

16 型人乳头瘤病毒 E5 基因对永生化 口腔上皮细胞 EGFR、p21、p53 和 Rb 基因表达的影响

李迪¹ 江彤² 陈传俊^{1,3}

摘要 目的 分析 16 型人乳头瘤病毒 E5 基因(HPV16 E5)对永生化口腔上皮细胞(HIOEC)肿瘤相关基因表皮生长因子受体(EGFR)、p21、p53 和 Rb 表达的影响,探究 HPV16 E5 在口腔鳞状细胞癌发生发展过程中的潜在作用机制。方法 将含有目的基因 HPV16 E5 的慢病毒载体 pLOV-E5 及对照病毒载体 pLOV-N 分别转染 HIOEC 细胞,并筛选出各自稳定转染的细胞株。RT-qPCR 和 Western blot 法分别检测 EGFR、p21、p53 和 Rb 基因 mRNA 和蛋白表达水平的变化。MTT 法分析 HPV16 E5 对 HIOEC 细胞增殖活性的影响。结果 pLOV-E5 转染的 HIOEC 细胞中 p21 和 p53 的 mRNA 转录水平较对照组显著提高($P=0.00, 0.02$),但 EGFR 的 mRNA 转录水平较对照组无明显变化;EGFR、p21 和 p53 的蛋白表达水平较对照组均显著提高,Rb 基因的 mRNA 和蛋白表达水平较对照组均无明显变化。MTT 法检测结果表明,pLOV-E5 转染 HIOEC 的增殖活力较对照组显著提高($P=0.00$)。结论 HPV16 E5 可以促进 HIOEC 的增殖,同时上调 EGFR、p21 和 p53 在 HIOEC 中的表达水平。

关键词 人乳头瘤病毒;永生化;上皮细胞;HPV16 E5 基因
中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1288-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.007

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)作为一种小型无包膜的双链环状 DNA 病毒,是引起口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)最常见的生物因素,高危型 HPV16 是其中最主要的病毒类型,其和大多数 OSCC 的发生密切相关^[1]。HPV16 编码 E5、E6 和 E7 三种致癌蛋白。E6 可以降解抑癌蛋白 p53,下调的 p53 蛋白又能抑制 p21

蛋白的表达;而 E7 能够结合抑癌蛋白 Rb^[2]。E6 和 E7 基因的致癌性研究较为深入,而 E5 基因的研究相对较少。目前推测 HPV16E5 可能通过增强表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号通路的活性,促进细胞增殖,表现出一定的致癌性^[3]。也有研究^[4]显示 E5 基因可以增强 E6 和 E7 基因的致癌功能,但是其具体机制尚不明确。

HPV16 E6 和 E7 基因可以诱导正常口腔上皮细胞转化为永生化口腔上皮细胞(human immortalized oral epithelial cell, HIOEC)^[5],该细胞为研究 OSCC 的发生发展提供了很好的体外实验模型。为揭示 HPV16 E5 基因在 OSCC 发生发展中的潜在作用机制,该研究以 HIOEC 为研究对象,探讨 HPV16 E5 基因对该细胞中 EGFR、p53、p21 和 Rb 基因表达的影响以及是否促进细胞的恶性转化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 慢病毒载体和细胞株 含有目的基因 HPV16 E5 的慢病毒载体 pLOV-EF1a-PuroR-CMV-EGFP-P2A-HPV16-E5-3Flag(pLOV-E5)及其对照病毒载体 pLOV-EF1a-PuroR-CMV-MCS-EGFP-3Flag(pLOV-N)由上海和元生物公司包装完成。HIOEC 由上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔肿瘤生物实验室叶冬霞老师惠赠。

1.1.2 引物设计与测序 所有引物的设计、合成和测序工作均由上海生工生物工程股份有限公司完成,引物序列见表 1。

1.1.3 主要试剂 角化细胞无血清细胞培养液 defined keratinocyte-serum free medium (DK-SFM)、0.05% Trypsin-EDTA 均购自美国 Gibco 公司;RNA 提取试剂 TRIzol 购自美国 Ambion 公司;高效 RIPA、蛋白酶抑制剂 PMSF 购自北京 Solarbio 公司;逆转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 购自日本 TaKaRa 公司;Flag 抗体、MTT、DMSO 均购自美国 Sigma 公司;p53 抗体、EGFR 抗

2017-05-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81172574);皖南医学院人才引进科研启动基金资助项目(编号:WK2014RC03)

作者单位:¹安徽医科大学第三附属医院口腔颌面外科,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:李迪,男,硕士研究生;

陈传俊,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail:cej6318@sina.com

体、Rb 抗体购自美国 Abcam 公司;p21 抗体购自美国 CST 公司;GAPDH 抗体购自美国 ImmunoWay 公司;ECL 试剂盒购自德国 Millipore 公司。

表1 所用引物序列表

基因	序列(5'-3')
EGFR	F: CCAAGGCACGACTAACAAGC R: ATTCCCAAGGACCACCTCAC
Rb	F: AGGTCTGCCAACACCAACA R: CCTTCAGCACTTCTTTGAGC
P53	F: TAGTGTGGTGGTGCCTATG R: CCACTGTGATGATGGTGAGG
P21	F: TGCCCAAGCTCTACCTCC R: CAGTCCACATGGTCTTCCT
β -actin	F: CCTGGCACCAGACAAT R: GGGCCGGACTCGTCATAC

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和稳定筛选 使用角化细胞无血清培养液 DK-SFM 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养皿中培养 HIOEC 细胞,待细胞融合度达 70% ~ 80% 时,用 0.05% 的 Trypsin-EDTA 消化,按 1 : 3 的比例进行传代。

6 孔板每孔接种 2.5×10^5 个对数期生长的 HIOEC,加入 DK-SFM 培养基(2 ml/孔) 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。待细胞融合度达 70% ~ 80% 时,用慢病毒 pLOV-E5 和等量的对照病毒 pLOV-N 分别转染 HIOEC(2.5×10^7 TU/孔),同时每孔细胞加入 10 μ l 的 polybrene 液。转染后待细胞生长接近融合时,用 0.05% 的 Trypsin-EDTA 消化,按 1 : 3 密度传代,继续培养至细胞融合达 50% ~ 70% 时,弃去培养液,用 1 μ g/ml 的嘌呤霉素开始抗性筛选,同时用未转染的细胞作对照。当对照细胞大部分死亡后,更换正常 DK-SFM 培养液,至细胞重新融合达 90% 左右时,再次加入 1 μ g/ml 的嘌呤霉素进行筛选。如是筛选 2 ~ 3 次,可见抗性克隆形成,待其长满后,转移至新的 6 孔板中继续培养。荧光显微镜观察以及 Flag 抗体检测 3Flag + HPV16 E5 融合蛋白的表达,来鉴定阳性克隆。稳定表达 HPV16 E5 的 HIOEC 简称 HIOEC/pLOV-E5 细胞,作为实验组;含有对照病毒的 HIOEC 简称 HIOEC/pLOV-N 细胞,作为空白对照组;未转染的 HIOEC 作为阴性对照组。

1.2.2 MTT 法绘制细胞增殖曲线 取对数生长期的 HIOEC/pLOV-E5、HIOEC/pLOV-N 和 HIOEC 细胞,用 0.05% 的胰酶消化,制成单细胞悬液,调整悬

液细胞浓度为 6×10^4 /ml,于 96 孔板中每孔加入 150 μ l 该悬液,每孔细胞 9×10^3 个,每种细胞设置 3 个复孔,旁边用 DK-SFM 培养基作为空白对照,共铺 6 块板,37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育。自接种第 2 天开始,每天定点取出 1 块板,加入 10 mg/ml 的 MTT 液 15 μ l 于每孔中,然后 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h,吸去孔内培养液,加入 150 μ l DMSO,室温避光震荡 10 min。上酶标仪检测 490 nm 处光密度值。

1.2.3 RT-qPCR 检测目的基因 EGFR、p21、p53 和 Rb 在细胞系中的表达 分别用 TRIzol 试剂提取 3 种细胞的总 RNA,然后通过反转录系统 Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 将总 RNA 反转录为 cDNA。每种样品设置 3 个复孔,加入目的基因的各自引物,在实时荧光定量 PCR 仪 Mx3000P (Stratagene) 上,用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 系统对目的基因的 cDNA 进行扩增和检测。反应条件如下:95 °C 10 min;95 °C 30 s,59 °C 1 min,72 °C 1 min,40 个循环;95 °C 1 min,60 °C 30 s,95 °C 30 s。RT-qPCR 扩增仪得到各孔样品达到指定阈值时的 Ct 值,目的基因 mRNA 的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 $\Delta\Delta Ct = [目的基因 Ct(慢病毒刺激组) - \beta-actin Ct(慢病毒刺激组)] - [目的基因 Ct(阴性对照组) - \beta-actin Ct(阴性对照组)]$ 。

1.2.4 Western blot 法检测目的蛋白 EGFR、p21、p53 和 Rb 在细胞中的表达 用强效 RIPA 蛋白裂解液裂解 3 种细胞,同时加入适量的蛋白酶抑制剂 PMSF(PMSF : RIPA = 1 : 100),提取细胞总蛋白。蛋白经 SDS-PAGE 后被分离,然后转移到 PVDF 膜上,5% BSA 封闭液室温封闭 1 h,Flag 抗体 1 : 1 000(美国 Sigma 公司);EGFR 抗体 1 : 2 000、p53 抗体 1 : 500、Rb 抗体 1 : 1 000(美国 Abcam 公司);p21 抗体 1 : 1 000(美国 CST 公司);GAPDH 抗体 1 : 10 000(美国 ImmunoWay 公司)4 °C 孵育过夜,相应的二抗 1 : 10 000 室温孵育 1 h,经 ECL 试剂盒曝光成像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。单因素方差分析 3 组及以上数据,如组间差异有统计学意义,则采用最小显著性差异法进行两两比较,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV16 E5 基因在 HIOEC 中的稳定表达 荧光显微镜下观察经过稳筛空白对照组和实验组细

胞,可见到满视野的细胞均有绿色荧光,见图1B、C。阴性对照组细胞则无绿色荧光,见图1A。Flag抗体检测融合蛋白3Flag+GFP和3Flag+HPV16 E5的表达,结果3Flag+HPV16 E5蛋白只在实验组细胞中表达,3Flag+GFP蛋白只在空白对照组细胞中表达,见图2。

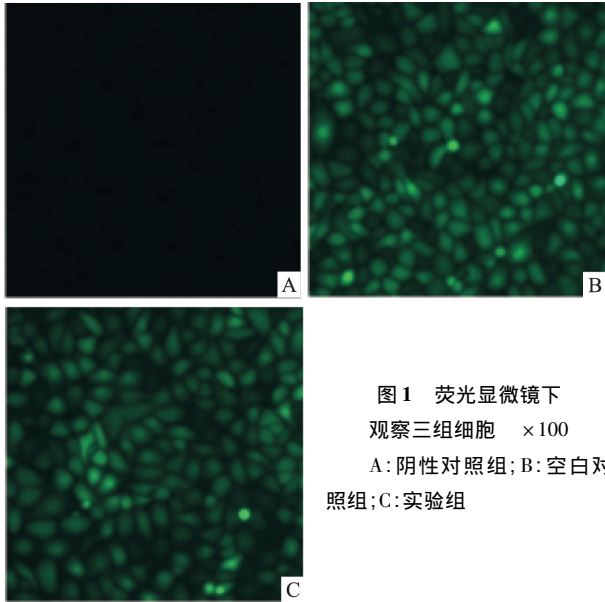


图1 荧光显微镜下观察三组细胞 ×100
A: 阴性对照组; B: 空白对照组; C: 实验组

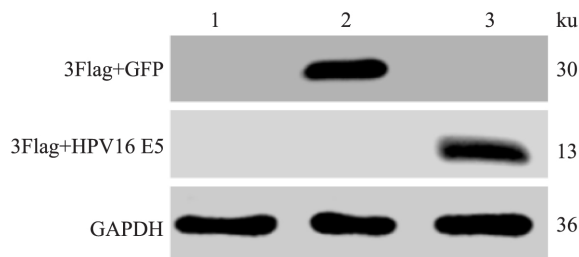


图2 不同Flag融合蛋白在三组细胞中的表达情况
1: 阴性对照组; 2: 空白对照组; 3: 实验组

2.2 HPV16 E5 促进 HIOEC 的生长与增殖
HPV16 E5 虽然没有上调 EGFR mRNA 的表达水平,见图3。但是 Western blot 法检测 EGFR 总蛋白在三组细胞中的表达情况,均可见到明显的阳性条带,其中阴性对照组和空白对照组细胞的条带深度基本一致,实验组细胞的条带深度较两对照组细胞明显增强,见图4,说明实验组细胞中 EGFR 总蛋白表达量增多。利用 MTT 法检测结果绘制的细胞增殖曲线显示,实验组细胞的增殖速度要快于其他两对照组细胞,差异有统计学意义 ($F = 187.05, P < 0.05$),见图5。

2.3 HPV16 E5 上调 p21 和 p53 基因的转录与翻译水平 RT-qPCR 检测结果显示,空白对照组细胞

和阴性对照组细胞的 p21 和 p53 mRNA 表达水平基本一致,而实验组细胞的 p21 和 p53 的 mRNA 表达水平要高于两对照组细胞,差异有统计学意义 ($F = 32.63, 25.36, P < 0.05$),见图6。Western blot 法分析 p21 和 p53 蛋白在三组细胞中的表达差异,取得了和 RT-qPCR 检测相一致的结果,见图7。但是 Rb 基因的 mRNA 和蛋白的表达水平均未见明显变化。

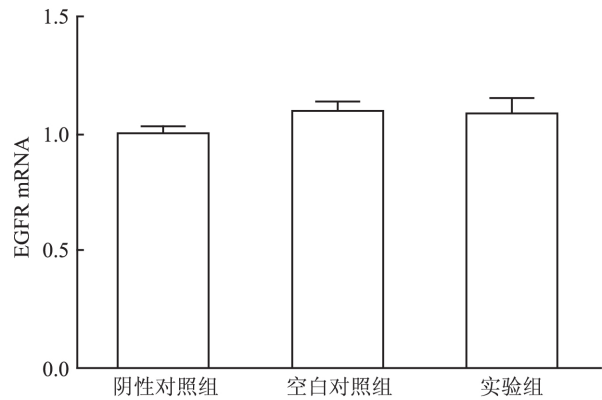


图3 RT-qPCR 检测 EGFR mRNA 在三组细胞中的表达水平

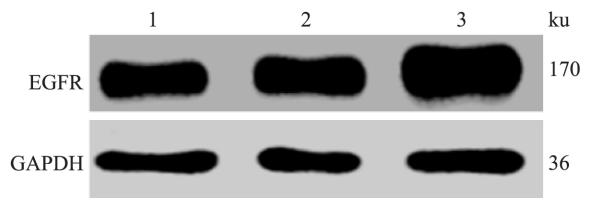


图4 Western blot 法分析 EGFR 蛋白在三组细胞中的表达差异
1: 阴性对照组; 2: 空白对照组; 3: 实验组

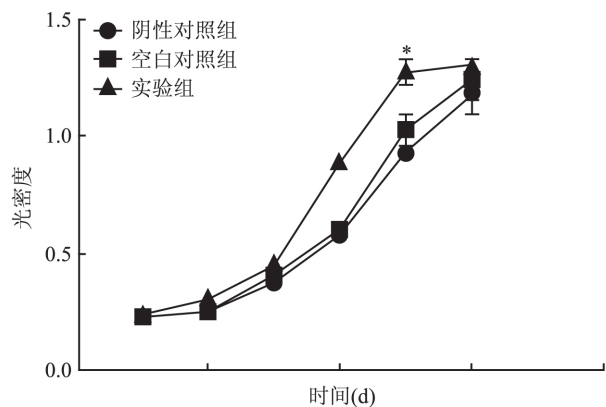


图5 三组细胞的增殖曲线
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

EGFR 作为一种跨膜酪氨酸激酶型受体,是表皮生长因子受体家族的一员。EGFR 信号通路在细

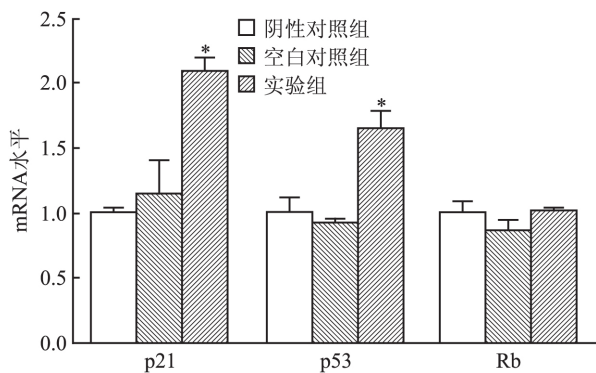


图6 RT-qPCR分析 p21、p53 和 Rb 的 mRNA 在三组细胞中的表达差异与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

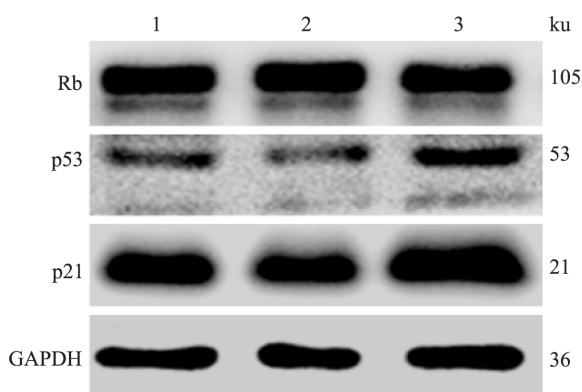


图7 Western blot 法分析 p21、p53 和 Rb 蛋白在三组细胞中的表达差异
1: 阴性对照组; 2: 空白对照组; 3: 实验组

胞生长、增殖、凋亡和生存等生理过程中发挥着重要作用,在许多肿瘤细胞中均发现了过表达的 EGFR。

早期研究^[6]显示,HPV16 E5 基因转染进细胞后,使得细胞对 EGF 更加敏感,低水平的 EGF 就能够促进其生长。随后 HPV16 E5 可以促进 EGFR 从内含体转移到细胞表面,从而间接地提高 EGFR 水平^[7]。进一步研究^[8]显示 HPV16 E5 通过结合 16 ku 空泡质子 ATP 酶的亚基来阻止内含体酸化及 EGFR 的降解,从而使更多的 EGFR 循环回细胞膜表面。但是也有研究^[9]推测 HPV16 E5 是通过影响肌动蛋白细胞骨架的重组来改变 EGFR 的转运。E5 还能够阻止 EGFR 和泛素连接酶 c-Cbl 相互作用,从而抑制泛素化以及 EGFR 的降解^[10]。总之,位于细胞表面的 EGFR 过表达可以增强 EGFR 信号通路活性,促进细胞的生长与增殖。在调控细胞周期进程方面,E5 能够通过 EGFR 依赖方式促进细胞进入 S 期^[11],进而加速细胞生长。本研究显示转染 HPV16 E5 基因后,HIOEC 中 EGFR mRNA 转录水

平无明显变化,但是 EGFR 蛋白表达量明显增多,提示在 HIOEC 中,E5 并不是通过直接调控 EGFR 的转录与翻译,使 EGFR 表达增多,而可能影响了 EGFR 翻译后的水平,如减慢 EGFR 的降解,使更多的 EGFR 循环回细胞表面,间接地增强了 EGFR 的表达水平,这与相关研究^[7-10]发现是一致的。而且 MTT 法检测显示,稳定转染 HPV16 E5 基因后,HIOEC 的增殖活性明显增强,这可能是由于 E5 增强了 EGFR 信号通路活性,加快了细胞增殖。

p21 是由 165 个氨基酸构成的小蛋白,属于 CIP/Kip 家族中的一员,位于 p53 基因下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子。p21 可以阻止 G1/S 期和 G2/M 期的细胞周期进程^[12],发挥着抑癌作用。早期研究^[13]显示 HPV16 E5 可以抑制 p21 基因启动子的活性,下调其表达水平,p21 作为调控细胞周期进程的关键蛋白,其下调将会导致细胞生长加快甚至呈恶性增殖。然而本研究却显示,HPV16 E5 在 HIOEC 中能够上调 p21 的表达水平,和预期的结果相反。p21 的表达主要还受 p53 的调控,而 E6 又能下调 p53 的表达,这点在对 HPV16 E6、E7 诱导永生生化包皮成纤维细胞及宫颈上皮细胞的研究中被证实^[14]。但是在 HPV16 E6、E7 基因诱导的 HIOEC 中,研究者却发现 p53 表达明显高于正常口腔黏膜上皮,而且 p21 的表达水平也随之升高^[15],说明在 HIOEC 中,E6、E7 基因可能通过其他机制促进了 p21 和 p53 的表达。本研究进一步检测了 p53 的 mRNA 和蛋白在每组 HIOEC 中的差异,实验组细胞中 p53 的表达要明显高于其他两个对照组。由于 E5 基因能促进 E6、E7 基因的表达^[16],在 HIOEC 中,E5 可能调控了 E6、E7 基因的表达,进而促进 p53 和 p21 的表达,但是具体调控机制并不清楚,有待进一步实验论证。p53 和 p21 在 HIOEC 中的过表达,在之前的研究^[17]中也有类似的发现,如在 HPV16 E6 E7 诱导的小鼠口腔黏膜细胞中显示,p53 及 p21 的表达比对照组细胞明显增强。在一些肿瘤细胞中,过表达的 p21 起到抗凋亡作用,表现出一定的致癌功能^[12]。还有研究^[18]表明 HPV16 E7 能够增加 p53 的稳定性,造成 p53 的堆积,随之其蛋白水平也升高。

Rb 蛋白是调控细胞周期进程的另一关键蛋白,去磷酸化 Rb 蛋白是其功能状态,HPV16 E7 蛋白可以结合去磷酸化 Rb 蛋白形成复合物,释放原本与其结合的转录因子 E2F 蛋白,E2F 蛋白能活化一系列基因的表达,加快细胞的生长与增殖^[2]。本研究

显示,在 HIOEC 中,HPV16 E5 对 Rb 基因的表达并无明显影响,这可能由于 E5 基因虽然能够促进 E7 基因的表达,而过表达的 E7 蛋白只是结合了去磷酸化 Rb 蛋白,并没有影响其表达。另有研究^[16]显示 p21 蛋白能够影响 CDK4-cyclin D 复合物的激活,激活的该复合物能够导致 Rb 蛋白的磷酸化。在 HIOEC 中,E5 可能通过影响 p21 蛋白的表达,进而使 Rb 蛋白的功能状态发生改变。总之,E5 并不是影响 Rb 蛋白的表达量,而可能改变其磷酸化状态,进而影响细胞的增殖与生长。

综上所述,在 HIOEC 中,HPV16 E5 能够上调 EGFR、p21 和 p53 的表达,促进细胞的生长与增殖,可能与其在 OSCC 中的潜在致癌性有关,但是其中具体分子机制并不清楚,有待继续研究。

参考文献

- [1] Zhu C, Ling Y, Dong C, et al. The relationship between oral squamous cell carcinoma and human papillomavirus: a meta-analysis of a Chinese population(1994–2011) [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36294.
- [2] Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(10):1505–11.
- [3] Ganguly N. Human papillomavirus-16 E5 protein: oncogenic role and therapeutic value[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2012, 35(2):67–76.
- [4] Riley R R, Duensing S, Brake T, et al. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis [J]. *Cancer Res* 2003, 63(16):4862–71.
- [5] 张志愿,帕提曼·司地克,曹俊,等. 16 型人类乳头状瘤病毒 E6、E7 诱导的永生化口腔上皮细胞系的建立 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2002, 37(1): 12–4.
- [6] Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor [J]. *Oncogene*, 1992, 7(1):27–32.
- [7] Straight S W, Hinkle P M, Jewers R J, et al. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes [J]. *J Virol*, 1993, 67(8):4521–32.
- [8] Dimairo D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins [J]. *Oncogene*, 2001, 20(54):7866–73.
- [9] Supryniewicz F A, Krawczyk E, Hebert J D, et al. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification [J]. *J Virol* 2010, 84(20):10619–29.
- [10] Zhang B, Srirangam A, Potter D A, et al. HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes [J]. *Oncogene* 2005, 24(15):2585–8.
- [11] Pedroza-Saavedra A, Lam E W, Esquivel-Guadarrama F, et al. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27 (Kip1) [J]. *Virology*, 2010, 400(1):44–52.
- [12] Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2016, 42:63–71.
- [13] Tsao Y P, Li L Y, Tsai T C, et al. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21 (Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes [J]. *Virology*, 1996, 70(11):7535–9.
- [14] Hietanen S, Syrjänen K, Syrjänen S. Characterization of keratin and cell cycle protein expression in cell lines from squamous intra-epithelial lesions progressing towards a malignant phenotype [J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(5):766–75.
- [15] 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(7):653–7.
- [16] Tsai T C, Chen S L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein [J]. *Arch Virol*, 2003, 148(8):1445–53.
- [17] Crish J F, Bone F, Balasubramanian S, et al. Suprabasal expression of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell cycle regulatory proteins [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(5):1031–7.
- [18] Jones D L, Munger K. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein [J]. *Virology*, 1997, 71(4):2905–12.

Effects of human papillomavirus E5 gene on EGFR, p21, p53 and Rb gene expression in immortalized oral epithelial cells

Li Di¹, 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 investigate the effects of HPV16 E5 on the expression of EGFR, p21, p53 and Rb in the

网络出版时间: 2017-7-20 23:55 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.008.html

TGF- β 1 对口腔鳞癌相关成纤维细胞 FAP 表达的影响

唐婉容, 李丽华, 喻洁, 马莹, 刘英

摘要 目的 探讨转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 对癌相关成纤维细胞 (CAFs) 中成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 表达的影响。方法 应用 10 ng/ml 的 TGF- β 1 作用于 CAFs 细胞, 设置正常成纤维细胞 (NFs) 和未经处理的 CAFs 细胞作为对照组, 采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测细胞中 FAP 的蛋白和 mRNA 表达情况。结果 FAP 在 NFs 中几乎不表达, 而在 CAFs 中 FAP 的 mRNA 和蛋白表达均增加。与 NFs 组和 CAFs 组相比, 10 ng/ml 的 TGF- β 1 能够明显促进 CAFs 细胞分泌 FAP, 作用 12、24 h 后 FAP mRNA 和蛋白的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。且随着作用时间的延长, FAP 的表达持续升高, 24 h 较 12 h 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 TGF- β 1 能够促进 CAFs 中 FAP 的表达, 在肿瘤上皮-间质交互作用中扮演着重要角色。

关键词 转化生长因子- β 1; 癌相关成纤维细胞; 成纤维细胞活化蛋白

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1293-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.008

口腔鳞状细胞癌是最常见的口腔恶性肿瘤, 以往对口腔癌的研究较多的集中于肿瘤上皮, 但近年

来的研究^[1]显示肿瘤微环境对肿瘤的发生发展转移具有重要的调控作用。肿瘤间质中数量最多的细胞为癌相关成纤维细胞 (carcinoma-associate fibroblasts, CAFs), 研究^[2]表明 CAFs 通过其分泌功能参与肿瘤的增殖、侵袭和转移。成纤维细胞活化蛋白 (fibroblast activation protein, FAP) 是 CAFs 最具代表性的分泌产物之一, 与肿瘤的生长侵袭密切相关, 目前对 FAP 的研究集中其对肿瘤的影响, 而对 CAFs 分泌 FAP 分子机制研究较少。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 能够促进正常成纤维细胞 (normal fibroblasts, NFs) 转化为 CAFs, 即促进肿瘤反应性间质的形成, 同时可以促进 CAFs 的重要蛋白质的表达。那么 TGF- β 1 是否可以促进 FAP 的表达, 是本研究想要探究的问题。本研究采用一定浓度的 TGF- β 1 作用于 CAFs, 利用 RT-PCR 和 Western blot 的方法, 观察 FAP 的 mRNA 和蛋白表达变化, 为研究 TGF- β 1 调控 CAFs 的生物学特性奠定基础, 也有助于了解上皮-间质之间的交互作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 H-DMEM 培养基、胎牛血清、双抗 (青霉素、链霉素) (美国 HyClone 公司); rhTGF- β 1 (美国 Sigma 公司); 鼠抗人细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 单抗、兔抗人波形蛋白 (vimentin, VIM) 单抗、鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -

2017-03-17 接收

基金项目: 四川省教育厅重点项目 (编号: 14ZA0189); 川北医学院校级科研发展重点项目 (编号: CBY15-A-ZD09)

作者单位: 川北医学院口腔医学系, 南充 637000

作者简介: 唐婉容, 女, 主治医师;

刘英, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1366937083@qq.com

human immortalized oral epithelial cell (HIOEC), and to discuss the potential mechanism of HPV16 E5 in the occurrence and development of oral squamous cell carcinoma. **Methods** Open reading frame of HPV16 E5 was cloned into the lentiviral vector pLOV-N to prepare recombinant plasmid pLOV-E5, which was stably transfected into HIOEC. EGFR, p21, p53 and Rb were detected by RT-qPCR and Western blot on the mRNA level and the protein level, respectively. Cell proliferation after stable transfection was evaluated by MTT assay. **Results** After stable transfection of HPV16 E5, the protein levels of EGFR, p21 and p53 in HIOEC were markedly overexpressed, as well as the mRNA levels of p21 and p53 ($P = 0.00$ – 0.02). However, the mRNA levels of EGFR had no obvious change after transfection. There were also no significant changes of Rb on the mRNA and protein levels. Compared with the control cells, the proliferation activity of HIOEC/pLOV-E5 cells was significantly increased ($P = 0.00$). **Conclusion** HPV16 E5 can stimulate the expression of EGFR, p21 and p53 as well as the proliferation of HIOEC.

Key words human papillomavirus; immortalization; epithelial cells; HPV16 E5 gene