

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*

罗非君 胡 智 曾 亮 唐发清 顾焕华 唐 敏 曹 亚**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 探讨 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 激活激活蛋白 1 (AP1), 和核转录因子 (NF- κ B) 在鼻咽癌细胞 SUNE-1 及亚细胞株恶性演进中的作用. 运用报告基因法和凝胶电泳迁移率法 (EMSA) 分析 AP1 和 NF- κ B 反式激活活性和 DNA 结合活性, 蛋白质印迹检测蛋白质表达; 裸鼠致瘤实验结合组织制片研究瘤细胞的成瘤和转移能力. 结果显示恶性程度不同的 SUNE-1 亚细胞株的反式激活活性、DNA 结合活性、LMP1 蛋白表达及 c-Jun 氨基端激酶 (JNK) 活性均存在明显差异, 且与细胞恶性程度正相关. 这些结果提示 LMP1 活化 AP1 和 NF- κ B 的信号通路参与了鼻咽癌细胞 SUNE-1 的恶性演进过程.

关键词 潜伏膜蛋白, EB 病毒, 鼻咽癌, 转录因子, 转移

学科分类号 R73

鼻咽癌 (NPC) 的主要临床特点之一是高转移性, 从肿瘤形成到转移发生涉及多基因改变的积累、多种转录因子调控机制. 潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 作为已认可的 EB 病毒唯一致瘤基因, 在鼻咽癌的发生中起着重要作用, 而近来研究发现 LMP1 也参与鼻咽癌恶性演进, Horikawa 等^[1]报道鼻咽癌组织中 LMP1 与间质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的表达呈相关性, 而 MMP-9 表达与淋巴结转移相关. 研究也发现 LMP1 可激活激活蛋白 1 (activator protein 1, AP1) 和核转录因子 (nuclear factor κ B, NF- κ B), 较多文献报道 AP1 和 NF- κ B 与肿瘤侵袭和转移有关^[2], 由此可推测 LMP1 可能参与 NPC 的恶性演进.

SUNE-1 是鼻咽癌组织来源的 EBV 阳性细胞株, 为典型低分化鳞癌细胞, 从 SUNE-1 中克隆了 11 种亚株, 宋立兵等^[2]对其中 4 种亚细胞株 13-9B、6-10B、9-4E、5-8F 进行了异质性研究证实: 5-8F 为具有高成瘤高转移潜能细胞株、9-4E 为中度恶性、6-10B 为只成瘤不转移, 13-9B 不成瘤. 本研究以这 4 种成瘤和转移能力不同的 SUNE-1 亚细胞株为对象, 拟探讨 LMP1 参与 NPC 恶性演进的转录调控机制, 从而为阐明 NPC 高转移的发生机制以及防治提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 主要材料

鼻咽癌细胞株 SUNE1 的 4 种亚细胞株 13-9B、6-10B、9-4E、5-8F 由中山医科大学肿瘤防治所惠赠. 实验动物 BALB/c 裸鼠由军事医学科学院提供, 3~4 周龄, 雌雄各半, “特殊无病原”环境

(specific pathogen free, SPF) 饲养. LMP1 单克隆抗体为 Dako 公司 (美国) 产品, CSI-4 克隆. 磷酸化 JNK 抗体购自 New England BioLabs.

1.2 裸鼠成瘤实验

收集处于对数生长期的上述 4 种亚细胞株, 每只裸鼠接种 2×10^6 个细胞于裸鼠右腋皮下, 每组 5~6 只, 雌雄各半. 6 周后处死裸鼠, 剥离肿瘤称重, 病理组织学检查, 检查鼠肺、肝及腋下淋巴结等器官是否有转移灶.

1.3 报告基因分析

参照 LipofectAMINE™ 转染说明书. 瞬间转染质粒于待研究细胞后继续培养 24 h. PLB (passive lysis buffer) 裂解, 收集蛋白质裂解液离心, 取上清液加入 LARII (luciferase assay reagent II), 用单光子检测仪 (LUMI-SCINT™, BIOSCAN. Co) 测定萤火虫荧光酶相对活性值 (RLU), 即 NF- κ B 相对活性; 再加入 Stop& Glo 试剂 (Promega 产品), 测定水母荧光酶 RLU 值, 即 AP-1 的相对活性.

1.4 凝胶迁移率

参照 Promega 公司 Gel shift assay kit 操作程序. 首先用 γ -³²P-ATP 在 T4 多核苷酸激酶的作用下, 连接到能与 AP-1 或 NF- κ B 结合的寡核苷酸链; 然后用 G-25 柱层析方法纯化同位素探针. 参照 Ichikawa 等^[3]的方法提取核蛋白, 将 5 μ g 核蛋

* 国家自然科学基金项目 (30000078) 和国家重点基础研究发展规划恶性肿瘤发生与发展的基础研究项目 (G1998051201).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2001-12-11, 接受日期: 2002-02-09

白用结合缓冲液孵育, 并以 Oct2A 转录因子蛋白作为阴性对照. 将标记探针与核蛋白孵育; 40% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离; x 光片曝光, 显影.

1.5 蛋白质印迹分析

用双喹啉甲酸 (BCA) 法将全细胞蛋白定量, 取 100 μ g 蛋白质与加样缓冲液混合, 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 分别与 LMP1、JNK、磷酸化 JNK 等 (sigma 公司) 单克隆抗体孵育 8~12 h, 抗小鼠 IgG-HRP 孵育, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色呈棕黄色条带.

1.6 基因组 DNA 抽提

参照《分子克隆》介绍的方法而略作修改. 0.25% 胰酶消化培养的贴壁细胞, PBS 洗涤, 沉淀重悬, 加入 STE 裂解缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 1% SDS) 及蛋白酶 K (终浓度为 100 mg/L) 37 $^{\circ}$ C 水浴消化过夜. 用等体积苯酚、苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1)、氯仿各抽提一次, 加入 0.1 体积 3 mol/L NaAc (pH 2.5) 和 2.5 体积冰乙酸回收 DNA, 75% 乙醇洗涤, 室温干燥, TE 缓冲液 (Tris-HCl, 10 mmol/L, pH 7.4, EDTA, 1 mmol/L, pH 8.0) 溶解, 用紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度.

1.7 碱裂解法大规模抽提质粒

将 10 ml 过夜生长的菌液, 接种到 1 000 ml LB 培养基中, 振荡、离心、收获细菌. 先后加入溶液 I (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA pH 8.0), 溶液 I 和溶菌酶、溶液 II 裂解液 (0.2 mol/L NaOH, 1% SDS)、预冷的溶液 III (3 mol/L NaAc), 分别进行振荡、离心、沉淀, 最后取上清液. 上清液经等体积饱和酚、氯仿抽提, 2.5 倍体积无水乙醇沉淀, TE 溶解, RNaseA 消化处理后抽提、沉淀、乙醇洗盐、风干、TE 溶解后 4 $^{\circ}$ C 备用.

1.8 基因转染实验

将 30 μ g 质粒 DNA 与 Neo 表达质粒按 1: 5 混合. 脂质体介导分别转染 6-10B、9-4E、5-8F 细胞株. 转染 2 d 后用 400 mg/L Neo 抗生素筛选, 经两周筛选和传代, 用报道基因系统检测转染效率.

1.9 苏木素-伊红 (HE) 染色实验

取材裸鼠肺、肝等组织, 经中性福尔马林固定、常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、苏木素-伊红 (HE) 染色, 封片后光镜观察并照相.

1.10 统计学分析

采用 t 检验和 χ^2 检验.

2 结 果

2.1 LMP1 蛋白在 SUNE-1 亚细胞间存在的差异

SUNE-1 亚细胞株总蛋白的蛋白质印迹结果显示: LMP1 在 13-9B 和 6-10B 中表达较低, 9-4E 和 5-8F 呈高表达, SUNE-1 表达也较高. 说明 LMP1 表达与瘤细胞恶性程度相关 (图 1).

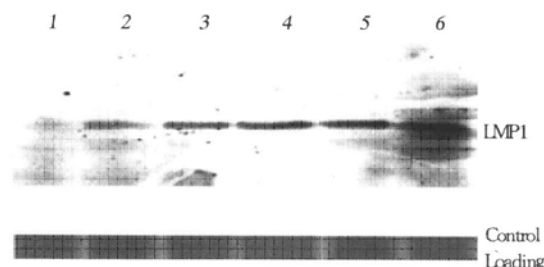


Fig. 1 LMP1 expression in the subclones of NPC cell lines SUNE-1 by Western blot

1: 13-9B; 2: 6-10B; 3: 9-4E; 4: 5-8F; 5: SUNE-1; 6: CNE-LMP1.

2.2 SUNE-1 亚株间 AP1 和 NF- κ B 活性的比较

2.2.1 SUNE-1 各亚细胞间 AP1 和 NF- κ B 活性的检测: 将 AP1 和 NF- κ B 报道质粒瞬间转染入 SUNE-1 的四个亚细胞株, 24 h 后用双报道荧光酶底物测定 AP1 和 NF- κ B 反式激活活性. 结果显示: AP1 反式激活活性在 13-9B 中最低, 与其他各组均有显著性差异 ($P < 0.01$); 5-8F 活性最高, 但与 9-4E 相差不明显. NF- κ B 活性在各组中差异不明显, 但随细胞恶性程度增加而升高. 这些结果提示 AP1 和 NF- κ B 活性与各亚细胞株恶性程度呈明显相关性 (图 2).

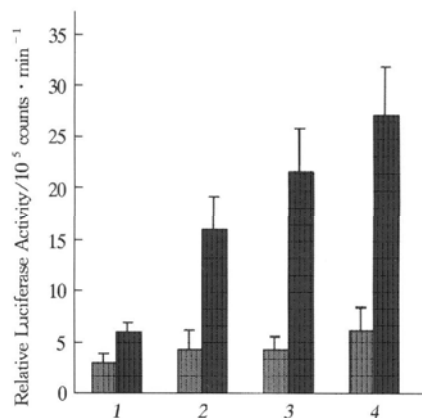


Fig. 2 Different activities of AP-1 and NF- κ B in the subclones of NPC cell line SUNE-1

1: 13-9B; 2: 6-10B; 3: 9-4E; 4: 5-8F. ■: AP1; □: NF- κ B.

2.2.2 SUNE-1 各亚细胞的 AP1 和 NF- κ B DNA 结合活性的检测: 通过对细胞核蛋白的非同位素 EMSA 法分析发现: AP-1 的 DNA 结合活性有显著差异, 13-9B 最低, 5-8F 最高, 而 13-9B 与 6-10B 间, 9-4E 和 5-8F 间的差别不明显 (图 3); NF- κ B 的结合活性也表现与恶性程度有相关性 (图 4).

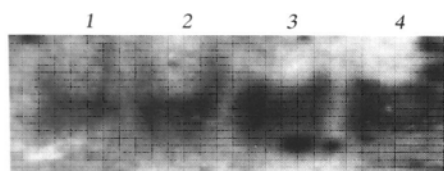


Fig. 3 AP1 DNA binding activities were analyzed by EMSA in the subclones of NPC cell SUNE-1
1: 13-9B; 2: 6-10B; 3: 9-4E; 4: 5-8F.

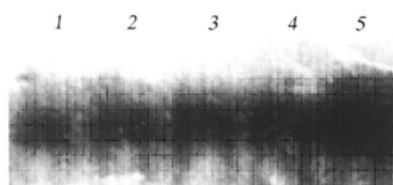


Fig. 4 NF- κ B DNA binding activities were analyzed by EMSA in the subclones of NPC cell SUNE-1
1: 13-9B; 2: 6-10B; 3: 9-4E; 4: 5-8F; 5: SUNE-1.

2.2.3 SUNE-1 各亚细胞间 JNK 活性的检测: 提取 SUNE-1 各亚细胞的蛋白质, 用抗磷酸化 JNK 抗体进行分析显示: 13-9B 的磷酸化 JNK 蛋白表达最低, 而 9-4E、5-8F 均具有较高表达 (图 5).

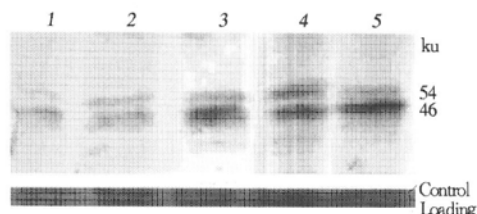


Fig. 5 Assay of phosphorylation of JNK by Western blotting in the subclones of SUNE-1
1: 13-9B; 2: 6-10B; 3: 9-4E; 4: 5-8F; 5: SUNE-1.

2.3 SUNE-1 各亚细胞间细胞表型差异的研究

2.3.1 SUNE-1 各亚细胞间恶性程度的细胞表型研究

将处于对数生长期的各种 SUNE-1 亚细胞株以 2×10^7 个细胞接种于鼠右腋下, 6 周后观察肿瘤生长情况. 结果显示: 4 种亚细胞株均可成瘤, 但不同细胞株成瘤的重量有明显差异 ($P < 0.05$), 但 9-4E 和 5-8F 成瘤大小无显著差异 (图 6 及表 1).

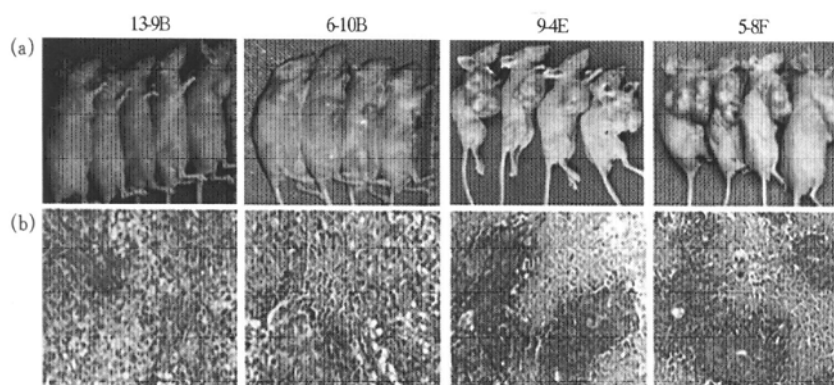


Fig. 6 Results of tumorigenesis in nude mice and corresponding histological type of tumors

(a) tumors in nude mice 6 weeks after the first intratumoral injection of NPC cells. (b) HE staining of lung tissue of nude mice subcutaneous injection of the subclones of NPC cell line SUNE-1.

Table 1 Results of nude mice tumorigenesis

SUNE-1 subline	number of nude mice	number of formed	average mass of tumor/g
6-10B	6	6	1.40
6-10B+ MEKK1	5	5	2.17
9-4E	4	4	10.78
9-4E+ TAM67	4	2	1.48
5-8F	5	5	19.16
5-8F+ TAM67	4	4	11.80

取各组裸鼠的肝、肺组织, 常规组织连续制片, HE 染色, 各组的肝组织均未发现转移灶; 13-9B 和 6-10B 组的肺中未发现转移灶, 但 9-4E 和 5-8F 组的肺组织中发现转移灶 (图 6).

2.3.2 干预 AP-1 和 NF- κ B 的信号转导通路对细胞表型的影响

(a) MAPK/细胞外信号调节的激酶激酶 (MEK kinase), MEK 激酶 1 (MEKK1) 表达质粒

的导入对6-10B细胞表型的影响: 将能激活AP1的表达质粒MEKK1导入6-10B, Neo抗性筛选两周后, 用AP1和NF- κ B双报道系统分析转染效率发现, MEKK1表达质粒的导入使6-10B的NF- κ B和AP-1活性明显增加, 较之6-10B基础表达分别约高2倍、9倍($P < 0.01$) (图7). 将6-10B细胞及MEKK1转染的6-10B细胞接种裸鼠. 观察肿瘤形成情况显示, MEKK1转染的6-10B细胞比6-10B细胞成瘤平均提前4 d, 且6周后瘤体重量相差约1倍.

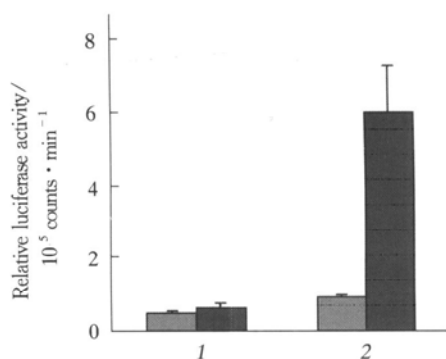


Fig. 7 Effect of MEKK1 on the transactivities of AP1 and NF- κ B in 6-10B cell line

1: 6-10B; 2: 6-10B + MEKK1. ■: NF- κ B; ■: AP1.

(b) c-Jun显性负性突变体TAM67对9-4E和5-8F细胞表型的影响: 将TAM67表达质粒导入9-4E和5-8F细胞, 其转染效率分析发现, TAM67导入使AP-1和NF- κ B活性均受到明显抑制, 与未处理的9-4E和5-8F细胞比较, 分别下调5倍和4倍(图8). 将TAM67表达质粒转染的9-4E和5-8F细胞接种裸鼠. 结果发现, 5-8F + TAM67组与5-8F组间成瘤能力上无显著差异, 但5-8F + TAM67组未发生肺转移. 而9-4E + TAM67成瘤较之9-4E显著减弱, 只有50%裸鼠成瘤且平

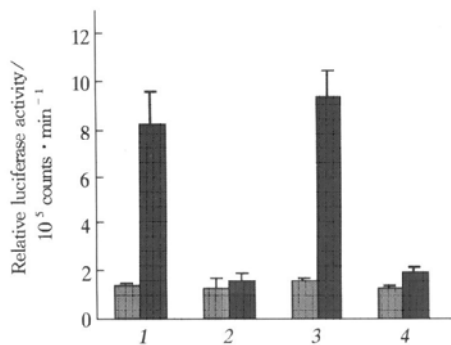


Fig. 8 Effect of expression TAM67 in the transactivities of AP1 in 9-4E and 5-8F cells

1: 9-4E; 2: 9-4E + TAM67; 3: 5-8F; 4: 5-8F + TAM67. ■: NF- κ B; ■: AP1.

均瘤体质量从10.78 g下降至1.48 g, 差异显著($P < 0.05$), 肺中未出现转移灶(图8).

3 讨 论

恶性肿瘤侵袭和转移是肿瘤患者死亡的主要原因之一, 其发生机制与多基因改变、多条信号转导通路的参与、多种转录因子调控相关, 其中AP1和NF- κ B与肿瘤转移发生密切相关^[4,5]. 鼻咽癌作为低分化、高转移的恶性肿瘤, 其转移发生早而使患者预后较差, 但转移发生机制却不清楚. EBV感染是鼻咽癌的重要病因之一, 其中LMP1是EBV的主要致癌蛋白, 较多证据支持LMP1与NPC发生相关. 而近年也有研究发现LMP1可能参与NPC的恶性演进, 而且也发现LMP1可激活AP1和NF- κ B^[6]. 本研究即在分子水平和细胞表型方面, 探讨LMP1活化AP1和NF- κ B在鼻咽癌恶性演进中的作用.

成瘤和转移能力不同的SUNE-1亚细胞系为本研究提供了较好的实验模型. 来源于同一鼻咽癌细胞系恶性程度的不同, 主要是由于细胞基因组改变和EBV变异等. 实验结果显示, 不同SUNE-1亚细胞系间LMP1表达存在明显差异, 且与细胞恶性程度密切相关, 提示LMP1蛋白表达差异是瘤细胞系恶性程度不同的主要原因.

大量文献报道, AP-1和NF- κ B核转录因子活化能调节多种转移相关基因的表达, 如基质金属蛋白酶(MMPs)^[7~9]. LMP1能通过上调MMP9表达, 可能参与鼻咽癌转移. 本研究用报道基因分析方法证实, AP1和NF- κ B反式激活活性与恶性程度呈正相关, 用核蛋白的EMSA法分析证实, AP1和NF- κ B的DNA结合活性与恶性程度呈正相关, 进一步研究发现JNK活性也与亚细胞系恶性程度密切相关, 以前实验已证实NPC细胞中JNK介导LMP1活化AP1的过程, LMP1可促进JNK磷酸化; 结合本实验结果提示, SUNE-1亚细胞株间JNK活性的差异可能与LMP1基因异常表达有关, 在NPC细胞中存在LMP1 → JNK → AP1通路, 并与恶性演进有关. 这些由亚细胞株AP1信号转导通路的干预实验结果进一步地支持: MEKK1表达质粒可活化AP1, 它的转染使成瘤和不转移的6-10B细胞AP1和NF- κ B明显升高、成瘤时间缩短、成瘤重量增加; 而AP1家族成员c-Jun显性负性突变体TAM67的导入阻断了9-4E和5-8F的AP1活化, 也部分抑制NF- κ B的活性, 并且被转

染细胞的成瘤和转移能力均降低; 这也提示 AP-1 和 NF- κ B 间存在 Cross-talk.

本实验通过分子水平和细胞生物学研究, 运用激活和反义阻断的干预策略, 证实了鼻咽癌细胞系 SUNE-1 中 LMP1 激活 AP1 和 NF- κ B 与肿瘤恶性演进的关系, 但 AP1 和 NF- κ B 可调控大量下游效应基因, 并且存在 Cross-talk, 故这些信号转导通路及在恶性演进中的作用尚需进一步深入研究.

参 考 文 献

- Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen T S, *et al.* Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 2000, **89** (4): 715~ 723
- 宋立兵, 汪慧民, 曾木圣, 等. 鼻咽癌细胞株 SUNE-1 异质性研究. *癌症*, 1998, **17** (5): 324~ 327
Song L B, Wang H M, Zeng M S, *et al.* *Cancer*, 1998, **17** (5): 324~ 327
- Ichikawa K, de Groot L J, Refetoff S, *et al.* Nuclear thyroid hormone receptors in cultured human fibroblasts: improved method of isolation. *Metabolism*, 1986, **35** (9): 861~ 868
- Smith L M, Wise S C, Hendricks D T, *et al.* C-Jun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*, 1999, **18** (44): 6063~ 6070
- Andela V B, Schwarz E M, Puzas J E, *et al.* Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear kappa B. *Cancer Res*, 2000, **60** (23): 6557~ 6562
- Murono S, Yoshizaki T, Sato H, *et al.* Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase 9 expression. *Cancer Res*, 2000, **60** (9): 2555~ 2561
- 罗非君, 彭小宁, 曹 亚, 等. EB 病毒 LMP1 上调鼻咽癌细胞系 AP-1 的活化. *中国生物化学和分子生物学报*, 2000, **60** (23): 6557~ 6562
Luo F J, Peng X N, Cao Y, *et al.* *Chin J Biochemi Mol Biol*, 2000, **60** (23): 6557~ 6562
- 廖 伟, 唐 敏, 曹 亚, 等. EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞中通过 NF- κ B 促进 Ig κ 表达. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (6): 659~ 663
Liao W, Tang M, Cao Y, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 1999, **31** (6): 659~ 663
- Westermarck J, Kahari V M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FABES J*, 1999, **13** (8): 781~ 792

Experimental Study on Transcriptional Regulation of Malignant Progression in Nasopharyngeal Carcinoma by EB Virus Encoded Latent Membrane Protein 1*

LUO Fei-Jun, HU Zhi, ZENG Liang, TANG Fa-Qing, GU Huan-Hua, TANG Min, CAO Ya**

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

Abstract In order to study the effect of activation of transcription factor AP1 and NF- κ B by EB virus encoded latent membrane protein 1 on invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma (NPC). NPC cell line SUNE-1 and its subclones were used. Transcriptional and DNA binding activity were analyzed by reporter gene assay and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) respectively. Western blot was used to determine the protein expression; the potential of metastasis of NPC cell lines was determined by nude mice tumorigenesis. The results showed the positive relationship of AP1 and NF- κ B transcriptional activity, DNA binding activity, LMP1 expression, c-Jun-N-terminal kinase (JNK) activity to malignancy in NPC cell lines. Activation of AP1 and NF- κ B by LMP1 may involved in invasion and metastasis of NPC.

Key words latent membrane protein1, EB virus, nasopharyngeal carcinoma, transcription factor, metastasis

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30000078) and State Key Basic Research Program, Fundamental Investigation on Human Carcinogenesis (G1998051201).

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

Received: December 11, 2001 Accepted: February 9, 2002