

3405~ 3410

19 Lindahl T. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision repair. *Pro Nuc Acid Res*, 1979, **22**: 139~ 192

20 Lawrence C W. Molecular mechanisms and their implications for environment protections. New York: Plenum Press, 1983. 34~ 60

A Sensitive Assay for the Detection of Cytosine Deamination Rate and Its Application. CHEN Hong (*Department of Chemistry, Duke University, Durham, NC 27708, USA*); LI Yumin (*Institute of Radiation Medicine, Chinese Acadmy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China*).

Abstract Deamination of bases is regarded as the major factor for mutation in DNA and it will induce transition mutation if the products of

deamination have not been repaired. Now a new sensitive genetic assay to determine quantitatively deamination of bases in DNA special site has been introduced to understand the relationship between DNA structure and its chemical activities. The assay is based on reversion of a mutant of CCC proline coding sequence which is located in Lac Z α gene of bacteriophage M13mp2 from a colorless to blue plaque phenotype. This approach is highly sensitive; deamination of a single cytosine residue in 10^5 M13mp2 DNA molecules can be detected. Besides, the kinetic rate constant of the reaction and the activation energy of deamination can be calculated.

Key words cytosine, deamination, DNA mutation

EB 病毒 BNLF-1 基因的分子生物学研究进展*

马先勇 曹 亚 姚开泰
(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 位于 EB 病毒基因组 U₅-TR 区内的 BNLF-1 基因, 其转译产物为潜伏膜蛋白 (latent membrane protein1, LMP-1), 由于 LMP-1 可以导致细胞转化并在 EB 病毒致癌过程中具有重要作用, 因而成为近年来 EB 病毒分子生物学及相关肿瘤如人鼻咽癌、伯基特淋巴瘤、何杰金氏病等疾病因发病学研究的热点, 并取得了一批有重要意义的成果, 文章从 BNLF-1 的基因结构及表达调控, LMP 蛋白的结构及生化功能, LMP-1 的生物学功能和 LMP-1 研究进行评述.

关键词 EB 病毒, BNLF-1 基因, 表达调控, 结构, 功能

EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 属人类疱疹病毒类, 它是一种广泛存在于人体的 DNA 致癌病毒. 1946 年 Epstein 和 Barr 首次从非洲儿童伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma, BL) 组织建立了一株可传代的类淋巴母细胞, 他们发现这一细胞株中有疱疹病毒颗粒 (后证明为 EB 病毒). 随后, 人们利用血清学、流行病学、分子生物学等方法证明:

EB 病毒能够导致免疫缺陷型患者的单核细胞及淋巴细胞增生性疾病^[1]. 同时, EB 病毒与人 BL、鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC)、何杰金氏病 (Hodgkins disease) 具有密切的联系. 在 EBV 的病毒粒子中其 DNA 以线性双链的构型存在, 基因组大小为 172 kb,

* 国家八·五攻关项目 (859140304).
收稿日期: 1996-08-09, 修回日期: 1996-12-09

由五种重复序列单位，即末端重复序列 (terminal repeat sequence, TR)，内部重复序列 (internal repeat sequence) IR₁, IR₂, IR₃, IR₄ 和五种间隔的特异性序列 (unique sequence) U₁, U₂, U₃, U₄, U₅ 所构成，其结构见图 1. 进一步的研究表明：位于 EBV 基因组 U₅-TR 区内的 BNLF-1 基因是其潜在瘤基因，它编码的潜伏膜蛋白 LMP-1 可以诱导培养的裸鼠细胞形成转化灶，因而目前在 EBV 的分子生物

学研究中形成了以 LMP-1 为中心的研究热点.

1 BNLF-1 的基因结构及表达调控

EB 病毒的全基因组结构及 LMP-1 的编码基因 BNLF-1 的结构如图 1 所示. 在 EBV 基因组的 U₅-TR 区的 BamH I Nhet 区域，有一个由左向的启动子 (EDL1, 169546) 控制转录的片段，称之为 BNLF-1 基因. BNLF-1 基因由三个外显子组成，其大小分别为 a

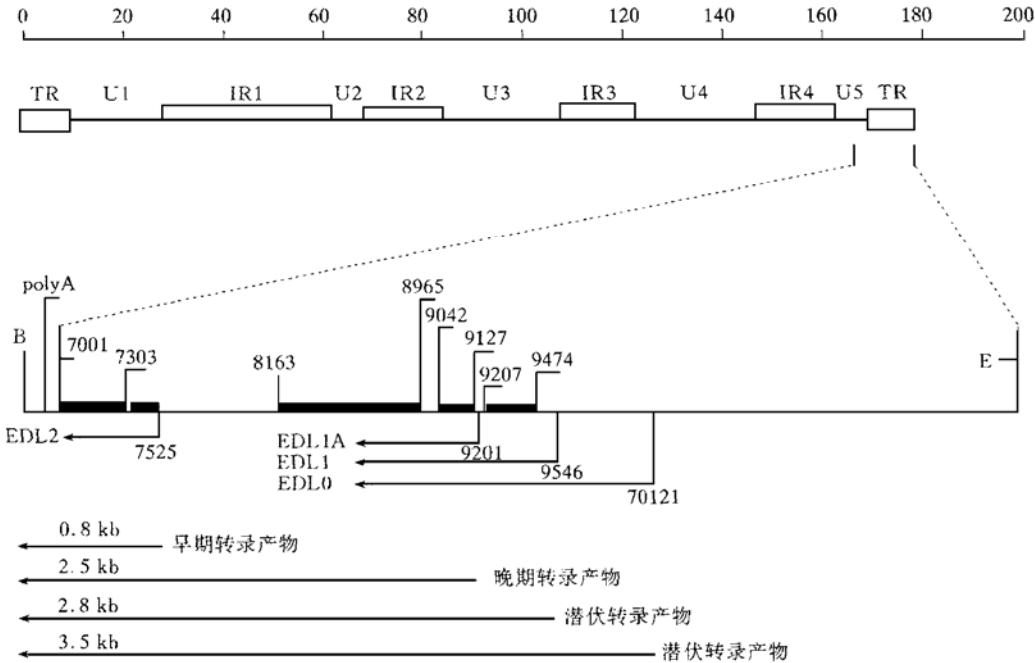


图 1 EB 病毒基因组结构和 U₅-TR 区基因表达及其产物 mRNA 的详细图谱

(264 bp)、b (85 bp)、c (803 bp). BNLF-1 基因的 poly A 位于 166 946~ 166 950 处. 由 EDL1 启动子转录产生一个大小为 2.8 kb 的 mRNA，大多数情况下潜伏膜蛋白即由此 mRNA 转译而来. 在外显子 a 下游的毗邻处有一个另外的左向转录启动子 EDL1A，由此启动子转录产生大小为 2.5 kb 的晚期转录产物，其 poly A 位点与 EDL1 启动子的相同. 在基因组的 169 206~ 169 129 及 169 041~ 168 966 处有两对拼接供体受体位点，这是转录过程中基因组内含子剪切部位. 在潜伏生活周期中，

来自 EDL1 启动子的转录产物往往只含有 BNLF_{1C} 开放阅读框并在 166 950 的 poly A 点终止. 其翻译产物为 42 ku 的膜蛋白. BNLF-1 的启动子包括 1 个 J_k 识别序列 (CTGGGAA)，J_k 为细胞 DNA 结合蛋白. 在类淋巴母细胞系 (lymphoblastoid cell lines, LCLs) 中，EDL1 启动子表达 2.8 kb 的 mRNA 可由 EBNA2 跨域激活^[2]，且 EBNA2 与细胞转录调节因子 J_k 及 PU1 发生作用^[3]. 在 BNLF-1 基因下游的较远端处，还有一个早裂解周期启动子 EDL2，这也是一个左向转录

的启动子, 由这个启动子所控制的转录基因称为 BNLF-2, 其对应的蛋白质产物为 LMP-2. 由于在 BNLF-2 内有两个不同的开放阅读框 ORF, 它们有 8 个相同的外显子及 1 个不同的 5' 外显子, 故 EDL2 控制下的编码区实际上可分为 BNLF-2a 及 BNLF-2b. 其转录产物 RNA 大小为 0.8 kb^[4], 相对应的转译产物分别为 LMP-2a 和 LMP-2b, BNLF-2 基因的 poly A 位于 166 946 处.

此外, 目前的研究发现, 在 U₅ 下游的 TR 区域 (171 075~ 171 125), 有一个新的启动子 (暂定名为 EDL)^[5]. 此启动子亦为左向转录, 其序列中不含有 TATA 或 CAAT 盒, 而只含有 GC 富集区, 推测 GC 富集区可单独与转录因子 SP₁ 结合而起始转录过程, 转录大小为 3.5 kb mRNA 的产物. 对 C₁₅ 细胞系 (一个以裸鼠传代的 NPC 细胞系) 和 NPC 标本中的 EBV LMP 表达进行 RNA 印迹显示 2.8 kb 及 3.5 kb 的 mRNA 表达量基本相等; 但在 IB₄ 细胞系中, 2.8 kb mRNA 的表达水平是 3.5 kb mRNA 的 9 倍多; 在 Akafa 细胞系中, 2.8 kb mRNA 表达水平是 3.5 kb mRNA 的 10 倍以上.

2 LMP-1 蛋白质的结构及生化功能

由 BNLF-1 翻译产生的 LMP-1 蛋白, 由三种不同的结构域组成^[6]: a. 24 个氨基酸残基所组成的氨基末端胞浆区; b. 跨膜疏水结构区 (由 5 个短的反转结构分开而形成 6 个不同的跨膜区); c. 200 个氨基酸残基结构成的羧基末端胞浆区. 其结构见图 2.

基因诱变的分子遗传学分析表明^[7]: a. N 端功能区, 包括从 N 端开始至第四跨膜区, 在这个区域内无转化作用的特殊序列, 推测与 LMP-1 蛋白在胞膜上的定位及 LMP-1 在胞膜上的聚合作用相关, 有实验表明: 将 N 端编码 Arg 及 Pro 两种氨基酸残基的 DNA 编码区删除, 可使突变子对 B 细胞的转化能力降低 90%, 这种结果提示了富电荷的 N 端对于 LMP-1 聚合作用的重要性; b. 在胞膜上的羧

基末端区 1 (从 187 至 232 氨基酸残基), 含有对初级 B 细胞转化作用的完整效应子, 这个胞溶性的效应子结构域又称 CTAR-1 (C-terminal activating regions); c. 羧基末端区 (从密码子 231 至 386), 含有对纤维母细胞转化作用的完整效应子 CTAR-2, 研究表明 NF- κ B 主要与这个效应子作用. 而 CD₅₄, CD₄₀ 的表达都需要这两个效应子^[8].

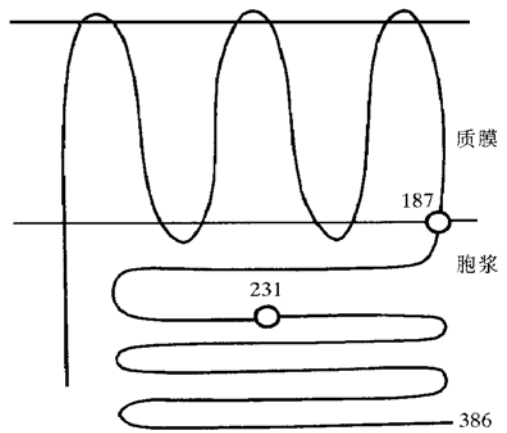


图 2 质膜上 LMP-1 的生物化学结构

LMP-2a 有一个 119 氨基酸残基所组成的氨基末端, 几个至少由 16 个氨基酸残基构成的疏水区和一个 27 氨基酸残基构成的羧基末端; LMP-2b 则缺乏 LMP-2a 氨基末端的前 120 个氨基酸. LMP-2 和 LMP-1 同样定位于浆膜上, 其功能和 LMP-1 介导的激活作用有关, 可能是 LMP-1 功能的一种辅助成分. Longnecker 等^[9]曾证明 LMP-2 是 EBV 转化的 B 淋巴细胞中酪氨酸激酶的底物, 其中 LMP-2a 的前 167 个氨基酸是酪氨酸激酶作用的关键部位. Burkhard 等^[10]进一步证明 LMP-2a 和 Src 家族酪氨酸激酶有特殊的联系, 特别是与该家系中的 lyn 及 fyn 激酶具有直接的联系, 即 LMP-2a 为这些激酶的反应底物. 由于酪氨酸激酶在生长因子介导的跨膜信号传导系统中的重要作用, 因而一些学者认为 LMP-2a 和酪氨酸激酶的这种相互关系可能是 EBV 对细胞生长实施调控的一个重要途径.

3 LMP-1 的生物学功能

LMP-1 是一种转化蛋白, 根据细胞定位,

推测其在细胞的信号传递及细胞骨架形成过程中具有重要作用. 研究表明: LMP-1 的生物学功能主要包括: a. 在裸鼠纤维细胞表达

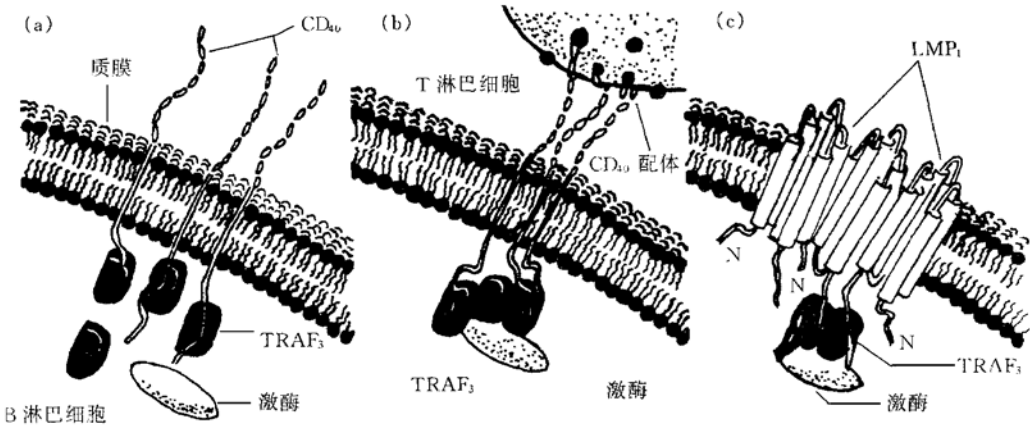


图3 正常B淋巴细胞中激活信号的传递及EB病毒潜伏膜蛋白LMP₁对信号传递过程的干扰

(a) CD₄₀受体均匀分布在未活化的B淋巴细胞膜上;(b) 激活的T淋巴细胞膜上的CD₄₀配体在其表面聚集,并通过CD₄₀受体将激活信号传至B细胞胞浆中;(c) 聚集在B细胞膜上的LMP-1模拟激活的CD₄₀受体功能,不断将激活信号传递至胞浆中.

LMP-1 可产生肿瘤^[11]; b. 上调 B 细胞标志及细胞粘附分子 CD₂₃, CD₄₀, CD₅₄ 等的表达, 下调 CD₁₀ 的表达, 激活细胞粘附分子 LFA₁, LFA₃, ICAM₁ 等的表达^[8, 12]; c. 诱导核转录因子 (如 NF-κB) 的表达活化^[13]; d. 可以跨域激活一些病毒的启动子, 如 HIV-1 LTR 的启动子、HPV 启动子、人类 T 细胞白血病病毒 I 型 (HTLV-1) 的启动子表达^[14]. 这些病毒启动子的表达活化主要是通过 NF-κB 的作用, 因为 LMP-1 可选择性地修饰抑制分子 IκBα (inhibitory molecular, IκBα) 使其失活从而解除 IκBα 对 NF-κB 的抑制, 使 NF-κB 活化表达^[15]. e. LMP-1 可诱导原瘤基因的表达, 如诱导 bcl2 基因的表达^[6, 16], 同时也能上调抑瘤基因 P₅₃ 的表达^[17], 用 LMP-1 表达质粒转染 B 细胞的实验显示 P₅₃ 表达水平升高 5 倍. 新近对 TNF 相关因子 (TRAFs) 作用机理的深入研究表明^[18]: TRAF₃ 能与 CD₄₀ 受体的胞浆部结合, 从而介导细胞激活. TRAFs 是如何将信号传递至核中的仍不清楚, 一种最可能

的模式就是 TRAF₃ 一端与 CD₄₀ 相连, 另一端与某种激酶相连, 激酶则可由 CD₄₀ 激活 (图 3). LMP₁ 在质膜上的聚合可形成与 CD₄₀ 受体相似的结构, 且这种结构一直存在于胞膜表

表 1 LMP-1 的生物学功能

靶基因(靶蛋白)	效 应
EGFR	诱导表达
A20	诱导表达
Ca M Kinase-Gr	诱导表达
CD ₂₃ , CD ₄₀ , CD ₅₄ (B-cell marker)	上调表达
粘附分子 (ICAM-1, LFA-1, LFA-3)	上调表达
bcl2	上调表达
p53	上调表达
NF-κB	上调表达
K ₆ 角蛋白	诱导表达
TRAFs(靶蛋白)	蛋白质/蛋白质相互作用 干扰 TRAFs/CD ₄₀ 信号传递
Cytokeratin	下调表达
HIV Type 1 的 LTR	诱导表达
HPV 启动子	诱导表达
HTLV-1 启动子	诱导表达
CD ₁₀ (CAILA)	下调表达

面, 因而它可以通过 TRAF₃ 的介导, 不断地激活胞浆中的某种激酶, 从而使细胞获得连续的生长信号. 可以预测, 随着研究的不断深入, LMP-1 蛋白的生化功能及在细胞信号传递中精确干扰作用的澄清, 将会为 LMP-1 蛋白是否为癌蛋白提供更为全面准确的实验证据. LMP-1 的主要生物学功能总结如表 1.

4 LMP-1 研究的展望

对于 BNLF-1 基因精细物理图谱的分析, 特别是对其翻译产物 LMP₁ 结构和功能的深入研究, 极大地扩展了人们对 EB 病毒的认识. 由于其细胞定位的确定及在整个细胞信号传导途径中作用的发现, 使人们有理由相信, LMP-1 是通过干扰细胞信号传递过程发挥作用的. 令人感到惊奇的是 LMP-1 可以激活核转录因子 NF- κ B 的表达, (NF- κ B 作为一个基因家系, 与细胞原瘤基因 *c-rel* 具有同源性), 而 NF- κ B 能够与免疫球蛋白 κ 基因的增强子结合, 作为一种有效的跨域调节因子调节 κ 基因的启动表达, 这些实验表明 EB 病毒可与 κ 基因进行协同作用. a. 已有人^[19]用 EBV 永生 B 淋巴细胞时发现, 被 EBV 感染的细胞其 *cdc-2*, *cyclinE*, *CD23*, *cyclin D₂* 基因的表达上调 100 倍以上, 由于这些基因的表达对细胞分裂有正调控作用, 因而探讨 EBV 的 BNLF-1 基因表达与细胞周期之间的关系将具有重要意义; b. 近年来 Cao 等^[20]从人鼻咽癌细胞株中所克隆的具有转化能力的 2.8 kb EcoR I 片段与 κ 基因高度同源这一事实提示我们, 免疫球蛋白 κ 基因与 NPC 的原瘤基因可能具有非常密切的联系, 因而下一步所要作的工作即是通过基因剔除的方法产生 κ 基因缺陷的小鼠, 并对这种小鼠以 EBV 感染, 进行 NPC 易感性的体外和体内研究, 在此基础上对 κ 基因进行突变分析及精细的功能研究, 从而最终确定其在 NPC 发病中的作用; c. 对 BNLF-1 的表达进行全面研究, 由于在 U₁-TR-U₅ 区内有多个启动子, 且目前的资料表明在不同疾病或组织中可有不同的启动子表达, 对这方面的深入研

究将会揭示出各个启动子表达的组织及时空特异性, 从而为其作为不同的疾病病因因子提供详实的分子生物学依据; d. 对 LMP-1 蛋白质生化功能进行深入研究, 从而确定在细胞信号传递过程及在基因转录中的作用, 为最终阐明由 EBV 所致的各种疾病发生机理提供可靠的理论依据.

参 考 文 献

- 1 Miller G. Epstein-Barr virus biology, pathogenesis, and medical aspects. New York: Raven Press Ltd, 1990. 1921~1958
- 2 Grossman S R, Johnsen E, Tong X *et al.* The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivation is directed to response elements by the J κ recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 7568~7572
- 3 Fahraeus R, Jansson A, Sjöblom A *et al.* Cell phenotype dependent control of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene regulatory sequences. *Virology*, 1993, **195**: 71~80
- 4 Busson P, McCoy R, Sadler R *et al.* Consistent transcription of the Epstein-Barr virus LMP2 gene in *Nasopharyngeal carcinoma*. *J Virol*, 1992, **66**: 3257~3262
- 5 Robert H S, Nancy R. The Epstein-Barr virus 3.5-kilobase from a TATA-less promoter with in the first terminal repeat. *J Virol*, 1995, **69**: 4577~4581
- 6 Rowe M, Peng-Polon M, Huen D S *et al.* Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1, a B-cell specific response that is delayed relative to NF- κ B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol*, 1994, **68**: 5602~5612
- 7 Kaye K M, Izumi K M, Mosialos G *et al.* The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function with in the terminal 155 residues. *J Virol*, 1995, **69**: 675~683
- 8 Huen D S, Henderson S A, Croon-Carter D *et al.* The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) mediates activation of NF- κ B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene*, 1995, **10**: 549~560
- 9 Longnecker R, Druker B, Thomas M *et al.* An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J Virol*, 1991, **65**: 3681~3692
- 10 Burkhardt A L, Bolen J B, Kieff E *et al.* An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J Virol*, 1992, **66**: 5161~5176
- 11 Wang D, Lebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 1985, **43**: 831~840
- 12 Wang F, Gregory C, Sample C *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear protein 2 and 3c are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol*,

1990, **64**: 2309~ 2318

13 Johannsen E, KOH E, Mosialos G *et al.* Epstein Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 is mediated by $\text{J}\kappa$ and $\text{P}\mu$ 1. *J Virol*, 1995, **69**: 253~ 262

14 Hirai R, Suzuki T, Fujisawa J I *et al.* Tax Protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor κB and induces nuclear translocation of transcription factor $\text{NF-}\kappa\text{B}$ proteins for transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 3584~ 3588

15 Herrero J A, Mathew P, Paya C V. LMP-1 activates $\text{NF-}\kappa\text{B}$ by targeting the inhibitory molecule $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. *J Virol*, 1995, **69**: 2168~ 2174

16 Hammarskjold M L, Simurda M C. Epstein Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activity. *J Virol*, 1992, **66**: 6496~ 6501

17 Weiping C, Neil R C. Epstein Barr virus nuclear antigen 2 and latent membrane protein independently transactivate p53 through induction of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activity. *J Virol*, 1996, **70**: 4849~ 4853

18 Kieff E. Epstein Barr virus: increasing evidence of a link to carcinoma. *N Engl J Med*, 1995, **333**: 724~ 726

19 Hollyoake M, Stuhler A O, Farrell P *et al.* The normal cell cycle activation program is exploited during the infection of quiescent B lymphocytes by Epstein Barr virus. *Cancer Res*, 1995, **55**: 4784~ 4787

20 Cao Ya, Yi Sun, Poirier S *et al.* Isolation and partial characterization of transformation associated sequence from human nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinogenesis*, 1991, **4**: 297~ 307

Progress in Molecular Biology of BNLF-1 Gene of EB Virus. MA Xianyong, CAO Ya, YAO Kaitai (*Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*).

Abstract The BNLF-1 gene located in U₅-TR region of Epstein-Barr virus genome encodes a latent membrane protein (LMP-1). As the protein can transform B cells and plays a key role in the carcinogenesis of EB virus, so it has become the “hot spot” of studying for the diseases relevance to EB virus, such as nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma, Hodgkins disease etc, and also the molecular biology of EB virus. A series of achievements have been achieved, the progress in following aspects are reviewed: 1. the structure and expressing regulation of BNLF-1 gene; 2. the structure and biochemical function of LMP-1 protein; 3. the biological function of LMP-1; 4. looking forward to the future.

Key words Epstein-Barr virus, BNLF-1 gene, expression and regulation, structure, function

nov 基因的研究*

曾宪春 蒋达和 李文鑫¹⁾
(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

B. PERBAL

(Laboratoire d'Oncologie virale et Moléculaire, Institut Curie, 91405-Orsay Cedex, France)

摘要 nov 基因是最近发现的一种新的细胞癌基因, 在细胞的增殖、癌变及胚胎发育过程中可能起着重要的调节作用. 文章综述了 nov 基因的发现、结构功能、表达调节特点以及与相关基因的关系.

关键词 nov 基因, 肾癌, Wilms 肿瘤, 细胞生长调节因子, 基因表达

自 80 年代初在人膀胱癌细胞株中发现人的癌基因以来, 癌基因的研究取得了许多激动人心的成就, 已经成为分子癌学研究中最活跃的领域之一. 癌基因的研究不仅使人们对肿瘤的癌变机理有愈来愈深入的了解, 而且其研究成果已逐步应用于临床诊断和治疗. 癌基因的

蛋白产物在正常细胞增殖和分化过程中, 尤其在胚胎发生过程中起着重要的调节作用^[1]. 本文介绍的是最近在肾癌细胞中发现的一种新

* 国家自然科学基金 (39470781) 和博士点基金资助课题.
¹⁾ 通讯联系人.
收稿日期: 1996-08-23, 修回日期: 1997-02-20