

# 新型 RNAi 载体抑制 HPV16E6 基因在人宫颈癌细胞 Caski 中的表达\*

杨峥嵘<sup>1,2</sup> 何飞<sup>3</sup> 李蓉<sup>4</sup> 王海峰<sup>2</sup>

(1 深圳市疾病预防控制中心艾滋病实验室 广东 深圳 518055 2 清华大学深圳研究生院生物医药研究中心 深圳 518055 ;

3 深圳市人民医院口腔医学中心 广东 深圳 518020 4 第三军医大学复合伤研究所 重庆 400037)

**摘要** 目的:利用自行构建的一种基于 Semliki 森林病毒的新型 RNAi 载体 pSFV-RNAi Ready, 验证将其用于短期高效沉默 HPV16E6 基因的效果。方法:以 HPV16E6 为靶标基因,设计并构建基于 pSFV-RNAi Ready 的重组质粒,分直接电击转染和病毒颗粒共培养两种方式转入人宫颈癌细胞株 Caski,RT-PCR、Western blot 检测 HPV16E6 表达水平。结果:重组质粒对 HPV16E6 沉默效果优于常规 RNAi 质料载体,接近化学合成小 RNA,抑制率可高达 90%以上,10 天后效果仍然存在。结论:新型 RNAi 载体 pSFV-RNAi Ready 可较好地应用于特异高丰度靶基因的表达抑制,有望用于未来的科学研究或治疗应用。

**关键词** RNA 干扰, Semliki 森林病毒, 病毒载体, 宫颈癌

中图分类号: Q784, R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)01-41-03

## A novel viral vector-mediated RNAi of HPV16 E6 expression in human cervical cancer cell Caski\*

YANG Zheng-rong<sup>1,2</sup>, HE Fei<sup>3</sup>, LI Rong<sup>4</sup>, WANG Hai-feng<sup>2</sup>

(1 Department of AIDS Prevention, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China;

2 Center for Biotech & BioMedicine, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China;

3 Department of stomatology, people's hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China;

4 Institute of Combined injury, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**ABSTRACT Objective:** To examine the silence effects of HPV 16E6 gene, which mediated by pSFV-RNAi Ready, a novel RNAi vector based on SFV replicator. **Methods:** Targeting HPV16E6 gene, Construct an re-combined plamid with pSFV-RNAi Ready, Then introduced into Caski cells by PLUS transfection and co-culture with viral particle. The expression of HPV16 E6 were investigated by RT-PCR and Western blot. **Results:** The novel pSFV-RNAi Ready vector was constructed successfully, Results of RT-PCR and Western blot indicated that pSFV-RNAi Ready mediated RNAi reduced HPV16E6 expression by more than 90 percent, which similar to chemically synthesized short interfering RNAs, much stronger than traditional RNAi vector, and continue to work after more than 10 days. **Conclusion:** pSFV-RNAi Ready vector could silence the specific high-expressed target gene efficiently, It have potential for scientific research or clinical therapy in the futrue.

**Key words:** RNAi; Semliki forest virus; vector; cervical cancer

**Chinese Library Classification(CLC):** Q784, R737.33 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)01-41-03

### 前言

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)近年来在基因分析和基因治疗研究中应用日益广泛,但在解决 RNA 给药途径及 RNA 稳定性上仍面临质疑。利用载体表达抑制时间相对较长,能部分解决药物稳定性和组织特异性的问题,但往往表达效率不够高,在形成局部 siRNA 浓度及抑制效果上均明显不如化学合成 siRNA,尤其是当面对表达丰度特别高的特定基因(如患者体内致病/癌基因)时普遍效果欠佳<sup>[1,2]</sup>,而表达效率较高的病毒载体如腺病毒则又易受宿主细胞抗病毒免疫等影响,使用受限<sup>[3,4]</sup>。

鉴于以上情况,本室近年自行构建了一种基于西蒙尼克森

林病毒(Semliki forest virus, SFV)复制子的新型 RNAi 体内表达载体系统,理论上具有利用 RNA 复制酶催化、短期高效表达的特点,不同于目前应用中的任何一类 RNAi 载体<sup>[5]</sup>。本研究拟验证将其用于沉默人宫颈癌细胞中 HPV16E6 基因的初步效果,以期为未来的科学研究或治疗应用打基础。

### 1 材料方法

#### 1.1 载体与细胞株

质粒 pSFV-RNAi Ready 由本室自行构建。siRNA 质粒 pSilencer1.0-U6 购自 Ambion。Caski、BHK21 细胞株购自武汉大学细胞保藏中心,培养条件:加入含 100 单位/ml 青霉素、10μg/ml 链霉素及 10%小牛血清(GIBCO)的 DMEM 完全培养

\* 基金项目:中国博士后基金项目(20060390073) 深圳市科技计划项目

作者简介:杨峥嵘(1973-)男,博士,副研究员,主要研究方向:病毒感染性疾病防治、分子生物学技术等。

(Tel)075525530324 (Fax)075525632404, E-mail yangzr1226@yahoo.com.cn

(收稿日期:2010-10-20 接受日期:2010-11-15)

基(GIBCO), 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下恒温培养箱中培养, 约 2-3 天传代一次。

### 1.2 核酸合成及主要试剂

RNAi 相关序列由上海吉凯合成。限制性内切酶 Spe I、Xba I、Spe I、EcoR、Ssp I、BamH I 等, 以及常规 PCR 试剂、连接酶, 均购自 Takara。Nucleofector 转染试剂盒购自 Amaxa。鼠抗人 HPV16E6 单抗购自 Chemicon, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 购自上海华美。

### 1.3 抑制 HPV16E6 基因表达的小干扰 RNA 的设计及其编码基因的获得

根据 HPV16E6 基因序列(GenBank :AF536179), 选取位于 HPV16E6 基因开放阅读框转录起始位点下游 104-124bp 处长 21bp 的序列为靶点进行设计, 所得 siRNA 序列转换成相应 DNA, 并添加上 BssH II 粘端、19N 链、茎环序列、反向互补 19N 链、转录终止区和 Cla I 粘端, 最终具体序列如下(下划线部分为针对 HPV16E6 mRNA 的靶序列): 正义链 5'-CGCGCGT-GTGTGACTGCAAGCAACTTCAAGAGA GTTGCCTGCA-GTACACACATTTTTTAT -3'; 反义链 3'-GCACACACAT-GACGTTCTGTTGAAGTCTCTCAACGAACGTCATGTGTG-TAAAAATAGC -5'。人工合成上述单链(上海吉凯), 加水分别溶解至 1 g/l。

### 1.4 抑制 HPV16E6 基因表达的重组 RNAi 载体的构建

1.4.1 将上述人工合成单链退火成为双链, 以 Sma I 和 BamH I 双酶切后连入 pSFV-RNAi Ready, 连接产物转化 DH5 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选, 挑单克隆摇菌培养, 所提质粒用 BssH II 和 Cla I 双酶切及测序鉴定。重组 RNAi 载体命名为 pSFV-RNAi-HPV16E6。

1.4.2 将前述双链 DNA 两端的酶切位点更换为 Hind III 和 EcoR I, 合成并重组入传统、无关 RNAi 质粒 pSilencer1.0-U6 相应多克隆位点处, 所得质粒命名为 pSilencer-RNAi-HPV16E6。

### 1.5 电击转染 Caski 细胞及转染细胞 HPV16E6 基因表达水平的检测

1.5.1 电穿孔法转染细胞 将经测序鉴定正确的重组载体 pSFV-RNAi-HPV16E6 用电穿孔法(Amaxa 电转仪)转染 Caski 细胞, 另设 Caski 细胞空白对照组、化学合成 siRNA 处理组、阴性对照 siRNA 组和无关 RNAi 质粒 pSilencer-RNAi-HPV16E6 处理组, 同样方法转染 Caski 细胞。具体步骤为: 常规培养 Caski 细胞至对数期, 收集细胞, 选择针对宫颈癌细胞的 Nucleofector 液转染液 100μl (Amata 电转试剂盒) 重悬细胞, 加入 2μg 线性化载体或终浓度为 250nmol/L 的 siRNA, 混匀后移入 Amata 特制电击池, 选择相应程序电转 3s。结束后向电击池中加入 0.5mL 培养液, 冲洗并移入 6 孔板中培养。

1.5.2 Western Blot 法检测沉默效果 分别于转染后 24、48、72、120h 和 10d 镜下观察并收集各细胞, Western Blot 法检测细胞内 HPV16E6 蛋白的表达, 具体步骤为: 收集细胞到蛋白上样缓冲液中, 沸水浴 10min, 10000rpm 离心 10min, 取上清, 经 15% 的 SDS-PAGE 分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 以鼠抗人 HPV16E6 单抗为一抗, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗进行免疫酶反应, DAB 显色, Gel-Pro Analyzer 软件对各处理组与空

白对照组的灰度扫描比值分析细胞中 16E6 蛋白表达水平的变化。

### 1.6 重组 SFV 病毒颗粒制备及感染细胞 HPV16E6 基因表达水平的检测

方法详见文献<sup>[5]</sup>。将前述经测序鉴定正确的重组载体 pSFV-RNAi-HPV16E6 及 SFV-helper 质粒共同转染 BHK-21 包装细胞, G418 筛选, 阳性转染细胞传代培养 48h 后取上清离心收集病毒, 然后将病毒颗粒加入 Caski 细胞共培养 (MOI=10), 并分别于 24、48、72、120 小时和 10 天收集细胞提总蛋白, 同样 Western Blot 法检测细胞内 HPV16E6 蛋白的表达水平; 另外, 取病毒转染后培养 48h 细胞, PBS 清洗, 2% 多聚甲醛固定 10min, 作 X-gal 染色, 计数 5 个高倍镜视野下, 核蓝染细胞和未蓝染细胞的比例, 分析病毒基因转染细胞的能力。

### 1.7 统计分析

SPSS13.0 统计学软件进行相应的统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 质粒/siRNA 电击转染细胞 HPV16E6 基因沉默效果分析

设计并合成 siDNA-HPV16E6 的正义链和反义链, 成功构建了基于 pSFV-RNAi Ready 和传统 siRNA 质粒的 shRNA 表达质粒(测序及电泳图略)。

2.1.1 RT-PCR 结果 质粒/siRNA 转染后细胞的 RT-PCR 检测结果部分如图 1 示, 结果表明, 设计的 HPV16E6 特异 siRNA 及质粒表达 shRNA 能有效抑制细胞中 16E6 的表达, 对各条带与同组 GAPDH 内参的灰度扫描比值的分析表明, 与 Control 比, siRNA 组的这种抑制作用达到 82.5%(48h), 转染后 48h 达到峰值, 72h 后基本丧失; 与 siRNA 组比, 使用 pSFV-RNAi Ready 载体 RNAi 抑制效果峰值无明显降低(78.1%), 但出现更早(24h 内), 持续时间更长, 实践中 10d 后依然可以观察到抑制效果存在。

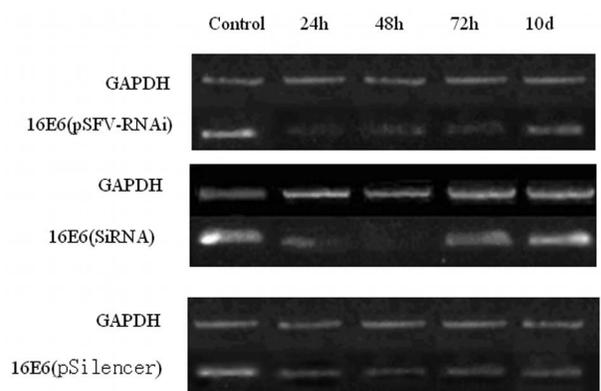


图 1 siRNA/RNAi 质粒转染细胞中 HPV16E6 表达的 RT-PCR 分析  
Fig 1 RT-PCR analyse of HPV16E6 gene expression in siRNA/RNAi plasmid transfected cells

2.1.2 Western blot 结果 转染后 48h 的 Western Blot 分析结果如图 2 所示, pSFV-RNAi Ready 载体所携 shRNA 高水平表达, 对 HPV16E6 蛋白表达水平的总抑制率为 72.4%, 化学合成 siRNA 组为 76.5%, 二者差异不显著(P>0.05)。镜下计数结果表明, 利用 Amata 电转方法, pSFV-RNAi Ready 载体对 Caski

细胞转染率为 75.7% ,因此该载体表达 shRNA 对 HPV16E6 蛋白表达的实际抑制率高达 95.6% ,甚至可能高于本实验所用浓度的化学合成 siRNA (理论上接近 100% 转染成功) ; 无关 RNAi 质粒组总抑制效果仅为约 60% , 由于其质粒远小于 pSFV-RNAi Ready , 细胞转染率应该更高 , 提示 pSFV-RNAi Ready 对外源 RNA (shRNA) 的表达效率大大超过常规的 RNAi 载体。

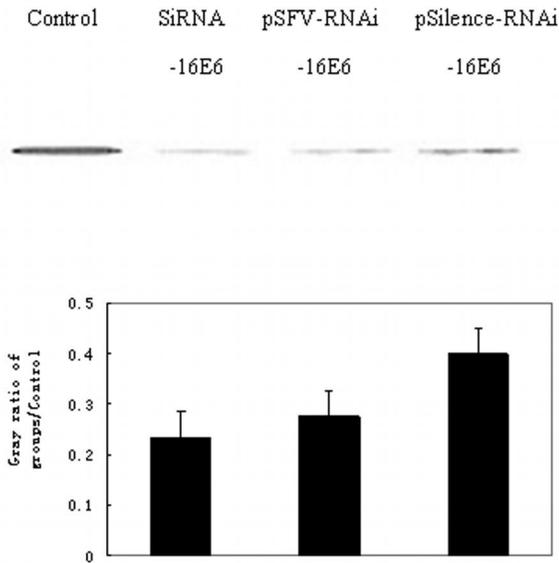


图2 siRNA/RNAi 质粒转染细胞中 HPV16E6 表达的 Western blot 分析

Fig 2 Western blot analyse of HPV16E6 protein expression in siRNA/RNAi plasmid transfected cells

## 2.2 重组 SFV 病毒颗粒转染细胞沉默效果分析

镜下观察结果显示 :本实验中该重组病毒对 Caski 细胞转染率接近 100% 。 各组 Western 结果趋势与电转移方法所获类似 , 其中 48h 组对 HPV16E6 表达总抑制率为 90.8% 。

## 3 讨论

SFV 几乎对所有哺乳动物细胞易感 , 表达效率高 , 病毒免疫反应小 , 可在胞浆内复制 / 表达 , 是最有前景的新兴病毒载体技术之一<sup>[6,7]</sup>。 本室以 pSFV1 载体为基础构建了一类新型重组 RNAi 载体 pSFV-RNAi Ready , 具有利用 RNA 复制酶高效催化的特点 , 不同于目前应用中的任何一类 RNAi 载体<sup>[5]</sup>。 本研究将其用于沉默 HPV16E6 基因 , 实验结果进一步证实 , 安全性改进后 , 此载体可高效表达 10 天以上 (野生型病毒一般 20 小时内诱发脊椎动物细胞凋亡<sup>[8]</sup>) , 超过体外合成 siRNA 的平均 66 小时<sup>[9]</sup> , 而沉默效果无显著差异<sup>[10]</sup> ; 与传统 RNAi 质粒载体相比 , 抑制效果出现早 (转染后 24 小时内) , 抑制效率则远远胜出 (>90%) , 提示该载体对外源 RNA (shRNA) 的表达效率大大超过常规 RNAi 载体<sup>[11-12]</sup>。 因此 , 我们推测 , 对于某些细胞内用常规载体抑制效果欠佳的高丰度表达基因 , pSFV-RNAi Ready 载体拥有突出的抑制效果。 此类载体用于需短期高效沉默目的基因的科学实验 (如基因功能研究) 将具有毋庸置疑的优势 , 进一步改进后亦将有望用于制备抑制特异靶基因 (包括病毒基因、癌基因、转录因子和生长因子等基因 , 例如 HIV  $\rho$ -myc 或

VEGF 等) 表达的基因治疗性药物 , 应用前景广阔。

不过 , 目前版本的载体 pSFV-RNAi Ready 还有一些缺点需要克服 , 如质粒较大 (>12Kb) , 常规转染细胞时 (如脂质体转染) 影响转化效率。 使用 Nucleofector 电转技术可保证较高细胞转染率 , 但同时在设备和使用范围上增加了限制。 由于 SFV 的病毒学基础研究还存在许多空白 , 如何精简非必要的结构基因部分、减小质粒始终是个难题。 比较而言 , 加辅助质粒组装成病毒颗粒再感染细胞更为便捷和有效 : 本室曾在 pSFV-RNAi Ready 的多酶切位点中连入一个 EGFP 以观察病毒颗粒感染细胞的效率 , 发现实际感染率 >95%<sup>[5]</sup>。 关于 SFV 在人体应用的安全性方面 , 大规模人体应用数据至今未见报导 , 但目前欧洲已有个别 SFV 载体疫苗已经或即将进入临床实验<sup>[13,14]</sup>。 本实验载体要最终用于生物医药开发 , 尚有待进一步摸索。

## 参考文献 (reference)

- [1] Huang DD. The potential of RNA interference-based therapies for viral infections [J]. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2008, 5(1):33-39
- [2] Kim SS, Garg H, Joshi A, et al. Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs in vivo [J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(11):491-500
- [3] Yang ZR, Wang HF, Zhao J, et al. Recent developments in the use of adenoviruses and immunotoxins in cancer gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(7):599-615
- [4] Wang QZ, Lv YH, Diao Y, et al. The design of vectors for RNAi delivery system [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(13):1327-40
- [5] Yang ZR, He F, Wang HF, et al. Construction of a novel RNAi vector Based on Replicon Derived from Semliki Forest Virus [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2008, 8(11): 2005-2009 (in Chinese)
- [6] Atkins GJ, Fleeton MN, Sheahan BJ. Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2008, 11(10):e33
- [7] Quetglas JI, Ruiz-Guillen M, Aranda A, et al. Alphavirus vectors for cancer therapy [J]. *Virus Res*, 2010, 153(2):179-96
- [8] 金奇. 医学分子病毒学 [M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001: 1105-1107  
Jin Q. Medical molecular virology [M]. 1st Ed, Beijing: Science Press, 2001:1105-1107
- [9] Chen Y, Xie XF. Advance in mechanism and anti-viral effect of RNA interference [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2006, 14 (21) : 2123-2129 (in Chinese)
- [10] Niu XY, Peng ZL, Duan WQ, et al. Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference in vitro and in vivo [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(2):743-51
- [11] Guo JX, Li L, Bai Y, et al. Inhibition of HPV16 E6 in cervical cancer cells by lentivirus mediated shRNA [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2006, 28(11):1218-1220 (in Chinese)
- [12] Bousarghin L, Touze A, Gaud G, et al. Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(2):357-65
- [13] Daemen T, Riezebos-Brilman A, Regts J, et al. Superior therapeutic efficacy of alphavirus-mediated immunization against human papilloma virus type 16 antigens in a murine tumour model: effects of the route of immunization [J]. *Antivir Ther*, 2004, 9(5):733-42
- [14] Quetglas JI, Ruiz-Guillen M, Aranda A, et al. Alphavirus vectors for cancer therapy [J]. *Virus Res*, 2010, 153(2): 179-96