

本文引用:李航,崔静,田明振,等. RNA 结合基序单链相互作用蛋白 3 在人乳头瘤病毒 16 型相关宫颈癌细胞和鳞状细胞癌组织中的表达[J]. 新乡医学院学报,2015,32(8):722-724,727.

【基础研究】

RNA 结合基序单链相互作用蛋白 3 在人乳头瘤病毒 16 型相关宫颈癌细胞和鳞状细胞癌组织中的表达

李 航, 崔 静, 田明振, 冯思佳, 杨 璐, 赵二趁, 原志庆, 千新来
(新乡医学院病理学教研室,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨 RNA 结合基序单链相互作用蛋白 3(RBMS3)在人乳头瘤病毒 16 型(HPV16)相关宫颈癌细胞和鳞状细胞癌组织中的表达。**方法** 通过 Western blotting 方法检测 RBMS3 在 HPV16 E7 表达阳性和阴性宫颈癌细胞中的表达,通过免疫组织化学(IHC)染色方法检测 RBMS3 在 HPV16 E7 表达阳性和阴性宫颈鳞状细胞癌组织中的表达,并分析 RBMS3 和 HPV16 E7 表达的关系。**结果** Western blotting 结果显示,HPV16 E7 在宫颈癌 C33-A 细胞中不表达,而 HPV16 E7 在宫颈癌 SiHa 细胞中表达;C33-A 细胞中 RBMS3 的表达显著高于 SiHa 细胞($P < 0.01$)。IHC 结果显示,RBMS3 在 HPV16 E7 表达阳性宫颈鳞状细胞癌组织中的表达显著低于 HPV16 E7 表达阴性宫颈鳞状细胞癌组织($P < 0.01$),RBMS3 和 HPV16 E7 表达呈负相关($P < 0.01$)。**结论** HPV16 相关宫颈鳞状细胞癌组织中 RBMS3 的表达与 HPV16 E7 的表达呈负相关,RBMS3 可能与 HPV16 相关宫颈癌的发生有关。

关键词: 宫颈鳞状细胞癌;人乳头瘤病毒;RNA 结合基序单链相互作用蛋白 3
中图分类号: R737.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2015)08-0722-04

Expression of RNA binding motif single-stranded-interacting protein 3 in human papillomavirus 16-related cervical carcinoma cells and squamous cell carcinoma

LI Hang, CUI Jing, TIAN Ming-zhen, FENG Si-jia, YANG Lu, ZHAO Er-chen, YUAN Zhi-qing, QIAN Xin-lai
(Department of Pathology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of RNA binding motif single-stranded-interacting protein 3 (RBMS3) in human papillomavirus 16(HPV16)-related cervical carcinoma cells and squamous cell carcinoma tissues. **Methods** The expression of RBMS3 in HPV16 E7-positive or negative cervical carcinoma cells was detected by Western blotting, and the expression of RBMS3 in HPV16 E7-positive or negative cervical squamous cell carcinoma tissue was detected by immunohistochemical (IHC) staining. The relationship between the expression of HPV16 E7 and RBMS3 was analyzed. **Results** The result of Western blotting showed that HPV16 E7 was expressed in cervical carcinoma SiHa cells, but not in C33-A cells; the expression of RBMS3 in C33-A cells was significantly higher than that in SiHa cells($P < 0.01$). The result of IHC showed that the expression of RBMS3 in HPV16 E7-positive cervical squamous cell carcinoma tissues was significantly lower than that in HPV16 E7-negative tissues($P < 0.01$); the expression of RBMS3 was negatively correlated with HPV16 E7($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of RBMS3 in HPV16-related cervical squamous cell carcinoma is negatively related to HPV16 E7. RBMS3 may be relevant to the genesis of HPV16-related cervical cancer.

Key words: cervical squamous cell carcinoma; human papillomavirus; RNA binding motif single-stranded-interacting protein 3

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与宫颈癌发生的病因学关系已被证实,100%的宫颈癌

病例中发现 HPV DNA^[1-2],以 HPV16 为最主要类型,其与全球超过 60% 的宫颈癌病例及印度多达 90% 的宫颈癌病变有关^[3]。研究显示,高危型 HPV 与口腔、食管和其他肛门生殖器癌等有关^[4]。RNA 结合基序单链相互作用蛋白 3(RNA binding motif single-stranded-interacting protein 3, RBMS3)在正常组织中广泛表达^[5-6],但在许多癌细胞系和原发性肿瘤中表达明显下调,如鼻咽癌^[7]、肺鳞状细胞癌^[8]、食管鳞状细胞癌^[9]等。另外, RBMS3 与胰腺发育^[10]、帕金森病^[11]、软骨发育^[12]、肝纤维化发生^[13]

DOI:10.7683/xyxyxb.2015.08.008
收稿日期:2015-04-29
基金项目:河南高校科技创新团队支持项目(编号:2012IRTSTHN015);河南省基础与前沿技术研究计划项目(编号:122300410121);河南省科技创新杰出青年基金项目(编号:094100510007);新乡医学院重点学科开放课题(编号:ZD200955)
作者简介:李 航(1989-),男,河南尉氏人,硕士研究生在读,研究方向:肿瘤分子病理与肿瘤生物治疗。
通信作者:千新来(1966-),男,河南武陟人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤分子病理与肿瘤生物治疗;E-mail:qxlfssws@163.com。

等有密切关系。本研究拟通过 Western blotting 和免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色方法从细胞和组织水平探讨 HPV16 E7 与 RBMS3 表达的关系,为进一步研究 RBMS3 与 E7 的详细调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养条件 HPV16 E7 表达阳性的宫颈癌 SiHa 细胞及其表达阴性的宫颈癌 C33-A 细胞购自中科院上海细胞库,培养于含体积分数 10% 胎牛血清、100 kU · L⁻¹青霉素和 100 mg · L⁻¹链霉素的高糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM), 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱中常规培养。

1.2 宫颈组织标本 211 例宫颈鳞状细胞癌组织标本收集于新乡医学院第三附属医院和新乡市第一人民医院病理科。每例标本制备约 3 μm 厚度石蜡切片 3 张,1 张用于苏木精-伊红 (haematoxylin-eosin, HE) 染色,2 张用于 IHC 染色。

1.3 试剂及仪器 高糖 DMEM 培养基为美国 Invitrogen 公司产品,鼠抗 HPV16 E7 单克隆抗体、鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、辣根酶标记的兔抗鼠二抗为美国 Santa Cruz 公司产品,通用型 PV9000 二步法免疫组化检测试剂盒购自美国 Zymed 公司,倒置显微镜 (TE2000-U) 购自日本 Nikon 公司,半干转膜仪 (TE-70) 购自美国 Amersham Biosciences 公司。

1.4 Western blotting 从细胞水平分析 HPV16 E7 和 RBMS3 表达 收集 SiHa 细胞和 C-33A 细胞,提取细胞总蛋白并定量,变性处理后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和转膜,体积分数 5% 脱脂牛奶封闭,室温 3 h,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温摇育 2 h,按照增强化学发光试剂盒操作步骤进行自显影。以 β-actin 为内参照,蛋白上样量均为 100 μg,鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、鼠抗人 RBMS3 单克隆抗体、鼠抗 HPV16 E7 单克隆抗体、辣根酶标记的兔抗鼠二抗的稀释倍数分别为 1 : 500、1 : 200、1 : 200、1 : 3 000。Western blotting 目的条带与内参照条带的灰度比值通过 Bandscan 5.0 软件进行分析。

1.5 IHC 方法从组织水平分析 HPV16 E7 和 RBMS3 表达及关系 石蜡切片通过二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,微波炉中进行抗原修复;体积分数 3% H₂O₂ 室温封闭 30 min;血清室温孵育 20 min;滴加稀释好的一抗 (HPV16 E7 和 RBMS3 稀释倍数分别为 1 : 75 和 1 : 50), 4 °C 孵育过夜;滴加通用型 IgG 抗体-辣根过氧化物酶多聚体,室温孵育 30 min;

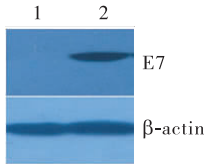
二氨基联苯胺显色、复染、脱水、透明、封片。以磷酸盐缓冲溶液代替一抗作为阴性对照。RBMS3 的阳性部位主要定位于细胞质,部分细胞膜着色,呈棕黄色。E7 的阳性部位主要定位于细胞核,部分细胞质着色,呈棕黄色。随机选取 5 个高倍视野观察阳性细胞着色程度及阳性细胞数占同类细胞总数的百分比。阳性细胞数占同类细胞总数的百分比计分: <25% 计 1 分,25% ~ 75% 计 2 分, >75% 计 3 分。阳性细胞着色程度计分:棕褐色计 3 分,棕黄色计 2 分,浅黄色计 1 分,无显色计 0 分。以上 2 种计分结果相乘作为最终积分,≤1 分为阴性,≥2 分为阳性。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两两比较采用 *t* 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

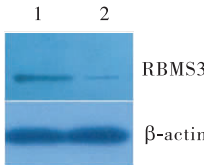
2.1 宫颈癌细胞中 HPV16 E7 和 RBMS3 的表达

结果见图 1 和图 2。C33-A 细胞不表达 HPV16 E7,而 SiHa 细胞中 HPV16 E7 阳性表达。C33-A 细胞和 SiHa 细胞中 RBMS3 均呈阳性表达 (C33-A 细胞:0.290 ± 0.015, SiHa 细胞:0.082 ± 0.006),但 C33-A 细胞中 RBMS3 的阳性表达显著高于 SiHa 细胞 ($t = 18.395, P < 0.01$)。



1: C33-A 细胞; 2: SiHa 细胞。
图 1 宫颈癌细胞中 HPV16 E7 表达

Fig. 1 Expression of HPV16 E7 in cervical cancer cells

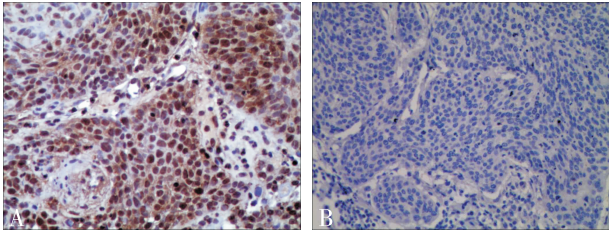


1: C33-A 细胞; 2: SiHa 细胞。
图 2 宫颈癌细胞中 RBMS3 表达

Fig. 2 Expression of RBMS3 in cervical cancer cells

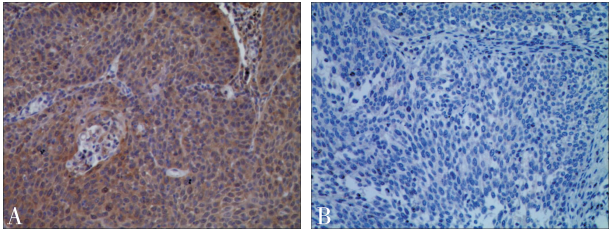
2.2 宫颈癌组织中 HPV16 E7 和 RBMS3 表达

结果见图 3、图 4 和表 1。211 例鳞状细胞癌组织中 HPV16 E6 表达阳性 169 例, HPV16 E6 表达阴性 42 例。HPV16 E7 表达阳性的宫颈鳞状细胞癌组织中 RBMS3 表达显著低于 HPV16 E7 表达阴性的宫颈鳞状细胞癌组织 ($P < 0.01$)。



A:HPV16 E7 表达阳性;B:HPV16 E7 表达阴性。
图3 宫颈鳞状细胞癌组织中 HPV16 E7 表达(IHC, ×200)

Fig.3 Expression of HPV16 E7 in cervical squamous cell carcinoma tissues(IHC, ×200)



A:RBMS3 表达阳性;B:RBMS3 表达阴性。
图4 宫颈鳞状细胞癌组织中 RBMS3 表达(IHC, ×200)

Fig.4 Expression of RBMS3 in cervical squamous cell carcinoma tissues(IHC, ×200)

表1 RBMS3 在 HPV16 E7 阳性和阴性宫颈鳞状细胞癌组织中的表达

Tab.1 Expression of RBMS3 in HPV16 E7-positive or negative cervical squamous cell carcinoma tissues

表达类型	n	RBMS3 表达		χ^2	P
		阳性/例	阴性/例		
HPV16 E7 表达阳性宫颈鳞状细胞癌	169	37	132	52.554	0.000
HPV16 E7 表达阴性宫颈鳞状细胞癌	42	34	8		

3 讨论

HR-HPV E7 蛋白可直接结合并灭活 pRb 蛋白,显著降低基因组的稳定性,是强有力的细胞增殖诱导者,有利于细胞向恶性转化^[14]。HR-HPV E7 被认为是宫颈癌治疗和检测的重要靶点^[15]。因此,深入研究 HPV16 E7 的致癌机制,对探索 HPV16 相关宫颈癌等恶性肿瘤新的治疗方法具有重要价值。经 Agilent 人基因表达谱芯片分析,发现沉默 HPV16 E7 表达阳性的宫颈癌细胞中 E7 表达后,RBMS3 表达上调。

RBMS3 基因属于 MSSP 家族成员,位于人类 3 号染色体 p23-p24 区^[5],其编码的 RBMS3 蛋白是一种核酸结合蛋白,可调节 DNA 复制转录,通过与 C-myc 相互作用调节细胞凋亡和细胞周期的进程。RBMS3 在正常组织中广泛表达^[5-6]。研究显示,RBMS3 与胰腺发育^[10]、帕金森病^[11]、软骨发育^[12]、

肝纤维化发生^[13]等有密切关系。进一步的研究显示,RBMS3 可作为一种肿瘤抑制基因在多种人体肿瘤发生中发挥作用,如鼻咽癌^[7]、肺鳞状细胞癌^[8]、食管鳞状细胞癌^[9]等。有研究报道,3 号染色体断臂缺失是肺癌发生过程中的常见的事件,RBMS3 表达下调可促进肺鳞状细胞癌的进展,是后者重要的分子标志物^[5,8]。鼻咽癌患者最早、最常见的遗传学改变是 3 号染色体短臂的缺失^[7],而 RBMS3 定位于人类 3 号染色体 p23-p24^[5]。Chen 等^[7]研究表明,鼻咽癌组织中 RBMS3 在 mRNA 和蛋白水平表达下调,提示 RBMS3 可能在鼻咽癌的发生中发挥了重要的作用。Li 等^[9]研究发现,RBMS3 在食管鳞状细胞癌组织中表达降低,且 RBMS3 的表达下调与 DNA 拷贝数目丢失有关。Li 等^[9]将 RBMS3 稳定转染入食管癌 KYSE30 细胞后发现,细胞生长速度明显降低,并通过 RT-PCR 和 Western blotting 分析发现,RBMS3 能够下调 c-Myc、CDK4 和磷酸化的 Rb 表达。

本研究 Western blotting 结果显示,HPV16 E7 表达阴性的宫颈癌 C33-A 细胞中 RBMS3 表达显著高于 HPV16 E7 表达阳性的 SiHa 细胞;RBMS3 在 HPV16 E7 表达阳性的宫颈鳞状细胞癌组织中的表达显著低于其在 HPV16 E7 表达阴性的宫颈鳞状细胞癌组织。该结果提示,RBMS3 在 HPV16 E7 表达阳性和阴性宫颈癌细胞中的表达与 HPV16 E7 表达呈负相关关系,RBMS3 表达的变化可能与 HPV16 诱导宫颈癌发生有关,即 RBMS3 可能在 HPV16 相关宫颈癌发生过程中具有重要作用,但二者之间的具体相互作用机制尚不清楚。

参考文献:

[1] Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis[J]. *Semin Cancer Biol*,2014,26:13-21.

[2] 尹宝靓,潘莹. 人乳头瘤病毒感染与宫颈癌[J]. 新乡医学院学报,2014,31(12):1055-1056,1060.

[3] Shukla S, Mahata S, Shishodia G, et al. Functional Regulatory Role of STAT3 in HPV16-mediated cervical carcinogenesis[J]. *PLoS One*,2013,8(7):e67849.

[4] Dillner J, Kjaer S K, Wheeler C M, et al. Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal intraepithelial neoplasia and anogenital warts: randomised controlled trial[J]. *BMJ*,2010,341:c3493.

[5] Penkov D, Ni R, Else C, et al. Cloning of a human gene closely related to the genes coding for the c-myc single-strand binding proteins[J]. *Gene*,2000,243(1/2):27-36.

开始前后,将细胞分别在室温和 4 ℃ 下放置 20 min。结果显示,室温与 4 ℃ 条件并没有影响 Jurkat 细胞转染效率,这说明短时期内温度对转染效率的影响不大。因此选择好的电转参数,对 Jurkat T 细胞转染条件进行优化,将会提高 Jurkat T 细胞转染效率。

本实验结果表明, Jurkat T 细胞在电压为 150 V、细胞处于对数生长期、质粒质量浓度不低于 0.5 g · L⁻¹ 时,电穿孔转染效率达到最高。通过优化 Jurkat T 细胞电转条件,可明显提高 Jurkat T 细胞电转效率。这将有助于 Jurkat 细胞电转在基础研究和临床研究中的应用。

参考文献:

[1] Xu Y, Lu Y, Xing W. An individually addressable suspended-drop electroporation system for high-throughput cell transfection[J]. *Lab Chip*, 2014, 14(4): 686-690.

[2] 张旭, 崔艳华, 张兰威, 等. 乳酸菌电转化条件研究[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2009, 45(专辑): 26-33.

[3] Faurie C, Rebersek M, Golzio M, et al. Electro-mediated gene trans-

fer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation[J]. *J Gene Med*, 2010, 12(1): 117-125.

[4] Escoffre J M, Portet T, Wasungu L, et al. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues [J]. *Mol Biotechnol*, 2009, 41 (3): 286-295.

[5] Golzio M, Teissie J, Rols M P. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1292-1297.

[6] 徐峰, 吕杨, 谢院生, 等. 原代大鼠肾小球系膜细胞最佳电转染条件的探索和验证[J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(5): 459-461, 482.

[7] 朱剑锋, 张广森, 龚凡杰, 等. 电穿孔法基因转染 K562 细胞条件的优化[J]. 实用临床医药杂志, 2008, 12(5): 43-49.

[8] 江雪, 杨平, 李玥, 等. 人急性淋巴细胞白血病细胞株 T 细胞电转染条件的优化[J]. 重庆医学, 2011, 40(15): 1463-1465.

[9] Cheong D E, Lee H I, So J S. Optimization of electrotransformation conditions for propionibacterium acnes [J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 72(1): 38-41.

(本文编辑: 杨 博 英文编辑: 杨 博)

(上接第 724 页)

[6] Li Y, Chen L, Nie C J, et al. Downregulation of RBMS3 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(19): 6106-6115.

[7] Chen J, Kwong D L, Zhu C L, et al. RBMS3 at 3p24 inhibits nasopharyngeal carcinoma development via inhibiting cell proliferation, angiogenesis, and inducing apoptosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44636.

[8] Chujo M, Noguchi T, Miura T, et al. Comparative genomic hybridization analysis detected frequent overrepresentation of chromosome 3q in squamous cell carcinoma of the lung [J]. *Lung Cancer*, 2002, 38(1): 23-29.

[9] Li Y, Chen L L, Nie C J, et al. Downregulation of RBMS3 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(19): 6106-6115.

[10] Lu C K, Lai Y C, Chen H R, et al. Rbms3, an RNA-binding protein, mediates the expression of Ptf1a by binding to its 3' UTR during mouse pancreas development[J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31

(7): 1245-1251.

[11] Gao J J, Liu R, Zhao E, et al. Head injury, potential interaction with genes, and risk for Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2015, 21(3): 292-296.

[12] Jayasena C S, Bronner M E. Rbms3 functions in craniofacial development by posttranscriptionally modulating TGF-β signaling [J]. *J Cell Biol*, 2012, 199(3): 453-466.

[13] Fritz D, Stefanovic B. RNA-binding protein RBMS3 is expressed in activated hepatic stellate cells and liver fibrosis and increases expression of transcription factor Prx1 [J]. *J Mol Biol*, 2007, 371 (3): 585-595.

[14] Pang C L, Thierry F. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets[J]. *Microb Pathog*, 2013, 58: 55-65.

[15] DiPaolo J A, Alvarez-Salas L M. Advances in the development of therapeutic nucleic acids against cervical cancer[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(8): 1251-1264.

(本文编辑: 徐自超 英文编辑: 徐自超)