

JAK3 蛋白在鼻咽癌细胞中参与 STAT 活化并受 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 调控*

谭运年 陶永光 宋鑫 唐敏 艾米丹 曹亚**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为了探讨在鼻咽癌细胞 (NPC) 中是否存在 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 (LMP1) /JAK3/STAT 信号传导途径, 首先采用 RT-PCR 方法对 NPC JAK 家族 4 种成员检测, 发现在两株鼻咽癌细胞株 CNE1 和 HNE2 中该家族 4 种成员均有表达. 选择最有可能与 LMP1 相互作用的 JAK 家族成员 JAK3 作为我们的研究对象. 利用已建立的一株受四环素衍生物强力霉素 (doxycycline, Dox) 调控的 LMP1 表达的鼻咽癌细胞系 (Tet-on-LMP1 HNE2), 诱导 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞 LMP1 动态表达, 蛋白质印迹发现 JAK3 的表达方式呈剂量和时间依赖性. 采用瞬间转染方法将 STAT 报告基因质粒 (GRR-Luc) 转染入 pTet-on-LMP1 HNE2 细胞中, 不同剂量的 Dox 促使 LMP1 的表达可以激活 STAT 报告基因活性, 在 0.06mg/L Dox 诱导 36 h 时, STAT 活性最高. 在该条件下, 加入 3 μ mol/L JAK3 特异性抑制剂 WHI-P131 时, 可抑制 STAT 的活性. 结果表明: JAK3 的表达在 NPC 细胞中受 LMP1 的调控, LMP1 可以通过调控 JAK3 的表达参与 STAT 的活化. 在鼻咽癌细胞中存在 LMP1/JAK3/STAT 信号途径并可能在其发生发展过程中起重要作用.

关键词 EB 病毒潜伏膜蛋白 1, 鼻咽癌, 潜伏膜蛋白 1, JAK3, STAT

学科分类号 R734

EB 病毒为一种环境致癌因素, 目前的研究发现其致癌谱越来越广, 除与人类的伯基特淋巴瘤、霍杰金氏淋巴瘤、鼻咽癌密切相关外, 还与 T 淋巴瘤、NK 细胞肿瘤、HIV 感染或其他免疫抑制疾患有关的 B 淋巴瘤和腮腺的上皮瘤有关, 最近相继在宫颈癌、肺癌、胃癌、平滑肌瘤、前列腺及乳腺的部分恶性肿瘤中发现有 EB 病毒存在^[1,2].

LMP1 是 EB 病毒编码的一种重要膜结合蛋白, 是已经被肯定的具有致癌作用的病毒蛋白, 其结构由三部分组成: 含有 20 个氨基酸残基的无明显信号肽特点的亲水性 N 端; 6 个由 α 螺旋和以 U 型转角构成的间隔区组成的穿膜区; 带有 200 个氨基酸残基的 C 端. C 端含有 2 个功能结构域: C 端活化区域 1 (carboxy-terminal activating region 1, CTAR1) 和 C 端活化区域 2 (CTAR2). CTAR1 靠近胞膜, CTAR2 位于 C 端的远端 379~384 位氨基酸. CTAR1 区有 PXQXT/S 基序能与肿瘤坏死因子相关因子 (tumor necrosis factor receptor associated factors, TRAFs) 结合激活 NF- κ B; CTAR2 区有 YYD 基序能与肿瘤坏死因子受体死亡域 (tumor necrosis factor receptor associated death domain, TRADD) 结合激活 NF- κ B、JNK-1 和 AP-1.

我们以往的研究发现, 在鼻咽癌中, LMP1 通过 CTAR1、CTAR2 介导激活 NF- κ B 和 AP-1 介导的信号传导途径, 并且在激活的 NF- κ B 和 AP-1 两条信号通路之间存在信号交流, 从而介导了 LMP1 的多种生物学效应, 在鼻咽癌变中起重要作用^[3,4].

新近的工作认为在经典的 CTAR1 和 CTAR2 之间存在一个新的功能结构区 CTAR3, 在 B 细胞中的研究认为, 该区与 JAK3/STAT 信号途径相关^[5]. 但随后的研究认为, 该区与 JAK3 的关系并不明确. 尽管如此, 仍不排除在其他 LMP1 和 CD40 高表达的细胞中及 NPC 中^[6,7], 可能存在这样一条途径. 且目前认为 LMP1 是 CD40 的模拟分子, 而 CD40 可以激活启动 JAK3/STAT 信号通路^[8].

JAK 家族有 4 种成员 JAK1、JAK2、JAK3、TYK2, 为新发现的胞浆内激酶. 细胞因子主要通

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1998051201)、国家自然科学基金 (30000087, 30100005) 和国家自然科学基金杰出青年基金 (39525022) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805448, Fax: 0731-4470589

E-mail: Ycao98@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2002-12-08, 接受日期: 2003-01-26

过该家族成员的磷酸化导致 STAT 家族磷酸化。活化的 STAT 形成二聚体进入细胞核, 启动其下游相关基因的表达。JAK3 是一种组织特异性表达的蛋白质。在 B 细胞中的研究发现 JAK 家族的 4 个成员中仅 JAK3 与 CTAR3 起作用。

在 NPC 中是否有 JAK3 表达, 如果 JAK3 没有表达, 其他的 JAK 家族成员是否会与 LMP1 起作用? 因此, 我们首先利用 RT-PCR 的方法检测了 NPC 两株细胞系中 4 种 JAK 家族成员的表达情况, 然后选择 JAK3 作为我们的研究对象。利用先前已建立的一株能够受四环素衍生物强力霉素 (doxycycline, Dox) 诱导表达的 NPC 细胞系 Tet-on-LMP1 HNE2, 探讨在 NPC 中 LMP1 通过调节 JAK3 的表达与活性从而激活 STAT, 启动下游相关基因的信号传导机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒: GRR5-Luc 报告基因为 5 个重复拷贝的 FcγR1 γ 干扰素激活序列, 插入胸苷嘧啶激酶启动子上游于 pBL-Luc 载体构建而成^[9,10], 由 Brennan 博士惠赠。pRSVβ-gal 报道质粒由 Perkins 惠赠。将质粒按常规方法转化大肠杆菌 DH5α, 纯化质粒酶切鉴定后, 测定其浓度置 -20℃ 保存备用。

1.1.2 引物: 上海博亚生物工程公司合成。Primer3 软件均跨内含子设计。Jak1 5' tgtaaggggatggactatttgg 3', 5' tcccagcatttctcataagtt 3'; Jak2 5' agaacctggtgaaagtccata 3', 5' cccttatttgatccactcgaag 3'; Jak3 5' cagagccccattttctggtta 3', 5' aggacaggagtggtgtttg 3'; Tyk2 5' actacatccaccgagacctagc 3', 5' gtatgaggttctcgaaggttg 3'。扩增片段长度分别为 437、350、406、447 bp。

1.1.3 细胞系: NPC 细胞系 HNE2 为中南大学湘雅医学院肿瘤研究所建立的 EB 病毒阴性的低分化鳞癌细胞系, CNE1 细胞系为中国医学科学院肿瘤研究所建立的 EB 病毒阴性的高分化鳞癌细胞系。PCR 进一步证实为阴性。经两轮稳定转染, 将四环素基因调控系统导入 HNE2, 构建 LMP1 受 Dox 诱导表达的 NPC 细胞系 Tet-on-LMP1 HNE2。细胞培养液为含 15% 小牛血清的 RPMI1640, 37℃, 5% CO₂, 并维持 200 mg/L G418 和 50 mg/L 潮霉素药物筛选浓度下进行培养。在该细胞系中, LMP1 能很好地被诱

导表达, 随着 Dox 浓度的增加, LMP1 呈现相应的表达增加^[11]。

1.1.4 抗体: 微管蛋白 α-tubulin (B-7, SC-5286)、JAK3 (C-217, SC-513)、抗兔 IgG-HRP (SC-2004)、抗鼠 IgG-HRP (2005)、抗羊 IgG-HRP (SC-2020) 均购自 Santa Cruz 公司, LMP1 (CS1-4, M0897) 购自 DAKO 公司。

1.1.5 JAK3 抑制剂 WHI-P131 (CALBIOCHEM) 为美国 NIH 王吉明博士惠赠。能够竞争结合 JAK3 的 ATP 结合位点, 从而抑制其活性。

1.1.6 主要试剂: RNA 提取试剂、DNA 聚合酶、逆转录酶 (AMV)、dNTP、oligo dT (15~17) 购自美国生命技术公司 (GIBCOBRL); 转染试剂、质粒抽提试剂盒均购自 Qiagen 公司; PCR 分子质量标准 (MG0781)、小牛血清购自华美生物工程公司; 0.45 μm 硝酸纤维素膜购自 Schleicher & Schuell 公司; BCA 蛋白质测定试剂, 化学发光试剂购自 Pierce Chemical Co. Rockford 公司; 荧光素酶报告基因测定试剂、β-gal 酶检测试剂购自 Promega 公司; 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司; RPMI1640 培养基、钒酸钠购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 JAK 家族在 NPC 细胞系中的表达: 提取 HNE2 与 CNE1 细胞中的 mRNA, 按《分子克隆》的方法设计 RT-PCR 体系。用未转录的总 RNA 做对照, 跨内含子设计引物并结合片段大小排除从基因组中的扩增。

1.2.2 Dox 处理 Tet-on LMP1 HNE2 细胞: 取对数生长期的 Tet-on LMP1 HNE2 细胞, 用含 0.02% EDTA 和 0.25% 胰酶消化计数, 细胞密度为 10⁵/ml 接种于培养瓶中。贴壁生长后, 分别加入 0, 0.006, 0.06, 0.6 和 6 mg/L Dox 诱导处理 24 h。选择 0.6 mg/L 的 Dox 剂量处理处于对数生长期的细胞 0, 12, 24, 36, 48 h。

1.2.3 蛋白质的提取和浓度测定: 取上述各组已加 Dox 的 Tet-on LMP1 HNE2 细胞, 用 1×PBS 洗 3~4 次后, 细胞裂解液 (radioimmunoprecipitation buffer) RIPA (50 mmol/L Tris · HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 1×蛋白酶抑制剂, 1 mmol/L 钒酸钠) 冰上裂解 30~60 min。13 000 r/min 离心去细胞碎片, 留含全蛋白质的上清液。用 BCA 试剂测定蛋白质浓度。

1.2.4 蛋白质印迹分析:取各组细胞中 50 μg 总蛋白在不连续胶中进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉加 PBST 在室温下封闭 1~2 h, 加入单抗, 孵育 1 h, 洗膜, 加入相应 IgG-HRP 二抗, 孵育 1 h. ECL 化学发光法检测. 以 α -tubulin 作为参照.

1.2.5 脂质体介导的瞬间转染:按照说明, 转染前 24 h 将 Tet-on LMP1 HNE2 细胞置于 24 孔细胞培养板培养, 待细胞生长至 50%~80% 融合度时弃培养基, 在 Eppendorf 管加入 0.9 μg GRR5-luc 和 0.1 μg pRSV β -gal 报道质粒, 补加无血清培养基至 60 μl , 加入 5 μl 脂质体室温下静置 5~10 min 后, 再添加完全培养基 350 μl 混合, 立即加入到 24 孔板中, 置 5% CO_2 培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 h 后, 用 PBS 洗一次, 再加入完全培养基 (含 15% 小牛血清的 RPMI1640), 用不同浓度 Dox 处理继续培养 36 h, 提取蛋白质用于报告基因检测.

1.2.6 STAT、 β -gal 报告基因活性检测:细胞瞬间转染 36 h 后, 用 1 $\times$ PBS 洗一次, 每孔加入 1 $\times$ 细胞裂解液 (RLB) 100 μl , 在室温下作用 30 min, 用细胞刮子刮下裂解物置于 Eppendorf 管, 12 000 g 离心 20 s. 收集上清液. 取 20 μl 上清加入 100 μl 荧光素酶报告基因测定试剂, 迅速推入单光子检测仪, 延迟 10 s, 测定 30 s 间隔萤火虫荧光酶相对活性值, 即 STAT 的相对活性.

取 20 μl 上清液加入 30 μl 1 $\times$ RLB 后, 再加入 50 μl 2 $\times$ β -gal 测定试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h, 加入 150 μl 碳酸钠终止反应, 在 ELISA 酶标仪上测 420 nm 吸光度值. 检测 β -gal 的活性, 以此校正 STAT 活性.

1.2.7 JAK3 抑制剂 WHI-P131 处理 Tet-on LMP1 HNE2 细胞并检测 STAT 活性:按文献 [12] 介绍的剂量在转染报告基因后采用 0.06 mg/L Dox 诱导, 同时分别加入 JAK3 抑制剂 WHI-P131 1 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$, 以 JAK3 抑制剂 WHI-P131 的溶剂 DMSO 和不加抑制剂做对照, 孵育 36 h, 检测 STAT 活性.

2 结 果

2.1 JAK 家族 4 种成员均有表达

JAK1、JAK2、JAK3、TYK2 RT-PCR 扩增片段长度分别为 437、350、406、447 bp (图 1).

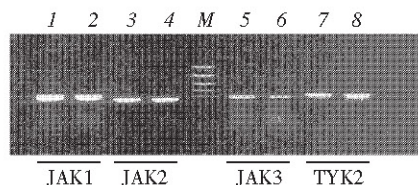


Fig. 1 Agarose electrophoresis analysis of RT-PCR products of four JAK family members JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2
1, 3, 5, 7; HEN2; 2, 4, 6, 8; CNE1; M; molecular mass marker.

2.2 JAK3 的表达呈剂量和时间依赖性

以四环素及其衍生物 Dox 诱导下的 Tet-on LMP1 HNE2 细胞为材料, 采用蛋白质印迹 (Western blot) 证实 LMP1 能否诱导 JAK3 表达. 结果发现, Tet-on LMP1 HNE2 细胞经不同浓度的 Dox (0、0.006、0.06、0.6 和 6 mg/L) 诱导 24 h 后 JAK3 均可表达, 并随 Dox 所诱导的 LMP1 的增加而增加. 选择 0.6 mg/L Dox 诱导 0、12、24、36、48 h, 发现 JAK3 的表达在 24 h 达到最高, 然后逐渐下降. 这表明 LMP1 在鼻咽癌细胞系中可诱导 JAK3 表达, 并呈剂量和时间依赖性诱导效应 (图 2 和图 3).

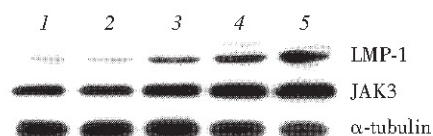


Fig. 2 Western blotting analysis of LMP1 and JAK3 expression induced by treatment with different concentrations of Dox for 24 h in Tet-on LMP1 HNE2 cell line
1; 0 mg/L; 2; 0.006 mg/L; 3; 0.06 mg/L; 4; 0.6 mg/L; 5; 6 mg/L.

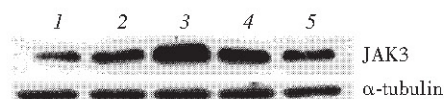


Fig. 3 Western blot analysis of JAK3 expression induced by treatment with 0.6 mg/L Dox for 0, 12, 24, 36, 48 h in Tet-on LMP1 HNE2 cell line
1; 0 h; 2; 12 h; 3; 24 h; 4; 36 h; 5; 48 h.

2.3 LMP1 激活 STAT 报告基因的活性

在 Tet-on LMP1 HNE2 细胞中转染报告基因,并用不同浓度的 Dox (0、0.006、0.06、0.6 和 6 mg/L) 诱导 36 h 后,检测 STAT 的报告基因活性,用 β -gal 校正,结果发现 STAT 报告基因活性随 Dox 浓度的增加而增加,在 0.06 mg/L 时 STAT 活性最高,随后下降 (图 4)。

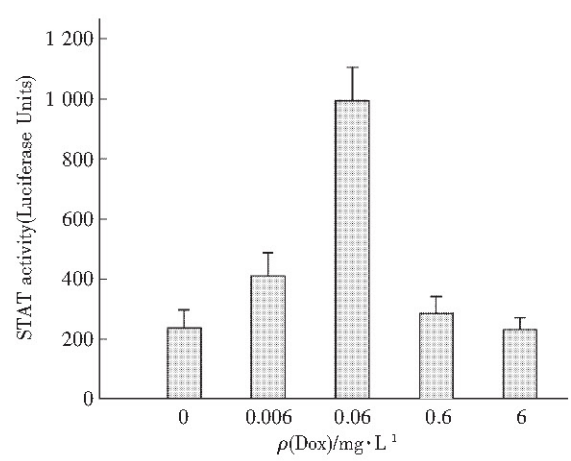


Fig. 4 GRR5-luc reporter gene activity was detected after Tet-on LMP1 HNE2 was induced 36 h by different concentration Dox

2.4 WHI-P131 抑制 STAT 报告基因活性

不加任何抑制剂的对照组和加 JAK3 抑制剂 WHI-P131 的溶剂 DMSO,对 STAT 活性无影响,而抑制剂能够抑制 STAT 的活性,3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度比 1 $\mu\text{mol/L}$ 效果更为明显.表明 JAK3 参与了 STAT 的激活 (图 5)。

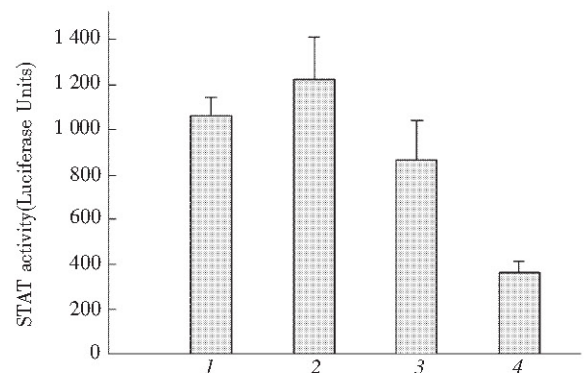


Fig. 5 JAK3 inhibitor | WHI-P131 can inhibit GRR5-luc reporter gene activity
1: control; 2: DMSO; 3: JAK3 inhibitor | WHI-P131 1 $\mu\text{mol/L}$;
4: JAK3 inhibitor | WHI-P131 3 $\mu\text{mol/L}$.

3 讨 论

JAK/STAT 信号途径是细胞因子作用的重要途径^[13,14].近年的研究发现,细胞因子与其相应受体结合启动其下游 JAK/STAT 信号,参与调控与细胞增殖、分化和凋亡相关的多种基因表达,如细胞周期素 D1 (cyclin D1)、Bcl-XL、血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等^[15~17].在多种肿瘤细胞中发现有 STAT1、3、5 的活化。

LMP1 作为一种致癌蛋白目前被认为是一种不需要配体起作用的 CD40 模拟分子,其自身聚集即可启动其下游信号传导^[8].LMP1 能够在体外转化细胞.最近对 EB 病毒在多种肿瘤中分布的免疫组化研究结果表明,EB 病毒有可能在癌变早期起作用,如在增生和不典型增生阶段都有 EB 病毒的检出,从而推测 EB 病毒可能在这些阶段起促进作用^[2].对其致癌机制研究发现,EB 病毒 LMP1 可以通过其 C 端结构活化域 CTAR1、CTAR2 激活 NF- κ B、AP-1 信号途径参与肿瘤的发生与发展.但 LMP1 C 端除活化域 CTAR1、CTAR2 外,还有约 100 多个氨基酸并未见有功能的报道.在 B 细胞中的研究认为 LMP1 可以模拟 CD40 起作用,而 JAK3/STAT 信号途径在 CD40 的信号传导中起重要的作用.通过对 CD40 和 LMP1 胞浆段氨基酸的比较发现,除 CTAR1、CTAR2 一致的共有序列外,LMP1 还有另外一个富含脯氨酸序列 PXXPPX Box1,紧邻的 Box2 可能与 Box1 辅助激活有关,并命名该结构为 CTAR3.在 B 细胞和 293 细胞中的研究认为 LMP1 可以通过该区激活 JAK3,而不是 JAK 家族其他成员.然后进一步活化 STAT^[5].而 Higuchi 等^[6]研究却认为 LMP1 的 CTAR3 区与 JAK3 的关系不明确.但并不排除在 EB 病毒相关的其他肿瘤细胞中 LMP1 通过 JAK3 起作用,尤其是在何杰金氏等一些 LMP1 和 CD40 高表达的与 EB 病毒相关疾病中.JAK3 是一种组织特异性表达蛋白,主要在活化的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞中表达,新近发现在肝癌细胞、乳腺癌组织、血管平滑肌、内皮细胞中有表达^[18].尽管如此,胡利富^[7]也推测在 NPC 细胞中 LMP1 有可能通过 JAK3 起作用.免疫组织化学研究发现在 NPC 细胞中有 STAT1、3、5 的活化表达,而且在 LMP1 启动子区存在 STAT 的结合位点,并提出可能存在一个反馈通路的假设^[19].

因此如果在 NPC 中存在 LMP1/JAK3/STAT 信号途径, 在 NPC 细胞中首先必须有 JAK3 的表达, 如果 JAK3 不参与, 是否有其他的 JAK 家族成员参与? 我们首先利用 RT-PCR 方法对 JAK 家族 4 种成员的表达进行了检测. 发现 JAK 家族的 4 种成员在 NPC 中均有表达. 在我们先前建立的一个 LMP1 可控表达的细胞系 Tet-on-LMP1 HNE2 中, 蛋白质印迹研究表明 JAK3 受 LMP1 表达调控并呈现 Dox 剂量和时间的依赖性. 用不同浓度 Dox (0、0.006、0.06、0.6、6 mg/L) 诱导 24 h, 发现 JAK3 随 LMP1 的增高而增高. 用 0.6 mg/L 的剂量诱导发现随诱导时间的延长, JAK3 的量在 24 h 达到高峰, 然后逐步下降. 这种诱导的时间与剂量的依赖性, 证明 LMP1 可以调控 JAK3 的表达.

进一步利用 STAT 报告基因分析发现用 0、0.006、0.06、0.6、6 mg/L Dox 诱导 36 h, 在 0.06 mg/L 剂量诱导时报告基因活性最高, 在此条件下, 加入 JAK3 特异性抑制剂 WHI-P131, 发现其报告基因活性受到抑制. 而加入 WHI-P131 的溶剂二甲基亚砜 (DMSO) 组与不加组 STAT 报告基因活性没有受到影响.

至此, 我们提出在 NPC 中 JAK3 能够表达并且确实存在 LMP1 通过激活 JAK3 进而激活转录因子 STAT 这一信号传导通路. 这一途径在 NPC 的发生与发展中可能发挥一定的作用. LMP1 C 端已知有活化域 CTAR1、CTAR2, 是否 JAK3 通过推测的 CTAR3 区, 还是通过其他尚未发现的功能域来激活 STAT, 还有待进一步的研究. LMP1 是否还通过其他的 JAK 家族来激活 STAT 亦将是我们的下一步的工作.

参 考 文 献

- Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans. *Int J Hematol*, 2000, **71** (2): 108~117
- Grinstein S, Preciado M V, Gattuso P, *et al.* Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res*, 2002, **62** (17): 4876~4878
- 胡 智, 曾 亮, 陶永光, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 通过 TRAF/TRADD 激活 JNK 信号途径. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (4): 562~565
- Hu Z, Zeng L, Tao Y G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (4): 562~565
- 罗非君, 胡 智, 曾 亮, 等. EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 参与鼻咽癌恶性演进的转录调控实验研究. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (4): 567~571
- Luo F J, Hu Z, Zeng L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (4): 567~571
- Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, *et al.* Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*, 1999, **18** (11): 3064~3073
- Higuchi M, Kieff E, Izumi K M, *et al.* The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol*, 2002, **76** (1): 455~459
- 胡利富. EBV 编码的潜伏膜蛋白. *癌症*, 2002, **21** (5): 559~566
- Hu L F. *Chin J Cancer*, 2002, **21** (5): 559~566
- Kaykas A, Worringer K, Sugden B, *et al.* CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *EMBO J*, 2001, **20** (11): 2641~2654
- Beadling C, Ng J, Babbage J W, *et al.* Interleukin-2 activation of STAT5 requires the convergent action of tyrosine kinases and a serine/threonine kinase pathway distinct from the Raf1/ERK2 MAP kinase pathway. *EMBO J*, 1996, **15** (8): 1902~1913
- Fielding C A, Sandvej K, Mehl A, *et al.* Epstein-Barr virus LMP-1 natural sequence variants differ in their potential to activate cellular signaling pathways. *J Virol*, 2001, **75** (19): 9129~9141
- 廖 伟, 易 红, 曹 亚, 等. 一株受四环素及其衍生物诱导表达的 Tet-on 鼻咽癌细胞系. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (1): 132~135
- Liao W, Yi H, Cao Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, **15** (1): 132~135
- Sudbeck E A, Liu X P, Narla R K, *et al.* Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. *Clin Cancer Res*, 1999, **5** (6): 1569~1582
- Aaronson D S, Horvath C M. A road map for those who know JAK-STAT. *Science*, 2002, **296** (5573): 1653~1655
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, *et al.* Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 2002, **285** (1~2): 1~24
- Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, *et al.* Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene*, 2000, **19** (48): 5419~5427
- Gesbert F, Griffin J D. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood*, 2000, **96** (6): 2269~2276
- Niu G, Wright K L, Huang M, *et al.* Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 2002, **21** (13): 2000~2008
- Verbsky J W, Bach E A, Fang Y F, *et al.* Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non-lymphoid and non-myeloid cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** (24): 13976~13980
- Chen H, Lee J M, Zong Y, *et al.* Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J Virol*, 2001, **75** (6): 2929~2937

Expression of JAK3 in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line Associated With STAT Activation Regulated by EB Virus Encoded Protein LMP1*

TAN Yun-Nian, TAO Yong-Guang, SONG Xin, TANG Min, AI Mi-Dan, CAO Ya**

(Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to investigate whether there exists LMP1/JAK3/ STAT signal pathway in NPC cell line, RT-PCR was first used to detect that four of JAK family members all expressed in two NPC cell lines CNE1 and HNE2. JAK3 which is the most possible associated with LMP1 was used to study further. A stable cell line Tet-on-LMP1 HNE2 expressing LMP1 regulated by tetracycline derivative Dox was used as a model. Western blotting was used to detect JAK3 expression in dose and time dependent fashion under dynamic changes of LMP1. STAT activity was observed after STAT reporter gene GRR-luc was transiently transfected in Tet-on-LMP1 HNE2 cell and was induced by varied Dox dose for 36 h. At Dox concentration of 0.06 mg/L, STAT activity reached a peak. JAK3 specific inhibitor I WHI-P131 can inhibit this peak STAT activity at concentration of 3 μ mol/L. Therefore, JAK3 expressed in NPC cells can be regulated by LMP1 to activate STAT. The identified LMP1/JAK3/STAT signal pathway maybe plays an important role in NPC carcinogenesis.

Key words EB virus, nasopharyngeal carcinoma, latent membrane protein 1, JAK3, STAT protein

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1998051201), The National Natural Sciences Foundation of China (30000087, 30100005) and The National Science Fund for Distinguished Young Scholars (39525022).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805448, Fax: 86-731-4470589, E-mail: Ycao98@public.cs.hn.cn

Received: December 8, 2002 Accepted: January 26, 2003