

文章编号 1006-8147(2016)06-0487-05

论 著

## 宫颈腺癌细胞中 HPV18-E7 与上皮间质转化的关系研究

米合日尼沙·买买提, 阿比丹·吐尔汗江, 韩莉莉

(新疆维吾尔自治区人民医院妇科, 乌鲁木齐 830000)

**摘要** 目的:探究宫颈腺癌细胞中 HPV18-E7 与上皮间质化(EMT)之间的关系。方法:针对 HPV18-E7 的 siRNA 转染入人宫颈腺癌 HeLa 细胞,观察细胞形态变化,并运用 Real-time PCR 技术、免疫印迹实验和细胞免疫荧光染色实验在 mRNA 水平和蛋白水平检测 E7、EMT 相关的标记因子的表达及定位变化;应用细胞划痕愈合实验及 Transwell 细胞体外侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力。结果:特异性沉默 HPV18-E7 表达后 HeLa-SIE7 细胞间连接变得疏松,细胞中 E7 与间质性标记物的 mRNA 及蛋白表达水平较对照组细胞显著下降,上皮性标记因子较对照组细胞明显增加 ( $P<0.01$ );随着 HeLa 细胞 E7 表达的下调,E-cadherin 在细胞膜上的表达增加,间质性标记因子在细胞质内的表达随之下降。HeLa-SIE7 细胞迁移及侵袭能力明显低于对照组( $P<0.01$ );沉默 HPV18-E7 表达的 HeLa 细胞其增殖能力也明显减弱。结论:宫颈腺癌细胞中 HPV18-E7 能够引起 EMT,促进肿瘤发生侵袭转移。

**关键词** 宫颈腺癌;上皮-间质转化;HPV18-E7

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

### Study on the relationship between HPV18-E7 and epithelial-mesenchymal transition in cervical adenocarcinoma cells

Miherinisha Maimaiti, Abidan Tuerhanjiang, HAN Li-li

(Department of Gynecology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Wulumuqi 830000, China)

**Abstract Objective:** To determine the role of HPV18-E7 oncogene in the epithelial to mesenchymal transition (EMT) like process.

**Methods:** HPV18-E7 siRNAs were transfected in human cervical cancer HeLa cells. Real-time PCR, western blot and immunofluorescence technique were performed to examine the localization and expression of E7 and EMT markers, respectively. Furthermore, the wound healing assay and matrigel invasion assay were used to evaluate the invasion and migration ability. **Results:** On the mRNA and protein levels, E7 depletion significantly induced the expression of E-cadherin. Furthermore, N-cadherin, Vimetin, and fibronectin expression were decreased in HeLa-SIE7 cells. E-cadherin was up-regulated and mainly observed in contact areas between cells in HeLa/SIE7 cells, while the mesenchymal markers such as N-cadherin, and fibronectin were reduced and detected mainly in the cytoplasm. Down-regulation of HPV18-E7 by transient transfection of HPV18-E7 siRNAs in HeLa cells caused significant inhibition of cell invasion and migration compared with the siNC transfected cells. **Conclusion:** In HeLa cells HPV18-E7 can enhance invasion and migration by inducing EMT.

**Key words** cervical adenocarcinoma; EMT; HPV18-E7

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一。在发展中国家,由于高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染增多、筛查程序混乱,宫颈癌的发病率和病死率增加并出现年轻化倾向<sup>[1]</sup>。目前,虽然早期筛查和手术联合放化疗的防治模式已有效改善早期宫颈癌的预后,然而对于发生宫旁浸润和远处转移的宫颈癌的治疗和预后的改善仍是棘手问题<sup>[2]</sup>。因此寻找肿瘤进展过程中的关键因子有助于我们建立肿瘤进展的预测体系,开展个体化诊治和靶向干预,从而为晚期宫颈癌患者争取治

疗时机、改善预后。上皮-间质转化(Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)是指上皮细胞失去极性及细胞间连接,获得浸润迁移的能力,成为具有间质细胞形态和特性的细胞<sup>[3]</sup>。目前越来越多的研究证实 EMT 是肿瘤进展及发生侵袭转移的重要过程<sup>[4]</sup>。近年来,在宫颈癌中也有研究证实其浸润转移过程与 EMT 相关<sup>[5]</sup>。目前没有文献证实宫颈癌最主要的病因 HPV 感染与 EMT 的具体关系。直到 2009 年及 2013 年分别在正常上皮细胞及鼻咽癌细胞中有研究指出 HPV16-E6/E7 能够诱导 EMT<sup>[6-7]</sup>,但是这些研究只是简单的证明 HPV16-E6/E7 可以诱导 EMT,并没有指出其诱导 EMT 后是否会促进肿瘤的侵袭转移。关于宫颈腺癌的最重要致癌基因

作者简介 米合日尼沙·买买提(1976-),女,副主任医师,硕士,研究方向:妇科肿瘤的诊治;通信作者:韩莉莉, E-mail: hanliliabcd@163.com。

HPV18-E6/E7 至今仍无相关研究。为此,本研究以 HPV18 型阳性的宫颈腺癌细胞 HeLa 为基础,用针对 HPV18-E7 的小干扰 RNA 特异性的沉默 E7 的表达,运用实时定量 PCR,免疫印迹实验,细胞免疫荧光技术,细胞划痕愈合实验,Transwell 细胞体外侵袭实验及检测 EMT 特异性标记因子的表达及定位变化,观察其细胞迁移、侵袭能力,从而探索 HPV18-E7 与 EMT 的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞来源 HPV18 阳性的宫颈癌 HeLa 细胞购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂 LipofectamineTM2000(Invitrogen, 美国);逆转录酶试剂盒(Fermentas 公司,美国);Realtime PCR Master Mix(TOYOBO,日本);HPV18-E7 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc.公司,美国);E-cadherin 单克隆抗体(EPITOMICS 公司,美国);Vimentin 多克隆抗体(Proteintech 公司,中国武汉);N-cadherin 单克隆抗体(EPITOMICS 公司,美国);FN1 多克隆抗体(Proteintech 公司,中国武汉);GAPDH 单克隆抗体(Anbo biotechnology, 美国);小干扰 RNA(siRNAi)由广州市锐博生物科技有限公司设计合成;引物由上海英骏公司合成。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养与转染

1.2.1.1 细胞培养:用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞,倒置显微镜下观察细胞的状态,按照细胞密度、状态及实验安排进行具体操作。一般 2 d 换液 1 次,4 d 传代 1 次。处理后的细胞放置于 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中进行培养。

1.2.1.2 siRNA 的转染:待处于对数生长期且状态良好的 HeLa 细胞密度达到 80%时用上述细胞传代的方法以每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞接种于 6 孔板中进行培养。孔板中细胞汇合度达 40%~50%面积时,分别用 SIE7 及对照 SINC 转染 HeLa 细胞,具体操作步骤按照脂质体 lipofectamine2000 及 siRNA 使用说明书进行。

1.2.2 Real-time PCR 检测 mRNA 的表达 Trizol 法提取细胞总 RNA,将 mRNA 逆转录为 cDNA。在 BIO-RAD 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s,59℃ 5 s,39 个循环;65℃ 5 s,95℃,读取每个样品相应的 CT 值,采用荧光相对定量计算公式为:样品/对照 = 2<sup>-ΔΔCt</sup>,计算出各基因的 mRNA 的表达量,选择 GAPDH 作内参,本实

验重复 3 次。

1.2.3 蛋白免疫印迹杂交技术(western blot)检测蛋白表达 12% SDS-PAGE 分离上述蛋白质,湿转至 PVDF 膜后,5%脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 h,4℃一抗孵育过夜,HRP 标记二抗室温孵育 1 h,ECL 检测目的蛋白条带。

1.2.4 细胞划痕愈合实验 待孔板中的细胞长到几近完全融合时,用 10 μL 的小枪头在孔板的底面上沿直线轻轻划痕,枪头要垂直,不能倾斜;加入含 2%胎牛血清的 DMEM 培养基置于 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养,分别于 0、12、24、36、48 h 在倒置显微镜下观察细胞划痕愈合情况并拍照片记录。记录完成后,用 Image J 软件测量细胞的迁移距离,SPSS13 统计分析并应用 sigmaplot 软件作图,用细胞划痕愈合百分比判断细胞的运动能力(0 h 的细胞划痕愈合为 0)。

1.2.5 Transwell 细胞体外侵袭实验 收取细胞后用含 2%胎牛血清的 DMEM 培养基重悬。调整细胞密度至 1×10<sup>5</sup>/mL。取细胞悬液 200 μL 加入 Transwell 小室(1×10<sup>4</sup> 个细胞)。孔板下室加入 600 μL 趋化因子(趋化因子:胎牛血清=9:1),37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养,48 h 后结晶紫溶液染色,400 倍显微镜下随意挑选 5 个视野观察细胞,并记数,取平均数。

1.2.6 细胞免疫荧光染色技术 胰酶消化细胞,按照细胞传代的方法将细胞悬液加入事先备好的含有玻璃爬片的 24 孔板中。24 h 后转染 siRNA,并置于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 48 h。每孔内加入适量 4%多聚甲醛室温固定细胞,用 0.1%triton-X-100 室温通透细胞膜 5 min。1%BSA 室温封闭 30 min,4℃一抗孵育过夜。次日取出室温复温 30 min,避光滴加二抗,37℃温箱避光孵育 30 min。DAPI 染料避光染细胞核 5 min,洗去染核液后,每孔加入 1×PBS,荧光显微镜或激光共聚焦扫描显微镜观察拍照。

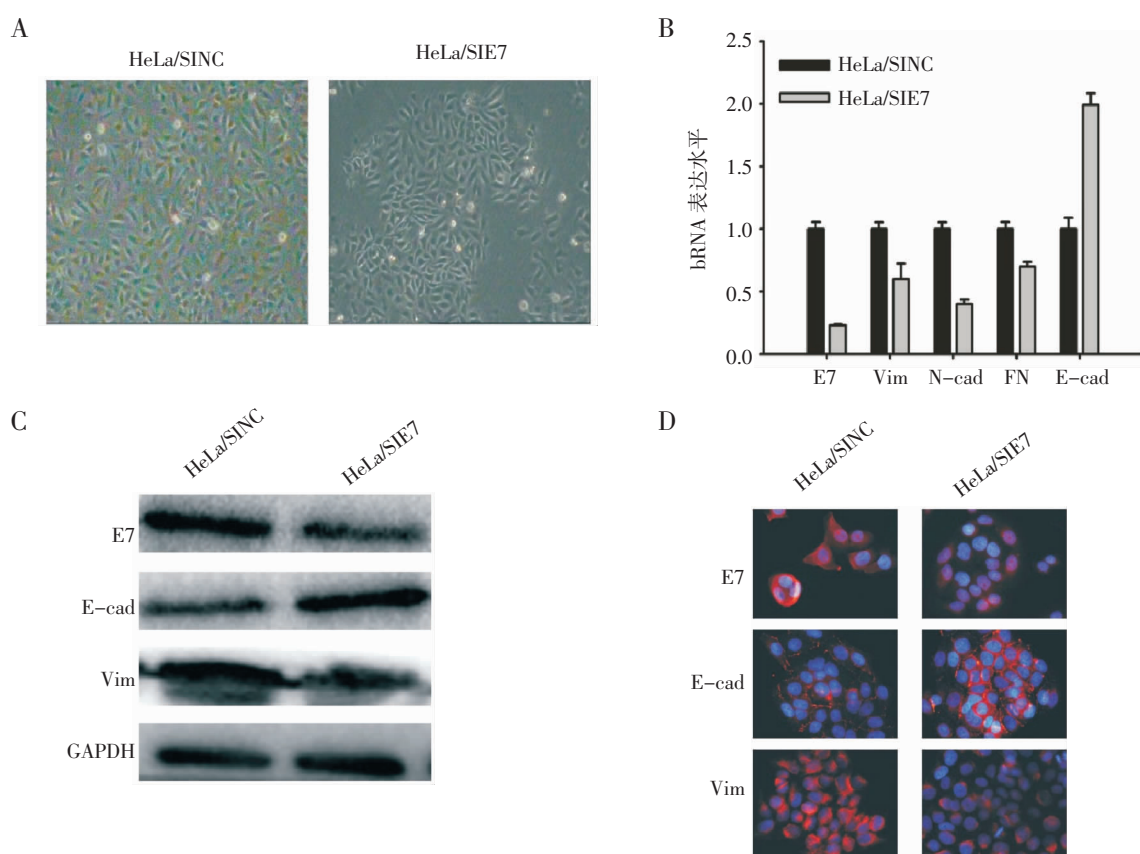
1.3 统计学分析 每个实验重复 3 次,计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS11.5 软件对数据进行方差分析、t 检验和非参检验,以  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 沉默 HeLa 细胞 HPV18-E7 基因表达并检测 EMT 标记物的表达变化 为证实 HPV18-E7 基因与 EMT 的诱导有相关性,本实验用针对 HPV18-E7 的 siRNA 转染入 HeLa 细胞并应用 real-time PCR 技术与免疫印迹实验分别在 mRNA 和蛋白水平检测 EMT 相关标记物的表达变化。如图 1A 示,SIE7 转染入 HeLa 细胞后细胞间连接变得更加紧密;图

1B 示 SIE7 转染入 HeLa 细胞后 48 h,细胞中 E7 与间质性标记物 N-cadherin, Vimetin 及 fibronectin 的 mRNA 表达水平较对照组细胞显著下降,其下降幅度分别为  $(82.97 \pm 4.90)\%$ 、 $(66.58 \pm 1.78)\%$ 、 $(42.34 \pm 1.89)\%$  和  $(32.47 \pm 1.67)\%$ ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );然而上皮性标记物 E-cadherin mRNA 表达水平较对照组细胞明显增加,其增加幅度为  $(95.25 \pm 3.40)\%$ ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。采用 Western 印迹法检测各指标蛋白水平的表达变化,结果显示,HeLa-SIE7 细胞 E7 和 Vimentin 表达与

对照组相比显著下降,降幅分别为  $(91.25 \pm 11.97)\%$  和  $(61.09 \pm 3.40)\%$ ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );E-cadherin 与对照组相比增加幅度为  $(85.27 \pm 2.35)\%$ ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 1C)。如图 1D 示,随着 HeLa-SIE7 细胞 E7 表达的下调,E-cadherin 在细胞膜上的表达增加,然而间质性标记因子 vimentin 细胞质内的表达随之下降。以上数据表明,在 HPV18 阳性的人宫颈癌细胞 HeLa 中特异性下调 E7 基因的表达可以导致 EMT 发生逆转,即发生 MET。



A.细胞形态的变化;B.real-time PCR 检测 E7 与 EMT 标记因子 mRNA 水平的表达变化;C.免疫印迹技术检测 E7 与 EMT 标记因子蛋白水平的表达变化;D.细胞免疫荧光技术检测 EMT 标记因子的定位分布情况

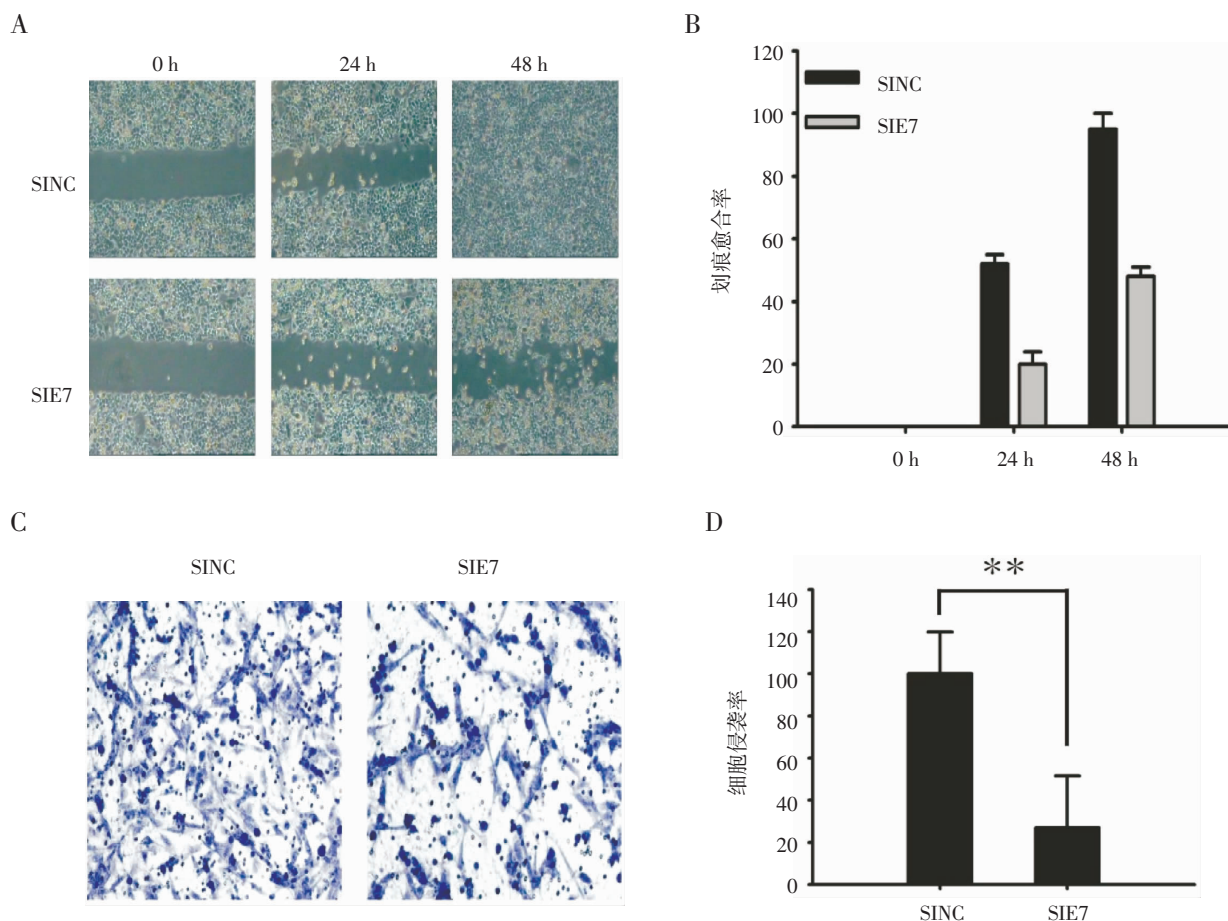
图 1 HeLa 细胞沉默 HPV18-E7 表达后细胞形态及 EMT 标记因子的表达变化

Fig 1 HPV18-E7 depletion induced MET in HeLa cells

**2.2 特异性沉默 HeLa 细胞 HPV18-E7 基因表达对细胞侵袭迁移能力的影响** 运用细胞划痕愈合实验及 Transwell 细胞体外侵袭实验检测特异性沉默 HeLa 细胞 HPV18-E7 基因(HeLa-SIE7 细胞)后细胞迁移及侵袭能力的变化。在 0、24、48 h 时点对细胞迁移情况进行对比显示,HeLa-SIE7 细胞迁移能力明显低于对照组,且具有统计学意义( $P < 0.01$ )

(图 2 A,B)。行 Transwell 细胞体外侵袭实验 48 h 后,对发生侵袭转移的细胞进行染色计数,发现穿透 Transwell 小室基底膜的 HeLa-SIE7 细胞数较对照组少,且差异有统计学意义( $P < 0.01$ )(图 2 C,D)。以上结果表明,在 HPV18 阳性的人宫颈癌细胞 HeLa 中特异性下调 E7 基因的表达可使细胞侵袭迁移能力明显下降。





A.细胞划痕愈合实验检测细胞迁移能力;B.细胞迁移能力的统计图;C.Transwell 细胞体外侵袭实验检测细胞侵袭能力;D.细胞侵袭能力的统计图, \*\* $P<0.01$

图2 HeLa 细胞下调 HPV18-E7 表达对细胞侵袭迁移能力的影响

Fig 2 Down-regulation of HPV18-E7 inhibited invasion and migration of HeLa cells

### 3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,我国宫颈癌的发病率和死亡率持续增加并出现了年轻化趋势。现有的流行病学及分子生物学研究证实,HPV 病毒(human papillomavirus,HPV)的感染是导致宫颈癌发生的最主要病因,约 97%的宫颈癌均伴有 HPV 的感染。临床最为常见的宫颈癌有宫颈鳞状细胞癌和宫颈腺癌两大类,所占比例分别为 75%~90%,10%~25%。近年来多项研究指出宫颈腺癌的发病率有上升及年轻化趋势。宫颈腺癌易发生局部浸润、淋巴结转移及远处转移,且病程进展迅速,预后较鳞癌差。对 3 471 例宫颈癌患者进行分类研究,指出宫颈腺癌发生卵巢转移的比例较鳞癌高,分别是 5.31%,0.79%。两种病理类型的宫颈癌其感染 HPV 的类型也不同。流行病学显示,宫颈鳞状细胞癌多以 HPV16、HPV58 型感染为主,宫颈腺癌以 HPV18、HPV45 型感染为主,其中 HPV18 型所占比例高达 34%~50%。在宫颈癌发生发展过程中,

HPV 的两个重要癌蛋白 E6/E7 起着关键作用。现有研究表明 E6/E7 蛋白可分别与抑癌蛋白 p53 和 pRb 结合,使 p53 通路和 Rb 通路失去活性,导致其对细胞周期的调控发生异常,最终引起细胞增殖失控,抑癌基因对 DNA 的损伤修复功能丧失,导致癌前病变及癌症的发生,与宫颈癌的发生发展密切相关。因此可以针对 HPV18-E6/E7 为靶点来研究宫颈腺癌发生侵袭转移的机制,从而解释其预后差的原因,并以此找到改善其不良预后的治疗方法。

EMT 是哺乳动物胚胎发育过程中的生理现象,也是维持生命体组织平衡的基本生理事件。现在越来越多的证据证实 EMT 可以抑制细胞凋亡、促进肿瘤耐药性发生、促使肿瘤细胞具有干细胞特性、促进肿瘤细胞发生浸润转移等<sup>[8]</sup>。EMT 是上皮标记性物质表达下调并发生再定位的同时间质标记性物质表达上调最终导致细胞获得侵袭迁移能力的一个动态过程<sup>[9]</sup>,这一过程需细胞内特定的因子及通路的协助与调控。目前证实的参与调控 EMT 过

程的因子包括转录因子 (Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist1, Twist2 等), miRNAs(miR-200 家族)及一些生长因子(PDGF-D)等。近期,对人正常包皮细胞,犬肾上皮细胞 (MDCK 细胞),HPV16 阳性的 SiHa 细胞及头颈部鳞状细胞癌细胞中的研究证实 HPV16-E6/E7 能够诱导 EMT 发生,然而 HPV18 阳性表达的宫颈腺癌 HeLa 细胞中无相关研究。

本次研究首次在人宫颈腺癌 HeLa 细胞中探讨 HPV18-E7 与 EMT 的关系。研究证实,宫颈腺癌中 HPV18-E7 能够诱导 EMT 发生并使细胞处于间质化状态从而促进肿瘤细胞发生侵袭转移。诱导 EMT 是 HPV18-E7 新发现的功能,此结果为 HPV18-E7 在宫颈腺癌中的作用添加了另一个标签:HPV18-E7 不仅在宫颈腺癌发生中起作用,其还在宫颈腺癌的发展即侵袭迁移方面起重要作用,HPV18 持续感染可诱导宫颈腺癌细胞发生侵袭转移,影响其预后及治疗效果。

#### 参考文献:

- [1] Zhao F H, Tiggelaar S M, Hu S Y, et al. A multi-center survey of age of sexual debut and sexual behavior in Chinese women: suggestions for optimal age of human papillomavirus vaccination in China[J]. Cancer Epidemiol, 2012, 36(4):384
- [2] 冯淑瑜,张彦娜,刘建刚. 宫颈癌淋巴结转移的高危因素及预后分析[J].癌症, 2005, 24(10):1261
- [3] Grigore A D, Jolly M K, Jia D, et al. Tumor budding: the Name is EMT. partial EMT[J]. J Clin Med, 2016, 5(5): pii: E51
- [4] Brivio S, Cadamuro M, Fabris L, et al. Epithelial-to-Mesenchymal transition and cancer invasiveness: what can we learn from cholangiocarcinoma[J]. J Clin Med, 2015, 4(12):2028
- [5] Li Y, Wang W, Wang W, et al. Correlation of TWIST2 up-regulation and epithelial-mesenchymal transition during tumorigenesis and progression of cervical carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2012, 124(1): 112
- [6] Hellner K, Mar J, Fang F, et al. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of epithelial to mesenchymal transition[J]. Virology, 2009, 391(1):57
- [7] Jung Y S, Kato I, Kim H R. A novel function of HPV16-E6/E7 in epithelial-mesenchymal transition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435(3):339
- [8] Micalizzi D S, Ford H L. Epithelial-mesenchymal transition in Cancer:parallels between normal development and tumor progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2):117
- [9] Hugo H, Ackland M L, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression[J]. J Cell Physiol, 2007, 213(2):374

(2016-04-30 收稿)

文章编号 1006-8147(2016)06-0491-03

个例报道

## 儿童嗜酸性胃肠炎伴血性腹水 1 例报道

王瑜,郑荣秀

(天津医科大学总医院儿科,天津 300052)

关键词 嗜酸性粒细胞;嗜酸性细胞性胃肠炎;腹水;儿童

中图分类号 R725.7

文献标志码 B

嗜酸性细胞性胃肠炎 (eosinophilic gastroenteritis, EGE) 是一种少见的胃肠道某些部位有弥漫性或局限性嗜酸性粒细胞(eosinophilic cell, EC)浸润为特征的消化系统疾病,儿童更为罕见,现报道 1 例儿童 EGE 合并血性腹水的病例,并结合文献回顾分析,探讨其临床表现、影像学特点、病理改变及治疗和转归,希望临床医师加深对该病的理解与认识。

### 1 临床资料

患儿,男,11 岁,主因“间断腹痛 1 个月,发热 10 d”入院。既往史:自 6~7 岁始反复发生皮肤大

片状荨麻疹,尤以夏季潮湿季节多见。1 年前行点刺试验示对霉菌、干草尘埃、肉类、蚌类、桃、鸡蛋、牛奶等过敏。半年前曾因腹痛、腹泻在当地医院就诊,发现外周血嗜酸性粒细胞增多(55%),予一般助消化药物(多酶片)治疗 1 周后症状缓解,后随访监测外周血常规,嗜酸性粒细胞比例逐渐下降,1 个月后降至正常。家族过敏史:患儿父亲既往有反复荨麻疹史。

入院查体:体温 36.7℃,心率 80 次/min,呼吸 15 次/min,血压 100/80 mmHg,体质量 38 kg;精神尚可,反应正常,体形较消瘦。皮肤弹性可,无水肿。全身表浅淋巴结未触及。两肺呼吸音正常。心音有力、

作者简介 王瑜(1986-),女,住院医师,硕士,研究方向:儿科;通信作者:郑荣秀,E-mail:rxzheng@hotmail.com。