

## HPV E6 通过 Rap1 信号通路影响宫颈癌细胞增殖、 侵袭及迁移的研究

秦祥川, 李金秋, 黄晓婧, 忽吐比丁·库尔班, 阿仙姑·哈斯木  
(新疆医科大学基础医学院/新疆地方病分子生物学重点实验室, 新疆乌鲁木齐 836001)

**[摘要]** 目的 探讨人乳头瘤病毒 E6 蛋白(human papillomavirus E6 protein, HPV E6)对宫颈癌Hela 细胞增殖、侵袭和迁移的影响及潜在分子机制。方法 基于 Illumina Hiseq 4000 转录组测序技术检测 12 例不同程度的宫颈病变组织之间的基因表达特征, 筛选与 HPV 相关的差异基因; 利用 GO、KEGG Pathway 方法对差异基因进行生物学功能富集分析; Western blotting 检测正常宫颈上皮细胞 HCEpEpic、宫颈癌细胞 Hela 中 Rap、Rap1GAP 蛋白表达水平; 通过平板克隆实验、Transwell 实验和划痕实验检测其增殖、侵袭及迁移能力; 通过 sh-E6 慢病毒转染下调细胞内 HPV E6 表达, 分为对照组(Hela 细胞)、空载组(sh-NON)和sh-E6 组(低表达 HPV E6); 下调 HPV E6 表达, 采用平板克隆和 CCK-8 实验分别检测每组细胞增殖能力和细胞活力; Transwell 和划痕实验检测细胞侵袭、迁移能力; Western blotting 检测各组细胞中 E6、Rap1、Rap1GAP、CyclinD1、E-cadherin、N-cadherin 蛋白的表达水平。在 sh-E6 组基础上过表达 Rap1, Western blot 检测细胞中 Rap1 通路及相关蛋白的表达水平; 平板克隆实验、Transwell 实验和划痕实验分别检测细胞增殖、侵袭和迁移能力。结果 测序结果显示, 与正常宫颈 HPV 阴性比较, HPV 阳性的正常宫颈、CIN、宫颈癌组织中差异上调表达的基因分别有 340、864 和 1036 个; 3 个数据集寻找共有差异基因共 24 个。GO/KEGG 富集分析 24 个差异表达基因主要富集在 Rap1 相关信号通路。与 HCEpEpic 细胞相比, Hela 细胞内 Rap1 表达升高, Rap1GAP 表达降低( $P < 0.01$ ); 其细胞的增殖、侵袭和迁移能力增强( $P < 0.01$ ); 下调 HPV E6 表达后, 与 Hela 组比较, sh-E6 组细胞的增殖、细胞集落形成、侵袭和迁移能力降低( $P < 0.001$ ); Western blotting 表明, 与 Hela 组比较, sh-E6 组细胞内 Rap1、CyclinD1、N-cadherin 蛋白表达降低, Rap1GAP 和 E-cadherin 蛋白表达升高( $P < 0.001$ )。与 sh-E6 组相比, 过表达 Rap1 组(sh-E6/OE Rap1)细胞内 Rap1/Rap1GAP、CyclinD1、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达被恢复( $P < 0.001$ ), 细胞增殖、侵袭迁移能力被恢复( $P < 0.01$ )。结论 在宫颈癌发展过程中, HPV E6 通过激活 Rap1 信号通路促进宫颈癌细胞增殖、侵袭及迁移。

**[关键词]** HPV E6; 宫颈癌; Rap1 通路; 增殖; 侵袭; 迁移

**[中图分类号]** R737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)09-0009-08

## Effect of HPV E6 on Proliferation, Invasion and Migration of Cervical Cancer Cells Through Rap1 Signaling Pathway

QIN Xiangchuan, LI Jinqiu, HUANG Xiaojing, HUTUBIDING · Kuerban, AXIANGU · Hasim  
(Basic Medicine College of Xinjiang Medical University/Xinjiang Key Laboratory of Molecular  
Biology of Endemic Diseases, Urumqi Xinjiang 836001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of human papillomavirus E6 protein (HPV E6) on the proliferation, invasion and migration of Hela cells of cervical cancer and its potential molecular mechanism. **Methods** Illumina Hiseq 4000 transcriptome sequencing technology was employed to identify the gene expression profiles of 12 cases featuring various degrees of cervical lesions and to screen for HPV-related differential genes. The

**[收稿日期]** 2024-05-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(82260516)

**[作者简介]** 秦祥川(1998~), 男, 河南安阳人, 在读硕士研究生, 主要从事宫颈癌的发病机制研究工作。

**[通信作者]** 阿仙姑·哈斯木, E-mail: axiangu75@126.com

biological function enrichment of the differential genes was analyzed using GO and KEGG Pathway. Western blotting was utilized to detect the expression levels of Rap and Rap1GAP proteins in normal cervical epithelial cells HCerEpic and cervical cancer cells Hela. The capabilities of proliferation, invasion, and migration were examined by plate cloning, Transwell, and scratch tests. Intracellular HPV E6 expression was down-regulated through sh-E6 lentivirus transfection and classified into the control group (Hela cells), the no-load group (sh-NON), and the sh-E6 group (with low expression of HPV E6). The expression of HPV E6 was diminished, and the proliferation ability and cell viability of each group were determined by plate cloning and CCK-8 assay. Transwell and scratch assays were adopted to detect cell invasion and migration. Western blotting was conducted to detect the expression levels of E6, Rap1, Rap1GAP, CyclinD1, E-cadherin, and N-cadherin in cells of each group. Rap1 was overexpressed based on the sh-E6 group, and the expression levels of the Rap1 pathway and related proteins were measured by Western blot. Cell proliferation, invasion, and migration were evaluated respectively by plate cloning, Transwell assay, and scratch assay. **Results** The sequencing results indicated that, in contrast to normal cervical HPV-negative tissues, 340, 864 and 1036 differentially upregulated genes were respectively present in HPV-positive normal cervix, CIN and cervical cancer tissues. A total of 24 differential genes were identified across the 3 datasets. GO/KEGG enrichment analysis of the 24 differentially expressed genes primarily focused on the RAS1-related signaling pathway. Compared with HCerEpic cells, Rap1 expression was elevated and Rap1GAP expression was reduced in Hela cells ( $P < 0.01$ ). The proliferation, invasion and migration of the cells were enhanced ( $P < 0.01$ ). After down-regulating the expression of HPV E6, the proliferation, colony formation, invasion and migration of sh-E6 cells were decreased compared with the Hela group ( $P < 0.001$ ). Western blotting showed that the protein expressions of Rap1, CyclinD1 and N-cadherin in sh-E6 group were lower than those in Hela group, and the protein expressions of Rap1GAP and E-cadherin were higher than those in Hela group (sh-E6/OE Rap1) were restored ( $P < 0.001$ ), and the cell proliferation, invasion and migration were restored ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** During the development of cervical cancer, HPV E6 promotes the proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells by activating Rap1 signaling pathway.

[ **Key words** ] HPV E6; Cervical cancer; Rap1 pathway; Proliferation; Invasion; Migration

子宫颈癌(cervical cancer, CC)的高发病率和死亡率在全球呈上升趋势,威胁着女性的生命健康,在2020年全球有60.41万例新发病例并有34.18万死亡病例<sup>[1]</sup>。中国国家癌症中心发布的《2022年全国癌症报告》研究显示,中国子宫颈癌新发病例约11.93万例,死亡人数约3.72万例<sup>[2]</sup>。近95%的CC病例是由于高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染,其中在约200种已确定的HPV毒株中,高危HPV16和HPV18占HPV相关宫颈癌的75%<sup>[3-4]</sup>。这种疾病往往在发展到晚期才被发现,而肿瘤细胞的恶性增殖以及无法控制的转移是宫颈癌复发和治疗失败的主要原因<sup>[5]</sup>。

HPV编码的早期蛋白6(E6)和早期蛋白7(E7)过与TP53和pRB蛋白相互作用来解除细胞周期的调节,从而在细胞转化中发挥重要作用,增强癌细胞增殖并促进癌症进展<sup>[6-7]</sup>。研究表明,HPV18 E6癌蛋白干扰上皮细胞极性Par3蛋白,促进肿瘤进展<sup>[8]</sup>。HPV E6除了与P53结合使p53降解外,HPV E6还能与其它蛋白相互作用,包

括端粒酶、Myc、Akt、Wnt、mTORC1。随着HPV E6作用的深入研究,HPV E6可影响CC进展的多个步骤,但其机制尚不明确。

因此,为探索宫颈癌中HPV16 E6基因对其恶性进展的影响,本研究采用Illumina HiSeq技术,通过转录组学筛选HPV16 E6感染后不同病变程度宫颈组织的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并将DEGs进行富集分析筛选相关信号通路。通过慢病毒转染、Western blot和肿瘤细胞恶性化表型等实验方法检测及验证,为探索宫颈癌相关分子的致病机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究中涉及的12例样本分别取自2015年6月至2017年3月期间新疆医科大学第一附属医院妇科住院患者的宫颈病变组织(分别为正常宫颈HPV阴性、正常宫颈HPV16阳性、CIN HPV16阳性和宫颈癌HPV16阳性组织各3例)。标本术

前均未接受过放疗或其他特殊处理且, 入组前均经过新疆医科大学第一附属医院病理科医师确诊, 患者及家属均签署知情同意书。本研究已得到了新疆医科大学第一附属医院伦理委员会的批准(20130216-147)。

## 1.2 实验材料

人源宫颈癌 HeLa(HPV+)细胞, HCErEpiC 人子宫颈上皮细胞购买于国家实验细胞资源共享平台; 胎牛血清 FBS、青-链霉素 PS、DMEM 培养基购买于上海道鹏生物科技有限公司, sh-E6、OE-Rap1、空载 sh-NON 慢病毒由上海吉凯生物科技有限公司构建。一抗 HPV16 E6 抗体(sc-460)购买于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, Rap1 (68125-1-Ig)、Rap1GAP(19174-1-AP)、CyclinD1 (60186-1-Ig)、GADPH(10494-1-AP)购自美国 Proteintech Group 公司; E-Cadherin(WL01482)、N-Cadherin(WL01047)沈阳万类生物科技有限公司; Matrigel 胶(356234)购买于美国康宁CORNING 公司; 1% 结晶紫染色液(G1062)购买于北京索莱宝科技有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 宫颈病变组织基于 HiSeq 平台对其进行转录组测序分析

采用 Illumina Truseq™ RNA sample prep Kit 方法构建测序所需的文库, 实验步骤分为以下(1)从宫颈病变组织中提取总的RNA, 用 Oligo (dT)的磁珠与 ployA 碱基配(A-T), 从中分离 mRNA, 用于下游实验的文库构建、转录组测序及分析等; (2)实验中需要短序列片段进行测序, 加 Fragmentation buffer, 打断上述富集得到的 mRNA 序列, 使其长度为 1.5 ~ 2 kb; (3)以(2)步骤的 mRNA 为模板反转合成一链 cDNA, 随后进行二链合成, 形成稳定的双链结构。(4)连接 adaptor 及上机进行转录组测序。

### 1.3.2 生物信息学分析

应用 KEGG PATHWAY 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)对差异基因进行通路富集分析。使用在线软件 GO 分析(<http://geneontology.org/>)对富集途径中的基因功能进行分析, 包括分子功能(Molecular function)、生物过程(Biological process)和细胞组成(Cellular component)3个部分。

### 1.3.3 慢病毒转染和分组

sh-E6 慢病毒、其对慢病毒(sh-NON)以及 Rap1 过表达病毒根据上海吉凯有限公司的转染操作步骤进行病毒转染, 将对数生长的 HeLa 细胞进行胰酶消化, 配置  $4 \times 10^4$  个/mL 细胞悬液, 分别吸取 1 mL 细胞悬液于 6 孔板中, 待细胞量达 40% 时, 细胞立即进行

饥饿培养; 24 h 后弃培养基, 加含血清培养基加入慢病毒溶液, 转染 48 h 后, 使用  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  嘌呤霉素用于筛选慢病毒转进的细胞, 荧光显微镜观察并拍照。将筛选存活细胞用  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素继续培养, 过表达 Rap1 病毒的转染方法与 sh-E6 方法相似, 其中筛选稳转细胞株使用  $500 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  G418。

### 1.3.4 Western blot 检测

收集细胞样品裂解并通过蛋白质免疫印迹法进行检测, 以确定各组细胞中相关蛋白的表达情况。其主要步骤为: 通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白样品, 并将其转移至 PVDF 膜。抗体稀释: E6(1:3000)、CyclinD1 (1:10000)、Rap1(1:5000)、Rap1GAP (1:4000)、E-Cadherin (1:4000)、N-Cadherin (1:1000)和 GADPH (1:35000)。将 PVDF 膜置于提前用 TBST 配制的 10% 脱脂牛奶溶液中进行常温封闭 1.5 h, 一抗室温孵育 100 min, HRP 标记的二抗(兔抗稀释比 1:20000; 鼠抗稀释比例 1:10000)室温避光孵育 2 h, 最后使用增强化学发光(ECL)检测试剂进行蛋白条带显影。

### 1.3.5 CCK-8 和平板克隆实验检测细胞增殖和集落形成能力

取生长状态良好的细胞制备成每  $100 \mu\text{L}$  2000 个细胞悬液加入 96 孔板中, 在不同的时间段取出 96 孔细胞培养板, 加入含 10% 的 CCK-8 试剂的培养基,  $37^\circ\text{C}$  孵育 0.5 ~ 4 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的每组细胞吸光度数值。使用 3.5 cm 培养皿进行克隆形成试验, 将不同分组的细胞以  $1 \times 10^3$  个细胞/皿进行培养, 培养 7 ~ 15 d 观察集落大小和数量。

### 1.3.6 Transwell 和划痕实验检测细胞侵袭和迁移能力

Transwell 上室在实验前 3 h 加入  $60 \mu\text{L}$  的  $1 \text{ mg}/\text{mL}$  的 Matrigel, 培养箱中放置 3 h, 超净台内将上室多余液体吸弃, 随后向上室中加入  $5 \times 10^4/200 \mu\text{L}$  的无血清的细胞悬液, 下室含  $600 \mu\text{L}$  含有血清完全培养基; 24 h 后, 取出小室, 使用提前准备好的 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min, 4% 多聚甲醛固定细胞, 置于室温 15 min; 弃去多聚甲醛, PBS 洗涤细胞 2 次, 每次 10 min, 加入  $600 \mu\text{L}$  1% 结晶紫染色液,  $37^\circ\text{C}$  条件下放置 20 min; 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 10 min, 染色后用显微镜观察并拍照。使用记号笔在 12 孔板背后快速划平行线, 每组细胞以每毫升  $5 \times 10^4$  个细胞的密度接种于 12 孔板中, 24 h 后弃去培养基, 用温育的 PBS 洗涤细胞, 用直尺比着, 使用  $20 \mu\text{L}$  枪头垂直于 12 孔板和记号线制造细胞划痕, 使划痕与标记线相交, PBS 洗涤细胞, 用显微镜照相,

作为 0 h 对照。

### 1.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 7.0 软件和 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 统计结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用独立样本 *t* 检验比较 2 组变量, 应用单因素方差分析比较多组间变量, 两两比较运用 *LSD-t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HPV 16 感染宫颈病变组织的差异基因筛选和功能富集分析

转录组测序结果显示, 与正常宫颈(HPV 阴性)相比较, 正常宫颈、CIN 和宫颈癌(HPV 16 阳性)组织分别筛选出 340、864 和 1036 个差异基因。将 3 组数据进行排序, 做出差异排序图, 可视化差异分析后的结果, 见图 1A。取 3 组数据间差异基因的交集, 共有差异基因 225 个, 见图 1B, 根据  $\log_2FC \geq 2$ ,  $P < 0.01$  为筛选标准, 筛选差异基因并取差异基因的交集, 共有 24 个。将 24 个差异基因进行 GO/KEGG 富集分析, 差异表达基因主

要富集在 Rap1 相关信号通路(如 Rap1/Rap1GAP), 见图 1C。

### 2.2 HeLa、HCerEpiC 细胞中 Rap1/Rap1GAP 通路的比较

通过筛选 HPV 16 感染宫颈病变组织的差异基因并进行功能富集分析, 差异表达基因主要富集在 Rap1 相关信号通路(如 Rap1/Rap1GAP), 应用 Western blotting 实验验证正常宫颈上皮 HCerEpiC 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞中 Rap1 和 Rap1GAP 蛋白表达水平。与 HCerEpiC 组相比较, 宫颈癌 HeLa 组中 Rap1 表达量升高( $t = -18.58$ ,  $P < 0.01$ ), Rap1GAP 表达量降低( $t = 6.88$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 2。

### 2.3 HeLa 与 HCerEpiC 细胞增殖、侵袭和迁移能力的比较

Rap1 是 Ras 家族成员之一, 属于小分子 G 蛋白, 其主要功能影响癌细胞的增殖、侵袭和转移等。因此应用平板克隆实验、侵袭实验及划痕实验分别检测细胞的增殖, 侵袭和迁移能力。结果表明, 第 2 周时 HCerEpiC 组细胞的集落克隆数低于对照 HeLa 组( $t = 14.93$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 3A。

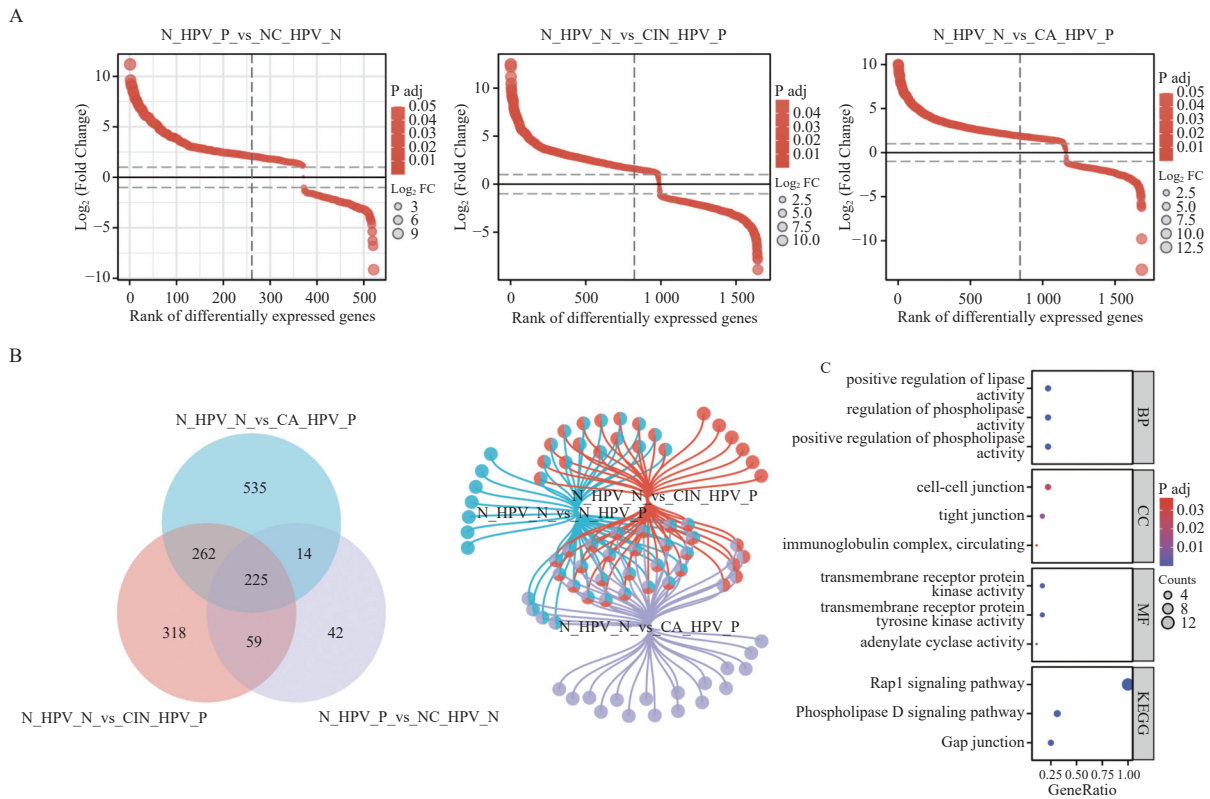


图 1 HPV 16 感染宫颈病变组织中差异基因的筛选和功能富集分析

Fig. 1 Screening and functional enrichment analysis of differential genes in HPV 16-infected cervical lesions

A: 可视化差异排序图 B: 3 组数据间差异基因的交集 C: 差异表达基因 KEGG 通路分析注: N\_HP\_V\_P\_vs\_NC\_HP\_V\_N: 正常宫颈(HPV 16 阳性)vs 正常宫颈(HPV 阴性); N\_HP\_V\_N\_vs\_CIN\_HP\_V\_P: 正常宫颈(HPV 阴性)vs CIN(HPV 16 阳性); N\_HP\_V\_N\_vs\_CA\_HP\_V\_P: 正常宫颈(HPV 阴性)vs 宫颈癌(HPV 16 阳性)。

与 HCerEpiC 组比较, HeLa 组细胞侵袭能力增强 ( $t = 16.20$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 3B, 迁移能力也增强。

以上结果表明, HPV E6 表达可使增强宫颈癌 HeLa 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

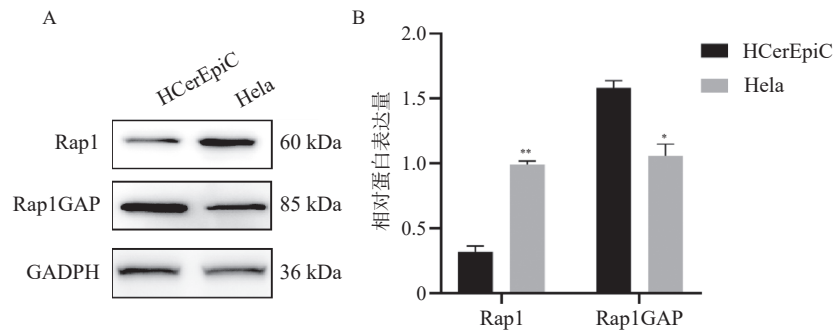


图2 HPV 16 感染激活宫颈癌 HeLa 细胞内 Rap1/Rap1GAP 通路 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 2 HPV 16 infection activates the Rap1/Rap1GAP pathway in HeLa cells of cervical cancer ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A: Western blot 检测结果; B: HeLa、HCerEpiC 细胞中 Rap1/Rap1GAP 通路关键蛋白相对表达水平; 与 HCerEpiC 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

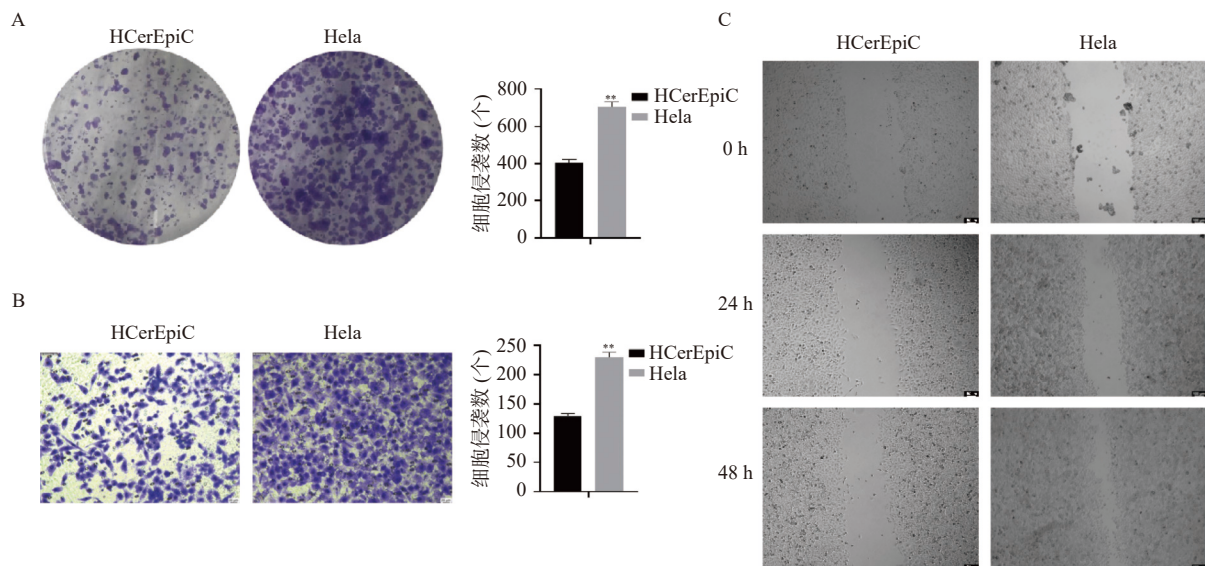


图3 HPV 16 感染促进宫颈癌 HeLa 细胞增殖、侵袭和迁移能力 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 3 HPV 16 infection promotes the proliferation, invasion and migration of HeLa cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A: 细胞平板克隆实验结果; B: Transwell 实验结果 (标尺为  $100 \mu\text{m}$ ); C: 细胞划痕实验结果 (标尺为  $100 \mu\text{m}$ ); 与 HCerEpiC 组相比, \*\* $P < 0.01$ 。

#### 2.4 HPV16 E6 低表达细胞株构建

荧光倒置显微镜观察对转染 HPV16 编码 E6 基因慢病毒的宫颈癌 HeLa 细胞, 明确 sh-E6 和 sh-NON 组病毒转染的效果, 见图 4A。应用 Western blotting 实验验证 sh-E6、sh-NON 组和 HeLa 细胞中 HPV E6 蛋白表达水平。与 HeLa 组相比较, sh-E6 组中 HPV E6 表达量降低 ( $F = 143.8$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 4B。

#### 2.5 HPV E6 表达对宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响

平板克隆实验结果表明, 第 2 周时 sh-E6 组细胞的集落克隆数低于对照 HeLa 组 ( $F = 90.93$ ,

$P < 0.001$ ), 见图 5A。CCK-8 结果表明, 与 HeLa 组相比, 24、36 和 48 h 时 sh-E6 组细胞的活力显著降低 ( $P < 0.001$ ), 见图 5B。与 HeLa 组比较, sh-E6 组细胞侵袭能力降低 ( $F = 103.2$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 5C。与 HeLa 组比较, sh-E6 组细胞迁移能力降低, 见图 5D。以上结果表明, 下调 HPV E6 表达可减弱 HeLa 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

#### 2.6 HPV E6 通过 Rap1 信号通路调控宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移

应用 Western blotting 检测下调 HPV E6 后 Rap1 信号通路相关蛋白 Rap1 和 Rap1GAP 以及增殖相关的蛋白 CyclinD1、E-Cadherin 和 N-

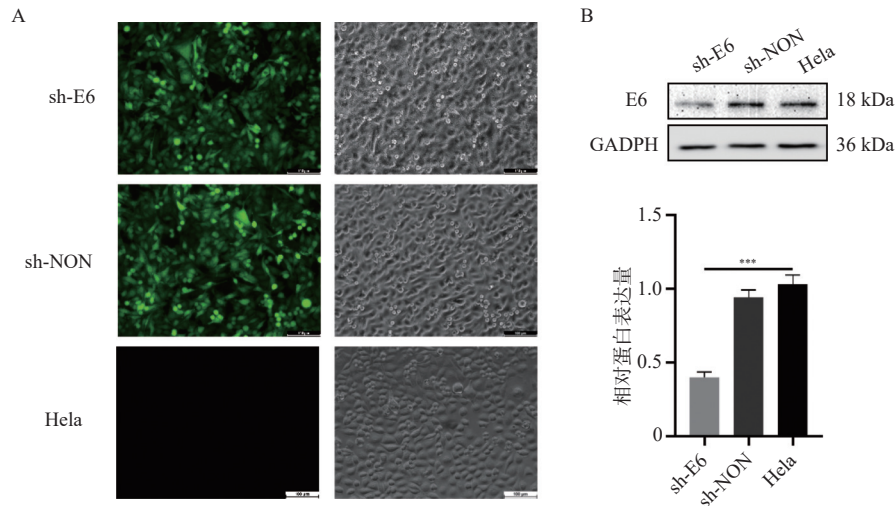


图 4 宫颈癌 HeLa 细胞慢病毒转染效率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 4 Lentivirus transfection efficiency of HeLa cells of cervical cancer ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A: 荧光倒置显微镜下观察各组细胞的荧光表达情况 (标尺为  $100 \mu\text{m}$ ); B: Western blot 检测慢病毒转染 HeLa 细胞后 HPV E6 蛋白表达; 与 HeLa 组相比,  $***P < 0.001$ 。

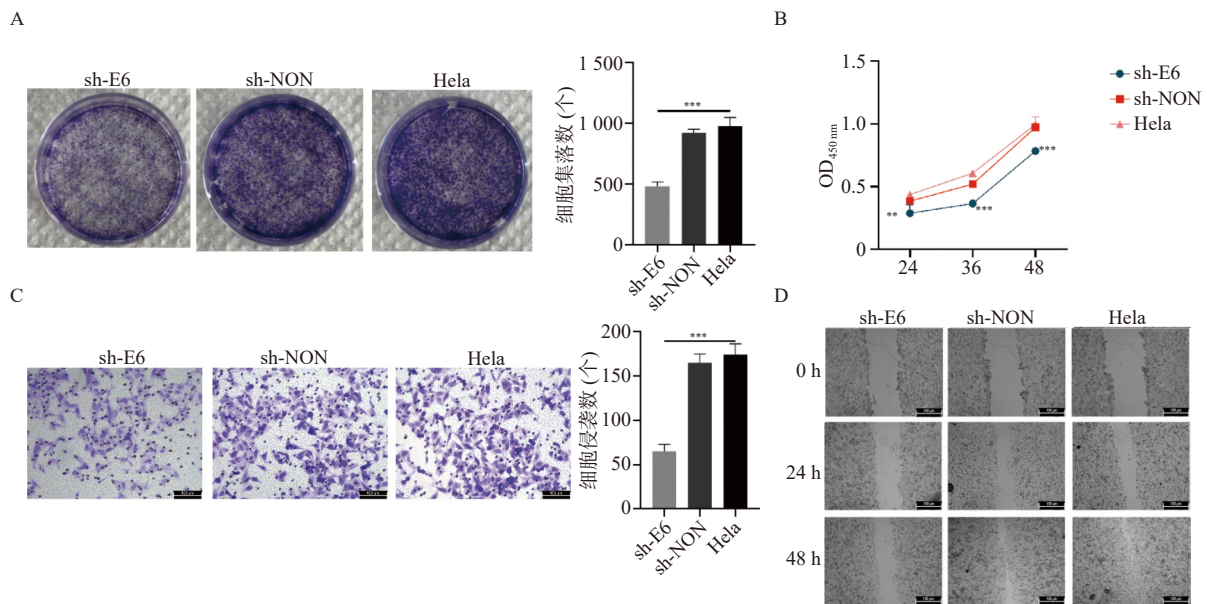


图 5 下调 HPV E6 表达后各组宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移能力 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 5 Proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells in each group after down-regulating HPV E6 expression ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A: 细胞平板克隆实验结果; B: CCK-8 实验结果; C: Transwell 实验结果 (标尺为  $100 \mu\text{m}$ ); D: 细胞划痕实验结果 (标尺为  $100 \mu\text{m}$ ); 与 HeLa 组相比,  $***P < 0.001$ 。

Cadherin 的表达。结果显示, 与 HeLa 组相比, sh-E6 组细胞内 Rap1、CyclinD1、N-cadherin 的表达降低, Rap1GAP 和 E-cadherin 表达增强 ( $P < 0.001$ ), 见图 6A。下调 HPV E6 的同时过表达 Rap1, Western blotting 结果显示, 与 sh-E6 组相比, 过表达 Rap1 组 (sh-E6/OE Rap1) 细胞内 Rap1、CyclinD1、N-cadherin 的表达增高, Rap1GAP 和 E-cadherin 表达降低 ( $P < 0.001$ ), 见图 6B, 其细胞的增殖、

侵袭和迁移能力显著被恢复 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 6C、D 和 E。

### 3 讨论

2020 年我国宫颈癌新发病例 11 万, 死亡病例近 6 万, 可见宫颈癌依然严重危害着女性健康<sup>[1]</sup>。新疆地区 HPV 阳性率较高, 宫颈病变患者 HR-

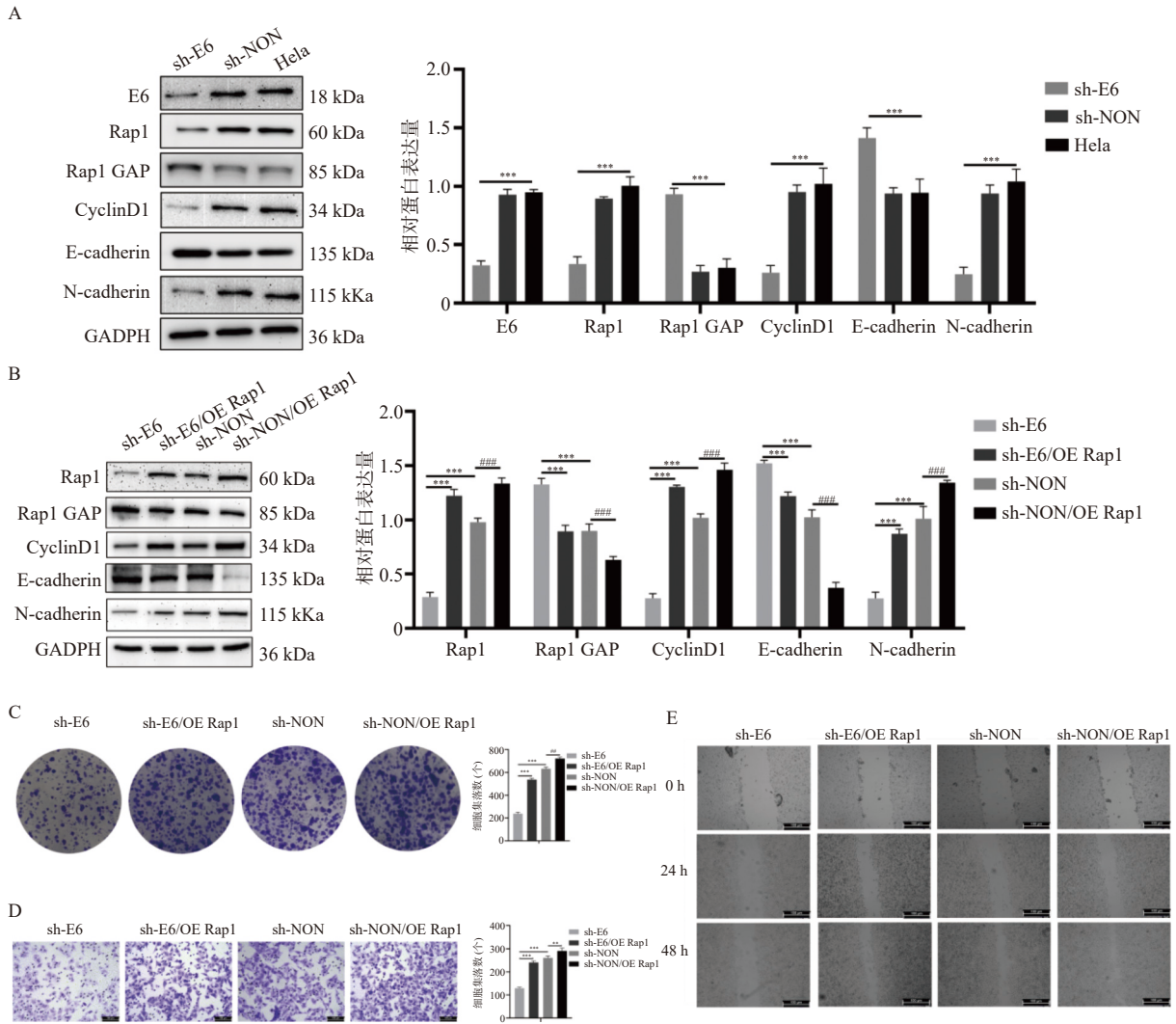


图 6 HPV E6 通过 Rap1 信号通路调控宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 HPV E6 by Rap1 signaling pathways regulating the cervical cancer cell proliferation, invasion and migration ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: Western blot 检测 HeLa 细胞下调 HPV E6 后 Rap1 信号通路中相关蛋白的表达; B: Western blot 检测下调 HPV E6 后再次过表达 Rap1 细胞内 Rap1 信号通路中相关蛋白的表达; C: 细胞平板克隆实验结果; D: Transwell 实验结果(标尺为 100  $\mu\text{m}$ ); E: 细胞划痕实验结果(标尺为 100  $\mu\text{m}$ ); 与 sh-E6 组相比, \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 sh-NON 组相比, #### $P < 0.001$ , ## $P < 0.01$ 。

HPV 感染率前五的亚型分别是: HPV16、52、58、39、51/53 型<sup>[9]</sup>。研究证实, 宫颈癌的发生与高危型的 HPV 感染密切相关, 尤其是 16/18 型的感染<sup>[10]</sup>。HPV 是一种双链 DNA 病毒, 其基因组可分为早期区域(E)、晚期区域(L)和长控制区域。HPV 病毒编码的致癌基因 E6 和 E7 不仅编码主要的致癌蛋白, 而且在宫颈癌的肿瘤微环境及免疫逃逸中发挥着关键作用<sup>[11-12]</sup>。已知高危型 HPV16 E6 参与众多信号通路的活化, 从而介导细胞的增殖、侵袭、转移行为及免疫相关等, 促进宫颈癌的恶性进展<sup>[13-15]</sup>。研究显示, HPV16 E6 与 NFX1-123 相互作用, 且 HPV16 E6 影响 NFX1-123 的亚细胞定位, 促进 HR-HPV 感染的宫颈上皮向宫颈癌发生<sup>[16]</sup>。本研究聚焦 HPV E6 基因, 筛选异常

活化的相关通路及有效的生物靶点, 探索 HPV E6 在宫颈癌前病变过程及宫颈癌的具体作用。

本研究通过转录组高通量测序, 获得 HPV16 E6 感染不同病变程度的宫颈组织所有转录本和所有转录信息, 研究 HPV16 E6 蛋白在宫颈癌致瘤中的作用机制。在转录组学测序中, 筛选与 HPV 相关的差异基因; 并利用 GO、KEGG Pathway 方法对差异基因进行生物学功能富集分析; 差异表达基因主要富集在 Rap1 相关信号通路。Rap1 是一种与 Ras 蛋白具有高度同源性的 GTPase 蛋白, 其活性可被 GEFs(鸟嘌呤核苷酸交换因子)和 GAPs(GTPase 激活蛋白)调节, 从而使其在 GTP 结合(活性状态)和 GDP 结合(非活性状态)二者之间循环, 在各自的信号传导途径中充当分子开

关<sup>[17]</sup>，其异常活化与肿瘤的恶性增殖和侵袭相关<sup>[18-19]</sup>。为了证明差异基因富集 Rap1 通路 HPV 相关，笔者选择宫颈癌 HeLa 细胞、正常宫颈上皮 HCerEpiC 细胞进行验证，发现 HPV 感染的 HeLa 细胞的 Rap1 表达增高，同时细胞增殖活性变强、其侵袭和迁移的能力同样增强。

Rap1 在多种肿瘤中过表达与肿瘤细胞侵袭迁移密切相关<sup>[20-21]</sup>，但 Rap1 的作用在 HPV16 /18 感染方面的研究少有报道，尤其对宫颈癌中发生发展的分子机制尚不明确。首先，笔者下调 HeLa 细胞 HPV E6 表达，细胞增殖、侵袭及迁移能力降低。进一步检测增殖与侵袭迁移相关的关键蛋白，结果发现下调 HPV E6 使肿瘤细胞中 CyclinD1、N-cadherin 蛋白表达降低，同时 E-cadherin 蛋白表达异常升高 ( $P < 0.001$ )。通过 Western blot 检测细胞内 Rap1 信号通路关键蛋白 Rap1 表达降低，其下游 Rap1GAP 表达增高 ( $P < 0.001$ )。下调 HPV E6 的同时过表达 Rap1，过表达 Rap1 细胞细胞的增殖、侵袭和迁移能力显著被恢复，CyclinD1、N-cadherin 的表达异常增高，Rap1GAP 和 E-cadherin 表达降低 ( $P < 0.001$ )。提示 HPV E6 可能通过 Rap1 信号通路的异常活化，从而在癌细胞的增殖、侵袭及迁移中发挥关键作用。

综上所述，本研究结果表明，在宫颈癌发展过程中，HPV E6 通过激活 Rap1 信号通路促进宫颈癌细胞增殖、侵袭及迁移，为治疗宫颈癌提供研究基础。

### [参考文献]

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 王苏蒙, 闫慧姣, 任文辉, 等. 中国宫颈癌防控进展 [J]. *中国预防医学杂志*, 2023, 24(12): 1366-1370.
- [3] Sae K, Anju M, Tamae H, et al. Hpv vaccination and cervical cancer screening [J]. *The Lancet*, 2022, 399(10339): 1939-1940.
- [4] Annika B, Anna M, Richard W L. Primary hpv screening vs cotesting for cervical cancer [J]. *Jama*, 2023, 330(21): 2121.
- [5] Ekaterina G, Oleg I K, Γ. A H, et al. Prognostic factors of cervical cancer recurrence [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2016, 34(15): e17025-e17025.
- [6] Yong S, Qi X. Hpv e6/e7 oncoprotein promotes cervical cancer by promoting mir-466 expression via p53 pathway [J]. *Annals of Oncology*, 2018, 29: ix83.
- [7] Siying L, Xiaoling H, Zhentong W, et al. Ubiquitination of the hpv oncoprotein e6 is critical for e6/e6ap-mediated p53 degradation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10(31): 2483.
- [8] Florencia Natalia F, Marina Paula Bugnon V, Federico M, et al. Human papillomavirus (hpv) - 18 e6 oncoprotein interferes with the epithelial cell polarity par3 protein [J]. *Molecular Oncology*, 2014, 8(3): 533-543.
- [9] 王文玲, 韩翠柳, 马洁, 等. 新疆地区高危型 hpv 病毒感染现状及与其与宫颈病变的关系 [J]. *中国生育健康杂志*, 2024, 35(3): 279-282.
- [10] Tyagi A, Vishnoi K, Mahata S, et al. Cervical cancer stem cells selectively overexpress hpv oncoprotein e6 that controls stemness and self-renewal through upregulation of hes1 [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(16): 4170-4184.
- [11] Ramos C A, Narala N, Vyas G M, et al. Human papillomavirus type 16 e6/e7-specific cytotoxic t lymphocytes for adoptive immunotherapy of hpv-associated malignancies [J]. *J Immunother*, 2013, 36(1): 66-76.
- [12] Juline P, Irina Paula S, Marie-Laure S, et al. High-risk mucosal human papillomavirus 16 (hpv16) e6 protein and cutaneous hpv5 and hpv8 e6 proteins employ distinct strategies to interfere with interferon regulatory factor 3-mediated beta interferon expression [J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(10): e0187521.
- [13] Lucas Boeno O, Ismar R H, Luisa L V. Human papillomavirus (hpv) 16 e6 oncoprotein targets the toll-like receptor pathway [J]. *Journal of General Virology*, 2018, 99(5): 667-675.
- [14] Saif F K, Carly A B, David J S, et al. Tbx3 promotes cervical cancer proliferation and migration via hpv e6 and e7 signaling [J]. *Molecular Cancer Research*, 2023, 21(4): 345-358.
- [15] Cindy C, Eva Katharina P, Jennifer B, et al. The human papillomavirus e6 oncoprotein targets usp15 and trim25 to suppress rig-i-mediated innate immune signaling [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(6): e01737-17.
- [16] 李娇生, 郭一帆, 于浩天. Hpv 阳性宫颈癌细胞中 nfx1-123 与 hpv16 e6 的细胞定位关系及其可能作用机制 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(16): 2972-2976.
- [17] Bailey C L, Kelly P, Casey P J. Activation of rap1 promotes prostate cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 4962-4968.
- [18] Jun Y, Qing L, Cheng L. Sox9 promotes the invasion and migration of lung adenocarcinoma cells by activating the rap1 signaling pathway [J]. *BMC Pulmonary Medicine*, 2023, 23(1): 421.
- [19] Jayachandran G, Sazaki J, Nishizaki M, et al. Fragile histidine triad-mediated tumor suppression of lung cancer by targeting multiple components of the ras/rho gtpase molecular switch [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10379-10388.
- [20] 朱远哲. 去泛素化酶 usp32 稳定 rap1 调控非小细胞肺癌进展的机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [21] 周思彤. Sharpin 上调 rap1 信号通路促进黑色素瘤发展 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.