

抗 HPV16 E7-ribozyme 在 CV-1 细胞中的稳定表达

黄扬中* 孔玉英 汪 垣 祁国荣 陆长德**

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200051)

摘 要 构建了由 RSV-LTR 启动子带动并能在细胞内稳定复制的 Ribozyme 的自身修剪表达质粒 pRSV-Rz523、Ribozyme 反义对照质粒 pRSV-AE7 及人增殖细胞核抗原基因 (PCNA) 启动子带动的 HPV16 E7 片段 (+554~+686) 的真核表达质粒 pPCNA-E7。经 G418 抗性筛选获得了稳定表达 Ribozyme 的 CV-1 细胞克隆, 其表达水平约为 $9.0 \text{ pmol}/10^6$ 个细胞, 其中活性 Ribozyme 的量大于 $50 \text{ fmol}/10^6$ 个细胞, 分离得到的 Ribozyme 可在体外特异切割 E7 靶 RNA 片段。通过共转染 Ribozyme (或反义对照) 和底物表达质粒并筛选出细胞克隆, 研究了 Ribozyme 在细胞中对底物表达水平的影响。初步结果显示, Ribozyme 的导入可使细胞内底物 E7 的 RNA 表达水平降低了 90% (反义对照使 E7 RNA 表达降低 20%)。上述结果提示: 在 CV-1 细胞中表达的 Ribozyme 不仅在体外, 同时在细胞内具有一定的生物学活性, 有可能应用于逆转宫颈癌细胞的恶性表型。

关键词 Ribozyme, HPV16 E7, 稳定表达, CV-1 细胞

宫颈癌是常见的人类生殖道肿瘤, 近年来的研究证实, 在宫颈癌组织及其细胞系一般都有人乳头状瘤病毒 (HPV) E7, E6 基因的高水平表达^[1]。E6 和 E7 基因可以转化宿主细胞, 包括细胞系和原代培养细胞^[2]。另外, HPV16 E7 蛋白可以通过其 N-端 38 个氨基酸与肿瘤抑制基因产物 Rb 蛋白结合而使其功能失活^[3], 导致细胞周期调控的紊乱和细胞染色体的不稳定, 在宫颈癌的癌前病变及恶性阶段可能是重要的因素。可见 HPV16 的 E6 和 E7 基因表达在人类生殖道肿瘤, 特别是宫颈癌的发生及其恶性表型的维持上起着重要作用。

Ribozyme 是具有催化功能的 RNA 分子, 可以序列特异地切割靶 RNA。我们针对 HPV16 E7 mRNA 设计的 Ribozyme 经体外实验证明它能特异地切割 E7 RNA 片段^[4,5]。在此工作基础上, 本文利用 G418 抗性筛选研究了 Ribozyme 在真核细胞内的稳定表达。研究表明 Ribozyme 表达质粒可以在 CV-1 细胞中稳定复制和表达, 从细胞总 RNA 分离的 Ribozyme 在体外具有特异切割活性。初步结果还证实 Ribozyme 能使细胞内 HPV16 E7 RNA 的表达水平明显降低, 提示 Ribozyme 在细胞内具有一定的生物学活性, 有可能利用 Ribozyme 逆转 HPV16 阳性的宫颈癌细胞恶性表型。

1 材料和方法

1.1 质粒和试剂

国家 863 高技术生物领域 (863-102-19-06) 资助项目。

* 现在地址: 中国人民解放军第一军医大学生物化学教研室, 广州, 510515。

** 通讯作者。

本文于 1995 年 6 月 12 日收到。

pRG523, pTZE7R 均由本组构建^[4,5]pREP9 购自 INVITROGEN 公司; 工具酶和细胞培养试剂购自 GIBCO-BRL 或 Promega 公司; $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 为北京亚辉公司产品。其它均为分析纯试剂。

1.2 体外转录

线性化的质粒作为模板进行体外转录, 反应体积为 20 μ l, 反应体系含有 40mmol/L Tris, HCl (pH7.5), 5mmol/L DTT, 2mmol/L spermidine, 8mmol/L MgCl_2 , ATP、GTP、CTP (各 0.5mmol/L) 和 0.2mmol/L UTP, 10 μ Ci 的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP, T7 RNA 聚合酶 10u, 37 $^\circ\text{C}$ 保温 90min。大量制备冷的 Ribozyme 时, 不加入同位素, 冷 UTP 为 0.5mmol/L。制备 E7 反义 RNA 探针时, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP 为 50 μ Ci., 不加冷 UTP。

1.3 细胞培养

转染前一天在 35mm 培养皿中接种 2.5×10^5 个 CV-1 细胞, 培养至细胞密度为 80%~90%, 采用磷酸钙共沉淀法将质粒 DNA 转染细胞, 在含 G418 (1mg/ml) 的选择性培养液中培养 2~3 周, 将筛选的细胞克隆在含 G418 (400 μ g/ml) 的培养液中继续培养至细胞密度为 10%~20%, 胰酶消化, 细胞重新接种于培养瓶中, 培养至细胞汇合后收集细胞。

1.4 细胞总 RNA 的制备和小分子 RNA 的分离

收集约 5×10^6 个细胞, 用 TRIzol RNA 提取试剂盒 (GIBCO-BRL 公司) 制备细胞总 RNA, 利用 OD_{260nm} 读数测定总 RNA 的浓度, OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值在 1.9~2.0。参照祁国荣等方法^[6], 将总 RNA 重新溶解于 1mol/L NaCl 中, 在 4 $^\circ\text{C}$, 8000r/min 离心 10min, 沉淀为大分子 RNA, 溶液为小分子 RNA, 上清用乙醇沉淀。

1.5 细胞表达的 Ribozyme 的分离及活性检测

将提取的细胞总 RNA 20 μ g 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 同时以体外转录的³²P 标记的 Ribozyme (含 50、63、69nt 三条带)^[6]作对照, 割取 69nt (E7-Rz) 的相应凝胶条带, 直接放入反应管中与³²P 标记的靶 RNA 保温 120min 测活, 以该条带上下各一块大小相近的凝胶条带作对照。

1.6 RNase 保护分析

方法参照文献 [7] 进行, 取共转染细胞总 RNA 各 20 μ g, 加入体外转录的³²P 标记的反义 RNA 探针, 先在 85 $^\circ\text{C}$ 变性 5min, 立即将样品放入 55 $^\circ\text{C}$ 水浴保温 6~8h。然后加入 RNase A 80 μ g/ml, RNase T1 20 u/ml 消化未杂交的单链 RNA。乙醇沉淀, 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (含 7mol/L 尿素) 鉴定, 放射自显影分析结果。

2 实验结果

2.1 PCR 扩增目的基因

应用 PCR 方法扩增目的基因 (Ribozyme, HPV16 E7, PCNA 启动子序列), 为方便基因的组装, 在引物 5' 端还设计了一些限制性酶切位点, 其核苷酸顺序如下:

引物 (P1):	5'	CCCAGTCACGACGTT	3'	15 mer
引物 (P2):	5'	CTTAACACTCGCCTATTG	3'	18 mer

引物 (P3):	5'	TG TCTAGAGCTTTAAAAGCTTTATACAAT	3'	29 mer
		Xba I		
引物 (P4):	5'	TA GGTACCGACGACCGGCTGAGA	3'	23 mer
		Kpn I		
引物 (P5):	5'	TC GGTACCTGTAATCATGCATGGAG	3'	25 mer
		Kpn I		
引物 (P6):	5'	AG AAGCTTGGACCATCTATTTTCATCC	3'	26 mer
		Hind III		

以质粒 pRG523^[5] 为模板, 用引物 P1, P2 扩增出大小为 267nt 的 Ribozyme 的基因片段 Rz523, 用引物 P3, P4 从 PCNA 基因^[6] 为模板扩增出 636nt 的 PCNA 启动子序列 (-560~+60), 引物 P5, P6 扩增出 148nt 的 E7 (+554~+686) 基因^[5] 片段, PCNA 启动子和 E7 基因片段的扩增产物分别用 Kpn I 酶解, 电泳分离纯化后用 T4 DNA 连接酶连接, 用引物 P3, P6 扩增拼接片段, 命名为 PE 基因片段。

2.2 表达质粒的组装

Rz523 用 Hind III 和 Sal I 酶解, 装入真核表达载体 pREP9 的 RSV-LTR 下游, 重组质粒命名为 pRSV-Rz523。

Ribozyme 的反义对照质粒的构建与 pRSV-Rz523 相似, 但删去了 Ribozyme 中 22 nt 催化核心部分, 只保留二侧与靶 RNA 配对部分。重组质粒命名为 pRSV-AE7。

PE 基因片段和 pREP9 分别用 Xba I 和 Hind III 酶切, 然后用 T4 DNA 连接酶连接, 重组质粒命名为 pPCNA-E7, HPV16 E7 (+554~+686) 将在 PCNA 启动子的控制下在细胞中表达。

将用 Kpn I 和 Hind III 酶解的 E7 (+544~+686) 基因片段组装入质粒 pTZ19R 的相应切点中, 重组质粒命名为 pTZ19E7F。pTZ19E7F 在 T7 RNA 聚合酶的作用下体外转录出 161nt 的反义 RNA 探针, 用于 RNase 保护分析。

2.3 Ribozyme 在 CV-1 细胞中获得稳定表达

将 5 μ g pRSV-Rz523 转染 CV-1 细胞, 同时转染 pREP9 (空质粒) 作阴性对照。经 G418 (1mg/ml) 抗性筛选得 neo^r 的细胞克隆, 继续培养至细胞汇合。收集 1 \times 10⁷ 个细胞, 抽提细胞总 RNA, 各取 10 μ g RNA 与探针进行点杂交分析, 用短暂表达的 Ribozyme 作为阳性对照 (另文发表)。

探针的核苷酸序列包括催化中心 (22nt, 序列划线表示) 及其两侧的互补序列:

5' CTCGAGATATATGT TTCGTCTCACGGACTCATCAGAGATTTGCT 3' 45 mer

结果证实, Ribozyme 在 CV-1 细胞中能稳定表达, 密度扫描结果显示, 其表达水平较短暂表达时 (约为 2.2pmol/10⁶ 个细胞) 约高 4 倍左右 (图版 I-B)。所以 Ribozyme 在 CV-1 细胞内的稳定表达水平约为 9.0pmol/10⁶ 个细胞。实验表明, 表达 Ribozyme 的细胞连续培养 4 周后, 在光镜下细胞形态无明显的改变 (图版 I-A), 提示 Ribozyme 的长期表达对细胞本身并无明显的毒性影响。

2.4 细胞表达的 Ribozyme 的体外切割活性

取制备的细胞总 RNA 和小分子 RNA 各 10 μ g 与 ³²P 标记的靶 RNA (171nt) 保温, 反应体系参见文献 [4, 5]。在与切割产物大小相应的位置上 (85nt, 86nt) 出现显影条带,

但存在着比较严重的电泳“拖尾”现象和 RNA 一定程度的降解情况。改变反应保温时间或反应的细胞 RNA 量, 结果仍不理想(结果未给出)。

我们通过 PAGE 电泳分离细胞表达的 Ribozyme, 能在体外特异切割靶 RNA, 出现 85, 86nt 的切割产物(图版 I-C), 区带密度扫描的结果显示, 其切割百分率为 11.8%~12.5%, 阳性对照的 Ribozyme 用量为 0.25pmol, 其切割百分比平均约为 30%, 因此在 CV-1 细胞中表达的活性 Ribozyme 的量至少为 50 fmol/ 10^6 个细胞。由于从细胞总 RNA 中分离得到 69nt 有活性 Ribozyme 从而肯定了起自身修剪功能的 5'-cis-Rz, 3'-cis-Rz 在 CV-1 细胞中有效进行了顺式切割反应。

2.5 RNase 保护分析检测细胞内 E7 RNA 的表达

将 pRSV-Rz523 和 pPCNA-E7; pRSV-AE7 和 pPCNA-E7; 空质粒 pREP9 和 pPCNA-E7 (作底物对照) 各 5 μ g 分别共转染 CV-1 细胞, 转染 pREP9 10 μ g 作空白对照。筛选出 G418 抗性的细胞克隆, 胰酶消化后继续培养至细胞汇合, 收获细胞前换无血清培养液培养 24h。取共转染细胞和空白对照细胞的总 RNA 各 20 μ g, 用于进行 RNase 保护分析, 用 2% 琼脂糖电泳鉴定样品上样量基本相同, 初步结果显示(图版 I-D): pRSV-Rz523 和 pPCNA-E7 共转染细胞后, RNase 全长保护的 E7 RNA 片段的水平, 与底物对照和反义对照相比均有明显降低, 但未见明显的切割产物的保护条带。对全长保护片段的区带密度扫描结果显示, Ribozyme 的稳定表达能使 pPCNA-E7 在 CV-1 细胞中表达的 E7 RNA 水平降低约 90% (反义对照使 E7 RNA 水平降低约 20%), 提示底物胞内水平的降低, 主要是 Ribozyme 催化切割作用的结果。我们在 CV-1 细胞内没有检测出 Ribozyme 的切割产物, 这可能是由于细胞内核酸酶的作用使 RNA 片段迅速降解, 或是靶 RNA 被切割后变得特别不稳定的缘故。

3 讨 论

Ribozyme 能够以序列特异的方式切割靶 RNA 分子, 对于阻断有害基因的表达有一定的应用前景。本实验结果表明, Ribozyme 表达质粒能在真核细胞内稳定复制和表达, 细胞内表达的 Ribozyme 具有一定的体外切割活性。RNase 保护分析的初步结果提示, Ribozyme 在体内具有一定的生物学活性。

本研究将 Ribozyme 基因组装入真核表达载体 pREP9 中, 可在 RSV-LTR 强启动子作用下, 转录出相应的 Ribozyme。载体 pREP9 包括 EB 病毒(非洲淋巴瘤病毒)的复制起始原件 OriP 及核抗原 EBNA-1, 此质粒能在转染细胞中以染色体外形式复制, 并以附加体(Episome)形式存在于广泛的宿主细胞核内。本研究结果表明, Ribozyme 表达质粒 pRSV-Rz523 能在细胞中稳定复制和表达。

目前 Ribozyme 的体内研究提示, 只有当细胞内的 Ribozyme 和底物的浓度比值在 100~1000 倍时, 才能检测到明显的靶 RNA 转录水平的变化^[9,10]。因此我们利用人增殖细胞核抗原(PCNA)的启动子序列(-560~+60)替换表达载体 pREP9 中的 RSV-LTR, 构建了底物表达质粒 pPCNA-E7, PCNA 启动子受细胞周期的控制, 在无血清培养液条件下与 RSV-LTR 启动子效率相比约低 10~100 倍^[11,12], 这样 Ribozyme 在细胞中稳定表达的水平大约是底物的 100 倍; 而对于 T7-痘苗表达系统(另文发表), Ribozyme 和底

物都使用相同的启动子, 因此两者的表达水平基本相同。实验结果表明, Ribozyme 在稳定表达系统中的活性与 T7-痘苗表达系统相比要高得多, 显然这主要是由于 Ribozyme/底物相对浓度的差异所致。结果提示, 对于 Ribozyme 的体内应用, 必须要尽量提高 Ribozyme 的转录水平, 才能在体内有效地切割靶 RNA。

参 考 文 献

- [1] Zur Hausen H, de Villiers E. *Annu Rev Microbiol* 1994, **48**: 427.
- [2] Munger K, Phelps W, Bubb W, *et al.* *J Virol*, 1989, **63**: 4417.
- [3] Munger K, Scheffner M, Huibregste J. *et al.* *Cancer Surv*, 1992, **12**: 197.
- [4] 何玉凯, 祁国荣. *生物化学和生物物理进展*, 1992, **5**: 371.
- [5] He YK, Lu CD, Qi GR. *FEBS Lett*, 1993, **322**: 21.
- [6] 祁国荣, 曹功杰, 竺来发等. *中山大学学报*, 1985, **2**: 65.
- [7] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd, Cold Spring Harbour Press, New York, 1989.
- [8] 王易伦, 邱海英, 冯晓黎等. *生物化学和生物物理学报*, 1995, **27**: 137.
- [9] Cameron F, Jennings P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 9139.
- [10] Sioud M, Drlica K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 7303.
- [11] Pearson B, Nasheuer H, Wang S F. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**: 2083.
- [12] Morris G, Mathews M. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 16116.

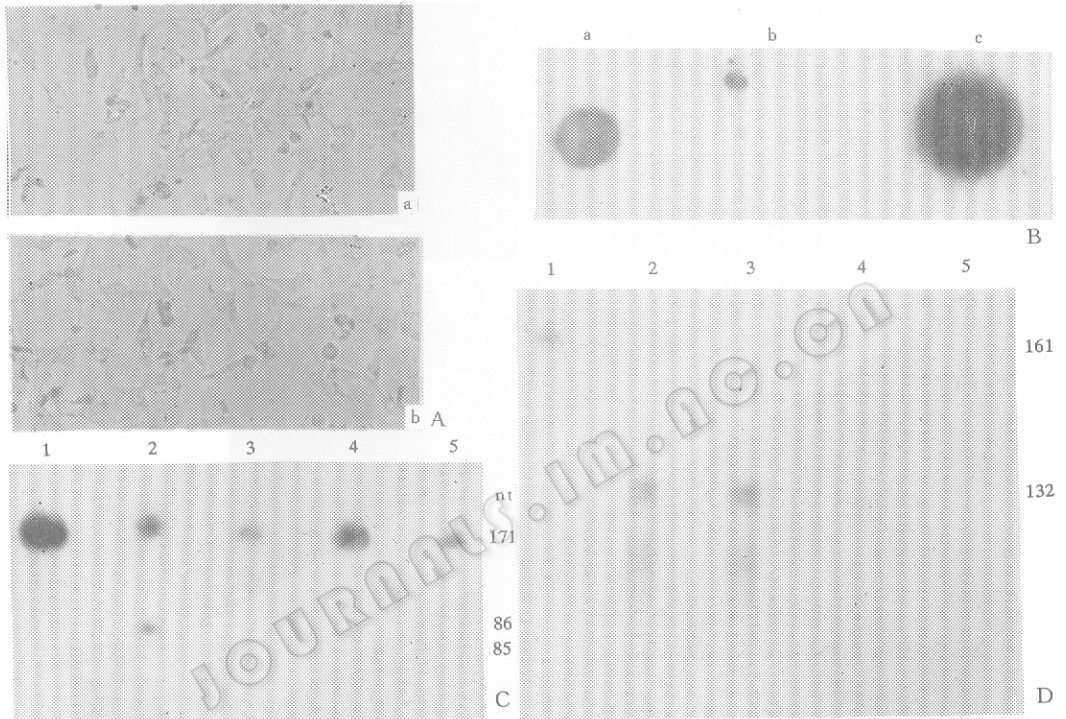
Stable Expression of Anti-HPV16 E7-ribozyme in CV-1 Cell Line

Huang Yangzhong Kong Yuying Wang Yuan Qi Guorong Lu Changde

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai, 200031*)

Abstract HPV16 (Human papilloma virus type 16) E7 gene product, an oncoprotein, has been considered to be casually involved in the pathogenesis of anogenital cancer, particularly in cervical cancer. In order to evaluate the effect of suppressing the expression of E7 gene in CV-1 cells by ribozyme, Rz523, with a rans-acting ribozyme targeted to E7 RNA and 5', 3' two processing ribozymes was cloned into the eukaryotic expression plasmid pREP9 under the control of RSV-LTR promoter. The resultant plasmid pRSV-Rz523 was transfected into CV-1 cells by the method of calcium phosphate coprecipitation. The expression of the ribozyme in G418-resistant cells was detected by dot-blot hybridization. Ribozymes stably expressed in CV-1 cells at a level of 9.0 pmol per 10^6 cells, in which the active ribozyme molecules were more than 50 fmol per 10^6 cells. The result of RNase protection assay showed that steady state level of E7 RNA fragment in CV-1 cell lines was significantly reduced by about 90% in ribozyme-expressing cells. In contrast, the antisense control plasmid pRSV-AE7 yielded only a small reduction (about 20%). This research implicated the possibility to reverse the malignant phenotype of cervical cancer by means of suppressing the expression of E7 gene by ribozyme.

Key words Ribozyme, HPV16 E7, stable expression, CV-1 cells



- A. Morphology of the ribozyme-expressing cells.
 a. Cultured for one week b. Cultured for 4 weeks
- B. Detection of ribozyme expressed in CV-1 cells by dot-blot hybridization.
 a. Positive control b. Negative control c. Ribozyme expressed in cells
- C. Cleavage activity of ribozyme isolated by PAGE. The corresponding gel slices were isolated and reacted with ^{32}P labelled target RNA at 37°C for 120 min.
 1. Control, 2. *In vitro* transcriptional ribozyme used as a positive control, 4. Ribozymes expressed in cells,
 3, 5. Two adjacent gel slices were used as controls.
- D. Detection of E7 target RNAs expressed in CV-1 cells by RNase protection assay.
 1. Control, 2. Transfection with plasmids pREP9 and pCNA-E7, 3. Transfection with plasmids pRSV-AE7 and pCNA-E7,
 4. Transfection with plasmids pRSV Rz523 and pCNA-E7, 5. Transfection with plasmid pREP9 only