司), 膜联蛋白 V 标记的异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 siha 细胞分为 4 个组: 空白对照组、NControl siRNA 组 (对照组)、HPC2 siRNA 组和 HPV16E7 siRNA 组。空白对照组为未转染任何序列 RNA 组, NControl siRNA 组为转染阴性序列对照组, HPC2 siRNA 组为沉默 HPC2 组, HPV16E7 siRNA 组为沉默 HPV16E7 组。

1.2.2 细胞转染 每个 6 孔培养板中接种 4×10^5 个对数生长期的 siha 细胞, 培养 24 h, 细胞融合达到

* 基金项目: 四川省卫生厅项目 (150075); 四川省科技厅项目 (2008JY0014-1); 西南医科大学附属医院科研项目 (12044)。 作者简介: 刘玲 (1981-), 副主任医师, 硕士, 主要从事妇科肿瘤、生殖内分泌研究。 Δ 通信作者, E-mail: mxg6639@163.com。

60%时开始实验。操作步骤按照美国 Invitrogen 公司提供的操作说明。倒置荧光显微镜下观察转染 24 h 后 NControl siRNA-CY3 转染组红色荧光情况。HPC2 siRNA(广州市锐博生物科技有限公司合成), 靶序列: 5'-GGT AGA ATG TCC AGA TGA A-3', 正义链: 5'-GGU AGA AUG UCC AGA UGA AdT-dT-3', 反义链: 3'-dTdTC CAU CUU ACA GGU CUA CUU-5'。HPV16E7 siRNA(上海吉玛公司合成), 5'-GGA CAG AGC CCA UUA CAA UTT AUU GUA AUG GGC UCU GUC CTT-3'。

1.2.3 荧光定量 PCR 提取细胞总 RNA 参照北京天根公司提供的说明书操作, 引物由上海生工生物工程公司合成, 引物序列如下。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列: 上游 5'-CCC CAT ACA CAG TGT TAG CC-3', 下游 5'-GAG TGA TTT TCC CGT CC-3'; HPC2 引物序列: 上游 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', 下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'; HPV16E7 引物序列: 上游 5'-TGC AAC CAG CAA CTG AT-3', 下游 5'-TGC AAC CAG CAA CTG AT-3'。DNA 扩增条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; 终延伸 72 °C 5 min。荧光定量 PCR 反应条件为 96 °C 预变性 5 min; 96 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次; 终延伸 72 °C 10 min。每组设 3 个复孔, 记录 Ct 值, 取平均值。 ΔCt 值 = 目的基因 Ct 值 - 内参基因的 Ct 值; $\Delta\Delta Ct$ 值 = 实验组基因的 ΔCt 值 - 空白对照组基因的 ΔCt 值; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 = 实验组基因/空白组基因(倍数)。

1.2.4 Western blot 提取总蛋白并测其浓度, 制胶, 正丁醇封闭 20~30 min, 上样, 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 置于摇床上摇 2 h, 封闭液稀释一抗 HPC2(1 : 400)、 β -actin(1 : 1 000) 孵育; 封闭液稀释兔二抗(1 : 1 000) 孵育。化学发光后凝胶成像系统成像, 保存图片。

1.2.5 CCK-8 试验 每组设 5 个复孔, 将 96 孔板放细胞培养箱 24 h 后转染 siRNA, 细胞转染 1~7 d 时间点每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 放进细胞培养箱继续培养, 于 2 h 时间点用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(OD)。

1.2.6 流式细胞技术 siha 细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶, 24 h 后行细胞转染, 转染 48 h 收集细胞, 1 000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 加入 195 μ L 结合缓冲液轻轻重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 轻轻混匀, 避光室温孵育 15 min; 离心后弃上清液, 加入 190 μ L Annexin V-FITC 结合缓冲液轻轻重悬细胞, 10 μ L 碘化丙啶(PI)溶液, 轻轻混匀, 避光室温放置 20 min, 冰浴; 上机检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差

分析和 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siha 细胞 HPV16E7 基因沉默后 HPC2 基因的表达 siha 细胞转染 HPV16E7 siRNA 48 h 后, HPC2 mRNA 表达水平较对照组下调 75% 左右, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 1。

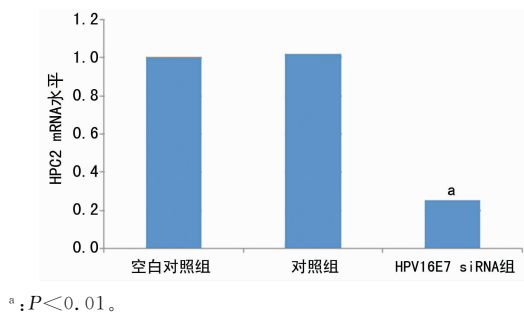


图 1 3 组 HPC2 mRNA(2^{- $\Delta\Delta Ct$} 值柱状图) 在 siha 细胞中的表达

2.2 HPV16E7 基因抑制后对 siha 细胞中 HPC2 蛋白表达的影响 siha 细胞转染 HPV16E7 siRNA 48 h 后, HPC2 蛋白水平下调, 与 HPC2 siRNA 转染效果相当, 见图 2。

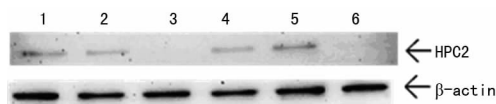


图 2 6 组 HPC2 蛋白在 siha 细胞中的表达

2.3 HPC2 基因抑制后对 siha 细胞增殖的影响 随着时间延长, OD 值逐渐增加。与其他各组细胞相比, 转染 HPC2 siRNA 的 siha 细胞 OD 值自第 3 天开始增幅降低, 第 7 天各组细胞 OD 值分别为: 空白对照组 2.08 ± 0.07; 对照组 2.00 ± 0.09; HPC2 siRNA 组 0.92 ± 0.10。HPC2 siRNA 组较对照组显著降低($t = 20.403, P < 0.01$), 见图 3。

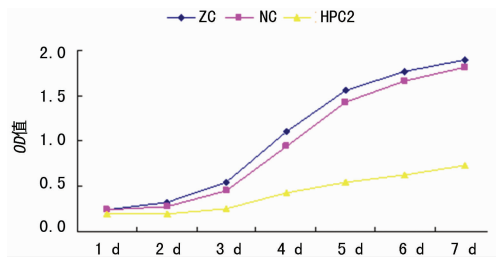


图 3 3 组 siha 细胞 OD 值变化

2.4 HPC2 基因抑制后对 siha 细胞凋亡的影响 转染 48 h 后, HPC2 siRNA 组早期凋亡和晚期凋亡比例为 6.38%, HPV16E7 siRNA 组为 7.03%, 对照组为 3.94%, 空白对照组为 0.21%; HPC2 siRNA 组转染后细胞凋亡比例较对照组增加 2.44%, HPV16E7 siRNA 组转染后细胞凋亡比例较对照组增加 3.09%, 见图 4。

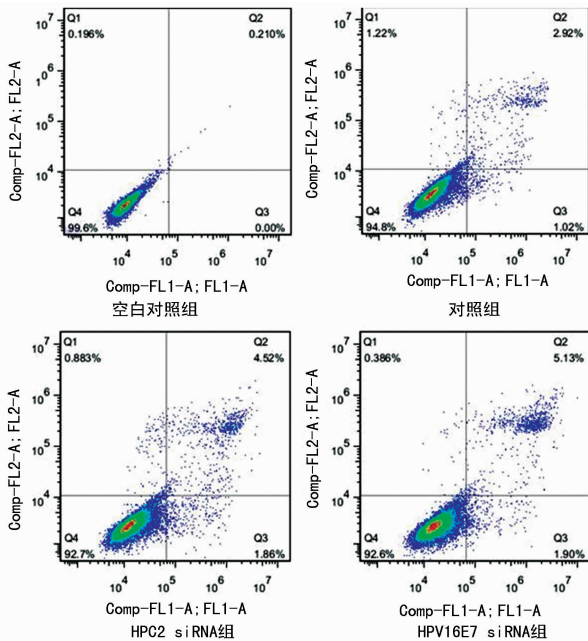


图 4 4 组 siha 细胞凋亡率

3 讨 论

HPC2 作为 PcG 家族重要成员,是基因转录抑制因子,与 B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒插入位点-1(BMI-1)、RING1、HPH3 3 种 PcG 蛋白及非 PcG 蛋白 C-末端结合蛋白(CtBP)和转录因子 E2F 相互作用形成 HPC-HPH 蛋白复合物来执行功能^[4]。HPC2 可能抑制原癌基因的转录而参与调控肿瘤形成、细胞凋亡及细胞周期等^[5]。HPC2 既是 PcG 蛋白又是 SUMO E3 连接酶,其可通过 SUMO 化修饰调节 KDM5B 活性,抑制细胞周期和 DNA 修复基因的表达^[5];CBX4 通过募集 HCAC3 到 RUNX2 启动子抑制 RUNX2 的表达^[6]。人类癌细胞系和正常组织中 HPC2 的表达水平差异较大,在 Burkitt 淋巴瘤和肺癌中几乎检测不到 HPC2 转录子,而 HPC2 在其他细胞系中均呈高表达状态^[5]。HPC2 基因突变或表达异常与肿瘤的发生可能存在密切联系^[7-8],CBX4 通过抑制 RUNX2 的表达抑制结肠癌的转移^[6,9],CBX4 通过控制 HIF-1 α 蛋白在肿瘤血管生成中起着关键作用,作为 SUMO E3 泛素连接酶促进肝癌的进展和转移^[7-8],敲除 CBX4 导致了 HIF-1 α 靶基因的下调表达,导致在常氧条件下骨肉瘤细胞生长和细胞存活率的显著抑制^[2]。既往研究证实 PC 家族中 HPC2 是唯一具有 SUMO E3 活性的成员^[10],在细胞干性、细胞衰老/胚胎发育、细胞周期、DNA 损伤应答及肿瘤的发生等方面均有调控作用。

羧基端是 HPC2 蛋白发挥抑制功能必不可少的结构域,若其发生突变会导致其抑制靶基因转录的功能丧失。但其可与内源性的 HPC2 蛋白竞争结合 PcG 蛋白反应元件,从而干扰正常内源性 HPC2 蛋白的功能。HPC2 的 SUMO 化作用能改变蛋白构型,进而改变蛋白功能。有研究检测到入宫颈癌 HPC2

基因的 C 端的保守序列的突变,其与转录抑制物 CtBP 结合的能力丧失,抑制靶基因转录的作用降低,细胞恶性分化,诱发宫颈癌^[3]。以上文献报道基于对 HPC2 结构水平上的研究,而本实验从定量上探讨 HPC2 与 E7 基因的关系,结果显示:E7 基因沉默后,HPC2 无论是在基因水平还是在蛋白水平均呈现下调表达,推测 E7 蛋白可能调控 PcG 蛋白 HPC2 的表达。

Notch 信号转导途径的变化与某些肿瘤的发生、发展密切相关。HPV 相关蛋白 E6/E7 介导宫颈癌细胞 Notch 信号通路的异常上调,二者在维持肿瘤的生长及异型性有协同作用。此外,Fas 蛋白家族介导 Notch1 抑制 E6/E7 的表达。Notch 信号途径参与了细胞增殖、凋亡与分化等过程,参与肿瘤的发生^[11]。关键转录因子 CBF-1/RBP-Jk 介导了经典的 Notch 信号途径,而 HPC2 参与了对 RBP-Jk 的调控^[12]。本研究结果提示 E7 调控 HPC2 的表达,由此推测 E7 可能通过调控 HPC2 的表达来调控 RBP-Jk 介导的经典 Notch 通路,Notch 通路的异常调控,最终导致宫颈癌的发生。本研究发现抑制 HPC2 与抑制 E7 基因后对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响相似,结合 E7 与 HPC2 基因之间的关系,推测 E7 基因可能通过调控 HPC2 来参与细胞的增殖凋亡过程,从而参与宫颈癌的发生。但其具体通过何种途径何种机制来参与,还需要更进一步的研究来证实。

参考文献

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):359-386.
- [2] LIN F M, KUMAR S, REN J, et al. SUMOylation of HP1 α supports association with ncRNA to define responsiveness of breast cancer cells to chemotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21):30336-30349.
- [3] 秦鸿雁, 王林, 杨红等. HPC2 基因与宫颈癌关系的研究 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(2):166-168.
- [4] SEWALT R G, LACHNER M, VARGAS M, et al. Selective interactions between vertebrate polycomb homologs and the SUV39H1 HMTase suggest histone H3-K9 methylation to contribute to chromosomal targeting of Polycomb-group proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(15):5539-5553.
- [5] BUENO M T, RICHARD S, REN J, et al. SUMOylation negatively modulates target gene occupancy of the KDM5B, a histone lysine demethylase [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(11):1162-1175.
- [6] WANG X, KANG T. Role of CBX4 in the colorectal carcinoma metastasis-response [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9):2550-2551.

3 讨 论

胆道闭锁是婴儿期累及肝内外胆管、最终导致终末期肝硬化的严重肝脏疾病,其特点为胆管进行性的炎症、纤维化,并最终消失形成胆道闭锁。

EMT 是指分化成熟的极化上皮细胞丧失上皮/内皮细胞特征,向间充质细胞转化,使其具有更大的活性和迁移性。EMT 很可能参与了胆道闭锁中多发性硬化性胆管炎的病理机制。

TGF- β 1 在体内外各种上皮细胞和组织纤维化过程中介导 EMT 的发生。目前,部分 miRNA 已被证实在 TGF- β 1 诱导的 EMT 中发挥关键作用,miRNA 可能成为新的治疗各种慢性病的靶点。有研究发现 miRNA-129-5p 与 EMT 的过程密切相关,在心脏、肝脏、肺、皮肤纤维化的过程中,miRNA-129-5p 的表达是下调的。

体内外转染 miRNA 的前体,如 pre-miRNA、pre-mir,以增强相应 miRNA 的作用,是当前最容易实现的 miRNA 干扰技术。本课题组通过 5 ng/mL 的 TGF- β 1 的终浓度干预诱导胆道上皮细胞进一步纤维化,从细胞水平模拟胆道闭锁的形成。同时进行 EMT 标志物的检测,证实了 TGF- β 1 诱导下细胞 EMT 的形成,miRNA-129-5p 的表达随时间延长逐渐下调。随后转染了 pre-miRNA-129-5p 以上调 miRNA-129-5p 的表达,并转染了一段随机并不会在体内产生任何影响的序列 pre-mir 作为阴性对照,再给予胆管上皮细胞 TGF- β 1 刺激,检测转分化相关指标及细胞外基质成分的变化。结果发现过表达 miRNA-129-5p 后,胆道上皮细胞标志物 E-cadherin、CK-19 表达有所上调,而间充质细胞标志物 Vimentin、FMNL2 表达水平均有所下调,说明上调 miRNA-129-5p 的表达可以抑制 TGF- β 1 诱导的胆道上皮 EMT。这一结果提示 miRNA-129-5p 可能通过调节 TGF- β 1 通路相关靶基因表达,参与调控胆道上皮细胞转分化及细胞外基质沉积。在胆道闭锁 EMT 进程中起着关键的作用。

(上接第 1722 页)

- [7] MEI Z, JIAO H, WANG W, et al. Polycomb chromobox 4 enhances migration and pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma cell line MHCC97L[J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(6): 610-617.
- [8] LI J, XU Y, LONG X D, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 118-131.
- [9] SANCISI V, CIARROCCHI A. Role of CBX4 in the colorectal carcinoma metastasis-letter[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2548-2549.
- [10] AGRAWAL N, BANERJEE R. Human polycomb 2 pro-

参考文献

- [1] HARADA K. Sclerosing and obstructive cholangiopathy in biliary atresia: mechanisms and association with biliary innate immunity[J]. *Pediatr Surg Int*, 2017, 33(12): 1243-1248.
- [2] HSU Y A, LIN C H, LIN H J, et al. Effect of microRNA-155 on the interferon-gamma signaling pathway in biliary atresia[J]. *Chin J Physiol*, 2016, 59(6): 315-322.
- [3] YE Y, LI Z, FENG Q, et al. Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3 [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0180896.
- [4] GOLDMAN M, PRANIKOFF T. Biliary disease in children[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2011, 13(2): 193-201.
- [5] MA N, CHEN F, SHEN S L, et al. MiRNA-129-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell metastasis and invasion via targeting ETS1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, 461(4): 618-623.
- [6] ZHANG J, LI S, YAN Q, et al. Interferon- β induced miRNA-129-5p down-regulates HPV-18 E6 and E7 viral gene expression by targeting SP1 in cervical cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81366.
- [7] DONG R, SHEN Z, ZHENG C, et al. Serum microRNA microarray analysis identifies miR-4429 and miR-4689 are potential diagnostic biomarkers for biliary atresia[J]. *Sci Rep*, 2016, 16(6): 21084.
- [8] GOLDSCHMIDT I, THUM T, BAUMANN U. Circulating miR-21 and miR-29a as markers of disease severity and etiology in cholestatic pediatric liver disease[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(3): e28.
- [9] SHAN Y, SHEN N, HAN L, et al. MicroRNA-499 Rs3746444 polymorphism and biliary atresia[J]. *Dig Liver Dis*, 2016, 48(4): 423-428.
- [10] 杨瑛, 汤绍涛, 曹国庆, 等. L-12P35, P40 和 IFN- γ 在胆道闭锁小鼠模型肝脏组织中的表达[J]. *临床小儿外科杂志*, 2008, 7(6): 26-29.

(收稿日期: 2017-10-13 修回日期: 2017-12-24)

tein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine beta-synthase sumoylation[J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e4032.

- [11] YUAN X, WU H, XU H, et al. Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment[J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(1): 20-27.
- [12] QIN H, DU D, ZHU Y, et al. The PcG protein HPC2 inhibits RBP-J-mediated transcription by interacting with LIM protein KyoT2[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(5): 1220-1226.

(收稿日期: 2017-10-15 修回日期: 2017-12-26)