

EGCG 干预 LMP1 激活的 NF- κ B 信号转导通路中的靶分子*

赵燕 罗非君 唐发清 唐敏 曹亚**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为阐明在鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 细胞中茶多酚干预 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 激活的 NF- κ B 信号转导通路中的靶分子, 采用 EBV 阴性及阳性的鼻咽癌细胞系 CNE1 和 CNE1-LMP1 细胞, 利用噻唑蓝 (MTT) 法, 观察表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 对 CNE1 和 CNE1-LMP1 细胞生存率的影响. 采用瞬时转染及报道基因法观察 EGCG 对 NF- κ B 活性的作用. 利用间接免疫荧光法, 观察 EGCG 对 NF- κ B (p65) 核移位的影响, 再分别提取 CNE1 和 CNE1-LMP1 的胞浆及胞核蛋白, 通过蛋白质印迹分析 EGCG 抑制 NF- κ B (p65) 的核移位后胞浆及胞核蛋白中 NF- κ B (p65) 的变化. 采用蛋白质印迹分析 EGCG 对 I κ B α 的磷酸化水平的影响. 采用瞬时转染及报道基因法观察 EGCG 对 EGFR 启动子活性的影响, 并用蛋白质印迹分析 EGCG 对 EGFR 自身磷酸化的作用. 结果表明 EGCG 对鼻咽癌细胞的抑制作用有剂量依赖性, 并可抑制 NF- κ B 的活性. EGCG 能抑制 NF- κ B (p65) 的核移位, 并抑制 I κ B α 的磷酸化. EGCG 对 NF- κ B 信号通路下游的靶基因 EGFR 的启动子活性及自身磷酸化都有抑制作用. 由上述结果可以推断, EGCG 对信号转导通路上的 NF- κ B、NF- κ B (p65)、I κ B α 、EGFR 多个靶点分子具有干预作用. LMP1 是 EB 病毒编码的蛋白质, 因此, EGCG 抑制与病毒相联系的信号转导通路, 可能是 EGCG 抑制与病毒相关的肿瘤的分子机制之一.

关键词 茶多酚, EGCG, 爱泼斯坦-巴尔病毒 (EB 病毒), 潜伏膜蛋白 1, 鼻咽癌, 核因子 κ B, 表皮生长因子受体

学科分类号 R73

茶叶富含多酚类化合物, 茶多酚类化合物包括黄烷醇, 黄酮类和茶多酚酸类, 其中大部分为黄烷醇, 通称儿茶素. 主要的绿茶儿茶素有: 表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin 3-gallate, EGCG), 表没食子儿茶素 (epigallocatechin, EGC), 表儿茶素没食子酸酯 (epicatechin 3-gallate, ECG) 和表儿茶素 (epicatechin, EC), 其中 EGCG 含量最高, 占儿茶素的 80%. 大量的流行病学研究、体外实验及动物实验证实, 茶多酚主要有抗氧化、清除自由基、抗炎抗病毒及抗突变和抗肿瘤形成等生物学活性和药理效应, 其中起主要作用的是 EGCG.

LMP1 是一种 Epstein-Barr (EB) 病毒编码的, 由 384 个氨基酸组成的跨膜蛋白^[1]. LMP1 主要激活核因子 κ B (NF- κ B) 和激活蛋白 1 (AP-1) 两条信号转导通路. 核转录因子 NF κ B 和 AP-1 均处于 LMP1 介导的转录调控网络的枢纽, 并且都是 LMP1 介导的信号转导通路关键的效应分子. NF- κ B 在胞浆中通常以异源二聚体存在, 其中 p50, p65 两个亚基结合它的抑制蛋白 I κ B. I κ B 磷酸化后随即降解, 导致 NF- κ B 活化并移位至核中^[2]. 许多刺激如肿瘤坏死因子 (TNF)、白介素 (IL) -1、脂多糖 (LPS)、生长因子等均可引起 NF- κ B 活化并核移位. 我们的研究证实 LMP1 可

诱导 NF- κ B 核移位^[3].

LMP1 活化 NF- κ B 后, 可进一步调节多种靶基因的表达, 其中一个重要的靶基因即表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR). EGFR 的启动子上有 1 个 NF- κ B 的结合位点. NF- κ B 活性增加后可直接结合 EGFR 启动子, 使 EGFR 表达增加, 从而使细胞生长失控和恶性化^[4]. 病毒编码的瘤蛋白可靶向性地调节 EGFR 蛋白表达、磷酸化以及启动子活性, 在肿瘤的发生发展过程中起着重要作用^[5].

NF- κ B 异常活化与肿瘤发病高度相关, 其活性受细胞氧化还原状态的调控. 有研究表明茶多酚具有抗活性氧的作用^[6], 新近的研究显示在细胞内活性氧作为第二信使, 调控 NF- κ B 的活化, 并且这一信号转导通路被认为与细胞的癌变密切相关^[7]. 同样具有抗氧化作用的维生素 E 和维生素 C 抑制雌激素诱导的 NF- κ B 活化^[8]. 为此, 我们利用已导入致癌基因 LMP1 高表达质粒的鼻咽癌稳定细胞系 (CNE1-LMP1), 探讨 EGCG 对鼻咽癌

* 国家自然科学基金 (30000087) 和国家自然科学基金杰出青年基金资助项目 (39525022).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805448, E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2002-07-23, 接受日期: 2002-09-26

细胞NF- κ B信号转导通路上的多个靶点分子的作用,以阐明EGCG可能的抗癌机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系: CNE1细胞(EBV阴性的鼻咽癌细胞系)和CNE1-LMP1细胞(EBV阳性,导入致癌基因高表达质粒的鼻咽癌稳定细胞系)。

1.1.2 质粒: NF- κ B-Luciferase质粒是在pGL2-Basic vector的多克隆位点,插入一个HIV来源的,带有两个NF- κ B结合位点的196 bp长反式调控序列,系美国国立卫生研究院Li博士赠送。EGFR启动子全长1.1 kb,经Hind III酶切后插入pGL3-Basic载体,系Johnson惠赠。将质粒按常规转化大肠杆菌TG1,纯化质粒酶切鉴定后,测其浓度,置4℃保存备用。

1.1.3 主要试剂: EGCG购自Sigma公司。Lipofectamine购自美国生命技术公司。RPMI1640培养基购自美国GIBCO公司。小牛血清为华美生物工程公司产品。NF- κ B(p65)抗体(sc-109),p-I κ B α 及I κ B α 抗体,p-EGFR(Tyr1173)及EGFR(528)抗体均购自Santa Cruz公司。Supersignal West Extended Dura Substrate购自Pierce公司, α -tubulin和Actin均购自Santa Cruz公司,BCA assay reagent购自Pierce Chemical公司。

1.2 方法

1.2.1 噻唑蓝(MTT)法:取对数生长期的CNE1和CNE1-LMP1细胞用含0.02% EDTA和0.25%胰蛋白酶消化后接种于96孔培养板,各孔细胞密度为 1×10^4 个/ml。加盖,于37℃,5% CO₂培养箱中培养24 h后,加EGCG于各孔中,浓度梯度依次为0, 50, 100, 200, 400 mg/L。在37℃,5% CO₂培养箱继续培养24 h,加5 g/L的MTT 20 μ l于各孔中,再培养4 h后倒尽板中的培养液,各孔加100 μ l二甲亚砜(DMSO),轻轻振动后用酶标仪测定各孔的A₅₇₀值,根据下列公式计算细胞的生存率:(实验组A₅₇₀/对照组A₅₇₀) $\times 100\%$ 。

1.2.2 Lipofectamine介导的瞬间细胞转染:按LipofectAMINE转染说明书,转染前24 h,将CNE-LMP1细胞种植于24孔板培养,待细胞生长至70%~80%融合,弃培养基(RPMI 1640)。在两个eppendorf管中加无血清培养基,其中一管加NF- κ B报道质粒,另一管加Lipofectamine,混匀,置室温下45 min。然后加入细胞孔板,再补加

200 μ l无血清培养基,37℃,5% CO₂条件下转染5 h,换含10%小牛血清的培养基,并加入100 mg/L EGCG继续培养24 h,用于实验。EGFR启动子质粒瞬间转染方法同上。

1.2.3 单报道荧光素酶活性分析及转染效率的校正:按Lipofectamine的方法,将NF- κ B-Luc报道质粒及RSV β -Gal质粒共转染入细胞。24 h后,按Luciferase assay system的说明,加入100 μ l裂解缓冲液置摇床上裂解30 min,用细胞刮子将细胞刮下,移至eppendorf管内,室温12 000 r/min离心15 min。取20 μ l上清液,加100 μ l反应底物,迅速推入美国产的LUMI-SCINT Luminometer/LSC单光子仪检测相对光单位(relative light unit, RLU)值,它间接反映NF- κ B的相对活性。每个样品平行三孔,取平均值。转染效率的校正按 β -galactosidase Enzyme Assay System说明,取上述细胞裂解上清液50 μ l加入96孔板,加入50 μ l反应底物,混匀,37℃孵育30 min后,150 μ l碳酸钠终止反应,酶标仪420 nm检测。

1.2.4 间接免疫荧光法:将贴壁生长的CNE1及CNE1-LMP1细胞用D-Hank's液洗两遍,0.1%胰蛋白酶37℃消化数分钟后,细胞悬液滴片于已消毒的载玻片。在37℃,5% CO₂培养箱中培养,待细胞贴壁伸展后,用100 mg/L EGCG处理CNE1-LMP1细胞24 h,1 $\times$ PBS洗3次,每次3 min,室温下非免疫血清封闭10 h。抗体I 4℃孵育2 h,1 $\times$ PBS洗3次,每次5 min,加FITC标记的抗体II室温孵育1 h,1 $\times$ PBS洗3次,每次5 min, Olympus BX60 荧光显微镜下观察,利用spot camera采集图象,spot software分析图象。

1.2.5 细胞总蛋白提取和浓度测定:取对数生长期的CNE1和CNE1-LMP1细胞,经100 mg/L EGCG处理24 h。用1 $\times$ PBS洗3~4次后,细胞裂解液(50 mmol/L Tris $\cdot$ HCl, pH 8.0, 5 mmol/L EDTA, 0.5% IGEPAL, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 10 mmol/L 苯甲基磺酸氟化物(PMSF), 1 $\times$ 蛋白抑制剂混合物(protein inhibitor mix), 2.5 mmol/L sodium orthovanadate) 4℃裂解30 min,超声粉碎30 s。13 000 r/min离心去细胞碎片,留含有全蛋白的上清液。用BCA assay reagent测定蛋白质浓度后用于蛋白质印迹检测。

1.2.6 胞浆及胞核蛋白的提取和浓度测定:取对数生长期的CNE1和CNE1-LMP1细胞,经100 mg/L EGCG处理24 h后,用含0.02% EDTA

和 0.25% 胰蛋白酶消化, 悬浮于缓冲液 I (20 mmol/L HEPES, pH 7.0, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.5% Nonidet P40, 1 mmol/L Na_2VO_4 , 1 mmol/L 乙基苯基聚乙二醇, 0.15 U/ml 抑蛋白酶肽) 匀浆, 1 500 g 离心 5 min, 沉淀为核团块。将上清液再 15 000 g 离心 5 min, 所得上清液即为非核部分。将核团块用缓冲液 I 洗三遍, 悬浮于缓冲液 II (缓冲液 I 中加入 0.5 mol/L NaCl), 15 000 g 离心 10 min, 上清液即为核部分。利用 BCA assay reagent 测定蛋白质浓度后用于蛋白质印迹检测。

1.2.7 蛋白质印迹分析: 70 μg 蛋白与加样缓冲液混合, 100°C 变性 10 min, 在 10% 不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 胶中电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 膜与抗体 I 孵育 12 h, 抗体 II 孵育 2 h, Supersignal West Extended Duration Substrate 检测, 结果用 α -tubulin 作为内对照校正。

2 结 果

2.1 EGCG 对鼻咽癌细胞的抑制作用

分别用不同浓度 (0, 25, 50, 100, 200, 400 mg/L) 的 EGCG 处理 CNE1 和 CNE1-LMP1 细胞, 发现随着浓度的升高, EGCG 对 CNE1 和 CNE1-LMP1 细胞抑制作用逐渐增强, 细胞存活率与 EGCG 的浓度呈负相关, 与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), 并且 EGCG 对 CNE1-LMP1 细胞的抑制稍强于 CNE1 细胞 (图 1)。

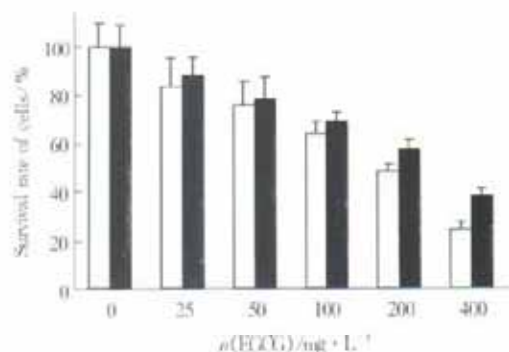


Fig.1 The survival rate of CNE1 and CNE1-LMP1 cells was inhibited by various concentration of EGCG for 24 h
□: CNE1-LMP1; ■: CNE1.

2.2 EGCG 对鼻咽癌细胞中 NF- κ B 的抑制作用

分别用不同浓度 (0, 25, 50, 100, 200 mg/L) 的 EGCG 处理 CNE1-LMP1 细胞, 采用荧光酶报道

基因系统分析, 发现 NF- κ B 的活性显著下降, 当 EGCG 浓度为 100 mg/L 时, NF- κ B 的活性下调了约 5 倍 (与 0 mg/L EGCG 组比较) (图 2)。

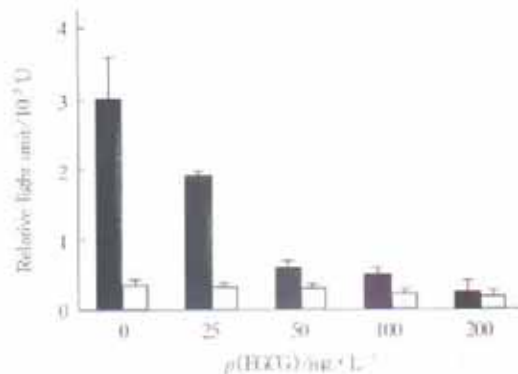


Fig.2 The activities of NF- κ B was suppressed by various concentration of EGCG for 24 h on CNE1-LMP1 cells
■: NF- κ B; □: β -Gal.

2.3 EGCG 抑制 NF- κ B (p65) 的核移位

利用间接免疫荧光显微镜法发现, EBV 阴性的 CNE1 细胞中, NF- κ B (p65) 组成性活化, NF- κ B (p65) 位于胞浆, EGCG 处理后对其无明显影响。而 EBV 阳性的 CNE1-LMP1 细胞中, NF- κ B (p65) 诱导性活化, 其荧光强度较强, 活化的 NF- κ B (p65)

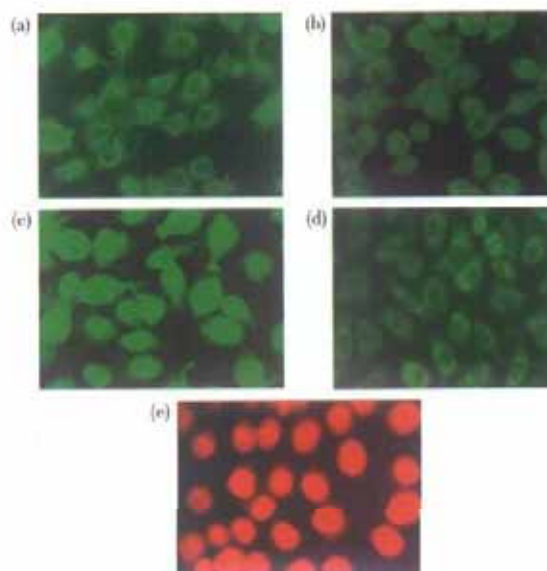


Fig.3 Inhibition of NF- κ B (p65) nuclear translocation by 100 mg/L EGCG for 24 h

(a) CNE1 cells, NF- κ B (p65) mainly located in the cytoplasm; (b) NF- κ B (p65) mainly located in the cytoplasm on CNE1 cells after 100 mg/L EGCG treatment for 24 h; (c) CNE1-LMP1 cells, NF- κ B (p65) mainly located in the nucleus; (d) NF- κ B (p65) mainly located in the cytoplasm on CNE1-LMP1 cells after 100 mg/L EGCG treatment for 24 h; (e) nucleus of CNE1-LMP1 was stained by propidium iodide (PI).

主要在核内聚集. 经 100 mg/L EGCG 处理 CNE1-LMP1 细胞 24 h 后, NF- κ B (p65) 主要滞留在胞浆中, 引起其在边缘聚集, 这说明 EGCG 能有效抑制活化的 NF- κ B (p65) 核移位 (图 3).

2.4 EGCG 对胞浆核蛋白中 NF- κ B (p65) 的改变

蛋白质印迹显示, EGCG 处理 CNE1 和 CNE1-LMP1 细胞后, 分别抽提胞核及胞浆蛋白, 100 mg/L EGCG 处理 CNE1 细胞前后, 胞核和胞浆蛋白中的 NF- κ B (p65) 变化不大. CNE1-LMP1 细胞中的 NF- κ B (p65) 由于被 LMP1 激活而核移位, 则出现胞核蛋白中的 NF- κ B (p65) 量增多, 而胞浆蛋白中的 NF- κ B (p65) 量减少. 100 mg/L EGCG 处理 CNE1-LMP1 细胞后, 胞核蛋白中的 NF- κ B (p65) 量减少, 而胞浆蛋白中的 NF- κ B (p65) 量有所增加. 这从蛋白质水平证实 EGCG 能有效抑制活化的 NF- κ B (p65) 核移位 (图 4).

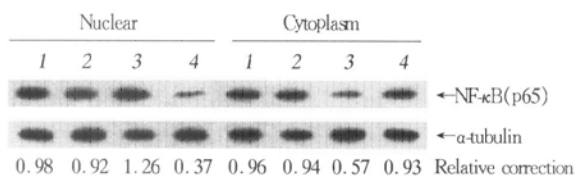


Fig.4 Change of NF- κ B (p65) protein in nuclear and cytoplasm after inhibition of NF- κ B (p65) nuclear translocation by 100 mg/L EGCG for 24 h

1: CNE1 cells; 2: Non-change of NF- κ B (p65) in nuclear and cytoplasm after treated by 100 mg/L EGCG for 24 h in CNE1 cells; 3: NF- κ B (p65) protein expression in nuclear was higher than in cytoplasm; 4: NF- κ B (p65) protein expression in nuclear was lower than in cytoplasm after 100 mg/L EGCG treatment for 24 h.

2.5 EGCG 抑制 I κ B α 的磷酸化水平

分别利用非磷酸化和磷酸化的 I κ B α 抗体进行蛋白质印迹分析. 结果显示, 当用非磷酸化的 I κ B α 时, EGCG 对 CNE1 和 CNE-LMP1 细胞中 I κ B α 蛋白无影响. 利用磷酸化的 I κ B α 抗体进行蛋白质印迹分析则显示, CNE-LMP1 细胞中的 I κ B α 磷酸化水平升高, 而经 100 mg/L EGCG 处理 24 h 后, 其磷酸化水平降低, 而 EGCG 处理 CNE1 细胞前后, I κ B α 无明显改变 (图 5). 提示 EGCG 有效抑制活化的 NF- κ B (p65) 核移位是通过抑制 I κ B α 的磷酸化水平.

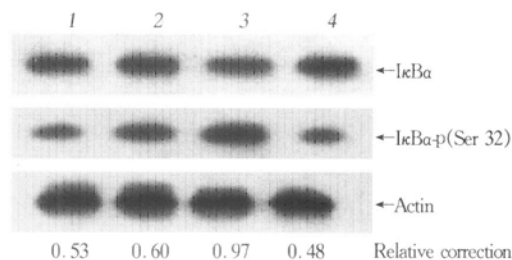


Fig.5 I κ B α phosphorylation was inhibited by EGCG

1: CNE1 cells treated by 100 mg/L EGCG for 24 h; 2: CNE1 cells; 3: I κ B α phosphorylation levels in CNE-LMP1 cells were high; 4: I κ B α phosphorylation levels in CNE-LMP1 cells were inhibited by 100 mg/L EGCG for 24 h.

2.6 EGCG 抑制 EGFR 启动子的活性

用荧光酶报道基因系统分析发现, CNE-LMP1 细胞中 EGFR 启动子的活性比 CNE1 细胞显著升高, 而经 100 mg/L EGCG 处理 24 h 后, 明显抑制 EGFR 启动子的活性 (图 6).

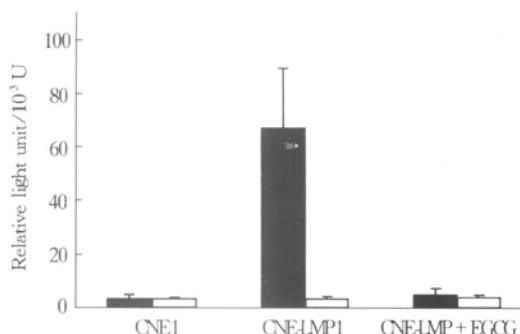


Fig.6 Activity of EGFR promoter was inhibited by EGCG

Activity of EGFR promoter (negative control) in CNE1 cells was very low. Activity of EGFR promoter in CNE-LMP1 cells was high. Activities of EGFR promoter in CNE-LMP1 cells was inhibited by 100 mg/L EGCG for 24 h. ■: EGFR-Luc; □: β -Gal.

2.7 EGCG 显著抑制 EGFR 磷酸化

分别利用非磷酸化和磷酸化的 EGFR 抗体进行蛋白质印迹分析. 利用非磷酸化的 EGFR 抗体进行蛋白质印迹, EGCG 对 CNE1 和 CNE-LMP1 细胞中 EGFR 蛋白无影响. 利用磷酸化的 EGFR 抗体进行蛋白质印迹分析显示, CNE-LMP1 细胞中的 EGFR 磷酸化水平升高, 经 100 mg/L EGCG 处理 24 h 后, 其磷酸化水平降低, 而 EGCG 处理 CNE1 细胞前后, EGFR 无明显改变 (图 7). 说明 EGCG 有效抑制 EGFR 的自身磷酸化水平.

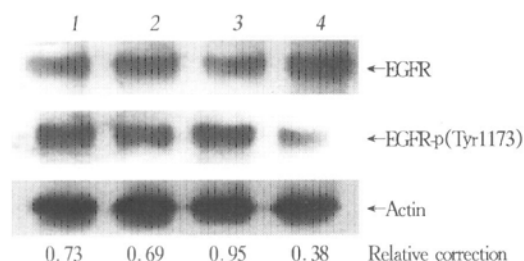


Fig 7 EGFR phosphorylation was inhibited by EGCG

1: CNE1 cells; 2: Non-change of EGFR phosphorylation level in CNE1 cells treated by 100 mg/L EGCG for 24 h; 3: EGFR phosphorylation level was high in CNE-LMP1 cells; 4: EGFR phosphorylation level was inhibited in CNE-LMP1 cells after 100 mg/L EGCG treatment for 24 h.

3 讨 论

鼻咽癌是东南亚和我国南方地区的一种常见恶性肿瘤,其发病与EB病毒感染高度相关。EB病毒表达的蛋白质产物中,LMP1被确证具有瘤蛋白功能^[9],它所介导的信号转导途径,尤其是通过活化NF- κ B调控下游靶基因的表达,在细胞增殖、分化、转化与凋亡中发挥重要作用^[10]。

细胞内信号转导途径的异常有可能导致NF- κ B的异常活化,这种异常活化主要通过促进相关基因的转录(如cyclin D1等),加速细胞周期演进,导致细胞周期调节失控^[11],细胞表现为无限增殖和自主分裂。或通过上调促细胞存活基因和凋亡抑制基因表达(Bcl 2, myc),或抑制促凋亡因子(caspase 8),从而抑制细胞凋亡。NF- κ B的诱导剂对细胞的刺激导致I κ B α 在32、36位丝氨酸的磷酸化,这种磷酸化由依赖于泛素蛋白化的I κ B α 蛋白激酶介导。磷酸化的I κ B α 随即在Lys21\ Lys22上被泛素化,泛素化的I κ B α 迅速被26位丝氨酸的蛋白酶降解。受其抑制的NF- κ B得以释放,发生核移位,在核内与相关的靶基因特异序列相结合并启动转录^[12]。

我们的前期研究表明,在鼻咽癌细胞中,EB病毒LMP1能够活化核转录因子NF- κ B,增强NF- κ B的DNA结合活性,NF- κ B的活化与鼻咽癌的恶性演进有关。同时,我们还进一步确定了p65是鼻咽癌中NF- κ B的主要组分。NF- κ B属于一个高度保守的转录因子家族。细胞在静息状态下,NF- κ B二聚体与其抑制子I κ B相结合而存在于细胞浆中。胞外刺激通过一系列细胞内信号转导作用于

抑制子I κ B,I κ B发生磷酸化并进一步被降解,NF- κ B得以自细胞浆移位至细胞核,进而参与调控下游靶基因的转录^[3]。

EB病毒编码的LMP1活化NF- κ B等转录因子后,可进一步调节多种靶基因的表达,其中一个重要的靶基因即为表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)。LMP1主要通过精细调控NF- κ B活化,上调EGFR的蛋白表达^[13]。LMP1可诱导EGFR磷酸化及EGFR启动子活性增加^[14]。Sheen等^[15]发现鼻咽癌组织中LMP1和EGFR存在共表达。由此可见,NF- κ B信号转导通路的下游靶基因EGFR受LMP1的调控,在肿瘤的发生发展过程中具有重要地位。

利用信号转导系统的靶分子为靶点进行抗癌药物的筛选,尤其是天然产物中提取的抗癌药物的作用机制研究,正在成为人们密切关注的新领域。茶多酚是从茶叶中提取的抗癌有效成分,它在干预信号转导通路的作用,同样引起了人们的极大兴趣。

大量实验已证实茶多酚,尤其是EGCG的抗氧化活性在抑癌中起重要作用。EGCG能调控致癌物代谢酶类,抑制亚硝化反应,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡和细胞周期停滞^[16,17],并通过调控生长因子受体的连结而阻断有丝分裂信号传导^[18],阻断核基因的表达^[19]。

本研究证实EGCG不但抑制鼻咽癌细胞的生长,而且阻断LMP1激活的NF- κ B活性。继而进一步通过间接免疫荧光检测显示,EGCG引起NF- κ B(p65)在胞浆中滞留,这可能是EGCG引起NF- κ B活性下调的主要原因。蛋白质印迹的结果显示,经EGCG处理的CNE-LMP1细胞,其胞核中NF- κ B(p65)的蛋白质水平降低而胞浆中NF- κ B(p65)的蛋白质水平升高,这从蛋白质水平的改变也证实了EGCG能够抑制鼻咽癌细胞中NF- κ B(p65)核移位。本实验证实EGCG对NF- κ B的活性及对NF- κ B(p65)核移位的抑制作用,是通过抑制I κ B α 磷酸化降解来调节的。并且EGCG抑制LMP1激活的EGFR启动子活性和其自体磷酸化。

上述结果提示,通过对信号转导通路上的NF- κ B、NF- κ B(p65)、I κ B α 、EGFR多个靶点分子的作用,可以发现EGCG作为天然产物中提取的抗癌有效成分对信号转导通路有干预作用。而LMP1又是EB病毒这种环境致癌因素编码的蛋白

质, 因此, EGCG 抑制与病毒相联系的信号转导通路, 可能是 EGCG 抑制与病毒相关的肿瘤分子机制之一。

从干预信号转导通路的角度来阐明茶多酚化合物抑制细胞增生, 诱导细胞凋亡的分子机制, 将为临床防治肿瘤开辟新的通路, 也为茶叶及其提取物防癌抗癌功能的利用提供重要的实验依据。

参 考 文 献

- Liebowitz D, Wanf D, Kieff E, *et al.* Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol*, 1986, **58** (1): 233~ 237
- Chaturvedi M M, Kumar A, Darnay B G, *et al.* Sanguinarine (Pseudocheleerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ Ba phosphorylation, and degradation. *J Biol Chem*, 1997, **272** (48): 30129~ 30134
- Yin Liqun, Liao Wei, Cao Ya, *et al.* LMP1 activates NF- κ B via degradation of I κ Ba in nasopharyngeal carcinoma cells. *Chinese Medical J*, 2001, **114** (7): 718~ 722
- Johnson A C, Murphy B A, Matelis C M, *et al.* Activator proteir 1 mediates induced but not basal epidermal growth factor receptor gene expression. *Mol Med*, 2000, **6** (1): 17~ 27
- Miller W E, Raab-Traub N. The EGFR as a target for viral oncoproteins. *Trends Microbiol*, 1999, **7** (11): 453~ 458
- Salah N, Miller N J, Paganga G, *et al.* Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys*, 1995, **322** (2): 339~ 346
- Arrigo A P. Gene expression and thiol redox state. *Free Radic Biol Med*, 1999, **27** (9): 936~ 944
- Ripple M O, Henry W F, Schwarze S R, *et al.* Effect of antioxidants on androger-induced AP-1 and NF- κ B DNA-binding activity in prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 1999, **91** (14): 1227~ 1232
- Klein G. Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. *Cell*, 1994, **77** (6): 791~ 793
- Kilger E, Kieser A, Baumann M, *et al.* Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*, 1998, **17** (6): 1700~ 1709
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, *et al.* NF- κ B function in growth control: regulation of cyclinD1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (4): 2690~ 2698
- Baldwin A S. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 1996, **14** (1): 649~ 681
- 王承兴, 邓锡云, 曹亚, 等. EB病毒LMP1在鼻咽癌细胞系中上调EGFR表达. *中华肿瘤学杂志*, 2001, **23** (4): 269~ 272
- Wang C X, Deng X Y, Cao Y, *et al.* Chinese Journal of Oncology, 2001, **23** (4): 269~ 272
- 陶永光, 胡智, 曹亚, 等. EB病毒潜伏膜蛋白1在鼻咽癌细胞中调节表皮生长因子受体磷酸化. *中华肿瘤杂志*, 2002, **24** (3): 226~ 229
- Tao Y G, Hu Z, Cao Y, *et al.* Chinese Journal of Oncology, 2002, **24** (3): 226~ 229
- Sheen T S, Huang Y T, Chang Y L, *et al.* Epstein-Barr Virus-encoded latent member protein 1 co-expression with epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 1999, **90** (12): 1285~ 1292
- Brown MD. Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern Med Rev*, 1999, **4** (5): 360~ 370
- Yang C S, Chung J Y, Yang G, *et al.* Tea and polyphenols in cancer prevention. *J Nutr*, 2000, **130** (2s Suppl): 472s~ 478s
- Lin J, Liang Y C, Lin Shiau S Y. Cancer chemaprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol*, 1999, **58** (9): 911~ 915
- Lin Y L, Lin J K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor NF- κ B. *Mol Pharmacol*, 1997, **52** (3): 465~ 472

Interference of Epigallocatechin-3-gallate on Targets of Nuclear Factor κ B Signal Transduction Pathway Activated by EB Virus Encoded Latent Membrane Protein 1*

ZHAO Yan, LUO Fei Jun, TANG Fa Qing, TANG Min, CAO Ya**

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

Abstract In order to elucidate the interference effect of epigallocatechin-3-gallate on targets of nuclear factor κ B signal transduction pathway activated by Epstein-Barr virus encoding latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells, the survival rate of CNE1 and CNE-LMP1 cells after EGCG treatment was determined by MTT assay. NF- κ B activation in CNE1 and CNE-LMP1 cells after EGCG treatment was analyzed by promotor luciferase reporter system. And then nuclear translocation in NF- κ B (p65) after EGCG treatment was analyzed by immunofluorescence and Western blotting. Meanwhile, the changes of I κ Ba phosphorylation were observed after EGCG treatment. EGFR promotor activity was analyzed by promotor luciferase reporter system and EGFR phosphorylation was observed by Western blotting after EGCG treatment.

It was showed that EGCG inhibited the survival rate of CNE-LMP1 cells and NF- κ B activation caused by LMP1 in CNE-LMP1 cells. EGCG also suppressed the nuclear translocation in NF- κ B (p65) and I κ B α phosphorylation. Meanwhile, EGCG inhibited EGFR promotor activity and EGFR phosphorylation. It can be concluded that EGCG can inhibit NF- κ B, NF- κ B (p65), I κ B α and EGFR which are key targets on NF- κ B signal transduction pathway. It was suggested that interference effect of epigallocatechin 3-gallate on signal transduction pathway which activated by LMP1 encoded by EB virus plays an important role in anticancer.

Key words tea polyphenols, EGCG, Epstein-Barr virus, latent membrane protein 1, nasopharyngeal neoplasms, nuclear factor κ B, epidermal growth factor receptor

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30000087) and The Youth Foundation of National Science Foundation of China (39525022).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805448, E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

Received: July 23, 2002 Accepted: September 26, 2002

知识与动态

新的重组蛋白表达系统——植物根分泌和叶分泌

甘 强 金礼吉 安利佳*

(大连理工大学生物工程系, 大连 116012)

多种基因工程抗体、酶、激素、血浆蛋白和疫苗等都已植物的叶、茎、根、果实、种子以及植物细胞和器官中得到表达, 然而提取和纯化始终是大规模利用植物生产重组蛋白的主要障碍。Borisjuk 和 Komamytsky 等 (1999 年和 2000 年) 依据内质网和内质网信号肽在蛋白质合成中的作用, 把 3 种重组蛋白, 嗜热细菌来源的木聚糖酶、水母的绿色荧光蛋白和人胎盘分泌的碱性磷酸酶 (SEAP), 定位到质外体中, 通过植物根分泌和叶分泌途径获得表达, 从而建立了 2 种新的重组蛋白表达系统——植物根分泌和叶分泌, 简化了分离和纯化程序, 为利用转基因植物大规模生产重组蛋白提供了潜在的途径。我们利用植物根分泌表达系统, 获得了抗乙肝表面抗原单链抗体的连续表达, 每天每克干重根的可溶性总蛋白 (TSP) 表达量为 630~760 ng, 活性单链抗体占 TSP 的 2%, 证实了此系统的可行性。

在不损坏植物的条件下, 新的重组蛋白表达系统有利于连续地从植物根分泌物和吐水液中得到目的蛋白。正如 Borisjuk 等提到, 每天每克干重根中分泌水平为 20 μ g 时, 一棵烟草在 4 个月里就可分泌 2.4 mg 活性 SEAP。其次, 根分泌物相对于植物组织来说成分简单, 无色素和鞣酸, 并且培养基是一种简单的溶液, 有利于重组蛋白的分离和纯化。植物叶分泌是在封闭环境中进行的, 消除了转基因

植物中外源基因向外扩散的潜在危害, Duist 等 (2001 年) 发表于《Nature》上的一篇文章, 就有这方面的报道。目前植物叶分泌表达系统的主要障碍在于重组蛋白的分泌水平较低, 如每天每克干重的转 SEAP 基因烟草叶分泌水平为 0.15~1.1 μ g, SEAP 占 TSP 的 0.3%~2.8%。

如何有效地从植物根分泌物及叶分泌物中提取治疗性药物分子, 为下一步大规模生产重组蛋白打下基础, 将是植物根分泌和叶分泌表达系统面临的难点。现已表明, 启动子、信号肽、末端多肽以及植物材料、组织都对植物抗体的表达产生重要影响, 因而可以从这几方面入手来提高重组蛋白的分泌水平。除此之外, 把植物根分泌和叶分泌表达系统结合起来生产重组蛋白将是一种很好的方案, 一方面可以提高重组蛋白的分泌量, 另一方面只需用浇水浇植物叶片, 让叶分泌物流到水培液中, 就可以把叶分泌与根分泌的重组蛋白汇合在一起, 进一步简化提取和纯化蛋白质的程序。总之, 随着人们对内质网定位系统和分泌途径以及基因表达调控, 特别是植物生物反应器的深入了解, 植物根分泌和叶分泌表达系统将被有效地用于大规模生产重组蛋白。

* 通讯联系人。

Tel: 0411-4706365, E-mail: ljan@mail.dlptt.ln.cn

收稿日期: 2002-07-13, 接受日期: 2002-09-28