

# IFI16基因外来表达对喉癌细胞Hep-2的影响

陈建明\* 赵菁 邱明

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

**摘要** 将RT-PCR扩增得到的IFI16基因构建到真核表达质粒pVR1012中, 得到pVR1012-IFI16重组质粒, 用脂质体将其转染导入Hep-2细胞。半定量RT-PCR及Western blot检测IFI16基因在Hep-2细胞中的外来表达情况, 细胞生长曲线绘制法及MTT法测定IFI16基因外来表达对Hep-2细胞增殖的影响, 流式细胞术检测IFI16基因外来表达对Hep-2细胞周期及凋亡的影响。半定量RT-PCR分析结果发现, pVR1012-IFI16重组质粒转染的Hep-2细胞IFI16基因mRNA水平显著升高; Western blot分析结果发现, pVR1012-IFI16重组质粒转染的Hep-2细胞IFI16基因蛋白质表达水平显著升高; 细胞生长曲线测定结果发现, 第2天开始pVR1012-IFI16重组质粒转染的Hep-2细胞生长变慢, 至第3天时pVR1012-IFI16重组质粒转染的Hep-2细胞生长速度明显变慢, 与mock转染及空载体转染对照细胞相比差异显著( $P < 0.05$ ); MTT测定结果发现, pVR1012-IFI16重组质粒转染Hep-2细胞48 h后, 其相对活细胞数目显著降低, 与mock转染及空载体转染对照细胞相比差异十分显著( $P < 0.01$ ); 流式细胞术检测结果发现, 与mock转染及空载体转染对照细胞相比, pVR1012-IFI16重组质粒转染48 h后Hep-2细胞亚G<sub>0</sub>期细胞比例以及凋亡细胞比例都显著升高。上述研究结果说明, 构建得到的pVR1012-IFI16重组质粒能在Hep-2细胞中外来表达IFI16基因, IFI16基因外来表达抑制Hep-2细胞增殖、阻滞Hep-2细胞周期在亚G<sub>0</sub>期并诱导Hep-2细胞发生凋亡。

**关键词** IFI16基因; Hep-2细胞; 增殖; 细胞周期; 凋亡

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤, 其发病率呈逐年上升趋势。目前, 对喉癌等恶性肿瘤的传统治疗方法是手术、放疗和化疗, 但对中晚期患者来说, 传统疗法的疗效并不理想且有很大毒副作用。因此, 近年来兴起的综合疗法倍受人们关注, 干扰素(interferon, IFN)治疗肿瘤就是综合疗法中最重要的[1-3]。IFN是一种具有广泛生物活性的细胞因子, 具有抗病毒、免疫调节、抗细胞增殖以及诱导细胞分化等功能。目前, IFN已被广泛应用于临床抗病毒和抗肿瘤治疗, 干扰素分白细胞干扰素(interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )、成纤维干扰素(interferon- $\beta$ , IFN- $\beta$ )和免疫干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )三类。其中IFN- $\gamma$ 的抗肿瘤作用最强[2-3]。我们的前期研究发现, IFN- $\gamma$ 能抑制喉癌细胞Hep-2的增殖并诱导IFI16基因的表达, 但却不影响与IFI16基因同一家族的MND A基因的表达。我们推测: IFN- $\gamma$ 抑制Hep-2细胞的增殖可能是通过诱导IFI16基因表达来介导的[4]。IFI16基因是干扰素可诱导表达的IFI-200(又称p200)家族成员之一, 该家族在人体中有4个成员, 分别是IFI16、MND A、AIM2和IFIX[5-7]。近年来, 有研究表明IFI16基因在头

颈部肿瘤中起肿瘤抑制作用[8-10]。根据我们的前期研究结果以及他人的研究报道推测: IFI16基因在喉癌细胞系Hep-2细胞的增殖中起抑制作用。本文以Hep-2细胞为研究材料, 通过构建IFI16基因真核表达载体pVR1012-IFI16重组质粒, 研究IFI16基因外来表达对Hep-2细胞增殖的影响, 探讨IFI16基因在Hep-2细胞增殖中的作用, 为进一步揭示IFN- $\gamma$ 抑制Hep-2细胞增殖的分子机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 总RNA抽提试剂Trizol购自BioBasic公司, Taq DNA聚合酶购自上海鼎国生物技术有限公司, DL2 000 DNA Marker购自天根生化科技(北京)有限公司, Trans 2K plus DNA Marker购自

收稿日期: 2011-10-21 接受日期: 2011-12-05

浙江省钱江人才计划(No.2010R10062)和浙江省自然科学基金(No.Y2090698)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0571-28933086, Fax: 0571-28865333, E-mail: jianmingchen@hznu.edu.cn

北京全式金生物技术有限公司, cDNA第一链合成试剂盒、DNA片段纯化/回收试剂盒、*Bam*H I、*Pst* I、T4 DNA连接酶、X-gal、IPTG、细胞转染试剂Lipofecter、RIPA裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒、预染蛋白质分子量标准、PVDF膜、小鼠来源actin抗体、HRP标记的山羊抗小鼠IgG、BeyoECL Plus及MTT试剂均购自碧云天动物药业公司, 牛小肠碱性磷酸酶购自TaKaRa公司, 质粒大量制备试剂盒Plasmid Maxi Kit购自Qiagen公司, 小鼠来源的IFI16抗体为Santa Cruz生物技术公司产品, 流式细胞仪分析用试剂Guava Nexin Reagent及Guava Cell Cycle Reagent购自Millipore公司, RPMI-1640细胞培养基购自北京赛默飞世尔公司, 新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

**1.1.2 细胞系、菌种和质粒** 人喉癌细胞系Hep-2购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞中心, 由本实验室保存和传代。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 由本实验室保存。pUCm-T质粒购自碧云天动物药业公司, 由本实验室保存。质粒pVR1012由美国Vical公司惠赠, 为含有CMV promoter/enhancer的真核表达质粒。

## 1.2 方法

**1.2.1 pVR1012-IFI16重组质粒的构建** Hep-2细胞用10 ng/mL IFN- $\gamma$ 处理48 h后, 消化收集细胞, 用Trizol试剂提取细胞总RNA, 取2  $\mu$ g总RNA用cDNA第一链合成试剂盒逆转录合成cDNA, 取2  $\mu$ L cDNA作为模板PCR扩增IFI16基因编码区。PCR扩增引物序列为: 上游引物: 5'-GGC GGA TCC ATG GGA AAA A-3', 下游引物: 5'-GGC GGA TCC CAG ATT TTA GAA GAA A-3'; PCR扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C预变性4 min后, 94  $^{\circ}$ C变性35 s, 54  $^{\circ}$ C退火35 s, 72  $^{\circ}$ C延伸2 min, 35个循环后, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。RT-PCR扩增产物纯化回收后克隆到pUCm-T载体中并进行测序, 经测序正确后用*Bam*H I酶从pUCm-T-IFI16重组载体中切出IFI16基因。纯化回收后将IFI16基因亚克隆到pVR1012质粒多克隆位点的*Bam*H I切点上, 用*Pst* I酶切筛选IFI16基因正向插入的pVR1012-IFI16重组质粒。IFI16基因正向插入pVR1012-IFI16重组质粒时, *Pst* I酶切重组质粒会产生7 173 bp和517 bp两条条带。

**1.2.2 细胞转染** 指数生长的Hep-2细胞接种于24孔培养板中, 每孔接种 $1 \times 10^4$ 细胞于0.5 mL RPMI-1640培养基中, 培养24 h后, 用lipofecter转染试剂按其

操作说明分别对Hep-2细胞进行mock转染(取0.5  $\mu$ L PBS代替质粒DNA)、pVR1012空载体转染(1  $\mu$ g/ $\mu$ L大量制备的pVR1012质粒DNA 0.5  $\mu$ L)、1 $\times$ pVR1012-IFI16重组质粒转染(1  $\mu$ g/ $\mu$ L大量制备的pVR1012-IFI16重组质粒DNA 0.5  $\mu$ L)和2 $\times$ pVR1012-IFI16重组质粒转染(1  $\mu$ g/ $\mu$ L大量制备的pVR1012-IFI16重组质粒DNA 1  $\mu$ L)。每次实验时每种转染分别转染3个复孔细胞, 每个实验分别独立重复进行3次。

**1.2.3 IFI16基因外来表达检测** 通过各种不同方式转染的Hep-2细胞, 转染后48 h消化收集细胞, 分别用半定量RT-PCR及Western blot检测pVR1012-IFI16重组质粒在Hep-2细胞中外来表达IFI16基因的情况。半定量RT-PCR检测时, 用Trizol试剂分别提取细胞总RNA并进行定量, 每种转染各取2  $\mu$ g细胞总RNA。用cDNA第一链合成试剂盒分别逆转录合成cDNA, 各取2  $\mu$ L cDNA用PCR技术扩增IFI16基因, 同时各取2  $\mu$ L cDNA用PCR技术扩增 $\beta$ -actin基因作为内参基因对照。IFI16基因引物序列: 上游引物: 5'-CCA AGA CTG AAG ACT GAA-3', 下游引物: 5'-TAG AAG AAA AAG TCT GGT GAA GTT TCC ATA CTT G-3';  $\beta$ -actin基因引物序列: 上游引物: 5'-GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT T-3', 下游引物: 5'-GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG-3'。PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳及溴化乙锭染色后, 在紫外灯下观察结果并拍照。Western blot检测时, 用RIPA裂解液分别制备细胞蛋白裂解液, 再用BCA蛋白浓度测定试剂盒分别测定各蛋白裂解液的蛋白浓度, 每种蛋白裂解液各取20  $\mu$ g进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后按湿转法将产物转印到PVDF膜上, PVDF膜用含5%脱脂牛奶的TBST液室温封闭2 h后, 加小鼠来源一抗(1:200稀释)37  $^{\circ}$ C孵育2 h, 用TBST液室温洗膜10 min $\times$ 3次后, 加HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1:5 000稀释)室温孵育1 h, TBST液洗膜后加BeyoECL Plus底物化学发光成像到X-胶片。

**1.2.4 细胞增殖分析** 本研究利用细胞生长曲线绘制法及MTT法, 分别进行细胞增殖分析。

(1)细胞生长曲线绘制法操作流程: 将指数生长期的Hep-2细胞接种于24孔培养板, 每孔接种 $1 \times 10^4$ 细胞于0.5 mL RPMI-1640培养基中培养过夜。第2天开始, 分别对Hep-2细胞进行各种不同方式的转染。从第3天起, 每种转染每天收集3个复孔的细胞用guava easyCyte 8HT流式细胞仪分别进行计数, 共

计数3天(第3天设定为day 1, 第4天为day 2, 第5天为day 3), 实验独立重复3次, 求出day 1~day 3每天每种转染细胞的细胞数平均值及标准差, 然后以计数天数作为横坐标(即day 0~day 3), 以对应每天的细胞数平均值作为纵坐标, 绘制细胞生长曲线图。

(2)MTT法操作流程: 各种不同方式转染的Hep-2细胞经24 h转染后, 消化收集细胞再分别接种于96孔细胞培养板, 每孔接种 $1 \times 10^3$ 细胞于100  $\mu$ L RPMI-1640培养基中继续培养48 h, 随后每孔细胞加入10  $\mu$ L MTT试剂, 作用4 h后加入100  $\mu$ L formazan溶解液, 继续作用4 h后用酶联免疫检测仪在570 nm波长处测定光吸收值(D), 每种转染测定3个复孔细胞。求出每种转染细胞的光吸收值平均值与标准差, 以mock转染细胞的光吸收值平均值为100%活细胞数目; 其它各种转染细胞的光吸收值平均值分别与mock转染细胞的光吸收值平均值相除, 求出其它各种转染细胞的相对活细胞数目。最后, 以相对活细胞数目为纵坐标, 以各种不同转染方式为横坐标进行作图。

1.2.5 细胞周期分析 各种不同方式转染的Hep-2细胞经48 h转染后, 消化收集细胞分别制备成0.5 mL细胞悬浮液, 各加入3 mL无水乙醇经混匀后在 $-20^\circ\text{C}$ 固定过夜。固定后离心收集细胞, 最后各加入500  $\mu$ L 1 $\times$ PBS将各种不同方式转染的细胞沉淀分别制备成细胞悬浮液。各种不同方式转染的细胞悬浮液各取100  $\mu$ L, 分别与100  $\mu$ L细胞周期分析用Guava Cell Cycle Reagent染色液混合, 避光染色30 min。染色结束后用guava easyCyte 8HT流式细胞仪, 运用其Cell Cycle软件, 对各种不同方式转染的细胞进行细胞周期分析。

1.2.6 细胞凋亡检测 各种不同方式转染的Hep-2细胞经48 h转染后, 消化收集细胞分别制备成1 mL细胞悬浮液。各种不同方式转染的细胞悬浮液各取100  $\mu$ L, 分别与100  $\mu$ L细胞凋亡分析用Guava Nexin Reagent染色液混合, 避光染色20 min。染色结束后用guava easyCyte 8HT流式细胞仪, 运用其Nexin软件, 对各种不同方式转染的细胞进行细胞凋亡分析。

## 2 结果

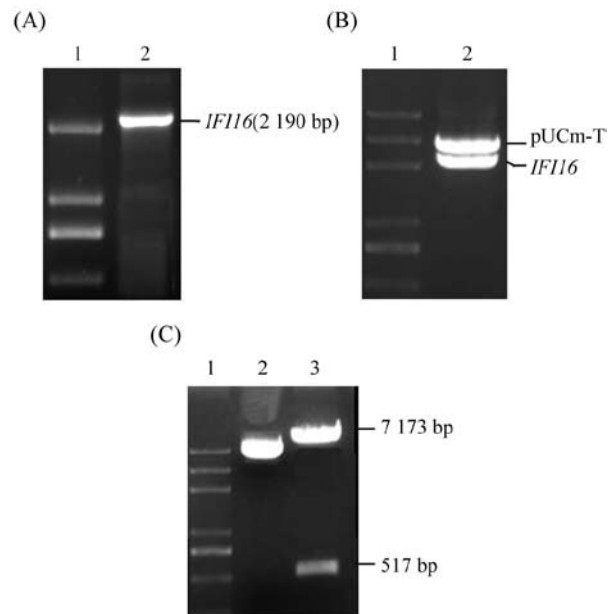
### 2.1 pVR1012-IFI16重组质粒的构建

用RT-PCR技术从干扰素- $\gamma$ 处理的Hep-2细胞中扩增得到一条符合预期大小(2 190 bp)的DNA条带(图1A), 将其纯化回收后克隆到pUCm-T载体并经测序证实该DNA条带就是IFI16基因。随后, 用BamH I

将IFI16基因从pUCm-T载体切出(图1B), 亚克隆到pVR1012质粒多克隆位点中的BamH I切点, 得到的重组质粒用Pst I酶切进行筛选, IFI16基因正向插入时, pVR1012-IFI16重组质粒用Pst I酶切会产生7 173 bp和517 bp两条条带。最后, 筛选得到IFI16基因正向插入的pVR1012-IFI16重组质粒(图1C)。

### 2.2 pVR1012-IFI16重组质粒在Hep-2细胞中的表达

用1倍(1 $\times$ )和2倍(2 $\times$ )量pVR1012-IFI16重组质粒分别转染Hep-2细胞48 h后, 半定量RT-PCR及Western blot分析结果发现, 1 $\times$ pVR1012-IFI16和2 $\times$ pVR1012-IFI16转染的Hep-2细胞, 其IFI16基因RT-PCR扩增条带及蛋白条带的亮度呈倍增关系且要明显高于对照细胞的条带亮度(图2A和图2B)。半定量RT-PCR及Western blot结果说明, 1 $\times$ pVR1012-IFI16和2 $\times$ pVR1012-IFI16转染Hep-2细



A: RT-PCR扩增得到IFI16基因; 泳道1: DL2 000 DNA marker; 泳道2: RT-PCR扩增产物IFI16基因; B: BamH I酶切pUCm-T-IFI16重组载体结果; 泳道1: Trans 2K plus DNA Marker; 泳道2: pUCm-T-IFI16重组载体BamH I酶切结果; C: Pst I酶切筛选得到的pVR1012-IFI16重组质粒; 泳道1: Trans 2K plus DNA Marker; 泳道2: pVR1012质粒Pst I酶切结果; 泳道3: pVR1012-IFI16重组质粒Pst I酶切结果。

A: RT-PCR amplification to produce IFI16 gene; lane 1: DL2 000 DNA marker; lane 2: RT-PCR amplification product IFI16 gene; B: pUCm-T-IFI16 recombinant vector digested with BamH I; lane 1: Trans 2K plus DNA Marker; lane 2: pUCm-T-IFI16 recombinant vector digested with BamH I; C: screening for pVR1012-IFI16 recombinant plasmid with Pst I digestion; lane 1: Trans 2K plus DNA Marker; lane 2: pVR1012 plasmid digested with Pst I; lane 3: pVR1012-IFI16 recombinant plasmid digested with Pst I.

图1 pVR1012-IFI16重组质粒的构建

Fig.1 Construction of pVR1012-IFI16 recombinant plasmid

胞, 其*IFI16*基因mRNA转录水平及蛋白表达水平呈倍增关系且明显高于对照细胞, 证明pVR1012-*IFI16*重组质粒能在Hep-2细胞中表达*IFI16*基因。

### 2.3 *IFI16*基因外来表达抑制Hep-2细胞增殖

流式细胞仪计数绘制细胞生长曲线结果发现, 从第2天起, 1×pVR1012-*IFI16*和2×pVR1012-*IFI16*重组质粒转染的Hep-2细胞生长开始变慢; 至第3天时, 1×pVR1012-*IFI16*和2×pVR1012-*IFI16*重组质粒转染Hep-2细胞, 其生长速度明显变慢, 与mock转染组及空载体转染对照组细胞相比差异显著( $P < 0.05$ , 图3A)。细胞生长曲线测定结果说明, *IFI16*基因外来表达能抑制Hep-2细胞的增殖。

MTT法测定结果显示, 1×pVR1012-*IFI16*和2×pVR1012-*IFI16*重组质粒分别转染48 h后, Hep-2细胞的相对活细胞数目显著降低, 且与重组质粒浓度呈递降关系, 与mock转染组及空载体转染对照组细胞相比差异显著( $P < 0.01$ , 图3B)。MTT法测定结果也说明, *IFI16*基因外来表达能抑制Hep-2细胞的增殖。

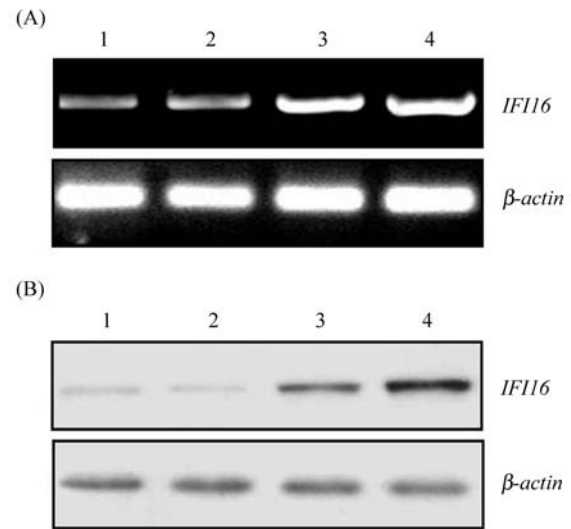
### 2.4 *IFI16*基因外来表达阻滞Hep-2细胞周期

流式细胞仪检测细胞周期结果显示, 与mock转染及空载体转染对照细胞相比, 1×及2×pVR1012-*IFI16*重组质粒分别转染48 h后, Hep-2细胞的亚G<sub>0</sub>期(sub-G<sub>0</sub>)细胞比例显著升高且呈递增关系(图4)。细胞周期检测结果说明, *IFI16*基因外来表达能阻滞

Hep-2细胞周期在亚G<sub>0</sub>期。

### 2.5 *IFI16*基因外来表达诱导Hep-2细胞凋亡

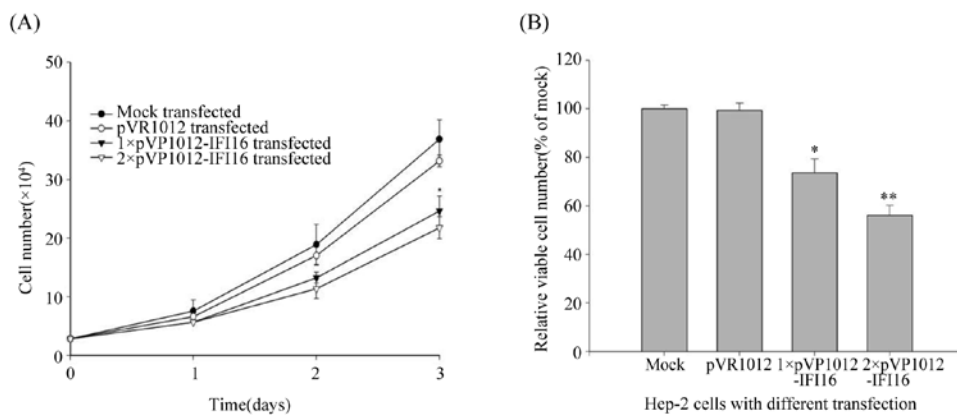
流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示, 与mock



A: 半定量RT-PCR分析结果; B: Western blot分析结果。泳道1: mock转染Hep-2细胞; 泳道2: pVR1012质粒转染Hep-2细胞; 泳道3: 1×pVR1012-*IFI16*重组质粒转染Hep-2细胞; 泳道4: 2×pVR1012-*IFI16*重组质粒转染Hep-2细胞。

A: semi-quantitative RT-PCR analysis result; B: Western blot analysis result. Lane 1: mock-transfected Hep-2 cells; lane 2: pVR1012 plasmid-transfected Hep-2 cells; lane 3: 1×pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid-transfected Hep-2 cells; Lane 4: 2×pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid-transfected Hep-2 cells.

图2 pVR1012-*IFI16*重组质粒在Hep-2细胞中的表达  
Fig.2 Expression of pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid in Hep-2 cells



A: 细胞生长曲线测定结果; B: MTT法测定结果。图中每个数据表示来自3次独立实验的细胞数平均值和标准差。\* $P < 0.05$ 和\*\* $P < 0.01$ 分别表示与相应mock转染组及空载体转染的对照组细胞相比具有统计意义。

A: cell growth curve assay result; B: MTT assay result. Each result was expressed as cell number mean values(means±SD) obtained from three independent experiments. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  indicate statistical significance as compared to the corresponding untreated group and pVR1012-transfected group, respectively.

图3 *IFI16*基因外来表达抑制Hep-2细胞增殖  
Fig.3 Ectopic expression of *IFI16* gene inhibited Hep-2 cells proliferation

转染组及空载体转染对照组细胞相比, 1×pVR1012-IF116和2×pVR1012-IF116重组质粒分别转染48 h后,

Hep-2细胞的凋亡细胞比例显著升高且呈递增关系(图5)。细胞凋亡检测结果说明, *IF116*基因外来表达

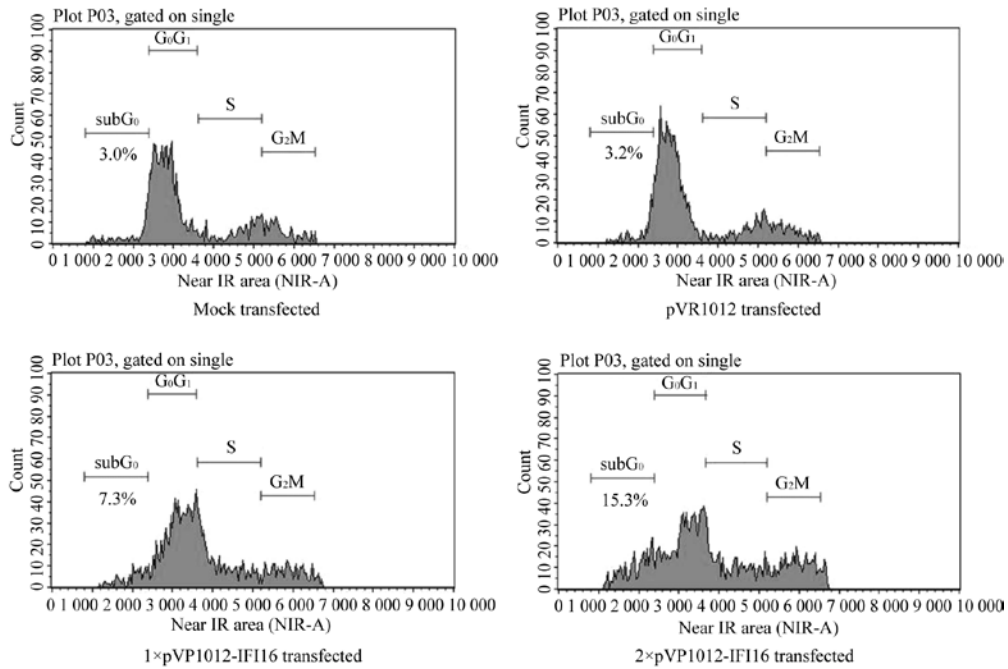


图4 *IF116*基因外来表达阻滞Hep-2细胞周期

Fig.4 Ectopic expression of *IF116* gene retarded cell cycle of Hep-2 cells

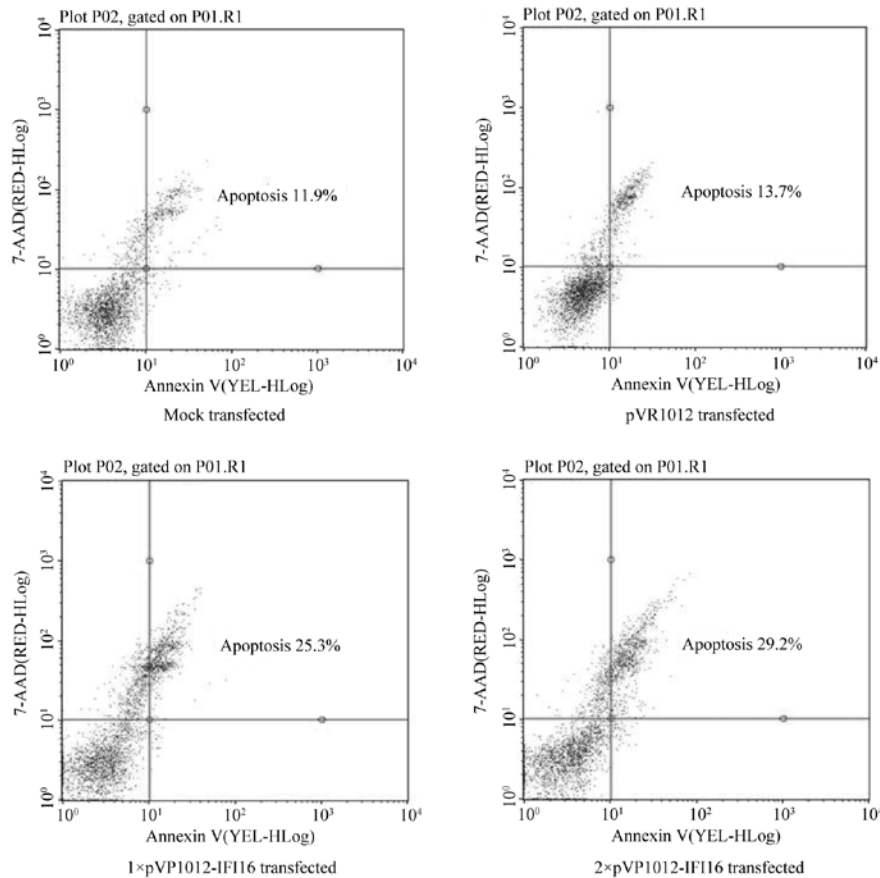


图5 *IF116*基因外来表达诱导Hep-2细胞凋亡

Fig.5 Ectopic expression of *IF116* gene induced Hep-2 cells apoptosis

能诱导Hep-2细胞发生凋亡。

### 3 讨论

喉癌等恶性肿瘤的治疗方法传统上有手术、放疗和化疗3种,前两种方法只对局限性肿瘤有效,而化学疗法则副作用太大,病人往往难以忍受。因此,近年来兴起的综合疗法倍受关注,以干扰素治疗肿瘤就是其中最重要的一种方法。干扰素抗肿瘤作用尤其以IFN- $\gamma$ 的抗癌作用为最强<sup>[1-3]</sup>。人喉癌细胞系Hep-2是常见的喉癌细胞,Hep-2细胞*p53*肿瘤抑制基因为野生型,但由于Hep-2细胞内P53蛋白水平很低,Hep-2细胞野生型*p53*基因处于失活状态。Hep-2细胞内还感染有人乳头瘤病毒HPV-18并表达其E6癌蛋白<sup>[11-12]</sup>。E6癌蛋白是P53蛋白降解时的一种辅酶,E6癌蛋白能通过启动细胞内的蛋白水解酶而降解P53蛋白,使细胞P53蛋白水平处于较低状态,野生型*p53*基因失活而引发细胞癌性病变<sup>[13-15]</sup>。有报道发现,*IFI16*基因的编码产物IFI16蛋白在细胞内外能与E6癌蛋白相结合,IFI16蛋白通过与E6癌蛋白结合拮抗E6癌蛋白的功能而起抗肿瘤作用<sup>[16]</sup>。近年来的研究报道证实,*IFI16*基因在头颈部肿瘤中起抗肿瘤作用<sup>[8-10]</sup>。

我们前期研究发现,Hep-2细胞内*IFI16*基因处于低表达状态,IFN- $\gamma$ 处理Hep-2细胞后能抑制Hep-2细胞增殖,并诱导其*IFI16*基因表达升高,但IFN- $\gamma$ 处理Hep-2细胞后,并不影响与*IFI16*基因同属一个家族的*MNDA*基因的表达<sup>[4]</sup>。根据他人的报道以及我们的研究发现,我们推测,*IFI16*基因在Hep-2细胞中起增殖抑制作用,IFN- $\gamma$ 抑制Hep-2细胞增殖可能是通过诱导*IFI16*基因表达而介导的。为了验证我们的推测,本文运用基因外来过表达技术,通过构建*IFI16*基因真核细胞表达载体,利用在Hep-2细胞中外来表达*IFI16*基因,研究探讨*IFI16*基因在Hep-2细胞中的作用。本文的研究结果显示,*IFI16*基因外来

表达能抑制Hep-2细胞增殖、阻滞Hep-2细胞周期在亚G<sub>0</sub>期并诱导Hep-2细胞发生凋亡,证明*IFI16*基因在Hep-2细胞中起增殖抑制作用。

本研究结果对于揭示IFN- $\gamma$ 抑制Hep-2细胞增殖的分子机制有重要作用,为我们进一步探讨*IFI16*基因参与IFN- $\gamma$ 抑制Hep-2细胞增殖的作用奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Gil Z, Fliss DM. Contemporary management of head and neck cancers. *Isr Med Assoc J* 2009; 11(5): 296-300.
- 2 曾洁萍, 余勤, 梁茂植, 段俊国. 干扰素抗肿瘤作用研究进展. *现代预防医学* 2008; 35(18): 3650-2.
- 3 朱颖慧, 朱兰才, 刘然义, 黄文林. 干扰素- $\gamma$ 治疗肿瘤的研究进展. *肿瘤学杂志* 2008; 14(1): 4-9.
- 4 陈建明, 赵菁, 葛莉伟. 干扰素- $\gamma$ 对喉癌Hep-2细胞增殖和凋亡的影响. *中国细胞生物学学报* 2011; 33(3): 258-62.
- 5 赵菁, 陈建明, 邱明, 应奇才. 干扰素诱导的IFI-200蛋白家族研究进展. *杭州师范大学学报(自然科学版)* 2009; 8(5): 375-80.
- 6 Choubey D, Deka R, Ho SM. Interferon-inducible IFI16 protein in human cancers and autoimmune diseases. *Front Biosci* 2008; 13: 598-608.
- 7 Ludlow LE, Johnstone RW, Clarke CJ. The HIN-200 family: More than interferon-inducible genes? *Experimental Cell Res* 2005; 308(1): 1-17.
- 8 Azzimonti B, Pagano M, Mondini M, de Andrea M, Valente G, Monga G, *et al.* Altered patterns of the interferon-inducible gene *IFI16* expression in head and neck squamous cell carcinoma: Immunohistochemical study including correlation with retinoblastoma protein, human papillomavirus infection and proliferation index. *Histopathology* 2004; 45(6): 560-72.
- 9 de Andrea M, Gioia D, Mondini M, Azzimonti B, Renò F, Pecorari G, *et al.* Effects of *IFI16* overexpression on the growth and doxorubicin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma-derived cell lines. *Head Neck* 2007; 29(9): 835-44.
- 10 Mazibrada J, de Andrea M, Rittà M, Borgogna C, Dell'eva R, Pfeffer U, *et al.* *In vivo* growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma by the interferon-inducible gene *IFI16*. *Cancer Lett* 2010; 287(1): 33-43.

- 11 Min BM, Baek JH, Shin KH, Gujulova CN, Cherrick HM, Park NH. Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30B(5): 338-45.
- 12 Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol* 2010; 17(6): 394-403.
- 13 Liu Y, Baleja JD. Structure and function of the papillomavirus E6 protein and its interacting proteins. *Front Biosci* 2008; 13: 121-34.
- 14 Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 2007; 98(10): 1505-11.
- 15 Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, *et al.* Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res* 2007; 67(22): 10686-93.
- 16 于 瑾, 赵蔚明, 齐 眉, 宋长芹, 赵 丽, 刘传聚, 等. 干扰素诱导蛋白IFI16与HPV16E6、E7蛋白相互作用的研究. *山东大学学报(医学版)* 2004; 42(5): 525-30.

## Influences of *IFI16* Gene Over-expression on Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells

Chen Jianming\*, Zhao Jing, Qiu Ming

(College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

**Abstract** *IFI16* gene amplified from RT-PCR was constructed into eukaryotic expression plasmid pVR1012 to obtain pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid, and then this recombinant plasmid was transfected into Hep-2 cells with Lipofecter transfection. After transfection, the ectopic expression of *IFI16* gene in Hep-2 cells was analyzed using semi-quantitative RT-PCR and Western blot methods, Hep-2 cells proliferation influenced by the ectopic expression of *IFI16* gene was determined using cell growth curve drawing method and MTT method, and Hep-2 cell cycle and apoptosis influenced by the ectopic expression of *IFI16* gene was analyzed using flow cytometry. Semi-quantitative RT-PCR result showed that the mRNA level of *IFI16* gene was noticeably increased in pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid transfected Hep-2 cells, and Western blot result also showed that the protein level of *IFI16* gene was obviously increased in pVR1012-*IFI16* transfected Hep-2 cells. It was found from cell growth curve assay that Hep-2 cells grew slower than control cells after one day of transfection with pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid, and the growth rate of Hep-2 cells was obviously slower than control cells when transfected with pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid for two days and statistically different to that of control cells ( $P<0.05$ ). MTT result showed that the relative viable cell number of Hep-2 cells was remarkably decreased after 48 h of transfection with pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid and significantly different to that of control cells ( $P<0.05$  and  $P<0.01$ ). Flow cytometry analysis disclosed that the ratios of sub- $G_0$  phase cells and apoptotic cells in Hep-2 cells transfected with pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid for 48 h were obviously increased comparing to that of control cells. The above results illustrated that the pVR1012-*IFI16* recombinant plasmid could ectopically express *IFI16* gene in Hep-2 cells and the ectopically expressed *IFI16* gene could inhibit Hep-2 cells proliferation, retard Hep-2 cells cycle in sub  $G_0$  and induce Hep-2 cells apoptosis.

**Key words** *IFI16* gene; Hep-2 cells; proliferation; cell cycle; apoptosis

---

Received: October 21, 2011 Accepted: December 5, 2011

This work was supported by the Qianjiang Talented Person Project of Zhejiang Province (No.2010R10062) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2090698)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-28933086, Fax: 86-571-28865333, E-mail: jianmingchen@hznu.edu.cn