

研究工作

人乳头瘤病毒 16 型 E7 蛋白在子宫颈癌细胞内的定位*

徐 铃 齐凤菊

(第一军医大学生生化教研室, 广州 510515)

提 要

应用重组质粒在大肠杆菌中表达人乳头瘤病毒 (HPV) 16 型 E7 基因。以所产生的 E7 融合蛋白为抗原免疫家兔, 制得抗 E7 蛋白抗血清。在子宫颈癌组织切片中用此抗血清作免疫组化染色(胶体金标记染色法), 在光学显微镜下可观察到癌细胞中存在 E7 抗原黑色颗粒, 位于细胞核内。主要附着于核膜, 可证明 E7 基因在 HPV16 感染的子宫颈癌细胞中有强烈表达; 提示 E7 基因可能即为 HPV16 的癌基因。

关键词 人乳头瘤病毒, 子宫颈癌, 癌基因, 细胞内定位, 免疫组织化学染色法

人乳头瘤病毒 (HPV) 是一群很小的 DNA 病毒, 能引起皮肤和粘膜的多种增生性病灶。目前已发现 HPV 有 60 多型, 大多数存在于良性病灶如疣和乳头瘤中。但有少数型 HPV 却存在于 80% 以上的生殖道恶性肿瘤中。在这些 HPV 阳性的癌中大多数含有 HPV16, 其次为 HPV18, 这个事实强烈提示 HPV 在生殖道癌的发生中有重要作用, 但是仍然不能完全排除其他遗传或环境因子的作用。

在子宫颈癌细胞中, 病毒基因组常常整合在宿主细胞染色体的随机部位, 而在良性病灶中却存在许多游离的病毒 DNA 拷贝^[1,2]。在大多数子宫颈癌中, 病毒的整合部位是在 E2 开放读框 (ORF) 内部或正好在其上游。因为 E2 基因的产物是病毒转录的调节者, 这种整合作用可能会影响 HPV DNA 表达的调节。肿瘤内大多数病毒转录本都编码 E6 和 E7ORF, 以及一种剪接产物, 称为 E6*^[1,3]。E6 和 E7 蛋白(但不包括 E6* 蛋白) 都已在子宫颈癌细胞中发现^[4,5], 提示这两种蛋白质可能与恶性肿瘤的产生有关。E7ORF 还能和激活的 ras 基因协同, 促使原代细胞转化^[6]。此外, E7ORF 还能使体外培养的细胞永生化^[7]。

我们利用重组 DNA 技术在大肠杆菌中表达 E7 的融合蛋白 (TrpE/E7_{32-95,1})^[8]。在本文中, 我们以此 E7 融合蛋白作为抗原免疫家兔, 制备抗血清。然后应用这种抗 E7 抗血清以免疫组织化学法观察 E7 蛋白在子宫颈癌细胞内的分布, 借以对 E7 蛋白的致癌作用的机制有初步了解。

1 材料和方法

1.1 重组质粒 pDV31 pDV31 含有 HPV16 的 DdeI 片段 (654 位至 845 位核苷酸, 共长 194bp), 插入于质粒 pATH10 中色氨酸操纵子的 trpE 基因之后的多接头 (polylinker) 的 HindIII 位点中。pDV31 由本室自行制备^[9]。

1.2 E7 融合蛋白的分离和纯化^[10] 质粒 pDV31 转化的大肠杆菌 DH5 α 的 LB 培养液 1L, 经吡啶丙烯酸 (IAA) 诱导后, 取全菌裂解液经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 考马西亮蓝染色。切取 TrpE/E7 融合蛋白凝胶带, 电泳驱出凝胶中的

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-11-27 修回日期: 1992-02-24

融合蛋白, 浓缩后低温保存。产量为每升培养液可得纯化的融合蛋白约 11mg。

1.3 抗 E7 融合蛋白抗体的制备 新西兰大白兔 3 只, 雄性, 2kg/只。喂养 1 周后免疫。方法为: 纯化抗原 0.4mg, 用生理盐水稀释至 0.5ml, 与等量完全弗氏佐剂混合, 经兔背部皮下多点注入。用同样方法每 2 周免疫一次, 共注射 4 次。但第 4 次用 0.4mg 抗原溶于 1ml 生理盐水, 不加佐剂, 经耳静脉缓缓注入。最后一次注射后 1 星期经颈动脉放血, 离心 4000r/min, 10min, 收集血清。将制得兔血清过 QAE-纤维素柱, 收集其 IgG 组分, 经透析和冷冻干燥后, 小瓶分装, 低温保存备用。

1.4 细胞内 E7 抗原位置的标定 胶体金标记染色法是按照西安市中医药研究院病理解剖教研室介绍的方法。已经确诊的子宫鳞状上皮癌组织石蜡固定切片(厚 5 μ m)共 10 例, 由本校病理解剖教研室赠与。切片标本用二甲苯脱腊, 用胰蛋白酶消化 5min。滴加正常羊血清(1:5 稀释)以阻断非特异性吸附。20 min 后, 洗去羊血清, 用制备的兔抗血清 IgG 为第一抗体, 在室温处理 2h, 再 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤后加第二抗体, 即胶体金标记的羊抗兔抗血清(比利时 Janssen 公司出品, 胶体金颗粒直径为 15 μ m), 室温处理 1h, 再 4 $^{\circ}$ C 3h。洗涤后避光置银显影液中 5min。最后, 用核固红进行衬染。脱水、透明及封固后, 在光学显微镜(Olympus)下观察和显微照相。

用磷酸盐缓冲液(PBS)代替兔抗血清进行同样染色, 以及用正常皮肤(鳞状上皮)切片进行胶体金法染色。二者均作为阴性对照。

2 结果和讨论

质粒 pDV31 转化的大肠杆菌的全裂解液经 SDS-PAGE 后出现的新蛋白带为 E7 融合蛋白, 产量约为细菌总蛋白质量的 30%(图 1)。

将此 E7 融合蛋白带自凝胶上切下, 再经重复 SDS-PAGE 后, 电泳呈现为一条带。

以 E7 融合蛋白为抗原, 免疫家兔, 获得兔抗血清 IgG, 在琼脂(日本进口)凝胶上进行对

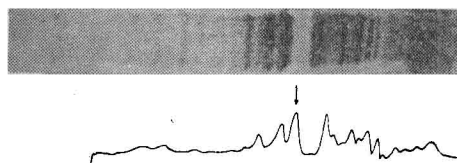


图 1 重组菌的全蛋白提取液的 SDS-PAGE 图(考马西亮蓝染色)及其光密度扫描结果

Fig. 1 Densitometric scanning of SDS-PAGE electropherogram of the protein extract from the recombinant bacteria

箭头示融合蛋白(TrpE/E7)的峰

The arrow indicates the peak of the fusion protein (TrpE/E7)

流免疫电泳^[8], 测得制得的抗血清效价为 1:64。

子宫颈癌组织切片经免疫组化法染色后, 在光学显微镜下, 在阳性细胞中可见到 E7 抗原呈黑色的小颗粒(图 2)。在癌细胞中, E7 蛋白主要分布在细胞核的周边, 估计为附着在核膜上, 相当密集。在 10 例标本中, 有 6 例可看到有 E7 蛋白的表达(图 2a, b)。在另 4 例标本上则未见有抗原存在。这和我们以前的报告^[9], HPV16 感染占子宫颈癌的约 57% 的结果是相符合的。在用 PBS 替代兔抗血清所作的阴性对照标本上同样亦未见 E7 抗原的存在(图 2c)。在阳性标本中, 可见抗原被局限于细胞核内, 主要附着在核膜上, 往往排列成圆形的一圈。细胞浆中仅偶而可见小的银染颗粒。

E7 抗原阳性细胞的分布是弥散性的, 6 例中仅有一例呈灶性分布。

Yasumoto 等报道^[10], 子宫颈癌细胞中整合在染色体中的病毒 DNA 仍有转录活性, 且 E7 基因产物对肿瘤发生是必需的。在癌细胞中检测不到晚期基因的 mRNA, 而主要存在着 E6 和 E7 的 mRNA。Bedell 等证明^[11], 仅 E6 和 E7 (但不包括 E6*) 基因之一即能使体外培养的哺乳动物细胞系(如 NIH3T3 和 Rat-1 细胞)发生转化。Tanaka 等发现^[12]仅 E7 蛋白即足以导致细胞转化的两个阶段, 即起始作用和促进作用(initiation and promotion)。

我们的实验证明 HPV16 的 E7 基因确实在子宫颈癌细胞中表达, 合成 E7 蛋白。我们

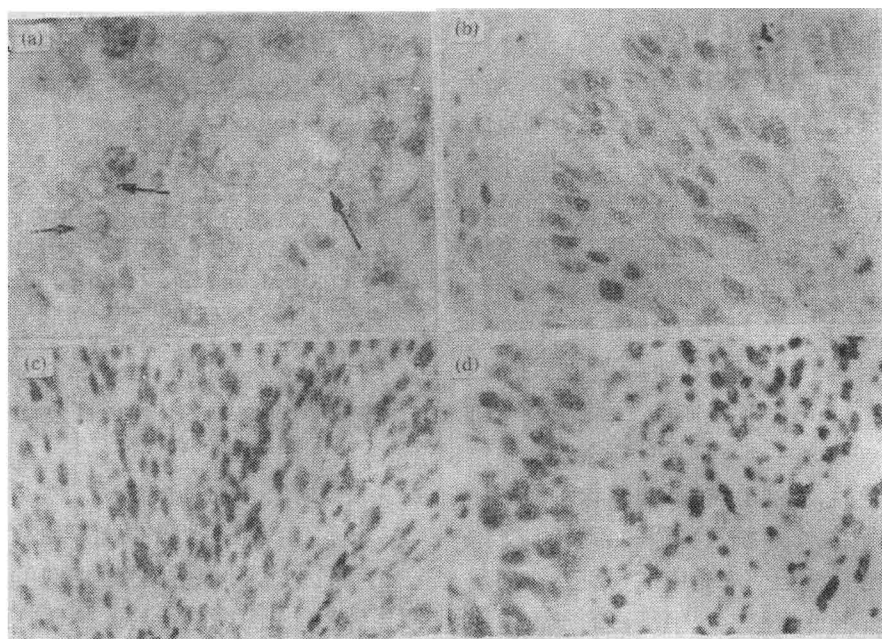


图 2 HPV16- 阳性的子宫颈癌组织中 E7 基因的表达(免疫组化法染色)

Fig. 2 Expression of E7 gene in tissues of HPV 16-positive uterine cervical cancer (immunohistochemical staining)

(a) HPV16-阳性癌组织. E7 抗原呈黑色小颗粒(箭头), 主要分布在核膜上 ($\times 1200$)

HPV 16-positive cancer tissue. E7 antigen appears as small dark granules (arrows), mainly distributed on the nuclear membrane ($\times 1200$)

(b) 同上组织, E7 抗原主要分布于核浆中 ($\times 1200$)

Same tissue. E7 antigen is mainly distributed in the nucleoplasm ($\times 1200$)

(c) 用 PBS 代替兔抗血清所作阴性对照. 未见 E7 抗原存在 ($\times 1200$)

Negative control, using PBS instead of the rabbit antisera. E7 antigen is not seen ($\times 1200$)

(d) 癌旁正常子宫颈粘膜组织. 未见 E7 抗原存在 ($\times 1200$)

Normal cervical mucosa tissue of about 3 cm away from the cancer. E7 antigen is not seen ($\times 1200$)

认为, 根据 E7 蛋白在癌细胞内的存在和分布情况, 可以认为 E7 基因在癌细胞中有强烈表达, 且主要存在于细胞核内, 提示 E7 基因可能即为 HPV16 的癌基因。孟祥金等^[13]在子宫颈癌中检测不到 HPV 蛋白质, 他们认为当病毒基因整合入宿主细胞基因组后, 即不能表达。然而他们所用的检测方法仅能检测 HPV 的晚期基因产物(外壳蛋白质)。

Smotkin 等报道^[2], 在 HPV16 相关的子宫颈癌中最多的病毒转录本及其翻译产物分别为 E7 mRNA 及其蛋白。但他们又指出^[2], 当将子宫颈癌组织进行亚细胞分部分离 (subcellular fractionation) 时 E7 蛋白存在于可溶性细胞浆组分中。并认为腺病毒 2 的 E1A 蛋白

已知为细胞核蛋白, 故 E7 蛋白和 E1A 蛋白二者没有同一作用机制。这种说法和最近 Dyson 等^[14]的说法和本文的实验结果均相矛盾。Sato 等^[15]亦用重组 DNA 技术合成 E7 融合蛋白 (lac-E7), 并用以免疫家兔产生抗血清。他们用间接免疫荧光法检测能短时表达 E7 蛋白的体外培养的猴 COS-1 细胞中 E7 抗原, 亦发现 E7 蛋白存在于细胞核内, 而不在细胞浆内。但 E7 蛋白和核的结合很疏松, 当细胞被破碎时, 细胞核中的 E7 蛋白即迅速被释出于细胞浆内。这就解释了我们和 Smotkin 的实验的矛盾。

我校病理解剖教研室张洪海副教授, 组胚教研室宋敏讲师给予技术指导, 谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 Baker C C, Phelps W C, Lindergren V *et al.* Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol*, 1987; 61: 962
- 2 Smotkin D, Wettstein F O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancerderived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83(13): 4680
- 3 Smotkin D, Prokoph H, Wettstein F O. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol*, 1989; 63: 1441
- 4 Banks L, Spence P, Androphy E *et al.* Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *J Gen Virol*, 1987; 68: 1351
- 5 Smotkin D, Wettstein F O. The major human papillomavirus protein in cervical cancer is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol*, 1987; 61(5): 1686
- 6 Phelps W C, Yee C L, Munger K *et al.* The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*, 1988; 53: 539
- 7 Kanda T, Watanabe S, Yoshiike K. immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic DNA fragments controlled by the SV40 promoter. *Virology*, 1988; 165(1): 321
- 8 齐凤菊, 徐铃. 人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因的克隆和表达. 生物化学与生物物理进展, 1992; 19: 273
- 9 Gao J M, Xu Q, Chen B H. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in cervical carcinomas. *J Med Coll PLA*, 1989; 4(3): 187
- 10 Yasumoto S, Doniger J, DiPaolo J A. Differential early viral gene expression in two stages of human papillomavirus 16 DNA-induced malignant transformation. *Mol Cell Biol*, 1987; 7(6): 2165
- 11 Bedell M A, Jones K H, Grossman S R *et al.* Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J Virol*, 1989; 63(3): 1247
- 12 Tanaka A, Noda T, Yagima H *et al.* Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J Virol*, 1989; 63(3): 1465
- 13 Meng X J, Sun Y, Chen M H *et al.* Viral etiology of cervical carcinoma—human papillomavirus and herpes simplex virus type 2. *Chin Med J*, 1989; 102(2): 94
- 14 Dyson N, Howley P M, Munger K *et al.* The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 1989; 243(4893): 934
- 15 Sato H, Watanabe S, Furuno A *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in *Escherichia coli* and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology*, 1989; 170(2): 311

Intracellular Localization of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in Uterine Cervical Carcinoma

Xu Qian Qi Fengju

(Department of Biochemistry, First Military Medical University, Guangzhou 510515)

ABSTRACT

The E7 gene of human papillomavirus type 16 was expressed in *Escherichia coli* with a recombinant plasmid prepared previously in our laboratory. The E7 fusion protein produced and purified by gel electrophoresis was used as antigen to immunize rabbits for preparing anti-E7 protein antisera. The antisera were used to stain the tissue sections of ten cases of uterine cervical cancer with an immunohistochemical technique (colloidal gold labeled stain). The E7 antigen was seen in the cells of 6 cases of cervical carcinoma as black granules under light microscope. The E7 protein was found in the nucleus of positive cells, mainly on the nuclear membrane, arranged in a circle. Only a few silver stained granules were seen in the cytoplasm. We believe that the intracellular distribution of the E7 protein indicates that there is high expression of the E7 gene in the HPV infected cells of the cervical cancer; and the fact that E7 antigen is a nuclear protein suggests that E7 gene is an oncogene of HPV 16.

Key words human papillomavirus, uterine cervical carcinoma, immunohistochemical technique, oncogene, intracellular localization