

# 探究 Neil2 基因突变对宫颈癌细胞增殖影响及其机制讨论

李妍 王鹤 (通讯作者)

(广西医科大学附属肿瘤医院妇科)

**【摘要】**目的：研究Neil2基因突变对宫颈癌细胞增殖的影响与其机制。方法：构建表达NEIL2基因的野生型和突变型载体，构建Neil2基因空载体、野生型和突变型SiHa细胞株。CCK8实验检测不同基因型SiHa细胞的增殖能力，绘制增殖曲线。结果：同对照小组对比，基因突变类-mut组增速最快，显著超过其余组；Neil2基因野生类-wt组增速放缓，差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。结论：Neil2基因突变可促进宫颈癌细胞的增殖。

**【关键词】** Neil2；基因突变；宫颈癌细胞增殖；cck8；机制分析

Exploring the Effect of Neil2 Gene Mutation on Cervical Cancer Cell Proliferation and Its Mechanism Discussion

Li Yan and Wang He, corresponding author

Gynecology Department of Guangxi Medical University Affiliated Cancer Hospital

**[Abstract]** Objective: To investigate the effect and mechanism of Neil2 gene mutations on the proliferation of cervical cancer cells. Method: Construct wild-type and mutant vectors expressing the NEIL2 gene, and construct SiHa cell lines with empty, wild-type, and mutant versions of the Neil2 gene. The CCK8 experiment detected the proliferation ability of SiHa cells with different genotypes and plotted the proliferation curve. Result: Compared with the control group, the gene mutation type mut group had the fastest growth rate, significantly exceeding the other groups; The growth rate of the Neil2 gene in the wild-type group slowed down, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Conclusion: The Neil2 gene mutation can promote the proliferation of cervical cancer cells.

**[Key words]** Neil2; Genetic mutations; Cervical cancer cell proliferation; Cck8; mechanism analysis

子宫颈癌(cervical cancer)是常见的妇科恶性肿瘤之一，发病率在女性恶性肿瘤中居第二位，仅次于乳腺癌。每年全球有大约50万新发宫颈癌病例，超过85%的宫颈癌发生在中国等发展中国家[1]。患者阴道微生态紊乱、性行为与生殖状况、生活习惯、自身免疫状态以及遗传易感性等因素都与宫颈癌发生和进展相关[2]。基因的SNPs和特定的SNPs组合是与肿瘤遗传易感性相关的重要方面[3]。NEIL2是核酸内切酶Ⅷ家族中的一员，其作为DNA修复酶的编码基因，主要参与了哺乳动物细胞中的碱基切除修复(base excision repair, BER)这一通路，以去除胞嘧啶氧化产物。目前已有文献证实：NEIL2基因多态性导致其高表达与中国人宫颈癌风险有关[4]。本研究将通过实验分析NEIL2基因多态性对宫颈癌细胞增殖影响，以此为宫颈癌的治疗提供新的思路。

## 1.材料与方法

### 1.1 实验材料

siha细胞：人宫颈鳞癌细胞，购于美国国立卫生研究院；DMEM培养基，美国Gibco公司；胎牛血清(FBS)，美国Gibco公司；0.25%胰酶，美国Gibco公司；CCK8试剂，日本同仁公司

### 1.2 Neil2 基因慢病毒构建和转染

构建表达NEIL2基因的野生型载体和突变型载体，选择该基因的两个SNP位点rs8191613和rs8191664的常见形式做突变，即rs8191613(G>A, R103Q)、rs8191664(G>T, R257L)。构建基因空载体Neil2-NC、基因野生型Neil2-wt及基因突变型Neil2-mut等细胞株。将对数生长期的SiHa细胞接种于24孔板中，接种细胞数为 $1 \times 10^5$ 个细胞每孔，将细胞放置于37℃，5%CO<sub>2</sub>的培养箱中继续培养。待细胞融合度达70%~80%时开始转染病毒，吸出旧培养基，用PBS缓冲液洗2遍，加入适量新鲜培养基。按照MOI为10、20、30加入慢病毒、A液、P液进行实验。病毒体积=细胞数目×MOI/病毒滴度。转染12~16h后换液，继续培养72h，荧光倒置显微镜下观察转染效率。

### 1.3 CCK8 实验

将 cell Counting Kit-8 (CCK8) 试剂与完全培养基按照 1:9 混合后检测细胞增殖, 取各组生长状况良好的细胞, 消化离心, 用培养基重悬各组细胞形成单细胞悬液。用细胞计数仪检测各组细胞浓度, 将  $2 \times 10^3$  细胞接种于 96 孔板里, 每孔接种 100 微升, 在每孔内加入 10 微升 CCK8 试剂, 在种板后每隔 24h 使用酶标仪检测各组细胞吸光度 OD 值, 连续测用 5d 后 2 用 GrahPad Prism 8 绘制细胞增殖曲线。

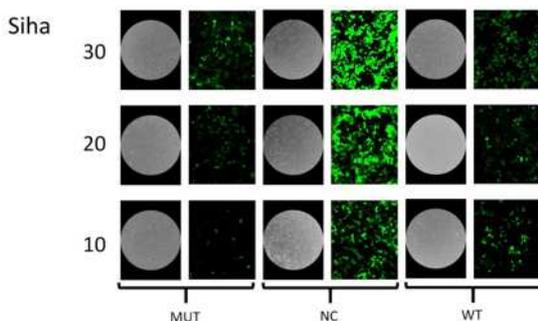
### 1.4 结果统计

使用 SPSS 18.0 软件完成数据解读, 试验成果通过  $x \pm s$  表达, 结果使用配伍设计方差分析进行解读 (ANOVA),  $P < 0.05$  有差别则表明具备统计学意义。

## 2. 结果

### 2.1 慢病毒转染结果

转染慢病毒 72h 后, 在荧光显微镜下观察各组细胞, 可见转染了病毒的细胞胞浆发出绿色荧光 (如图 1)。结果表明慢病毒能够高效感染 siha 细胞, 其中当 moi 等于 10 时, 转染效果一般, 当 moi 等于 30 时, 荧光过亮, 而达到 20 时转染效率最好。因此确定病毒感染的最佳 moi 值为 20。加入 1ug/ul 嘌呤霉素筛选后荧光更亮, 可用于后续实验。

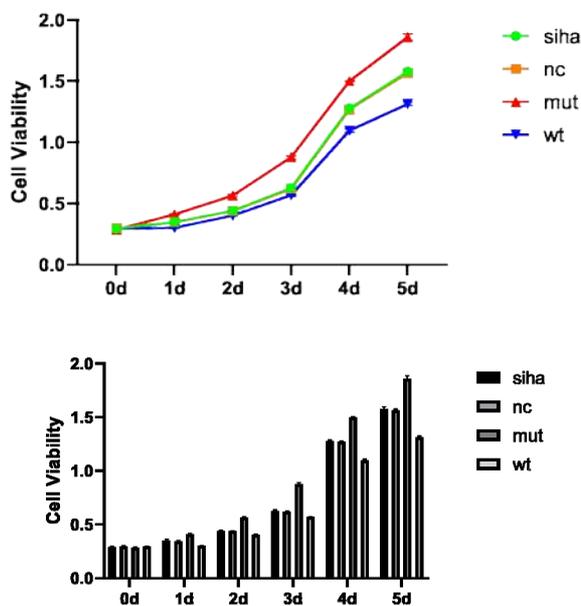


图片 1 病毒转染浓度探索

### 2.2 各组细胞增殖情况

OD 值 (optical density, 吸光度) 是指某一物质在某一个特定波长下的吸光度。CCK-8 试剂盒中的  $NAD^+$  可将活细胞氧化还原成为水溶性的黄色甲瓞产物 (Formazan)。活细胞数量越多, 试剂盒反应产生的 Formazan 就越多, 试剂液体颜色也会越深, 可以认为生成的甲瓞物的颜色的深浅与活细胞的数量成正比关系。因此可以利用这一特性直接进行

细胞增殖分析。将细胞分为四组: siha、siha-nc 组、Neil2-mut/siha 组、Neil2-wt/siha 组。各组细胞在各时间点的吸光度见如图 2 所示。在 0h 时, 各组细胞的 OD 值差异无统计学意义, 随着时间增加, 各组细胞的 OD 值均有增加, 其中基因空载型 siha-NC 组和 siha 细胞相比, 差异无统计学意义, 因此我们可以认为两组细胞增殖维持一致。而 Neil2-mut/siha 组的 OD 值明显高于其他组, Neil2-wt/siha 组的 OD 值最低。说明 Neil2 基因突变可促进 siha 细胞的增殖。



图片 2 CCK8 结果对比图

## 3. 讨论

基因多态性是指同一基因座位上存在多个等位基因或对等位基因的现象。基因多态性主要源自单核苷酸多态性 (SNP)。SNP 是指在基因组序列中, 某一位置上的单个核苷酸发生替换的现象。基因多态性在一定程度上解释了不同个体对疾病的易感性差异、对药物反应的差异性等。因此, 研究基因多态性对于疾病的预防、诊断和治疗都有重要意义 [5, 6]。近年来研究发现, 基因多态性与宫颈癌的发生、发展及预后存在一定的相关性。一些与宫颈癌相关的基因, 如 p53、p16、Fas 等基因的多态位点已被证实与宫颈癌易感性相关。此外, 一些涉及癌症代谢的酶如 GSTM1、CYP2E1 等的基因多态性也被报道与宫颈癌风险增加有关。总体来说, 基因多态性可通过影响宫颈癌的发生和进展来实现对宫颈

癌的预测[7, 8]。Neil2

是一种 DNA 糖基化酶, 参与了碱基切除修复途径来维持基因组稳定性。已有文献证明: Neil2 基因的突变与实体恶性肿瘤的易感性显著相关, 如口腔癌、胃癌、宫颈癌等[9-11]。

在本研究中, 我们通过慢病毒转染, 构建 NEIL2 基因空载型、野生型和突变型 SiHa 细胞株, 用 CCK8 试剂检测不同细胞株的生长增殖情况, 通过在同一时间内对比其他组, 我们发现 NEIL2-mut/siha 细胞组细胞增殖速度最快, 证明了 Neil2 基因与宫颈癌的易感性相关, 这可能是由于蛋白表达水平或者功能结构域的改变引起的 Neil2 的修复活性改

变[9]。在宫颈癌组织中 NEIL2 mRNA 和蛋白表达水平显著低于正常宫颈组织。此外, NEIL2 的低表达与宫颈癌淋巴结转移相关。在宫颈癌细胞系中过表达 NEIL2 可以抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡。因此, NEIL2 可能是宫颈癌的一个重要肿瘤抑制基因, 是潜在的宫颈癌生物标志物和治疗靶点[12, 13]。然而 Neil2 的启动子区域的遗传多态性与宫颈癌之间的关系需要进行下一步研究。

最后本研究也有一定的局限性, 需要通过更多实验技术如流式周期检测、transwell 迁徙、侵袭等进一步探明其 Neil2 的 snp 位点与宫颈癌之间的关系。这部分将有待今后更加深入的研究探讨。

## References:

- [1] Zhao, F.H., et al., A multi-center survey of age of sexual debut and sexual behavior in Chinese women; suggestions for optimal age of human papillomavirus vaccination in China. *Cancer Epidemiol*, 2012. 36 (4): p. 384-90.
- [2] Brown, M.A. and P.J. Leo, Genetic susceptibility to cervical neoplasia. *Papillomavirus Res*, 2019. 7: p. 132-134.
- [3] Fortini, P., et al., The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*, 2003. 85 (11): p. 1053-71.
- [4] Canugovi, C., et al., Endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) promotes short-term spatial memory retention and protects from ischemic stroke-induced brain dysfunction and death in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109 (37): p. 14948-53.
- [5] Lee, S., et al., Rare-variant association analysis: study designs and statistical tests. *Am J Hum Genet*, 2014. 95 (1): p. 5-23.
- [6] Bacanu, S.A., B. Devlin and K. Roeder, The power of genomic control. *Am J Hum Genet*, 2000. 66 (6): p. 1933-44.
- [7] van Duin, M., et al., Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal of general virology*, 2000. 81 (2): p. 317-325.
- [8] Chen, D., et al., Genome-wide association study of susceptibility loci for cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2013. 105 (9): p. 624-33.
- [9] Ye, F., et al., Cervical carcinoma risk associate with genetic polymorphisms of NEIL2 gene in Chinese population and its significance as predictive biomarker. *Sci Rep*, 2020. 10 (1): p. 5136.
- [10] Zhai, X., et al., Functional variants of the NEIL1 and NEIL2 genes and risk and progression of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Clin Cancer Res*, 2008. 14 (13): p. 4345-52.
- [11] Goto, M., et al., Three novel NEIL1 promoter polymorphisms in gastric cancer patients. *World J Gastrointest Oncol*, 2010. 2 (2): p. 117-20.
- [12] Sarker, A.H., et al., NEIL2 protects against oxidative DNA damage induced by sidestream smoke in human cells. *PLoS One*, 2014. 9 (3): p. e90261.
- [13] Chakraborty, A., et al., Neil2-null Mice Accumulate Oxidized DNA Bases in the Transcriptionally Active Sequences of the Genome and Are Susceptible to Innate Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 2015. 290 (41): p. 24636-24648.