

EB 病毒 LMP1-CTAR₃ 对 NP69 细胞增殖和蛋白质表达的影响 *

张志伟^{1, 2)} 张 琼¹⁾ 余艳辉¹⁾ 欧阳咏梅¹⁾ 贺智敏^{1)**}

(¹⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾南华大学医学院肿瘤研究所, 衡阳 421001)

摘要 为了探讨 EB 病毒潜伏性膜蛋白 1(LMP1)第三个功能活性区域(CTAR₃)在鼻咽上皮细胞 NP69 中的转化作用机制, 采用逆病毒感染的方法, 将浓缩的逆病毒 RV-LMP1 和 RV-LMP1^{Δ232~351} 分别感染鼻咽上皮细胞 NP69, 建立 NP69-LMP1 与 NP69-LMP1^{Δ232~351} 稳定表达细胞系。通过绘制生长曲线、平皿克隆形成试验和软琼脂集落形成试验比较野生型和突变型 LMP1 对 NP69 细胞增殖的影响, 运用蛋白质组学方法鉴定 NP69-LMP1 与 NP69-LMP1^{Δ232~351} 细胞间的差异表达蛋白, 选用实时荧光定量 RT-PCR 与 Western blot 对其中部分蛋白质点差异表达进行验证。结果发现: a. 突变型 LMP1^{Δ232~351} 促 NP69 细胞增殖的能力较野生型 LMP1 明显降低($n=3$, $P<0.05$); b. 鉴定了 LMP1-CTAR₃ 在 NP69 细胞中参与调节的 16 个蛋白质(表达上调的蛋白质 8 个, 下调的 8 个)。c. 实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 证实了部分上述蛋白质的差异表达。以上结果说明, LMP1-CTAR₃ 是其发挥促细胞增殖的重要活性部位, 可能通过参与调节 G 蛋白和异柠檬酸脱氢酶等蛋白质的表达而起作用。

关键词 EB 病毒, 潜伏性膜蛋白 1, 羧基端功能活性区域 3, 差异表达蛋白

学科分类号 R318.0

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00635

EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)与鼻咽癌的发生与发展密切相关^[1], 其编码的潜伏性膜蛋白 1(latent membrane protein, LMP1)是公认的病毒基因组编码具有促细胞癌变和转移作用的瘤蛋白^[2], 但其致病机理仍有待进一步研究。LMP1 羧基端有两个活性区域(carboxyl terminal activating region, CTAR), 即 CTAR₁ 和 CTAR₂, 分别经 NF κ B 和 AP-1 信号传导通路参与诱导细胞的恶性转化。1999 年 Gires 等^[3]首次报道 LMP1 存在第三个功能活性区域 CTAR₃, 并证实与细胞中 JAK3 信号通路密切相关。但 LMP1-CTAR₃ 在促鼻咽上皮细胞恶性转化中的作用尚不十分清楚。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒. pLNSX-LMP1(含全长 1.95 kb 野生型 LMP1)^[4]和 pLNSX-LMP1^{Δ232~351}(第三个活性区域缺失, 含 1.59 kb 的 LMP1)^[5]逆病毒质粒由南华大学肿瘤研究所提供。

1.1.2 细胞. 病毒包装细胞 PA317 为南华大学肿瘤研究所保存提供, 永生化鼻咽上皮细胞 NP69 由

香港大学 Dr. Tsao 惠赠, 上述细胞分别用含 10% 小牛血清(杭州四季青公司)的 DMEM(Gibco BRL 公司)或无血清 K-SFM(Invitrogen 公司)的培养基培养, 传代消化所用胰酶和 EDTA 均系 Gibco BRL 产品。

1.1.3 试剂和引物. 鼠抗人 LMP1 单抗 S12(1:50)来自杂交瘤细胞, 由香港大学曹亮博士惠赠; 固相 pH 梯度干胶条(IPG strip pH 3-10NL, 24 cm)为 Amersham Biosciences 产品; AMV Reverse Transcription 试剂盒和 PCR 系列均购自 Promega 公司。G418 和 Lipofectamine 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司, 单克隆抗体(一抗和二抗)购自 Zymed Ltd, 其他化学和生化试剂均为 Sigma 公司产品。引物见表 1。

* 国家自然科学基金(30470668), 湖南省自然科学基金(07JJ6164)和湖南省卫生厅科研基金(B2006-100)和湖南省重点科学建设经费资助项目。

** 通讯联系人。E-mail: hezhimin2005@yahoo.com

收稿日期: 2008-09-15, 接受日期: 2008-10-13

Table 1 Primer sequences used in fluorescent real-time quantitative RT-PCR

Primer	Sequence(5'→3')	Product size(bp)
Ribosomal protein P0	S 5' AAGGCTGTGGTGCTGATG 3'	132
	AS 5' GTCCTCCTTGGTGAACACA 3'	
Annexin A2	S 5' ATCTCTATGACGCTGGAGTGAA 3'	121
	AS 5' GGGCTGTAACCTTTGTACCTATCA 3'	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	S 5' CTGGATGGCCGTGTCATT 3'	143
	AS 5' GCCTCAATCTCCCAAACCT 3'	
Isocitrate dehydrogenase 3	S 5' TGCAGAGTATCAAGCTCATCAC 3'	143
	AS 5' TAGAAAAAGCCCATCTGACATC 3'	
G protein	S 5' GGGTCACTCCCACTTTGTTAG 3'	149
	AS 5' TCAGCACATCCTTGGTATGG 3'	
β-Actin (interior control)	S 5' ACCGTGGAGAAGAGCTACGA 3'	309
	AS 5' GTACTTGCCTCAGAAGGAG 3'	

1.2 方法

1.2.1 逆转录病毒制备和 NP69 细胞感染. 参考文献[5], 建立稳定产逆病毒的 PA317 细胞, 浓缩收集逆病毒液. 将 NP69 细胞种入 6 孔板培养, 分别用 RV-LMP1 和 RV-LMP1^{Δ232~351}逆病毒和 8 mg/L 聚凝胺 37℃ 孵育(感染)NP69 细胞 2 次(3~4 h/ 次, 间隔 8~12 h/ 次), 400 mg/L G418 筛选 2~3 周, 汇合克隆扩大培养, 建成稳定传代的转染细胞系(NP69-LMP1 和 NP69-LMP1^{Δ232~351}). 上述细胞用 Western blot 和免疫荧光检测 LMP1 的表达.

1.2.2 免疫荧光试验. 制备细胞爬片, 用甲醇与丙酮(1: 1)固定、洗片、干燥后用抗 LMP1 单抗 S12 (1: 50)标记 1 h(37℃), 洗片后用 FITC 标记的羊抗鼠二抗标记 1 h(37℃), 洗涤后甘油封片, 于荧光显微镜下观察, 拍照.

1.2.3 绘制生长曲线. 将 NP69-LMP1 和 NP69-LMP1^{Δ232~351}细胞(1×10⁴)接种于 96 孔板中, 每组设 3 个平行孔, 隔天用 MTT 法对细胞数进行检测, 每次重复测量 3 次, 取平均值代表测量值, 用校正值(每次测量值与第一天的测量值之商)代表细胞生长曲线的测量值, 总共检测 8 天, 将细胞的校正值绘制在坐标纸上, 即得出细胞的生长曲线, 本实验独立进行了 3 次.

1.2.4 平板克隆形成试验. 取对数生长期的细胞, 制成细胞悬液, 按 1 000 个 / 孔接种于 6 孔板中, 静置培养 2 周. 取出培养皿, 用 PBS 洗 2 次, 甲醇固定 15 min 后, 0.4%结晶紫染色. 用肉眼直接计数克隆数, 或在显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆. 然后, 按公式计算克隆形成率: 克隆形成率(%)=(克隆数 / 接种细胞数)×100%, 本实验亦独立进行了 3 次.

1.2.5 软琼脂集落形成试验. 用 K-SFM 培养基、0.6%琼脂糖(终浓度)配制底层琼脂, 取 1.5 ml 均匀铺于 6 孔板内, 4℃ 放置 10 min. 另外用转染的 NP69 细胞(密度为 5×10⁴ 个 / 孔)、K-SFM 培养基、0.3%琼脂糖(终浓度)配制顶层琼脂, 待底层琼脂凝固后将顶层琼脂铺于底层琼脂上, 37℃, 5% CO₂ 温箱内连续培养 2 周后, 计数集落数. 每组 3 个平行孔, 集落形成率计数: 于倒置显微镜下观察集落(≥50 个细胞为 1 个集落)的数目和大小, 计数每组每孔集落数的平均值, 计算出细胞集落形成率(集落形成率=集落数 / 接种细胞数×100%), 本实验亦独立进行了 3 次.

1.2.6 双向凝胶电泳与质谱分析. 参考文献[6], 收集 / 裂解细胞, 测定总蛋白质浓度, 将 1 000 μg 细胞总蛋白与水化液混合, 加入 IPGstrip 持胶槽中, 等电聚焦后, 用浓度为 12%分离胶 SDS-PAGE 垂直平板电泳, 考马斯亮蓝 G-250 蓝银染色, 实验在相同的条件下重复了 3 次. 选取差异表达点, 萃取、离心、点样. 将制备好的点样板放入 Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪中进行分析, 获得肽质量指纹图(PMF), 进行 Mascot 查询系统检索(搜索数据库为 SWISS-PROT 和 NCBI 蛋白质数据库).

1.2.7 Western blot 检测差异表达蛋白. 收集细胞, 制备蛋白质, 测定浓度后, 以各泳道 80 μg 的总蛋白进行 10% SDS 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(以 B95-8 作为阳性对照组, 以 NP69 细胞作为阴性对照组), 转膜、封闭, 一抗(1: 500)及抗 β-actin 单体(1: 10 000)4℃ 孵育过夜, 洗膜后, HRP 标记的羊抗鼠二抗(1: 1 000)孵育、洗膜、发光、曝光、显影、定影以及分析结果.

1.2.8 实时荧光定量 RT-PCR 检测差异蛋白的 mRNA 表达. a. 使用 SYBR Green I 荧光染料在密闭的毛细硅管(德国 Roche 公司)中进行定量 PCR 反应. 取模板 2 μ l, 上下游引物各 0.4 μ l, 超纯水补足体积 20 μ l, 混匀, 再与 10 μ l 混合染料混合后注入毛细硅管中, 离心后放入 Lightcycler PCR 热循环仪(德国 Roche 公司)中进行反应(设置条件: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 4 s, 62~65 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 40~50 个循环; 60 $^{\circ}$ C 10 s, 1 个循环), 计算出 Threshold cycle(C_t). 每一次反应均以双蒸水代替模板做为阴性对照, 实验重复 3 次. b. 相对定量公式及表达量计算: 目的基因的量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (表示实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数), $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 管家基因}})_{\text{实验组}} - (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 管家基因}})_{\text{对照组}}$. c. PCR 扩增产物送 Invitrogen 公司测序分析, 确定实时荧光 RT-PCR 扩增产物的特异性.

1.2.9 统计学分析. 应用 SPSS13.0 统计软件包进行 t 检验和 χ^2 检验. 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结 果

2.1 转化 NP69 细胞 LMP1 蛋白的表达定位与检测

转染 LMP1 和 LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 的 NP69 细胞, 经免疫荧光标记, 荧光显微镜下观察, LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 和 LMP1 蛋白的表达部位一致, 主要位于细胞膜和细胞浆内(图 1). Western blot 结果同样证实了 LMP1 和 LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 在 NP69 细胞中的表达(结果未显示).

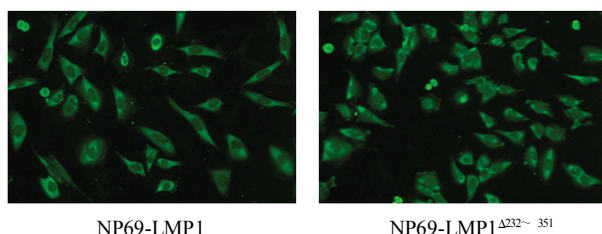


Fig. 1 Expression of LMP1 in NP69-LMP1 and NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ cells detected with immunofluorescence

2.2 LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 促 NP69 细胞的生长特点

将上述两种细胞以相同的数量接种于 96 孔板, 每组设 3 个平行孔, 用 MTT 法每隔一天测量, 连续检测 8 天, 绘制出生长曲线. 经绘制生长曲线和统计学分析, NP69-LMP1 细胞生长速度较

NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 细胞明显增快($n=3$, $P < 0.05$, 见图 2).

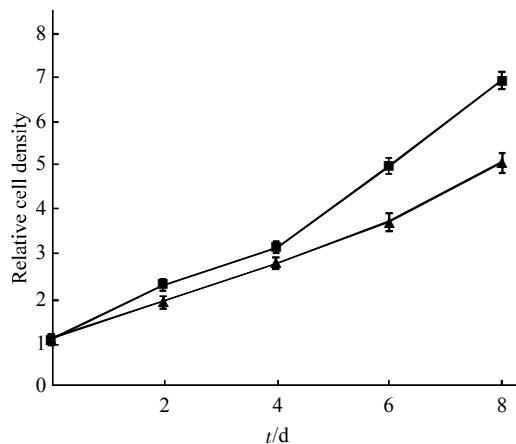


Fig. 2 Growth curve of NP69-LMP1 and NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ cell
■—■: NP69-LMP1; ▲—▲: NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$.

2.3 转化 NP69 细胞锚定依赖性生长与非停泊依赖性生长能力

NP69-LMP1 和 NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 细胞的平皿克隆与软琼脂集落形成结果显示(表 2), NP69-LMP1 组较 NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 组的平皿克隆与软琼脂集落形成数多, 说明 NP69-LMP1 锚定依赖性生长与非停泊依赖性生长能力较 NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 细胞强($n=3$, $P < 0.05$).

Table 2 Cell culture transformation analysis of NP69-LMP1 and NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$

Cells	Colony-forming number	Foci-forming number
NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$	214 $\pm$ 10	88 $\pm$ 7
NP69-LMP1	484 $\pm$ 17 ¹⁾	256 $\pm$ 14 ¹⁾

NP69-LMP1 versus NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$; ¹⁾ $P < 0.05$.

2.4 双向凝胶电泳图谱的建立和图像分析结果

应用 2-DE 技术分别分离了 NP69-LMP1 和 NP69-LMP1 $\Delta 232 \sim 351$ 细胞的总蛋白, 经 Imagescanner 扫描 2-D 胶, PDQuest7.1 软件分析, 总蛋白质点数分别为: 1 088 $\pm$ 43 和 1 142 $\pm$ 46, 平均匹配率为 92.5%. 将胶中重复出现的 3 次且大于 2 倍表达量差异的蛋白质点认为是两种细胞系间的差异表达蛋白质点(图 3 和图 4).

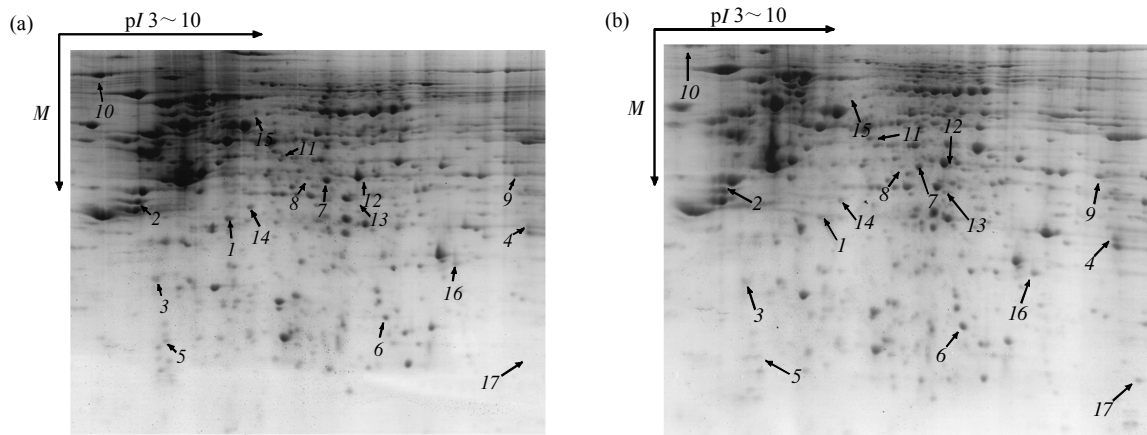


Fig. 3 2-D gel image of NP69-LMP1 (a) and NP69-LMP1^{Δ232~351}(b) cells, the arrow marked the differential protein spots

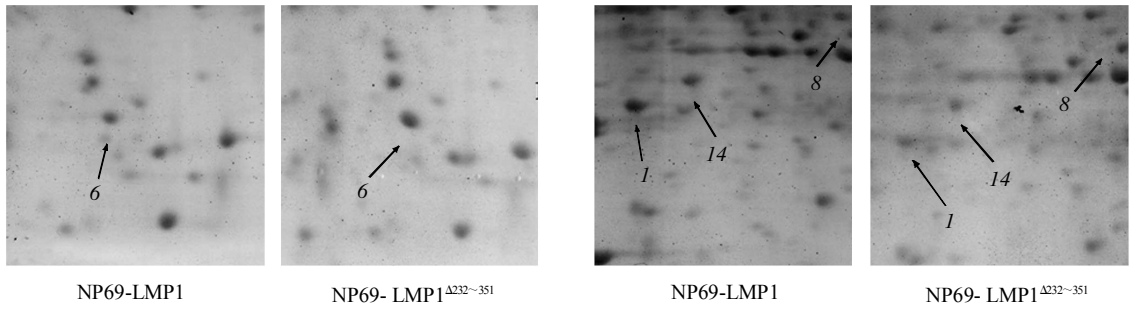


Fig. 4 Magnified region of protein spots between NP69-LMP1 and NP69-LMP1^{Δ232~351}cells

2.5 差异表达蛋白质点的鉴定

利用 Mascot 查询软件搜索 MSDB 或者 NCBI 数据库, 对搜索结果按 Mascot 分数、匹配的片段

数和覆盖率等进行综合考虑判定搜索结果, 总共鉴定了 16 个差异表达蛋白质点. 表 3 所示为鉴定得到的 NP69-LMP1^{Δ232~351}细胞差异表达蛋白.

Table 3 Identified differential protein spots of NP69-LMP1^{Δ232~351} and NP69-LMP1 cells

Spot	Peptide matches	Fold change expressed in NP69-LMP1	AC	Description	pI	M	Coverage (%)	Function
1	14/41	↑ 6.43	P05388	Ribosomal protein P0	5.42	34 424	50	Transcription and translation
2	10/43	↑ 3.25	P21964	Catechol O-methyltransferase	5.26	30 474	52	Metabolic enzymes
3	10/23	↓ 4.32	P36551	Coproporphyrinogen III oxidase	8.59	50 941	28	Metabolic enzymes
4	17/53	↓ 2.98	P07355	Annexin A2	8.53	40 671	47	Signal transduction
5	17/47	↑ 7.75	Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AB	6.49	36 059	37	Transcription and translation
6	20/39	↓ 4.68	P60174	Triosephosphate isomerase 1	6.45	26 910	80	Metabolic enzymes
7	17/47	↑ 3.12	P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	5.89	49 517	39	Transcription and translation
8	12/51	↑ 2.47	P01892	MHC class I histocompatibility antigen HLA-A alpha chain	6.32	41 171	47	Immunoregulation
9	10/25	↓ 3.26	P22695	UQCRC2 protein	8.74	48 584	22	Electron and energy transport
10	37/60	↓ 2.28	P14625	Tumor rejection antigen (gp96) 1	4.77	92 567	41	Molecular chaperones
11	23/41	↑ 2.04	P31930	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	5.94	53 297	50	Electron and energy transport
12	15/47	↓ 3.10	Q9NR45	N-acetylneuraminic acid phosphate synthase	6.29	40 738	45	Metabolic enzymes
13	10/21	↑ 3.28	P50213	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha precursor	6.47	40 022	26	Metabolic enzymes
14	24/50	↑ 2.43	P13674	Prolyl 4-hydroxylase alpha subunit	5.70	61 157	44	Metabolic enzymes
15	16/24	↓ 2.68	P63244	Guanine nucleotide binding protein (G protein)	7.60	35 511	65	Signal transduction
16	8/30	↓ 3.02	P23528	Cofilin 1	8.22	18 719	56	Structural proteins

↑ : The spot obviously up-regulation in NP69-LMP1 to compare with NP69-LMP1^{Δ232~351}; ↓ : The spot significant down-regulation in NP69-LMP1 to compare with NP69-LMP1^{Δ232~351}.

2.6 实时荧光定量 RT-PCR 检测差异蛋白的 mRNA 表达水平

采用实时荧光定量 RT-PCR 检测部分差异蛋白的 mRNA 在 NP69-LMP1 和 NP69-LMP1^{Δ232~351} 细胞

中的表达水平(表 4)。所有的实时荧光定量 RT-PCR 扩增产物进行测序, 结果显示均为特异的 PCR 产物。差异蛋白的 mRNA 表达实时荧光定量 RT-PCR 检测结果如下。

Table 4 Relative mRNA expression level of NP69-LMP1 and NP69-LMP1^{Δ232~351} cells

Gene	NP69-LMP1 vs. NP69-LMP1 ^{Δ232~351}
Ribosomal protein P0	Mean 5.31 ± 0.23 folds increased in NP69-LMP1
Annexin A2	Mean 2.30 ± 1.20 folds decreased in NP69-LMP1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Mean 6.45 ± 0.49 folds increased in NP69-LMP1
Isocitrate dehydrogenase 3	Mean 2.21 ± 0.13 folds increased in NP69-LMP1
G protein	Mean 2.07 ± 0.47 folds decreased in NP69-LMP1

2.7 Western blot 验证转染细胞中蛋白质的差异表达

选取 NP69-LMP1^{Δ232~351} 在表达上调的 G 蛋白和表达下调核内不均 - 核糖核蛋白 A/B 两种蛋白质, 验证差异蛋白在 NP69-LMP1 和 NP69-LMP1^{Δ232~351} 细胞中的表达情况, 结果与蛋白质组学鉴定的结果几乎一致。

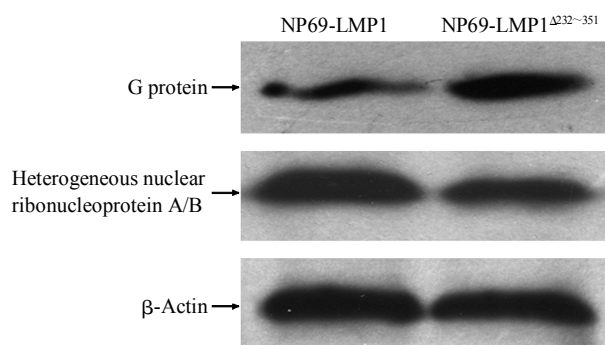


Fig. 5 Detection of differential expression protein by Western blot

3 讨 论

LMP1 在大多数鼻咽癌(NPC)组织的表达以及其对永生化上皮细胞的转化作用, 提示 LMP1 与鼻咽癌发病关系密切, 但缺乏直接证据。香港大学 Dr. Tsao 等最近建立了正常鼻咽上皮体外永生化细胞系 NP69, 并导入 LMP1 真核表达载体, 发现 LMP1 能使 NP69 细胞产生一系列恶性表型^[7, 8]。自 Gires 等^[9]首次提出 LMP1 羧基端活化区 3(275~330aa), 证实其参与调节 JAK3/STAT 信号通路以来, 该区域在上皮细胞中的功能尚不十分清楚。为

了全面探讨 LMP1-CTAR₃ 可能的功能活性, 本实验采用逆转录病毒感染的方式, 将野生型和 CTAR₃ 突变型 LMP1 导入 LMP1 表达阴性的永生化鼻咽上皮细胞 NP69, 通过筛选获得稳定高表达后, 对转化细胞的增殖进行了观察(如图 2 与表 2), 从整体上看, LMP1 促 NP69 细胞增殖转化(生长速度加快, 克隆形成能力增加)的作用在 Dr. Tsao 等^[7]工作的基础上得到进一步肯定。

长期以来, 有关 LMP1 对动物和人的纤维细胞和部分永生化上皮细胞的转化有较多的报道, 本研究结果进一步支持 LMP1 与包括鼻咽癌在内的多种上皮源性恶性肿瘤发病密切相关的理论。令人感兴趣的是: CTAR₃ 突变型 LMP1 促转化细胞的增殖作用比野生型 LMP1 明显降低, 强烈提示 CTAR₃ 区域部分参与了 LMP1 对细胞增殖的调控。Gires 等^[9]报道 LMP1-CTAR₃ 参与了 JAK3/STAT 信号通路的活化。同时 JAK3 的活化能引起 STAT 的磷酸化参与细胞增殖^[9]。因此, 我们推测 LMP1-CTAR₃ 可能通过 JAK3/STAT 通路调控细胞的增殖, 但具体的调控机制尚需进一步探讨。

有关 LMP1 促上皮细胞转化的机制已有一些相关的报道, 多是从一些独立的信号途径进行探讨, 且常常出现一些矛盾的结果, 尤其是有关 CTAR₃ 的功能特点, 缺乏统一的认识和深层次结论。本研究采用比较蛋白质组学方法, 利用双向凝胶电泳技术建立了 NP69-LMP1 和 NP69-LMP1^{Δ232~351} 细胞总蛋白的 2-DE 图谱, 图像分析识别在上述细胞中差异表达的蛋白质, 并在此基础上应用 MALDI-TOF 质谱技术共鉴定了 16 个差异表达的蛋白质, 为全方位深入探讨提供了重要的信息和素材, 就其中两

个较为重要的蛋白质进行分析。

G 蛋白(GTP-binding protein, GTP 结合蛋白)是调节细胞内信号转导过程的重要蛋白质,在细胞信号转导中起重要的作用。Navakauskiene 等^[10]的研究结果显示,细胞中的 G 蛋白磷酸化修饰后,可促进细胞凋亡。由此我们推测,在 NP69-LMP1 细胞中 LMP1 通过促使细胞中 G 蛋白下调表达(与 NP69-LMP1^{Δ232~351}相比),而使磷酸化的部分减少,导致促细胞凋亡通路中蛋白质活化降低,细胞凋亡减少,间接参与细胞的增殖,对照组(NP69-LMP1^{Δ232~351})中细胞增殖速度较慢可能与 G 蛋白的表达上调有关。

异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)是三羧酸循环的限速酶,负责催化异柠檬酸氧化脱羧成 α-酮戊二酸,并将氧化型 NAD 还原成 NADH^[11]。由此我们结合 NP69-LMP1 细胞中异柠檬酸脱氢酶表达上调(较 NP69-LMP1^{Δ232~351}),以及 NP69-LMP1 细胞生长和增殖较 NP69-LMP1^{Δ232~351}细胞快的生物学特点,可以推测 CTAR₃可能调节异柠檬酸脱氢酶而影响细胞的代谢和物质的合成,在 LMP1 促进细胞增殖与转化中发挥作用。

为了验证蛋白质差异表达水平,采用了实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 方法,验证结果与蛋白质组学研究的结果一致(表 3, 4 和图 5),说明本研究采用蛋白质组学方法鉴定的蛋白质确实在细胞之间存在差异表达。

总之,本研究建立了 NP69-LMP1 和 NP69-LMP1^{Δ232~351}细胞的蛋白质 2-D 图谱,鉴定了 16 个与 LMP1-CTAR₃活性区域参与调节细胞增殖、转化等作用相关的蛋白质。至于 LMP1-CTAR₃活性区域如何调控这些蛋白质的表达,以及这些蛋白质如何发挥促进上皮细胞生长、增殖与转化等作用还需要进行深入研究。

致谢 感谢香港大学 Dr. Tsao 惠赠永生鼻咽上皮

细胞 NP69。

参 考 文 献

- 1 Thompson M P, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2004, **10**(3): 803~821
- 2 Li H P, Chang Y S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci*, 2003, **10**(5): 490~504
- 3 Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, *et al.* Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *The EMBO J*, 1999, **18**(11): 3064~3073
- 4 He Z M, Xin B Z, Yang X, *et al.* Nuclear Factor-κB activation is involved in LMP1-mediated transformation and tumorigenesis of Rat-1 fibroblasts. *Cancer Research*, 2000, **60**(7): 1845~1848
- 5 张志伟, 张 琼, 余艳辉, 等. Epstein-Barr 病毒潜伏性膜蛋白 1 CTAR3 缺失突变体的构建与功能分析. *微生物学报*, 2008, **48**(10): 1308~1313
Zhang Z W, Zhang Q, Yu Y H, *et al.* *Acta Microbiolog Sin*, 2008, **48**(10): 1308~1313
- 6 Zhang Q, Zhang Z W, Wang C K, *et al.* Proteome analysis of the transformation potential of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 in nasopharyngeal epithelial cells NP69. *Mol Cell Biochem*, 2008, **314**(1~2): 73~83
- 7 Tsao S W, Wang X H, Liu Y, *et al.* Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1590**(1~3): 150~158
- 8 Angela K F, Liu Y, Wang X H, *et al.* Alterations of biologic properties and gene expression in nasopharyngeal epithelial cells by the Epstein-Barr Virus-encoded latent membrane protein 1. *Lab Invest*, 2003, **83**(5): 697~709
- 9 Lin Q, Lai R, Chirieac L R, *et al.* Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells. *Am J Pathol*, 2005, **167**(4): 969~980
- 10 Navakauskiene R, Treigyte G, Savickiene J, *et al.* Alterations in protein expression in HL-60 cells during Etoposide-induced apoptosis modulated by the caspase inhibitor ZVAD.fmk. *Ann NY Acad Sci*, 2004, **1030**(1): 393~402
- 11 Kim S Y, Lee S M, Tak J K, *et al.* Regulation of singlet oxygen-induced apoptosis by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Mol Cell Biochem*, 2007, **302**(1~2): 27~34

Influence of Epstein-Barr Virus Encoded Latent Membrane Protein 1-CTAR₃ for Proteinic Expression and Cellular Proliferation of NP69 Cells*

ZHANG Zhi-Wei^{1,2)}, ZHANG Qiong¹⁾, YU Yan-Hui¹⁾, OUYANG Yong-Mei¹⁾, HE Zhi-Min^{1)**}

¹⁾Cancer Research Institute, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾Cancer Research Institute of Medical College, University of Southern China, Hengyang 421001, China)

Abstract To investigate transduction mechanism on carboxyl terminal activating region 3 of Epstein - Barr virus encoded latent membrane protein 1 (LMP1) in nasopharyngeal epithelial cells NP69, the NP69 cell lines were respectively infected, applied the approach of retroviruses infection, by RV-LMP1 and RV-LMP1^{Δ252~351} retroviruses. Therefore, the NP69-LMP1 and NP69-LMP1^{Δ252~351} cell lines of stable expression LMP1 were established. Sequentially, cellular proliferation of the NP69-LMP1 and NP69-LMP1^{Δ252~351} cell lines was compared to draw growth curve, experiment plate clone formation and test soft agar colony forming. Meanwhile, adopted proteomic methods, the differential expression proteins were identified between NP69-LMP1 and NP69-LMP1^{Δ252~351} cell lines, and the expression levels of partial identified proteins were verified by Western blotting and fluorescent real-time quantitative RT-PCR. The results showed: 1) the ability of LMP1^{Δ252~351} promoting NP69 cell proliferation was obviously decreased to compare with wild type LMP1 ($n=3$, $P < 0.05$). 2) 16 proteins, 8 up- and 8 down-regulated ones, of LMP1-CTAR₃ mediated regulation were identified from infected NP69 cell lines. 3) The differential expression of partial identified proteins was similar with 2-DE separated ones and confirmed by Western blotting and fluorescent real-time quantitative RT-PCR. These results suggested that LMP1-CTAR₃ is the important activating domain of inducing cellular proliferation and the domain probably plays the role of mediating to regulate the expression of G-protein, isocitric enzyme, and so on.

Key words Epstein-Barr virus(EBV), latent membrane protein 1(LMP1), carboxyl terminal activating region 3, differential expressed protein

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00635

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470668), Natural Science Foundation of Hunan province (07JJ6164), The Health Department Scientific Research Foundation of Hunan Province (B2006-100) and Construct Program of The Key Discipline in Hunan Province.

**Corresponding author. E-mail: hezhimin2005@yahoo.com

Received: September 15, 2008 Accepted: October 13, 2008