

· 论 著 ·

## HPV16 E6 和 E7 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响及其机制\*

李娜, 冶亚平, 朱会芳, 韩芳毅, 千新来<sup>△</sup>

(新乡医学院病理学教研室, 河南新乡 453003)

**摘要:**目的 探讨 HPV16 E6、E7 和 E6/E7 同时稳定高表达对乳腺癌细胞 MCF-7 侵袭能力的影响及其机制。方法 利用脂质体介导将 HPV16 E6、E7 和全长 E6/E7 转染 MCF-7 细胞, 利用 Western blot 检测转染后 E6 和 E7 的表达。采用 Transwell 实验检测 MCF-7 细胞侵袭能力的变化, RT-PCR 法检测基质金属蛋白酶-2(MMP-2) mRNA 的表达情况。结果 在 MCF-7-E6 细胞克隆中, 克隆 1 表达水平最高; MCF-7-E7 细胞克隆中, 克隆 4 表达水平最高; MCF-7-E6/E7 细胞克隆中, 克隆 4 表达水平最高。与 MCF-7 亲本和 MCF-7-vect 细胞比较, MCF-7-E6 和 MCF-7-E6/E7 细胞穿过小室底膜的细胞数均显著增加( $P < 0.01$ )。在 MCF-7-E6、MCF-7-E7 和 MCF-7-E6/E7 细胞中 MMP-2 mRNA 表达均显著增加。结论 HPV16 E6 和 E7 促进 MCF-7 细胞体外侵袭能力的机制之一可能是通过诱导 MMP-2 的表达。

**关键词:** 乳腺肿瘤; 转染; 金属蛋白酶类; MCF-7 细胞; 人乳头瘤病毒

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.25.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)25-2572-03

## Effects of HPV 16 E6 and E7 on invasion of carcinoma cell and its mechanism\*

Li Na, Ye Yaping, Zhu Hui Fang, Han Fangyi, Qian Xinlai<sup>△</sup>

(Department of Pathology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of HPV 16 E6, E7 and simultaneous expression of E6 and E7 on the invasion of breast carcinoma cells MCF-7 and its mechanism. **Methods** The recombinant plasmids were transfected into human breast carcinoma cell MCF-7 mediated by lipofectamine. The Western blotting was used to detect the effects of stable expression of HPV16 E6, E7 and simultaneous expression of E6 and E7. The invasive ability was investigated by Transwell assay. The mRNA expression of MMP-2 was detected by RT-PCR. **Results** The results from Western blotting indicated that protein expression of clone 1 was highest in the four MCF-7-E6 positive clones, and protein expression of clone 4 was highest in the four MCF-7-E7 positive clones, and expression of clone 4 was highest in the four MCF-7-E6/E7 positive clones. The results from Transwell assay disclosed that compared with MCF-7 parental cells, MCF-7-vect cells and MCF-7-E7 cells, the numbers of invasion and metastasis cells were significantly increased in MCF-7-E6 cells and MCF-7-E6/E7 cells ( $P < 0.01$ ). The RT-PCR results indicated that expression of MMP-2 mRNA in MCF-7-E6 cells, MCF-7-E7 cells and MCF-7-E6/E7 cells were significantly increased than that in parental cells and MCF-7-vect cells. **Conclusion** HPV16 E6 and E7 can promote the expression of MMP-2, which may be one of its mechanisms of promoting invasion ability of MCF-7 cells.

**Key words:** breast neoplasms; transfection; metalloproteases; MCF-7 cells; human papillomaviruses

乳头瘤病毒(human papillomaviruses, HPV)是一组小分子双链 DNA 病毒, 研究证实高危型人乳头瘤病毒(high risk-HPVs, hr-HPVs)特别是 HPV16 型与宫颈癌的发生、发展存在着密切关系, 其与肺癌和乳腺癌等恶性肿瘤的发生与演进的关系也受到广泛关注<sup>[1-2]</sup>。本研究以人低转移乳腺癌细胞 MCF-7 为研究对象, 通过脂质体将 HPV16 E6、E7 和同时表达 E6/E7 的重组质粒转入 MCF-7 细胞, 探讨 HPV16 E6、E7 和 E6/E7 同时稳定表达对 HPV16 阴性的乳腺癌细胞侵袭能力的影响及其机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** (1)质粒与细胞株: pcDNA3.1-E6、pcDNA3.1-E7 和 pcDNA3.1-E6/E7 真核表达质粒由本实验室构建并保存。人低转移乳腺癌细胞系 MCF-7 购于中科院上海细胞库。(2)主要试剂: SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒、lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 均为 Invitrogen 公司产品。羊抗 HPV16 E6 多克隆抗体(IgG)、鼠抗 HPV16 E7 单克

隆抗体(IgG)为美国 Santa Cruz 公司产品。引物由上海生物工程公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与基因转染** 细胞在含有 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的完全培养基中 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 待细胞长至 70% 融合时, 按 lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书进行转染, 转染 9 h 后, 更换新鲜完全培养基, 培养 48 h, 设置 MCF-7-vect 转染组、MCF-7 亲本细胞组、转基因组(MCF-7-E6 细胞组, MCF-7-E7 细胞组, MCF-7-E6/E7 细胞组)。用 G418(800 μg/mL)筛选阳性克隆。每种转染细胞分别挑取 4 个单克隆培养扩增, 获得稳定转染细胞。

**1.2.2 Western blot 检测蛋白表达** 按照试剂盒说明书提取细胞质、细胞核蛋白, 蛋白上清经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(5% 浓缩胶, 12% 分离胶)后转移至硝酸纤维素膜, TBST 封闭, 一抗室温摇育, TBST 洗涤; 二抗于室温摇育, TBST 洗涤, 膜与化学发光底物孵育 3~5 min, 经 X

表 1 不同细胞克隆中 HPV16 E6、E7 蛋白的表达( $\bar{x} \pm s$ )

克隆	MCF-7-E6 细胞克隆 中 E6 蛋白表达	MCF-7-E7 细胞克隆中 E7 蛋白表达	MCF-7-E6/E7 细胞克隆中 E6 蛋白表达	MCF-7-E6/E7 细胞克隆中 E7 蛋白表达
克隆 1	1.176 ± 0.042*	0.298 ± 0.042	0.146 ± 0.012	0.272 ± 0.050
克隆 2	0.534 ± 0.036	0.397 ± 0.036	0.745 ± 0.046	0.275 ± 0.013
克隆 3	0.608 ± 0.035	0.502 ± 0.035	0.624 ± 0.035	0.386 ± 0.011
克隆 4	0.530 ± 0.050	1.230 ± 0.050 <sup>△</sup>	1.040 ± 0.047 <sup>△</sup>	0.570 ± 0.174 <sup>△</sup>

\*:  $P < 0.01$ , 与克隆 2、克隆 3、克隆 4 比较; <sup>△</sup>:  $P < 0.05$ , 与克隆 1、克隆 2、克隆 3 比较。

线片曝光、显影、定影。显色结果用软件 BandsScan5.0 进行灰度分析,并计算蛋白的相对表达水平。

**1.2.3 Transwell 侵袭实验和迁移实验** 加含 10%FBS 的完全培养基于 24 孔板(600  $\mu$ L/孔),小心取出小室放入 24 孔板中,膜上铺人工基底膜 Matrigal 胶,静置 5 min。取单细胞悬液 400  $\mu$ L 接种入小室,常规培养 18 h。取出小室,结晶紫染色。通过倒置显微镜下计数 6 个视野穿膜细胞数,每组设 3 个平行样本,共重复 3 次计算平均值。迁移实验小室内不铺设基质胶,余同侵袭实验。

**1.2.4 RT-PCR 法检测基质金属蛋白酶-2(matrixmetalloproteinases-2, MMP-2) mRNA 的表达** MMP-2 上游引物序列:5'-TTC AAG GAC CGG TTC ATT TGG CGG ACT GTG-3',下游引物序列:5'-TTC CAA ACT TCA CGC TCT TCA GAC TTT GGT T-3',目的片段长度为 493 bp。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C  $\times$  2 min,94  $^{\circ}$ C  $\times$  1 min,58  $^{\circ}$ C  $\times$  1 min 和 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ L 用 1.5%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪上成像及测定分析,实验重复 3 次计算平均值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多样本均数的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 LSD 和 SNK 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 不同细胞克隆中 HPV16 E6 和 E7 蛋白的表达** MCF-7-*vect* 和 MCF-7 亲本细胞中 HPV16 E6 和 E7 蛋白表达均为阴性。MCF-7-E6 的 1 号克隆、MCF-7-E7 的 4 号克隆和 MCF-7-E6/E7 的 4 号克隆分别稳定高表达 HPV16 E6、E7 和同时稳定高表达 E6/E7,见表 1。

**2.2 HPV16 E6 和 E7 稳定高表达对 MCF-7 细胞侵袭能力的影响** 与 MCF-7 亲本、MCF-7-*vect* 和 MCF-7-E7 细胞比较,MCF-7-E6 和 MCF-7-E6/E7 细胞穿膜细胞数显著增加( $P < 0.05$ ),见表 2,图 1。

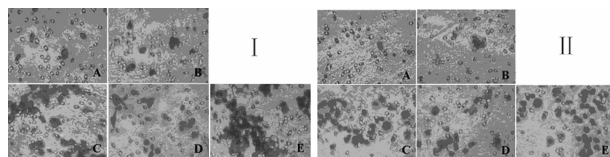
表 2 Transwell 迁移和侵袭实验结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	迁移实验穿膜细胞数	侵袭实验穿膜细胞数
MCF-7 亲本细胞组	5.600 ± 1.673	3.800 ± 2.387
MCF-7- <i>vect</i> 转染组	6.000 ± 3.808	3.400 ± 1.673
MCF-7-E6 细胞组	70.200 ± 23.774*	52.800 ± 21.534*
MCF-7-E7 细胞组	19.400 ± 7.021 <sup>#</sup>	15.400 ± 5.941 <sup>#</sup>
MCF-7-E6/E7 细胞组	101.600 ± 32.570*	82.600 ± 16.832*

\*:  $P < 0.05$ , 与 MCF-7 亲本细胞组、MCF-7-*vect* 细胞组、MCF-7-E7 细胞组比较; <sup>#</sup>:  $P < 0.01$ , 与 MCF-7-E6 细胞组、MCF-7-E6/E7 细胞组比较。

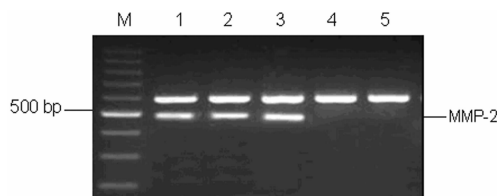
**2.3 HPV16 E6 和 E7 稳定高表达对 MCF-7 细胞 MMP-2**

mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示:在 MCF-7-*vect* 和 MCF-7 亲本细胞中 MMP-2 mRNA 表达阴性,而在 3 种重组细胞中均有表达。半定量分析结果显示,MMP-2 mRNA 的相对表达量在 MCF-7-E6、MCF-7-E7 和 MCF-7-E6/E7 细胞组中分别为 0.760 ± 3.784、0.742 ± 7.022 和 0.838 ± 2.770,组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。



A: MCF-7 亲本细胞; B: MCF-7-*vect* 细胞; C: MCF-7-E6 细胞; D: MCF-7-E7 细胞; E: MCF-7-E6/E7 细胞

图 1 Transwell 迁移实验(I)和侵袭实验结果(II)(10 $\times$ 40)



M: 1 000 bp 标记物; 1: MCF-7-E6 细胞; 2: MCF-7-E7 细胞; 3: MCF-7-E6/E7 细胞; 4: MCF-7-*vect* 细胞; 5: MCF-7 亲本细胞

图 2 转染后 MCF-7 细胞中 MMP-2 mRNA 的表达

**3 讨 论**

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,据资料统计,发病率占全部恶性肿瘤的 7%~10%。尽管目前对肿瘤的手术、化疗和放疗三位一体的综合治疗已取得了很大的进步,但仍约有 50% 的乳腺癌患者在治疗后 5 年内出现复发转移而导致治疗失败<sup>[1]</sup>。因此,阐明乳腺癌侵袭转移的机制以及寻找相应的干预措施,已成为提高患者 5 年生存率所面临的巨大挑战。

有研究显示大约 50% 的乳腺癌患者伴有 hr-HPVs 的感染<sup>[2]</sup>。hr-HPVs 感染在肺癌、食管癌、乳腺癌等恶性肿瘤发生和演进中的作用也日益受到重视<sup>[3-6]</sup>。hr-HPVs 特别是 HPV16 型与宫颈癌的发生、发展存在着密切的病因学关系<sup>[7-9]</sup>,其与头颈部恶性肿瘤、肺癌和乳腺癌等恶性肿瘤的发生与演进的关系也受到广泛关注。将 HPV16 E6 和 E7 基因转入无转移能力的鼠源性永生细胞后,可赋予该细胞侵袭转移的能力。这些结果均提示 hr-HPVs 与肿瘤的侵袭转移可能存在着密切的关系。但是关于 HPV16 E6 和 E7 在促肿瘤细胞侵袭和转移过程中的作用及其机制等问题仍不清楚。

人乳腺癌细胞系 MCF-7 是目前公认的具有低转移特性的细胞系,并且已证实该细胞系 HPV16 阴性。因此,本研究以该细胞系为研究对象,建立了稳定高表达 HPV16 E6、E7 和同

时表达 E6/E7 的乳腺癌细胞株,并通过 Transwell 实验进一步探讨了 HPV16 E6、E7 和 E6/E7 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响。通过 RT-PCR 方法探讨 HPV16 E6 和 E7 对转移相关基因 MMP-2 表达的影响。结果显示:与 MCF-7 亲本细胞和 MCF-7-vect 细胞比较,MCF-7-E6、MCF-7-E7 和 MCF-7-E6/E7 细胞穿过基膜的细胞数目明显增多,并且 MMP-2 mRNA 表达明显增加。表明 HPV16 E6 和 E7 可能通过诱导 MMP-2 的表达而促进了 MCF-7 细胞的侵袭能力。有研究亦证实了 HPV16 E6/E7 可增强细胞的侵袭和转移能力<sup>[1-10]</sup>。

另外,MCF-7-E6 细胞、MCF-7-E7 细胞和 MCF-7-E6/E7 细胞中,以 MCF-7-E6 细胞和 MCF-7-E6/E7 侵袭能力增强最为显著,表明 HPV16 E6 可能在促进肿瘤细胞侵袭和转移过程中发挥着更为重要的作用。其机制除促进 MMP-2 的表达之外还可能为:HPV16 等 hr-HPVs 的 E6 蛋白可通过其 C-端 PDZ 基序与调控细胞连接形成和细胞黏附等相关的 PDZ 蛋白相互作用,并诱导它们降解,从而引起肿瘤细胞间黏附性降低、失去接触性抑制并有利于癌细胞侵袭和转移<sup>[11-15]</sup>。

综上所述,本研究初步证实了 HPV16 E6 和 E7 稳定高表达可以诱导 MMP-2 的表达,并促进 MCF-7 细胞的侵袭能力。从而为设计新的、以 HPV16 E6 和 E7 为靶点的治疗乳腺癌等 HPV 相关肿瘤侵袭和转移的方案提供重要的科学依据。

#### 参考文献:

- [1] Karin H, Jessica M, Frank F, et al. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition[J]. *Virology*, 2009, 391(1): 57-63.
- [2] Spangle JM, Karl M. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis[J]. *J Virol*, 2010, 84(18): 9398-9407.
- [3] Yuri A, Koch WM, Xiao WH, et al. Oral HPV infection before and after treatment for HPV16-positive and negative head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 7143-7150.
- [4] William L, Schlecht NF, Margaret BG. The role of the human papillomavirus in the pathogenesis of schneiderian inverted papillomas; an analytic overview of the evidence [J]. *Head Neck Pathol*, 2008, 2(2): 49-59.
- [5] 郑秀惠,李力,郭建新. HPV16 E6E7 与 C3d3 融合基因真核表达质粒的构建及表达[J]. *重庆医学*, 2010, 39(1): 40-

42.

- [6] Zhou Y, Pan Y, Zhang S. Increased phosphorylation of p70 S6 kinase is associated with HPV16 infection in cervical cancer and esophageal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(2): 218-222.
- [7] Dreier K, Scheiden R, Lener B, et al. Subcellular localization of the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein in CaSki cells and its detection in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ[J]. *Virology*, 2011, 409(1): 54-68.
- [8] 徐晓英,汤春辉,薛晓玲. 高危型 HPV、p16、COX-2 在宫颈鳞癌中的表达及临床意义[J]. *重庆医学*, 2011, 40(12): 1199-1204.
- [9] Maëlle S, Sylvain MB, Frédéric M, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(11): 3678-3685.
- [10] Akil N, Yasmeen A, Kassab A, et al. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression; a tissue microarray study[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(3): 404-407.
- [11] Storrs CH, Silverstein SJ. PATJ, a tight junction-associated PDZ protein is a novel degradation target of high-risk HPV E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6[J]. *J Virol*, 2007, 81(8): 4080-4090.
- [12] An, JB, Mo DQ, Liu HR, et al. Inactivation of the CYLD Deubiquitinase by HPV E6 Mediates Hypoxia-Induced NF- $\kappa$ B Activation[J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(5): 394-407.
- [13] Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins[J]. *Virology*, 2009, 384(2): 324-334.
- [14] Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes P. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein [J]. *Arch Virol*, 2008, 153(3): 397-408.
- [15] Jason B, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infections; keys to malignant progression [J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19(1): 33-39.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-05-21)

(上接第 2571 页)

- 1998-1999.
- [11] Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(8): 2530-2540.
- [12] 何健,曾昭冲,杨平,等. 肾细胞癌骨转移的临床特征及主要预后因素分析[J]. *肿瘤*, 2010, 30(8): 687-690.
- [13] Aoki J, Yamamoto I, Hino M, et al. Osteoclast-mediated

osteolysis in bone metastasis from renal cell carcinoma [J]. *Cancer*, 1988, 62(1): 98-104.

- [14] 付伟金,丁强,夏国伟. 肾癌患者核素骨显像必要性分析 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2008, 29(10): 694-696.
- [15] Adiga GU, Dutcher JP, Larjin M, et al. Characterization of bone metastases in patients with renal cell cancer[J]. *BJU Int*, 2004, 93(9): 1237-1240.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)