

EB 病毒潜伏膜蛋白 1 在鼻咽癌细胞中 通过 ERK 介导 Ets-1 表达*

曾 亮¹⁾ 李 敏²⁾ 宋 鑫¹⁾ 陶永光¹⁾ 唐 敏¹⁾ 李 崑¹⁾ 曹 亚¹⁾**

(¹⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾基因公司长沙分公司, 长沙 410011)

摘要 为了探讨 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 对核转录因子 Ets-1 表达和活化的影响, 并证实细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 参与了该过程, 选用可调控表达 LMP1 的鼻咽癌细胞系 L7, 应用蛋白质印迹法检测 Ets-1、p-ERK 蛋白质表达, 免疫共沉淀-蛋白质印迹法检测 Ets-1 磷酸化状态, 使用 ERK1/2 特异性小分子阻断物 PD98059 作用后, 蛋白质印迹法检测 p-ERK、Ets-1 表达及磷酸化变化。结果显示: 在 L7 细胞中诱导性 LMP1 可促进 p-ERK、Ets-1 蛋白质表达及其苏氨酸残基磷酸化, 在一定范围呈时间和剂量效应; 通过 PD98059 对诱导性 LMP1 作用的干预发现, p-ERK 大部分表达被阻断, 而 Ets-1 表达及其苏氨酸磷酸化也被部分阻断, 以上结果提示 ERK 部分介导了 LMP1 诱导 Ets-1 表达和活化。

关键词 EB 病毒, 潜伏膜蛋白 1, Ets-1, 胞外信号调节激酶 (ERK), 鼻咽癌

学科分类号 R78

鼻咽癌是中国南方高发的恶性肿瘤, 大量证据支持 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 是鼻咽癌主要的致病因素之一, 而潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein1, LMP1) 已证实为 EB 病毒编码的主要致癌蛋白。LMP1 致癌分子机制的一个重要方面是通过激活一些核转录因子, 进一步活化这些转录因子所调节的靶基因。我们已在鼻咽癌细胞中证实 LMP1 通过转录因子 AP-1, NF- κ B 调节多个下游基因的表达而影响肿瘤的发生和发展, 并证明 MAPK 家族成员 JNK 介导 LMP1 活化 AP-1 的过程^[1]。

有研究发现癌基因 Ets 家族可能是 LMP1 新的靶基因^[2], 癌基因 Ets 家族也是一类重要的核转录因子, 其中 Ets-1 是 MAPK 家族另一成员胞外信号调节的蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的下游靶基因, Ets-1 可被 ERK 磷酸化而活化。活化的 Ets-1 与各种肿瘤细胞生物学行为密切相关, 并且其在转录水平可调节多种基因表达, 这些效应基因的异常表达与恶性肿瘤的发生和发展密切相关^[3], 故阐明 LMP1/ERK/Ets-1 通路将是对 EB 病毒致癌机制的重要补充。

1 材料和方法

1.1 细胞系

选用 pTet-on-LMP1 HNE2 (L7 细胞), 该细胞系是将四环素基因调控系统导入 EBV 阴性

(LMP1 阴性) 的鼻咽癌细胞系 HNE2, 经过两轮稳定的转染构建而成。该细胞系最突出的特点是: 当强力霉 (doxycycline, Dox) 不诱导时, LMP1 不表达或弱表达, 随着四环素或其衍生物 Dox 浓度增加, LMP1 呈相应的表达增加^[4]。

1.2 主要试剂

1.2.1 PD98059 (#9900, Cell Signaling): 该产品为 MEK1 抑制剂, 可高度选择性地抑制 MAPK/细胞外信号调节激酶的激酶 (MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase, ERKK) 及丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 激酶通路的活化。它以 10~100 mmol/L 的浓度溶解在二甲基亚砷 (DMSO) 中, 在用于体外或细胞实验中, 可在各种缓冲液中稀释而得到所需浓度。由于 ERK 是 MEK1 的下游激酶, 故 PD98059 可阻断 MEK1/ERK 靶基因通路。已有较为肯定的实验数据显示, 50 μ mol/L 的 PD98059 可有效抑制 ERK1/2 的表达^[5,6]。

1.2.2 用于免疫共沉淀的 Protein A Sepharose

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) “鼻咽癌发生发展的基础研究” (G1998051201) 和 “恶性肿瘤侵袭和转移的机理及分子阻遏” (2002CB513100)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805448, Fax: 0731-4470589

E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2002-12-23, 接受日期: 2003-01-28

CL-4B 为 Promega 产品, RPMI-1640 为 GIBCO 产品, 硝酸纤维素膜为 Qiagen 产品, 强力霉素 (Dox) 购自华美生物工程公司, 丙烯酰胺为 Sigma 公司产品, 化学发光试剂盒 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate 和 BCA 法蛋白质浓度检测试剂盒均为 Pierce 产品.

1.3 抗体

Ets-1 为兔多克隆抗体 (Sc-350), 针对人源性 Ets-1 的羧基端, 不和 Ets 家族其他成员发生交叉反应. 磷酸化 ERK (P-ERK) (E-4) 为鼠单克隆抗体 (Sc-7383), 针对 ERK1 和 ERK2 的磷酸化酪氨酸 Tyr-204. α -Tubulin 为鼠单克隆抗体 (Sc-5286), 针对人源性 α -Tubulin 的 149~448 位氨基酸. 磷酸化的苏氨酸抗体 (Sc-5267), 特异性检测含有磷酸化苏氨酸的蛋白质, 不与磷酸化丝氨酸或酪氨酸发生交叉反应; LMP1 为鼠单克隆抗体 (0897, Dako), 与 EB 病毒 BNLFI 编码的 60 ku 潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 反应, 主要识别 LMP1 疏水性羧基端的抗原决定簇. 鼠和兔源性辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗均为 Santa Cruz 产品.

1.4 主要方法

1.4.1 细胞总蛋白提取: 1×10^6 细胞用细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 2% SDS, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L PMSF) 裂解; 超声粉碎 30 s, 沸水浴变性 10 min, 13 000 g 离心沉淀细胞碎片, 上清即为细胞总蛋白; 蛋白质浓度用 BCA 法检测.

1.4.2 蛋白质印迹法 (Western blot): 100 μ g 蛋白质以变性不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 膜与抗体 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤, HRP 标记二抗室温孵育 2 h, PBS 洗涤, 加入化学发光底物, X 光片曝光, 显影, 定影显示阳性条带, 结果用看家基因 α -Tubulin 表达情况作为内对照校正 (loading control).

1.4.3 免疫共沉淀-蛋白质印迹法 (co-immunoprecipitation Western blot): 提取用于免疫共沉淀的细胞总蛋白, 其中细胞裂解液 (100 mmol/L NaCl, 1% NP40, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF) 中加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂; 细胞在裂解液中置于冰上 30 min, 刮下, 在 4℃, 14 000 r/min 离心 10 min, 保留上清液, BCA 法测定蛋白质浓度, 分装,

-70℃ 保存. 将含有样品蛋白质 20 μ g、Sephros 20 μ l、Ets-1 抗体 2 μ g、蛋白酶抑制剂和 PBS 的 100 μ l 反应体系于 4℃ 温和摇动过夜; 4℃, 14 000 r/min 离心 2 min, 去除上清液, 200 μ l PBS 洗涤 2 次, 14 μ l PBS 重悬, 加 5 μ l 上样缓冲液和 2 μ l 10 mmol/L DTT, 于 70℃ 孵育 10 min; 室温, 14 000 r/min 离心 5 s, 将上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 封闭, 磷酸化丝氨酸抗体 4℃ 孵育过夜, TBS 洗涤, HRP 标记二抗室温孵育 2 h, TBS 洗涤, 加入化学发光底物, X 光片曝光, 显影, 定影显示阳性条带, 结果用丽春红染色作为内对照校正 (loading control).

2 结 果

2.1 Dox 诱导 L7 细胞中 LMP1 表达的量效和时间效关系

为了验证 L7 细胞中诱导性 LMP1 表达与 Dox 诱导浓度和诱导时间的关系. 参考以往实验经验^[4], 用 0.006、0.06、0.6、6 mg/L Dox 作用于 L7 细胞 24 h 后, 提取细胞总蛋白, 用蛋白质印迹检测 Dox 诱导 LMP1 表达的剂量效应, 以不加 Dox 作为对照, 选用 Dox 6 mg/L 分别诱导 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、18 h、24 h 后提取总蛋白, 用蛋白质印迹检测 Dox 诱导 LMP1 表达的时间效应, 以不加 Dox 作为对照. 结果显示: 在诱导 24 h 后, 随着 Dox 浓度增加, LMP1 表达增强 (图 1a); 在 24 h 内, 在 6 mg/L Dox 诱导下, 随着诱导时间的延长, LMP1 表达增强 (图 1b).

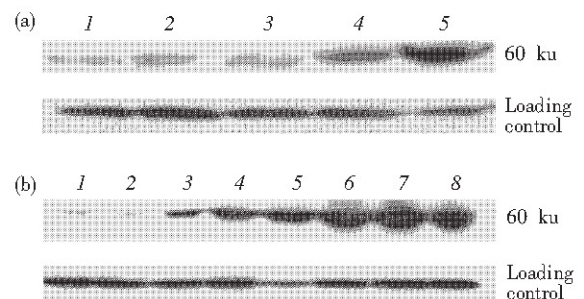


Fig. 1 Expression of LMP1 induced by Dox in L7 cell line

(a) Expression of LMP1 in L7 cell line after induction of Dox for 24h. 1: 0 mg/L Dox; 2: 0.006 mg/L Dox; 3: 0.06 mg/L Dox; 4: 0.6 mg/L Dox; 5: 6 mg/L Dox. (b) Expression of LMP1 in L7 cell line at different time induced by 6 mg/L Dox. 1: 0 h; 2: 1 h; 3: 2 h; 4: 4 h; 5: 8 h; 6: 12 h; 7: 18 h; 8: 24 h.

2.2 诱导性 LMP1 对 Ets-1 表达及磷酸化的调控

2.2.1 诱导性 LMP1 对 Ets-1 表达及磷酸化调控的剂量效应：根据 L7 细胞中 Dox 诱导 LMP1 表达的时间效应，选择 LMP1 表达最强的时间点 24 h，蛋白质印迹检测不同浓度 Dox (0.006、0.06、0.6、6 mg/L) 诱导后 L7 细胞中 Ets-1 表达情况，并进一步检测相应的 Ets-1 磷酸化状态变化。结果显示，在 0.6 mg/L Dox 诱导 24 h 后，Ets-1 总蛋白表达 (图 2a) 及其苏氨酸磷酸化水平 (图 2b) 为最大。

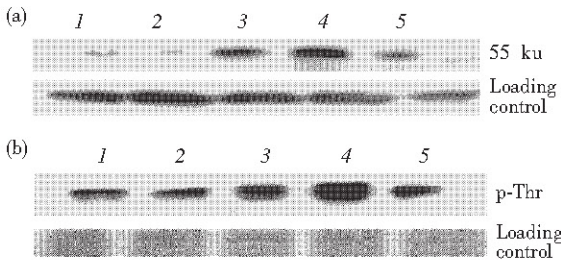


Fig.2 Effect of LMP1 on the expression and activation of Ets-1 in dose-dependent manner

(a) Expression of Ets-1 in L7 cell line induced by LMP1. 1: 0 mg/L Dox; 2: 0.006 mg/L Dox; 3: 0.06 mg/L Dox; 4: 0.6 mg/L Dox; 5: 6 mg/L Dox. (b) Expression of p-theorine of Ets-1 protein in L7 cell line induced by LMP1. 1: 0 mg/L Dox; 2: 0.006 mg/L Dox; 3: 0.06 mg/L Dox; 4: 0.6 mg/L Dox; 5: 6 mg/L Dox.

2.2.2 诱导性 LMP1 对 Ets-1 表达及磷酸化调控的时间效应：根据 L7 细胞中 Dox 诱导 LMP1 表达的剂量效应，选择 LMP1 最大表达时的 Dox 诱导

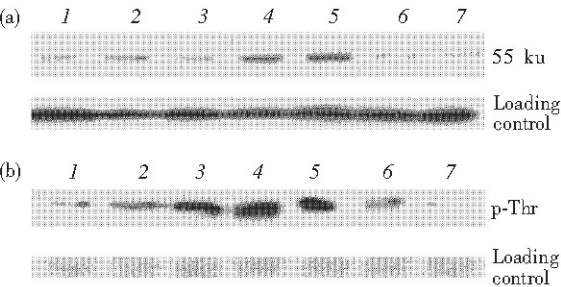


Fig.3 Effect of LMP1 on the expression and activation of Ets-1 in time-dependent manner

(a) Expression of Ets-1 in L7 cell line at different time induced by LMP1. 1: 0 h; 2: 1 h; 3: 2 h; 4: 4 h; 5: 8 h; 6: 12 h; 7: 24 h. (b) Expression of p-theorine of Ets-1 protein in L7 cell line at different time induced by LMP1. 1: 0 h; 2: 1 h; 3: 2 h; 4: 4 h; 5: 8 h; 6: 12 h; 7: 24 h.

浓度 6 mg/L，蛋白质印迹检测诱导不同时间 (1、2、4、8、12、18、24 h) 后 L7 细胞中 Ets-1 表达，并进一步检测 Ets-1 苏氨酸磷酸化状态的变化。结果显示，在 6 mg/L Dox 诱导下，Ets-1 总蛋白表达在诱导 4 h 时 (图 3a)，其苏氨酸磷酸化水平也在 4 h 达到最高 (图 3b)。

2.3 诱导性 LMP1 调控磷酸化 ERK 的表达

2.3.1 诱导性 LMP1 介导 p-ERK 表达的剂量效应：诱导时间为 24 h，蛋白质印迹检测不同浓度 Dox (0.006、0.06、0.6、6 mg/L) 诱导后 L7 细胞中 p-ERK 表达情况。结果显示，在 0.6 mg/L Dox 诱导 24 h 下，p-ERK 的表达最强 (图 4)。

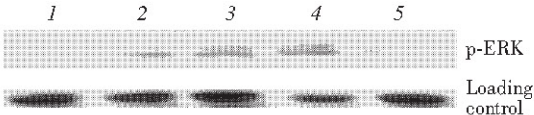


Fig.4 Expression of p-ERK in L7 cell line induced by LMP1 1: 0 mg/L Dox ; 2: 0.006 mg/L Dox ; 3: 0.06 mg/L Dox ; 4: 0.6 mg/L Dox ; 5: 6 mg/L Dox.

2.3.2 诱导性 LMP1 介导 p-ERK 表达的时间效应：选择 Dox 诱导浓度为 6 mg/L，蛋白质印迹检测诱导不同时间 (1、2、4、8、12、18、24 h) 后 L7 细胞中 p-ERK 表达情况。结果显示，在 6 mg/L Dox 诱导下，p-ERK 表达在诱导 4 h 时最强 (图 5)。

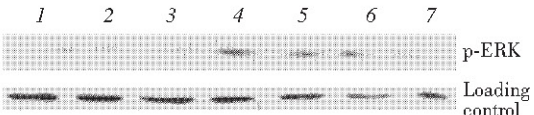


Fig.5 Expression of p-ERK in L7 cell line at different time induced by LMP1

1: 0 h; 2: 1 h; 3: 2 h; 4: 4 h; 5: 8 h; 6: 12 h; 7: 24 h.

2.4 ERK 介导诱导性 LMP1 对 Ets-1 的调控

2.4.1 PD98059 阻断对 L7 细胞中 LMP1 诱导 p-ERK 表达的影响：为了验证 PD98059 的作用是否可以阻断 p-ERK 表达，选用 25 μ mol/L、50 μ mol/L PD98059 作用于 L7 细胞 1 h 后，加入 Dox 0.6 mg/L 诱导 4 h，提取细胞总蛋白检测 p-ERK 表达情况。结果显示 0.6 mg/L 诱导 4 h 后，经 50 μ mol/L PD98059 预处理的细胞中，p-ERK 被大部分阻断，而未加 PD98059 的细胞有较强 p-ERK 表达，25 μ mol/L PD98059 也可部分阻断

p-ERK表达 (图 6).

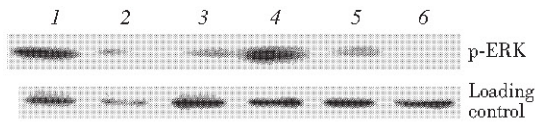


Fig. 6 After pre-treated by PD98059, expression of p-ERK in L7 cell line induced by LMP1

1: 0 mg/L Dox; 2: 25 μmol/L PD98059 + 0 mg/L Dox; 3: 50 μmol/L PD98059 + 0 mg/L Dox; 4: 0.6 mg/L Dox; 5: 25 μmol/L PD98059 + 0.6 mg/L Dox; 6: 50 μmol/L PD98059 + 0.6 mg/L Dox.

2.4.2 PD98059 阻断对 L7 细胞中 LMP1 诱导 Ets-1 总蛋白表达及苏氨酸磷酸化的影响: 选用 PD98059 25 μmol/L、50 μmol/L 作用于 L7 细胞 1 h 后, 加入 0.6 mg/L Dox 诱导 4 h, 提取细胞总蛋白检测 Ets-1 表达情况. 结果显示, 在 0.6 mg/L Dox 诱导 4 h 后, 经 50 μmol/L PD98059 预处理的细胞中 Ets-1 表达被部分阻断 (图 7a). 进而在 PD98059 50 μmol/L 作用 1 h 后, 0.6 mg/L Dox 诱导 4 h 后, 检测 L7 细胞中 Ets-1 磷酸化苏氨酸表达情况. 结果显示, PD98059 同样部分阻断了 LMP1 对 Ets-1 苏氨酸磷酸化的诱导 (图 7b).

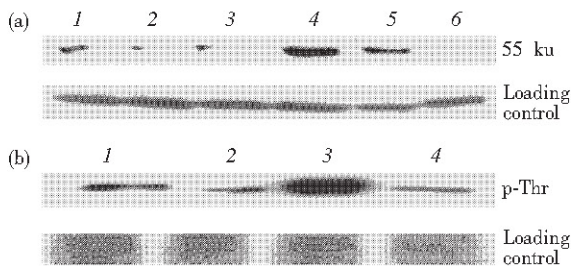


Fig. 7 Involvement of ERK in expression and activation of Ets-1 induced by LMP1

(a) After pre-treated by PD98059, expression of Ets-1 in L7 cell line induced by LMP1. 1: 0 mg/L Dox; 2: 25 mg/L PD98059 + 0 mg/L Dox; 3: 50 mg/L PD98059 + 0 mg/L Dox; 4: 0.6 mg/L Dox; 5: 25 mg/L PD98059 + 0.6 mg/L Dox; 6: 50 mg/L PD98059 + 0.6 mg/L Dox. (b) After pre-treated by PD98059, expression of p-theorine of Ets-1 in L7 cell line induced by LMP1. 1: 0 mg/L Dox; 2: 50 μmol/L PD98059 + 0 mg/L Dox; 3: 0.6 mg/L Dox; 4: 50 μmol/L PD98059 + 0.6 mg/L Dox.

3 讨 论

大量证据显示病毒是恶性肿瘤发生的重要环境因素, EB 病毒除了与伯基特淋巴瘤、鼻咽癌的发

病密切相关, 新的证据表明它也与肺癌、胃癌等肿瘤的发生相关, 这就迫切要求深入探讨 EB 病毒致癌机制以寻求更为有效的防治手段.

在 EB 病毒致癌机制的研究中, EBV 通过异常激活宿主细胞的信号通路, 影响细胞周期紊乱, 细胞增殖和细胞凋亡失衡而引起肿瘤发生的机制已逐渐被认识. EB 病毒编码的 LMP1 是已证实的病毒致癌蛋白^[7]. 它的重要致癌机制之一是激活胞浆激酶及相应的核内靶基因, 目前已有报道 LMP1 可激活 JNK 来活化 c-Jun 家族, 进而在转录水平调节大量下游基因的表达, 引起生物学行为的改变. MAPK 家族有 3 个主要成员 ERK、JNK、p38MAPK, 目前尚无 LMP1 影响 ERK 表达或活化的确切证据. 核转录因子 Ets-1 可能是 LMP1 的靶基因, 而 Ets-1 是 ras/MAPKKK/MAPKK/ERK 下游靶基因之一, 有报道^[8] LMP1 可能激活 Ras 通路, 这些提示 Ras/MAPKKK/MAPKK/ERK/Ets-1 可能是 LMP1 作用中的重要通路.

研究已证实 ERK 的活性形式为磷酸化, 其中在 Ras 通路中活化的 Raf 激酶可磷酸化并激活 ERK 激酶, 进而激活 ERK1/2^[9], 而 Ets-1 苏氨酸残基则是公认的 MAPK 通路特异性靶点^[10,11].

本研究中, 首先在 LMP1 受强力霉素诱导表达的鼻咽癌细胞系 L7 中, 分别检测诱导性 LMP1 对 ERK 和 Ets-1 表达和磷酸化 (活化) 的影响, 因为是研究诱导性 LMP1 的调节作用, 故选择 Dox 诱导 LMP1 最大表达的剂量点和时间点, 用于 p-ERK 和 Ets-1 表达的研究. 在剂量效应上, p-ERK、Ets-1 及其磷酸化苏氨酸均在 0.6 mg/L Dox 诱导 24 h 表达最强, 而在以往的研究中也发现不同强度的诱导性 LMP1 表达, 特别是 0.6, 6 mg/L Dox 诱导时, 可使不同转录因子达到最大活化^[12,13]. 在时间效应上, 6 mg/L Dox 作用下, 二者均在 4 h、6 h 后表达最强. 通过 MEK/ERK 特异性小分子阻断剂 PD98059 作用, 可明显阻断 LMP1 诱导后 p-ERK 表达, 说明该阻断剂有较好的阻断效应. PD98059 也可部分阻断 LMP1 诱导 Ets-1 表达和苏氨酸磷酸化水平, 提示酪氨酸磷酸化的 ERK 介导了 LMP1 促进 Ets-1 表达和活化的过程, 而 Ets-1 仅被部分阻断的现象提示可能存在其他通路的调节作用.

本研究首次在鼻咽癌细胞中发现 ERK 可部分介导 LMP1 激活 Ets-1 表达和磷酸化. 由于信号通路的复杂性和网络性, Ets-1 表达可能受到多条信

号通路的影响, 而 ERK 也可能活化 Ets 家族的其他成员, 而 Ets-1 作为核转录因子如何调节靶基因表达而在 EB 病毒致瘤过程中发挥作用则需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 胡 智, 曾 亮, 曹 亚, 等. 鼻咽癌细胞中潜伏膜蛋白 1 CTAR2 通过 TRAF/TRADD 复合物激活 JNK 信号通路途径. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (4): 562~566
Hu Z, Zeng L, Cao Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (4): 562~566
- 2 Kwang-Rok K, Tomokazu Y, Hisashi M, *et al.* Transformation of Madin-Darby kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein1 (LMP1) induced expression of Ets-1 and invasion growths. Oncogene, 2000, **19** (14): 1764~1771
- 3 曾 亮, 曹 亚. 癌基因 Ets 在恶性肿瘤转移中的转录调控研究进展. 肿瘤, 2002, **22** (1): 80~82
Zeng L, Cao Y. Cancer, 2002, **22** (1): 80~82
- 4 廖 伟, 曹 亚, 李晓艳, 等. 一株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, Cao Y, Li X Y, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 1999, **15** (1): 132~135
- 5 Dario R A, Ana C, Philip C, *et al.* PD98059 is a specific

- inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. J Bio Chem, 1995, **270** (46): 27489~27494
- 6 Tanaka K, Abe M, Sato Y. Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. Jpn J Cancer Res, 1999, **90** (6): 647~654
 - 7 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
 - 8 Roberts M L, Cooper N R. Activation of a Ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein1 is essential for cellular transformation. Virology, 1998, **240** (1): 93~99
 - 9 Westwick J K, Cox A D, Der C J, *et al.* Oncogenic ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91** (13): 6030~6034
 - 10 Yang B S, Hauser C A, Henkel G, *et al.* Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets-1 and c-Ets-2. Mol Cell Biol, 1996, **16** (2): 538~547
 - 11 Carolyn M S, Lisa N G, Logan W D, *et al.* Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. Biochemistry, 1998, **95** (21): 12129 ~ 12134

Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein1 (LMP1) Activated Ets-1 Expression Mediated by ERK in Nasopharyngeal Cell Line*

ZENG Liang¹⁾, LI Min²⁾, SONG Xin¹⁾, TAO Yong-Guang¹⁾, TANG Min¹⁾, LI Wei¹⁾, CAO Ya¹⁾**

¹⁾Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾Gene Company in Changsha, Changsha 410011, China)

Abstract To confirm the effect of EBV encoded LMP1 on expression and activation of nuclear transcription factor, Ets-1 and extracellular signal regulated kinase (ERK) involved in the process. The expression of p-ERK and Ets-1 were assayed with Western blot, and phosphorylation of Ets-1 was assayed with co-immunoprecipitation-Western blot. MEK1/ERK specific inhibitor PD98059 was used to confirm that ERK mediated the activation of Ets-1 by LMP1. The results showed that in nasopharyngeal carcinoma cell line, EBV-LMP1 enhanced the expression of Ets-1 and p-ERK, and phosphorylation of Ets-1 to some extent in time- and dose-dependent manner. With blockade of PD98059, expression of p-ERK induced by LMP1 decreased significantly, and expression and phosphorylation of Ets-1 by LMP1 decreased partly. These results suggest that expression and phosphorylation of Ets-1 by LMP1 was mediated partly by ERK.

Key words Epstein-Barr virus, latent membrane protein, Ets-1, extracellular signal regulated kinase, nasopharyngeal carcinoma

* This work was supported by grants from The Special funds for Major State Basic Research of China (G1998051201) and (2002CB513100).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805448, Fax: 86-731-4470589, E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

Received: December 23, 2002 Accepted: January 28, 2003