

乳头瘤病毒 11 型完整基因组成功转染角质形成细胞并促其增殖

张一, 吕凤林, 陈彩宇

第三军医大学大坪医院野战外科研究所一室, 重庆 400042

摘要: 构建含人乳头瘤病毒 11 型(Human papillomavirus type 11, HPV11)完整开放读码框(Open reading frame, ORF)基因组的质粒并对其功能进行初步验证, 为构建 HPV11 转基因动物模型奠定基础。分别构建重组质粒 pQE-Trisystem-EGFP/HPV11(pE/H)、pQE-Trisystem-EGFP/1.1copyHPV11(pE/1.1H), 将 pE/1.1H、pE/H、闭环状 HPV11 基因组分别转染原代人角质形成细胞(Keratinocyte, KC)并进行检测。在质粒上成功构建了目的序列, 转染后在 pE/1.1H 组、pE/H 组、HPV11 组中检测到 HPV11E6 基因的表达; 在 pE/1.1H 组、pE/H 组中检测到荧光; HPV11 组、pE/H 组、pE/1.1H 组具备促细胞增殖功能, 实验组间比较 pE/1.1H 组稍弱($P<0.01$), 但与对照组相比均差异极显著($P<0.01$)。将具有完整 ORF 的 HPV11 基因组(1.1copyHPV11)成功构建于质粒上, 其具备野生型 HPV11 病理表型; 为研究低危型 HPV 致病机理提供了实验材料和方法学指导; 为进一步构建 HPV11 转基因小鼠奠定了基础。

关键词: 人乳头瘤病毒 11 型, 角质形成细胞, 细胞增殖

Transfecting Keratinocyte and Enhancing Cell Proliferation by Integrated HPV11 DNA

Yi Zhang, Fenglin Lü, and Caiyu Chen

Institute of Surgery and Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: We constructed the plasmid containing the integrated open reading frame (ORF) HPV11 genome, and identified its function, to lay foundation for production of transgenic animal models of HPV11. Recombinant plasmid pQE-Trisystem-EGFP/HPV11 (pE/H) and pQE-Trisystem-EGFP/1.1 copy HPV11 (pE/1.1H) were constructed. Then, the human keratinocyte (KC) was transfected by pE/1.1H, pE/H and closed circular HPV11 and detected. The recombinant plasmid was successfully constructed. The expression of HPV11E6 gene was detected in the experimental group. Fluorescence was observed in the pE/1.1H and pE/H group. The HPV11, pE/H, and pE/1.1 enhanced the KC proliferation, with remarkable differences ($P<0.01$) from the control group. Amongst the three experimental groups, pE/1.1H was found to be the weakest. The plasmid containing the integrated ORF of HPV11 (1.1 copy HPV11) genome was successfully constructed. The pE/1.1H had the same phenotype of wild-type HPV11 genome. It provided experimental material and methodological guidance for studying the low-risk HPV, as well as for the production of HPV11 transgenic mice.

Keywords: HPV11, keratinocyte, cell proliferation

Received: December 29, 2007; **Accepted:** February 18, 2008

Supported by: the Foundation of National Natural Science (No. 30400386).

Corresponding author: Fenglin Lü. Tel: +86-23-68757431; E-mail: Lufenglin001@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目(No. 30400386)资助。

人乳头瘤病毒 11 型(HPV11)是尖锐湿疣的主要病原体。近年来,随着尖锐湿疣发病率的不断上升,对 HPV11 的研究也逐渐受到重视^[1]。由于 HPV11 属于 HPV 家族中的低危型病毒,故很长一段时间以来,对低危型 HPV11 的研究报道较高危型 HPV 来说要少得多;另一方面,高危型 HPV 的研究可以针对目前已公认的致病(癌)基因 E6、E7 来进行,操作相对较为容易。而对低危型 HPV 的致病基因的了解十分有限,使低危型 HPV 的研究没有这种针对性,进展缓慢。因此着眼于 HPV11 全基因组与角质形成细胞(Keratinocyte, KC)的相互作用,对 HPV11 致病机理的研究有重要意义。并且根据 HPV11 病毒基因组的表达特点,在质粒上构建线性的、完整开放读码框(Open Reading Frame, ORF)的 HPV11 基因组可为 HPV11 转基因动物病理模型的构建打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

含 HPV11 全基因组的质粒 pBR322/HPV11 由德国癌症研究中心(DKFZ)E.-M. de Villiers 教授惠赠;质粒 pQE-Trisystem (QIAGEN)由新加坡 Johns Hopkins 大学生物医学分部的孙凯惠赠;儿童包皮由第三军医大学大坪医院皮肤科提供。质粒小量和中量抽提试剂盒(Omega);DNA 凝胶回收试剂盒(维特洁);限制性内切酶 *Bam*H I、*Bgl* II;T4 DNA 连接酶试剂盒、去磷酸化试剂盒 BAP(TaKaRa);脂质体转染试剂盒 Lipfectamine Kit(GIBCO);RNA 提取试剂 Tripure(Roche);逆转录试剂盒、Olig (dT)18、rRNasin(40 u/μL)、M-MLV(200 u/μL)均为美国 Promega 公司产品;PCR 引物由上海基康公司合成;胶原酶 D(Roche);分离酶(SIGMA);标准胎牛血清(郑州);胰岛素(徐州万邦生化制药有限公司);氢化可的松(中国上海信谊药厂);胰蛋白酶(Sigma);分离酶(Sigma);二甲基亚砜(Merck);表皮细胞生长因子(Sigma)。

1.2 pQE-Trisystem/HPV11(p/H)的构建

HPV11 连接在 pBR322 上的酶切位点为 *Bam*H I。*Bam*H I 和 *Bgl* II 为两个同尾酶,位于质粒 pQE-Trisystem 上。首先将 HPV11 从质粒 pBR322 中转移到质粒 pQE-Trisystem 上。①用 *Bam*H I 酶切 pBR322/HPV11 后回收 HPV11 片段。②*Bam*H I 和

Bgl II 双酶切 pQE-Trisystem,回收载体片段。③对回收片段进行去磷酸化消除自连影响。④将去磷酸化回收产物和 HPV11 回收产物连接后转化大肠杆菌 DH5α感受态菌,测序鉴定阳性克隆。构建的质粒命名为 p/H。

1.3 pE/H 的构建(图 1)

上游引物(5'-3'): TCCCCCGGGGACGTGGTTT;

下游引物(5'-3'): AGGCCCGGGTCAACCCTATCTCGG,

划线部分为酶切位点;扩增长度为 1.1 kb ①从质粒 pIRES2-EGFP 中扩增出含 EGFP-POLYA 序列的片段,同时在片段两侧加上 *Sma* I 酶切位点,PCR 参数为 95°C 5 min;95°C 30 s,70°C 90 s,72°C 30 s 共 30 个循环。②用 *Sma* I 分别酶切质粒 p/H 和 PCR 产物,回收酶切产物。③用 T4 DNA 连接酶连接回收片段后转化 DH5α感受态菌,测序鉴定阳性克隆。构建的质粒为 pE/H。

1.4 pE/1.1H 的构建(图 1)

上游引物: 5'-TAACGCAGTCAGGCACCG-3';
下游引物: 5'-CGGGATCCATAAGAAGGAAATAT-3',

划线部分为酶切位点;扩增长度为 1.1kb ①从质粒 pBR322/HPV11 中扩增出 HPV11 中的 7073-7931 段序列(相当于 0.1copy 的 HPV11 基因组),同时加上 *Bam*H I 酶切位点。PCR 参数为 95°C 5 min;95°C 30 s,58°C 90 s,72°C 30 s 共 30 个循环。扩增出来的片段为: 部分载体序列-7073-7931-*Bam*H I(简称 V-H859),共 1177 bp。②用 *Bam*H I 分别酶切 PCR 产物和质粒 pE/H 后回收大片段。③用 T4 DNA 连接酶连接两个片段后转化 DH5α感受态菌。④*Bam*H I 酶切、测序鉴定阳性克隆。质粒构建部分完成,产物命名为 pE/1.1H。

1.5 转染角质形成细胞

转染用 DNA 的准备。①用质粒中量提取试剂盒对质粒 pE/1.1H、pE/H、pQE-Trisystem、pBR322/HPV11 进行中量提取。②用 *Bam*H I 对质粒 pBR322/HPV11 酶切,回收片段 HPV11 后用 T4 连接酶将其连接成环状。KC 分离培养参照李伟的方法^[2,3]。

脂质体介导转染 KC(本实验室常规方法)。按照转染的 DNA 共分 5 个组,分别为 pE/1.1H 组、pE/H 组、转染闭环 HPV11 基因组的 HPV11 组;转染空质

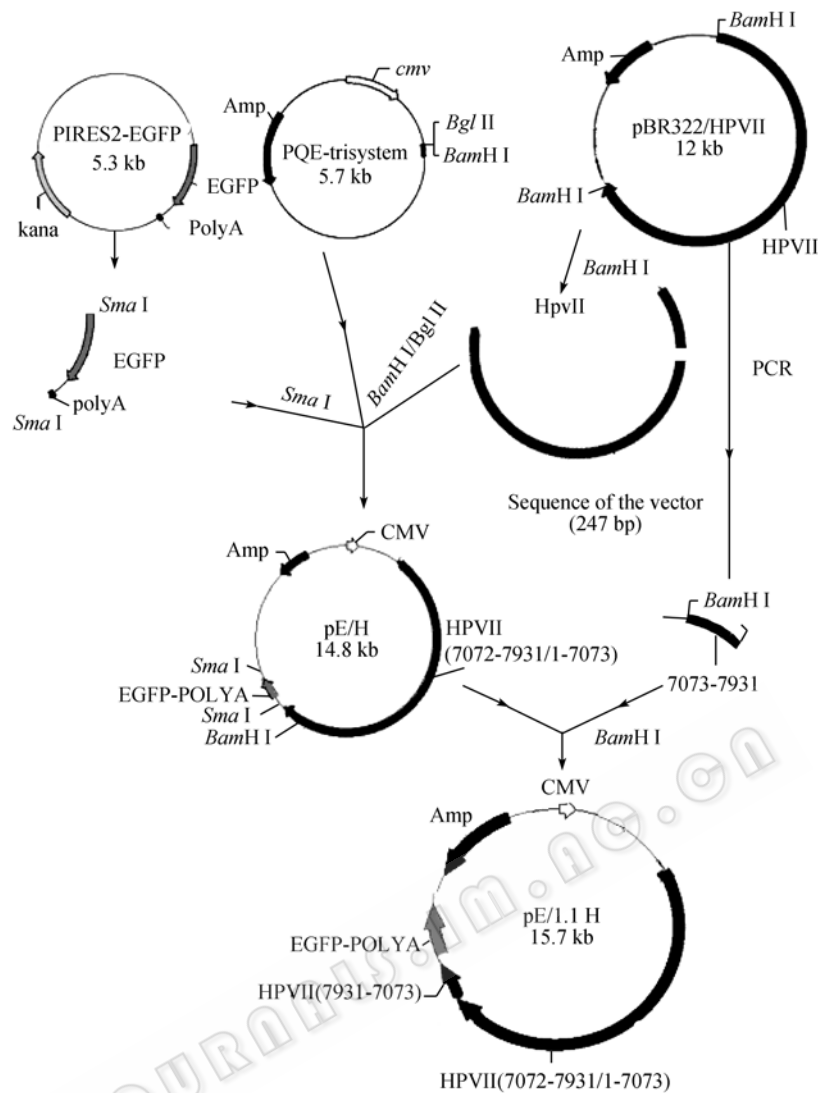


图 1 构建重组质粒 pE/H 和 pE/1.1H
Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pE/H and pE/1.1H

粒载体的 pQE-Trisystem 组; 对照组为正常 KC。① 无菌管中配制溶液 A: 2 μg 质粒溶于 100 μL 无血清培养基; 溶液 B: 10 μL Lipofectamine 溶于 100 μL 无血清培养基; ②混合溶液 AB, 室温放置 30 min; ③加 0.8 mL KC 培养液, 将质粒-Lipofectamine 复合物覆盖到细胞表面, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中培养 5 h(其间每隔 30 min 轻摇培养板)后终止转染; ④加 KC 培养液继续培养; ⑤转染后每 24 h 观察 1 次细胞生长情况, 并置于荧光显微镜下观察, 于荧光蛋白表达高峰期拍照记录。

1.6 转染细胞中 HPV11 基因在转录水平的检测

转染后 120 h 提取细胞总 RNA, 对 HPV11E6 基因进行 RT-PCR 检测, 同时设内参照。

HPV11E6 扩增引物(5'-3'):
上游引物: ATGCCTCCACGTCTGCAACATCTAT;
下游引物: AGCAACGACCCTTCCACTGGTTATTT;
扩增增长度为: 399 bp。
内参照引物(GAPDH) (5'-3'):
上游引物: CCATGGAGAAGGCTGGGG;
下游引物: CAAAGTTGTTCATGGATGACC;
扩增增长度为: 195 bp。
采用 Trizol 提取上述 5 组细胞总 RNA, 电泳检测。取 2 μg 总 RNA 按逆转录试剂说明进行逆转录反应, 取逆转录产物 5 μL 进行 PCR 反应, 反应体系 50 μL 。RT-PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 cycle; 94 $^{\circ}\text{C}$

60 s, 54°C 60 s, 72°C 75 s, 35 cycles, 72°C 10 min, 1 cycle。将 PCR 产物进行电泳检测。

1.7 水溶性四氮唑(WST-1)法检测细胞增殖能力^[4,5]

在进行了转染操作后,将实验组与对照组细胞按 1×10^4 /孔接种于 12 孔培养板中, 每组设 3 个复孔, 并设空白培养液组作为比色时的空白对照。接种后的细胞, 分别于第 7、8、9、10 天, 在每组 3 个平行孔内加入 CCK-8 试剂 30 μ L/孔。继续在孵箱内培育 2 h 后在测量波长 485 nm/535 nm 处测定吸光度 OD 值。重复实验 3 次。

1.8 统计学分析

用软件 SPSS 进行分析。数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 pE/1.1H 的构建部分

从质粒 pBR322/HPV11 中扩增出 V-H859, V-H859 片段长约 1.1 kb, 经电泳检测与预期相符(图 2.a)。因在 7073 端自带 BamH I 酶切位点, 所以用 BamH I 酶切 V-H85 后将把长 274 bp 的载体部分序列切下, 得到的应为 274 bp、867 bp 两个条带。电泳结果与预期相符(图 2.b)

用 BamH I 对重组质粒 pE/1.1H 进行酶切鉴定后得到的条带为 14.8 kb (其中 pQE-Trisystem 5.8 kb, EGFP 1.1 kb, HPV11 7.9 kb)和 858 bp(7073~7931)2 条带。电泳结果与预期相符(图 2.C)。

2.2 RT-PCR 检测目的基因在转录水平表达的结果

提取实验组、对照组细胞总 RNA 电泳,电泳后得到 28S、18S、5S 三个特异性条带(图 3a)。

RT-PCR 后电泳后可见长 195 bp 的内参 GAPDH 特异性条带, pE/1.1H 组、pE/H 组与 HPV11 组还可可见长 399 bp 的 E6 特异性条带(图 3b)。

2.3 荧光检测转录情况

对 pE/1.1H 组与 pE/H 组的细胞进行荧光检测, 结果为阳性(图 4)。其它组未检测到荧光。

2.4 细胞生长曲线

含 HPV11 基因组的 pE/1.1H; pE/H、HPV11 组与对照组比较细胞增殖能力提高明显(图 5)。

2.5 WST-1 实验

对细胞吸光度统计分析的结果显示, 实验组均高于对照组, 差异极显著($P < 0.01$); pE/H 组、HPV11 组高于 pE/1.1H 组, 差异极显著($P < 0.01$)。

2.6 细胞传代

细胞传代结果为: pE/1.1H 组共传 8 代; pE/H 组传 11 代; HPV11 组传 13 代; pQE-Trisystem 组传 2 代; 对照组传 2 代。

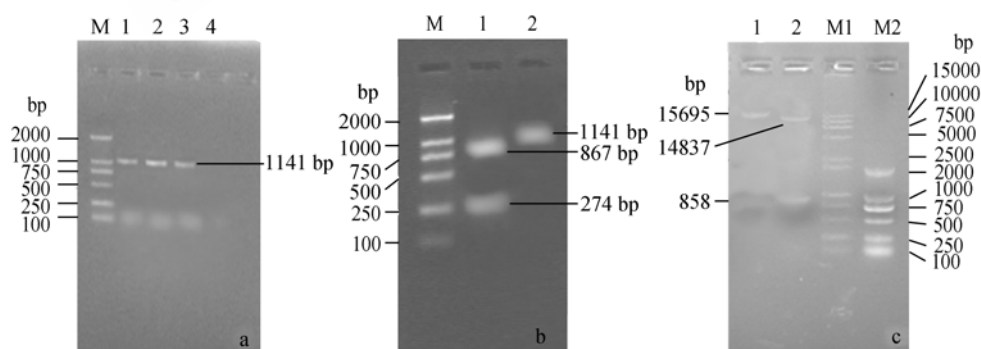


图 2 质粒构建

Fig. 2 Plasmid construction

(a) Amplification of "part of vector sequence-7073-7931-BamH I" by PCR; M: marker DL2000; 1~4: part of vector sequence-7073-7931-BamH I";
 (b) Enzyme digest the "part of vector sequence -7073-7931-BamH I"; M: marker DL2000; 1: part of vector sequence -7073-7931-BamH I after restriction enzyme digestion; 2: "part of vector sequence-7073-7931-BamH I";
 (c) Identification of pE/1.1H by enzyme digestion; M1: marker D15000+2000; M2: marker D2000; 1: pE/1.1H; 2: identify the pE/1.1H by restriction enzyme digestion

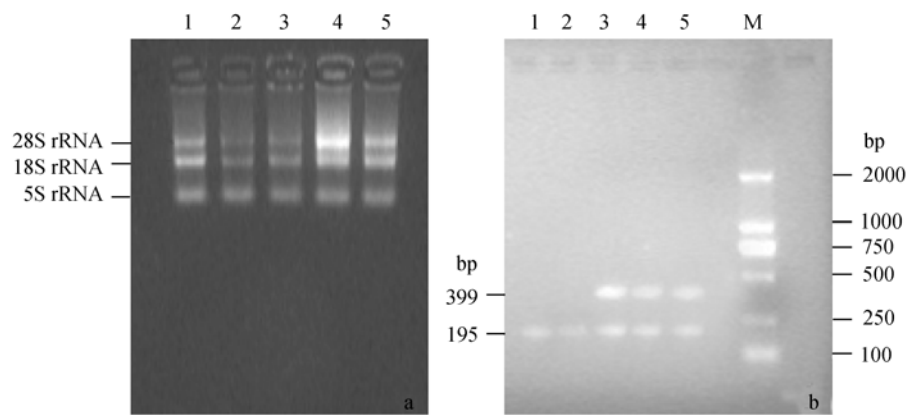


图 3 RT-PCR 电泳图

Fig. 3 RT-PCR

(a): total RNA; 1: control group; 2: pQE-Trisystem; 3: HPV11; 4: pE/H; 5: pE/1.1H; (b): RT-PCR; M: marker DL2000; 1: control group; 2: pQE-Trisystem; 3: HPV11; 4: pE/H; 5: pE/1.1H

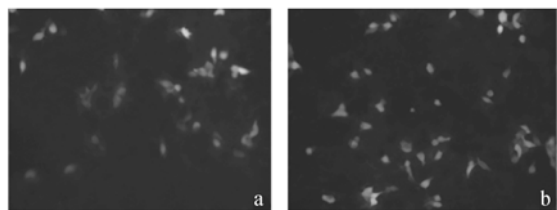


图 4 pE/1.1H 组与 pE/H 组细胞荧光

Fig. 4 Fluorescence detection in the pE/1.1H group and pE/H group

(a): pE/1.1H group($\times 100$); (b): pE/H group($\times 100$)

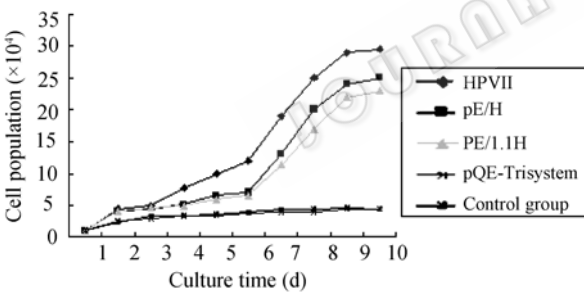


图 5 转染后 KC 的生长曲线

Fig. 5 Cell growth curve after transfection

表 1 不同组在不同时间下的细胞吸光度值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 The absorbance of different group at different time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Time Group	1 day	2 day	3 day	4 day
pE/1.1H	0.674 \pm 0.06 ^{abc}	1.123 \pm 1.123 ^{abc}	1.294 \pm 0.14 ^{abc}	1.355 \pm 0.11 ^{abc}
pE/H	1.551 \pm 0.13 ^a	0.864 \pm 0.06 ^a	1.476 \pm 0.12 ^a	1.672 \pm 0.11 ^a
HPV11	1.588 \pm 0.14 ^a	0.882 \pm 0.09 ^a	1.471 \pm 0.13 ^a	1.651 \pm 0.11 ^a
Control	0.494 \pm 0.07	0.306 \pm 0.09	0.347 \pm 0.05	0.423 \pm 0.05

^a $P < 0.01$ vs control; ^b $P < 0.01$ vs HPV11 group; ^c $P < 0.01$ vs pE/H group

3 讨论

本实验在细胞转染方面和大多数质粒转染的操作不同,没有用 G418 来筛选阳性细胞。通常的转染操作作用 G418 筛选出的为目的基因整合到宿主染色体内的阳性细胞。而根据前期共转染含 neo 抗性基因质粒的预试验,未经 G418 筛选的实验组细胞增殖更快,并且在培养 10 d 后 RT-PCR 检测发现未加 G418 的实验组细胞的 HPV 含量更高。可能是因为 HPV11 的复制不需要整合入宿主基因组内^[6,7], G418 将筛掉部分不含 neo 基因的 HPV11 阳性细胞。并且可能是因为 HPV11 可促进生长能力较弱的 KC 增殖,使得实验组细胞生长增殖能力远超过对照组细胞^[7],因此 HPV11 本身可能具备筛选淘汰阴性细胞的功能。

促 KC 细胞增殖是 HPV11 的典型病理表现,原理可能与该病毒的 E7 基因有关, E7 通过与 Rb1、p107、cyclin A/CDK2 的结合改变细胞正常凋亡周期,但高危、低危型的结合亲和力有所不同^[8,9]。实验结果显示含 HPV11 基因组的 pE/1.1H; pE/H、HPV11 组能明显促进 KC 增殖($P < 0.01$),初步证明所构建的重组质粒具备野生型 HPV11 的病理表现。

通过实验组间比较发现 pE/H 与 HPV11 促细胞增殖能力高于 pE/1.1H($P < 0.01$)。分析造成该结果的原因可能是 URR 序列中存在 4 个 E2 蛋白绑定,分别是 35-46、50-61、7592-7603 与 7890-7901 位点, E2 可与之结合并开始转录^[10]。步骤 2.3 在 1copy 的

HPV11 序列后面构建的 0.1Copy 的 HPV11 补充序列 (7073-7931) 包括部分 L1 序列, 和 URR 序列, 因此 E2 的绑定序列增加了 4 个, 此段 URR 序列将会竞争性地结合 E2, 但其 3' 端直接连接载体而不是 HPV11 序列, 从而起到消耗 E2, 减弱 E2 的的促转录、复制功能(图 6、7)。若此分析得到证实, 那么可以考虑利用 URR 基因开发 HPV11 的治疗手段。

本研究为构建 HPV11 转基因小鼠病理模型打下了一定基础。构建 HPV11 这种致病基因不明病毒的转基因病理模型, 通常需要将其全基因组整合入转基因动物染色体。本课题所构建的 1.1 拷贝的 HPV11 基因组既保证了 ORF 的完整性, 又降低了冗余序列。

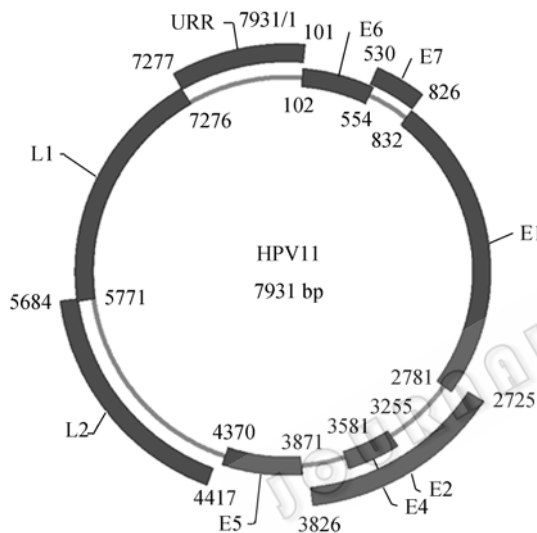


图 6 HPV11 开放读码框
Fig. 6 Open reading frame of HPV11

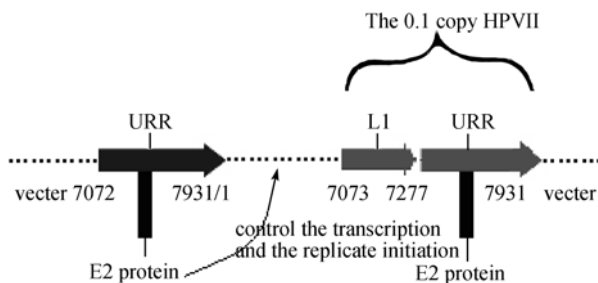


图 7 URR 结合 E2 蛋白示意图
Fig. 7 URR bind with protein E2

REFERENCES

- [1] Han GZ. The research progress of the condyloma accuminatum. *China J Lepr Skin Dis*, 2005, **6**(4): 385-387.
韩国柱. 尖锐湿疣研究进展. *中国麻风皮肤病杂志*, 2005, **6**(4): 385-387.
- [2] Li W, Wu JJ, Wu GX, *et al.* Construction of human skin keratinocytes bank. *Third Military Medical University*, 2004, **26**(11): 987-989.
李伟, 伍津津, 吴国选, 等. 人角质形成细胞库的建立. *第三军医大学学报*, 2004, **26**(11), 987-989.
- [3] Ouyang AL, Zhou Y, Hua P, *et al.* Effect of trypsin on the rat keratinocyte separation and subculture. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, **18**(1), 59-62.
欧阳安力, 周燕, 华平, 等. 胰酶对皮肤角质细胞分离和传代的影响. *生物工程学报*. 2002, **18**(1), 59-62.
- [4] Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, *et al.* SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature Cell Biology*, 2004, **6**(1): 731-740.
- [5] He CY, Zhou LT, Chen Y, *et al.* Detect the cytopathic effect with the WST-8. *Chinese Journal of Biologicals*, 2004, **17**(6): 405-407.
何春艳, 周琳婷, 陈延, 等. 采用可溶性噻唑盐 WST-8 检测细胞病变. *中国生物制品学杂志*, 2004, **17**(6): 405-407.
- [6] Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, *et al.* Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*, 2004, **92**(3): 873-880.
- [7] Middleton K, Peh W, Southern S, *et al.* Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*, 2003, **77**(19): 10186-10201.
- [8] Ciccolini F, Di PG, Carlotti F, *et al.* Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene*, 1994, **9**(9): 2633-2638.
- [9] Sandra J, Ethel M, Massimo. Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein. *Oncogene*, 2000, **19**(3), 821-826.
- [10] Ralph WJ, Liu K, Auborn KJ. CCAAT/enhancer-binding protein β represses human papillomavirus 11 upstream regulatory region expression through a promoter-proximal YY1-binding site. *J Gen Virol*, 2006, **87**(3): 51-59.
- [11] Yang JT, Liu CZ, Iannaccone P. The HPV 16 genome in transgenic mice. *Am J Pathol*, 1995, **147**: 68-78.