

· 基础研究 ·

沉默 E6 相关蛋白对人乳头瘤病毒阴性 宫颈癌细胞中 p53 蛋白表达水平的影响

解亦航, 郭宇微, 孙渤轩, 辛杨, 于嘉敏, 赵春艳

大连医科大学检验医学院 临床生化检验教研室, 辽宁 大连 116044

摘要: 目的 探讨沉默 E6 相关蛋白 (E6-associated protein, E6AP) 对人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 阴性宫颈癌细胞 (C33A) 中 p53 蛋白表达水平的影响。方法 在 Lipofectamine™ 2000 转染试剂的介导下, 将特异性沉默 E6AP 的 siRNA 序列 (siE6AP) 及沉默对照无序 siRNA 序列 (siControl) 分别转染 C33A 细胞。Western blot 法检测 siRNA 对 E6AP 的沉默效果及细胞中 p53 和 cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平。结果 siE6AP 组 C33A 细胞中 E6AP 蛋白表达水平显著低于 siControl 组 ($t = -4.597, P < 0.05$)。siE6AP 组 C33A 细胞中 p53 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达水平均显著高于 siControl 组 (t 分别为 4.533 和 7.099, P 均 < 0.05)。结论 沉默 E6AP 可显著提高 C33A 细胞中 p53 蛋白的表达水平, 表明沉默 E6AP 可能恢复 C33A 细胞中 p53 的活性和功能。

关键词: E6 相关蛋白; 人乳头瘤病毒; 宫颈癌; C33A 细胞; p53 蛋白

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)02-0163-04

Effect of silencing E6-associated protein on level of p53 protein in human papilloma virus negative cervical cancer cells

XIE Yi-hang, GUO Yu-wei, SUN Bo-xuan, XIN Yang, YU Jia-min, ZHAO Chun-yan

Department of Clinical Biochemistry, College of Laboratory Medicine, Dalian Medical University,

Dalian 116044, Liaoning Province, China

Corresponding author: ZHAO Chun-yan, E-mail: cyzhaok@yahoo.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of silencing E6-associated protein (E6AP) on the level of p53 protein in human papilloma virus (HPV) negative cervical cancer cells (C33A cells). **Methods** The siRNA sequence silencing E6AP (siE6AP) and silencing control disordered siRNA sequence (siControl) were transfected into C33A cells with the mediation of Lipofectamine™ 2000 transfection reagent respectively. The silencing effect of siRNA on E6AP and the expression of p53 and cleaved-caspase-3 proteins were detected by Western blot. **Results** The levels of E6AP protein in C33A cells of siE6AP group were significantly lower ($t = -4.597, P < 0.05$), while the levels of p53 and cleaved-caspase-3 proteins were significantly higher than those of siControl group ($t = 4.533$ and 7.099 respectively, each $P < 0.05$). **Conclusion** Silencing of E6AP significantly increased the expression of p53 protein in C33A cells, indicating that silencing of E6AP may restore the activity and function of p53 protein in C33A cells.

Keywords: E6-associated protein (E6AP); Human papilloma virus (HPV); Cervical cancer; C33A cells; p53 protein

抑癌基因 p53 具有调控细胞周期、细胞凋亡和维持基因组稳定性等多种重要功能, 在保持遗传完整性及避免生物细胞癌变等方面具有重要作用^[1-3]。50% 以上肿瘤细胞中存在 p53 的缺失、突变或功能失活^[4-5]。正常细胞在缺氧、射线、癌基因激活等压力下会激活 p53 途径, 启动细胞凋亡或基因修复, 而癌细胞

(即使存在野生型 p53) 几乎均缺乏激活 p53 途径的能力^[6]。因此, 尽管癌细胞暴露于各种形式的致癌应激环境中 (如致癌基因激活、细胞缺氧和正常环境丧失), 仍可继续增殖和存活^[7]。有研究表明, p53 蛋白使细胞在压力条件下通过凋亡避免细胞癌变^[1,7], 激活宫颈癌细胞中休眠的 p53 可抑制肿瘤细胞生长^[8-9]。因此, 抑制野生型 p53 降解、恢复突变体 p53 结构、促进 p53 重新激活是癌症治疗药物重要的研发方向。活化的

基金项目: 辽宁省自然科学基金 (20180530100)。

通信作者: 赵春艳, E-mail: cyzhaok@yahoo.com

(割裂的)半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(cleaved-cysteiny aspartate specific proteinase-3, cleaved-caspase-3)是诱导细胞凋亡的关键效应分子,其蛋白水平可反映细胞的凋亡情况^[10-11]。在正常细胞中,主要通过鼠双微体2(murine double minute 2, Mdm2)介导的泛素化降解途径进行 p53 蛋白的调控^[12-13]。

高危人乳头瘤病毒(high risk human papilloma virus, HR-HPV)入侵机体细胞后,病毒自身编码的 E6 蛋白通过与 E6 相关蛋白(E6-associated protein, E6AP)结合介导 p53 泛素化降解,从而逃避由 p53 触发的细胞凋亡^[14-15]。但在非 HPV 感染的宫颈癌细胞(C33A)中,E6AP 对 p53 蛋白的调控作用尚未明确^[16]。因此,本研究通过 siRNA 技术沉默 E6AP 表达,探讨沉默 E6AP 对 C33A 细胞中 p53 蛋白水平的影响,以期为后续宫颈癌治疗药物的研发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞 C33A 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清(11011-8611)购自浙江天杭生物科技股份有限公司;青-链霉素(SV30010)和 MEM 培养基(SH30024.01)均购自美国 HyClone 公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(11668-019)购自美国 Invitrogen 公司;RIPA(弱)裂解液(P0013D)及 ECL 均购自上海碧云天生物技术有限公司;鼠抗 p53 单克隆抗体(60283-2-Ig)及兔抗 E6AP 多克隆抗体(10344-1-AP)均购自美国 Proteintech 公司;兔抗 cleaved-caspase-3 多克隆抗体(WL02117)购自沈阳万类生物技术有限公司;兔抗 GAPDH 多克隆抗体(AP0063)购自南京巴傲得(Bioworld)生物科技有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG(ZB-2301)及山羊抗鼠 IgG(ZB-2305)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PVDF 膜(IPFL00010)购自德国 Merck Millipore 公司。

1.3 E6AP 的 siRNA 沉默 参考文献[8-9]方法,设计特异性沉默 E6AP 的 siRNA 序列(siE6AP:5'-CAACUCCUGCUCUGAGAUAATT-3')及沉默对照无序 siRNA 序列(siControl:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'),序列均由苏州吉玛基因股份有限公司合成。

1.4 细胞培养 将 C33A 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素双抗的 MEM 培养基,于 37 °C,5% CO₂ 条件下常规培养。

1.5 细胞转染 取对数生长期的 C33A 细胞,接种至 24 孔板,1.5 × 10⁵ 个/孔,于 37 °C,5% CO₂ 条件下培养 18 h;在 Lipofectamine™ 2000 转染试剂的介导下

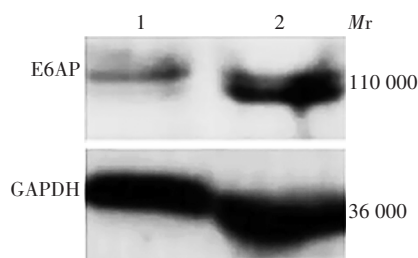
将 siE6AP 及 siControl 序列分别转染 C33A 细胞,继续培养 6 h;更换含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基(不含抗生素)。转染 48 h 后,用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 1 次,RIPA(弱)裂解液冰上裂解细胞 20 min;于 4 °C,2 000 × g 离心 10 min,取上清,BCA 法蛋白定量。

1.6 沉默 E6AP 对 C33A 细胞中 E6AP、p53 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达水平影响的检测 采用 Western blot 法。取 siE6AP 及 siControl 组 C33A 细胞培养上清,经 10% 及 15% SDS-PAGE(前者用于检测 E6AP、p53 和 GAPDH,后者用于检测 cleaved-caspase-3)分离蛋白后,转移至 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h;加入兔抗 E6AP 多克隆抗体(1:5 000 稀释)、鼠抗 p53 单克隆抗体(1:5 000 稀释)、兔抗 caspase-3 / cleaved-caspase-3 多克隆抗体(1:500 稀释)及兔抗 GAPDH 多克隆抗体(1:20 000 稀释),4 °C 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 及山羊抗鼠 IgG(均 1:5 000 稀释),室温作用 1 h;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,ECL 法显色。

1.7 统计学分析 应用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计学分析,实验数据均采用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 沉默 E6AP 的效果 siControl 和 siE6AP 组 C33A 细胞中 E6AP 蛋白表达量分别为(0.506 4 ± 0.185 99)和 1,前者明显低于后者,且差异有统计学意义(*t* = -4.597, *P* < 0.05),见图 1。表明 siE6AP 可沉默 C33A 细胞中 E6AP 的表达。



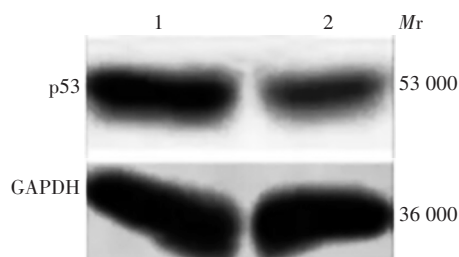
1:siE6AP组;2:siControl组。

图 1 Western blot 法检测 siE6AP 对 C33A 细胞中 E6AP 的沉默作用

Fig. 1 Western blotting of silencing effect of siE6AP on E6AP in C33A cells

2.2 沉默 E6AP 对 C33A 细胞中 p53 蛋白表达水平的影响 siE6AP 和 siControl 组 C33A 细胞中 p53 蛋白表

达水平分别为 (1.5725 ± 0.21877) 和1,前者明显高于后者,且差异有统计学意义($t = 4.533, P < 0.05$),见图2。表明在C33A细胞中沉默E6AP可显著提高p53蛋白水平。

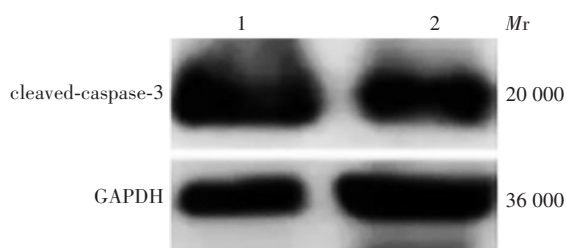


1: siE6AP组; 2: siControl组。

图2 Western blot法检测沉默E6AP对C33A细胞中p53蛋白表达的影响

Fig. 2 Western blotting of effect of silencing E6AP on expression of p53 protein in C33A cells

2.3 沉默E6AP对C33A细胞中凋亡关键效应分子cleaved-caspase-3表达水平的影响 siE6AP和siControl组C33A细胞中cleaved-caspase-3的蛋白水平分别为 (1.8178 ± 0.19955) 和1,前者明显高于后者,且差异有统计学意义($t = 7.099, P < 0.05$),见图3。表明在C33A细胞中沉默E6AP可显著提高cleaved-caspase-3蛋白的表达水平。



1: siE6AP组; 2: siControl组。

图3 Western blot法检测沉默E6AP对C33A细胞中cleaved-caspase-3蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Western blotting of effect of silencing E6AP on expression of cleaved-caspase-3 protein in C33A cells

3 讨论

泛素化蛋白酶体途径是细胞内蛋白质降解的主要途径之一,该途径主要由泛素活化酶E1、泛素结合酶E2及泛素蛋白连接酶E3完成,其中E3决定了靶蛋白的特异性^[16]。目前已知的E3酶多达600多种,Mdm2和E6AP是两种重要的E3酶^[16]。Mdm2是生理情况下介导p53降解的主要E3酶,Mdm2通过与p53蛋白结合抑制其转录功能,并通过泛素化蛋

白酶体途径介导其降解^[17]。同时,p53又可正调节Mdm2表达,从而形成自动反馈调节回路^[18-19]。E6AP蛋白广泛存在于几乎所有细胞中,参与多种抑癌基因蛋白的泛素化降解,如早幼粒细胞白血病蛋白(promyelocytic leukemia protein, PML)及簇集蛋白(stress-induced chaperone clusterin, CLU)、p27Kip1等,与宫颈癌、白血病、非小细胞性肺癌、前列腺癌及乳腺癌等多种癌症的发生发展密切相关^[16,20-21]。HR-HPV感染的宫颈癌细胞中,在E6蛋白参与下,E6AP可介导p53泛素化降解,使p53降解由自动反馈调节Mdm2途径转换为E6调控的E6AP途径^[14-15],导致p53调控失控。有研究发现,在缺乏E6的情况下,E6AP可单独通过泛素化途径降解p53^[15]。目前,对E6AP诱导p53降解的研究多集中于HPV感染的宫颈癌细胞或含有野生型p53的HPV阴性宫颈癌细胞中(如RKO和MCF7)^[15,22],对突变型p53在HPV阴性宫颈癌细胞研究较少。p53突变是HPV阴性宫颈癌细胞中p53失活的主要原因^[23],因此,本研究选择HPV阴性的宫颈癌细胞系C33A(其含有Arg273Cys突变型p53)进行研究。结果表明,沉默E6AP C33A细胞中的p53表达水平显著提高($P < 0.05$),表明E6AP介导的突变型p53泛素化降解可能存在不依赖E6的途径或其他间接途径,具体机制需进一步深入研究。

caspase-3为caspase家族成员之一,是参与凋亡途径的关键效应分子。正常状况下,胞质中的caspase-3以无活性Pro-caspase-3形式存在。p53可促使凋亡蛋白释放至细胞质中,诱导凋亡小体进行组装,切割Pro-caspase-3,形成具有活性的cleaved-caspase-3,快速启动细胞凋亡程序^[24]。本研究结果表明,沉默E6AP提高p53表达水平的同时,可显著提高细胞中凋亡的关键效应分子cleaved-caspase-3的含量($P < 0.05$)。提示在C33A细胞中,可通过沉默E6AP恢复p53活性,进一步诱导细胞凋亡。

恢复p53活性是抗肿瘤治疗的重要策略之一。在HPV阳性宫颈癌细胞中,p53失活主要是由E6AP介导的泛素蛋白酶体途径降解所致;而在HPV阴性宫颈癌细胞中,p53失活多是由p53的突变所引起^[23]。因此,对于野生型p53,可通过抑制蛋白酶体活性以降低p53的泛素化降解,从而恢复p53活性;对于突变型p53,治疗策略可分为3类:恢复突变p53的野生型构象和转录活性、靶向突变p53的降解、诱导合成杀伤力^[25-26]。目前,针对恢复p53活性的药物研发多集中于破坏p53-Mdm2相互作用方面^[1],而C33A细胞中p53的突变为热点突变Arg273Cys,该突变使其

(下转第171页)

- attenuates hypertrophy-induced redox imbalance and mitochondrial ATP-sensitive K channel repression [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 62: 87-94.
- [17] AHMET I, WAN R, MATTSON M P, *et al.* Cardioprotection by intermittent fasting in rats [J]. *Circulation*, 2005, 112 (20): 3115-3121.
- [18] OKOSHI K, CEZAR M, POLIN M, *et al.* Influence of intermittent fasting on myocardial infarction-induced cardiac remodeling [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2019, 19 (1): 126.
- [19] ZENG C, WANG R, TAN H J I. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15 (7): 1345-1357.
- [20] GUO X, HU S, LIU J, *et al.* Piperine protects against pyroptosis in myocardial ischaemia / reperfusion injury by regulating the miR-383 / RP105 / AKT signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (1): 244-258.

收稿日期:2022-05-10 编辑:李靓

(上接第 165 页)

失去与 DNA 结合的能力,从而丧失其抑癌基因活性并获得致癌活性^[25-26]。本研究发现,在 HPV 阴性宫颈癌细胞中,突变型 *p53* 有可能通过 E6AP 途径降解,这为靶向调控突变 *p53* 的降解提供了实验依据,为癌症治疗药物的设计和研发提供了新靶点。

参考文献

- [1] CHEOK C F, LANE D P. Exploiting the p53 pathway for therapy [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7 (3): a026310. DOI: 10.1101 / cshperspect. a026310
- [2] ENGELAND K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a dream [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25 (1): 114-132.
- [3] LI Y, ZHANG M C, XU X K, *et al.* Functional diversity of p53 in human and wild animals [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 152.
- [4] ZAFAR A, WANG W, LIU G, *et al.* Targeting the p53-MDM2 pathway for neuroblastoma therapy: Rays of hope [J]. *Cancer Lett*, 2021, 496 (1): 16-29.
- [5] STEIN Y, ROTTER V, ALONI-GRINSTEIN. Gain-of-function mutant p53: all the roads lead to tumorigenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (24): 6197.
- [6] LUO Q Y, BEAVER J M, LIU Y, *et al.* Dynamics of p53: A master decider of cell fate [J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8 (2): 66.
- [7] HOCK A K, VOUSDEN K H. The role of ubiquitin modification in the regulation of p53 [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol Cell Res*, 2014, 1843 (1): 137-149.
- [8] CHEN Y H, YANG S F, YANG C K, *et al.* Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK / p53 axis and suppressing PI3K / AKT signaling in human cervical cancer cells [J]. *Mol Med Reports*, 2021, 23 (1): 88.
- [9] STEELS A, VANNEVEL L, ZWAENEPOEL O, *et al.* Nb-induced stabilisation of p53 in HPV-infected cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 12680.
- [10] SHEN X L, BURGUILLOS M A, JOSEPHA B. Guilt by association, caspase-3 regulates microglia polarization [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16 (4): 306-307.
- [11] WANG W T, ZHU M Y, XU Z X, *et al.* Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase-3 activity [J]. *Biol Res*, 2019, 52 (1): 36.
- [12] MATSUMOTO Y, MIYAMOTO Y, CABRAL H, *et al.* Enhanced efficacy against cervical carcinomas through polymeric micelles physically incorporating the proteasome inhibitor MG132 [J]. *Cancer science*, 2016, 107 (6): 773-781.
- [13] WU D Y, PRIVES C. Relevance of the p53-MDM2 axis to aging [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25 (1): 169-179.
- [14] MARTINEZ-ZAPIEN D, RUIZ F X, POIRSON J, *et al.* Structure of the E6 / E6AP / p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53 [J]. *Nature*, 2016, 529 (7587): 541-545.
- [15] HENGSTERMANN A, LINARES L K, CIECHANOVER A, *et al.* Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98 (3): 1218-1223.
- [16] OWAIS A, MISHRA R K, KIYOKAWA H. The HECT E3 Ligase E6AP / UBE3A as a therapeutic target in cancer and neurological disorders [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (8): 2108-2127.
- [17] WANG S M, ZHAO Y J, AGUILAR A, *et al.* Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction for new cancer therapy: progress and challenges [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7 (5): a026245. DOI: 10.1101 / cshperspect. a026245.
- [18] AZER S A. MDM2-p53 interactions in human hepatocellular carcinoma: what is the role of nutlins and new therapeutic options [J]. *J Clin Med*, 2018, 7 (4): 64-83.
- [19] QI S M, CHENG G, CHENG X D, *et al.* Targeting USP7-mediated deubiquitination of MDM2 / MDMX-p53 pathway for cancer therapy: Are we there yet? [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 233.
- [20] GAMELL C, BANDILOVSKA I, GULATI T, *et al.* E6AP promotes a metastatic phenotype in prostate cancer [J]. *iScience*, 2019, 22: 1-15.
- [21] RAGHU D, PAUL P J, GULATI T, *et al.* E6AP promotes prostate cancer by reducing p27 expression [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (26): 42939-42948.
- [22] CELEGATO M, MESSA L, GORACCI L, *et al.* A novel small-molecule inhibitor of the human papillomavirus E6-p53 interaction that reactivates p53 function and blocks cancer cells growth [J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 115-125.
- [23] LI P, CHEN M B. Significance of p53 in cervical cancer and its influence on radiosensitivity [J]. *Chin J Radiation Oncol*, 2017, 26 (5): 593-597. (in Chinese)
李平, 陈敏斌. p53 基因在宫颈癌发病中的意义及对放射敏感性的影响. *中华放射肿瘤学杂志*, 2017, 26 (5): 593-597.
- [24] SCHULER M, GREEN D R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29: 684-688.
- [25] ZHU G, PAN C, BEI J X, *et al.* Mutant p53 in cancer progression and targeted therapies [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 595187.
- [26] CHEN S, WU J L, LIANG Y, *et al.* Arsenic trioxide rescues structural p53 mutations through a cryptic allosteric site [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39 (2): 225-239.

收稿日期:2022-04-06 编辑:李靓