

# 鼻咽癌细胞中 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 活化 cyclinD1 的表达\*

赵晓荣\*\* 王承兴 罗非君 顾焕华 唐敏 夏林庆 邓琳 易薇 邓锡云 曹亚\*\*

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

**摘要** 为了探讨 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 (EBV-LMP1) 促进细胞增殖, 参与 EBV 相关疾病致瘤的分子机制, 研究了 LMP1 在鼻咽癌细胞中调节 cyclinD1 表达, 进而影响细胞周期行进及细胞恶性表型改变, 并初步确定了 LMP1 发挥该功能的结构域. 利用已建株的 Tet-onr LMP1-HNE2 鼻咽癌细胞系, 蛋白质印迹实验分析 LMP1 诱导 cyclinD1 蛋白质表达的表动力学, 包括时间效应及剂量效应; 利用三种 LMP1 功能区缺失的突变体及野生型 LMP1, 以载体型细胞为对照, 确定 LMP1 活化 cyclinD1 表达的结构域. 同时结合基因诱导表达及反义寡聚核酸技术阻断基因表达的实验方法, 进一步确定 LMP1 上调的 cyclinD1 功能, 即对细胞周期行进及细胞恶性表型的影响. 结果表明 LMP1 确实可以诱导 cyclinD1 的表达 (2~4 倍), 且诱导具有时间依赖性及剂量依赖性; 利用三种 LMP1 功能区缺失的突变体及野生型 LMP1, 以载体型细胞为对照, 结合报道基因分析法, 确定与空白载体细胞系比较, 野生型 LMP1 从转录水平可反式激活 cyclinD1 报道基因活性约 11.2 倍, 其中 CTAR1 及 CTAR2 均可活化 cyclinD1 表达, 但以 CTAR2 为主, 与野生型 LMP1 诱导 cyclinD1 反式激活活性比较, CTAR1 缺失导致 cyclinD1 报道基因活性下降 23.6%, CTAR2 缺失导致 cyclinD1 活性下降约 80.7%, C 端均缺失时 cyclinD1 活性只有野生型的 17.7%. 流式细胞仪分析显示, 强力霉素诱导后 cyclinD1 高表达的细胞停留于 G0/G1 期明显减少, 较未经诱导的细胞, 从 66.42% 减至 56.55%, 而进入 S 期及 G2/M 期的细胞明显增多. 在稳定表达 LMP1 的细胞中, 与导入正义 LMP1 比较, 导入反义 LMP1 PS-ODNs 及反义 cyclinD1, 可以使细胞软琼脂集落形成率明显降低 (从 30.48% 分别降至 15.21%, 21.76%). EBV-LMP1 可以活化 cyclinD1 的表达, 且发挥这种功能的结构域以 CTAR2 为主, 活化的 cyclinD1 参与细胞周期行进, 抑制 LMP1 及 cyclinD1 的表达均可导致细胞软琼脂集落形成率降低.

**关键词** EB 病毒, 潜伏膜蛋白 1, 周期蛋白 D1

**学科分类号** R373

EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 (EBV encoded latent membrane protein1, EBV-LMP1) 作为唯一被确认的具有瘤基因功能的 EBV (EB virus, EB 病毒) 编码的潜伏膜蛋白基因产物, 对其分子致瘤作用及其机制的探讨一直是 EBV 致瘤机制研究领域令人关注的焦点. 对 LMP1 分子解剖研究的进展表明: LMP1 是一个膜蛋白, 其羧基端胞浆区包含两个重要的功能结构域: 一个是位于 185~231 位氨基酸残基的 CTAR1 (carboxyterminal activating region 1, C 端活化区域 1), 另一个是位于 352~386 位氨基酸残基的 CTAR2 (carboxyterminal activating region 2, C 端活化区域 2), 直接参与 LMP1 信号转导途径<sup>[1]</sup>, 在 LMP1 介导的各种生物学功能中发挥着不同的作用.

对肿瘤和细胞周期研究的突破性进展表明: 肿瘤是一类细胞周期病<sup>[2]</sup>. 令人关注的是 LMP1 做

为一个病毒致瘤蛋白, 是如何参与细胞周期调节紊乱的, 迄今为止, 尚缺乏直接证据. CyclinD1, 作为连接外界生长因子、信号转导与细胞周期调控机制的纽带, 是细胞周期调节网络中与肿瘤密切相关的瘤基因<sup>[3]</sup>. 作者所在的研究小组实验结果显示 cyclinD1 的表达在 LMP1 阳性的细胞系中强于 LMP1 阴性的细胞系, 且 LMP1 促进细胞生长<sup>[4]</sup>, 强烈提示, LMP1 促进细胞生长的机制可能与 LMP1 调节 cyclinD1 表达相关, 因此, 本文将首先确定 LMP1 是否调节 cyclinD1 表达, 进一步确定 LMP1 上调 cyclinD1 表达的结构域, 探讨 LMP1 上调的 cyclinD1

\* 国家自然科学基金杰出青年基金 (39525022) 和国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (G1998051201).

\*\* 通讯联系人.

赵晓荣 Tel: 0731-4805448, E-mail: xrzhao@163.net;

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

收稿日期: 2000-11-16, 接受日期: 2000-12-12

是否为有功能的细胞周期调节因子。通过本研究试图为最终阐明 LMP1 促进细胞增殖, 参与细胞癌变的分子机制提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒:** pDI-Luc 质粒由 Reuther 博士 (Laboratory of Albert S. Baldwin, Jr) 惠赠。pDI-Luc 质粒含 cyclinD1 启动子, 该启动子调控 Luc 荧光素酶基因表达。按常规方法将质粒转化大肠杆菌 TG1 后, 抽提质粒 DNA, 用相应的内切酶酶切消化鉴定后, 以分光光度计测定 DNA 浓度, 置 4℃ 保存, 留待报道基因检测用。

**1.1.2 细胞系:** Tet-onr-LMP1-HNE2 细胞系: 以鼻咽癌细胞 HNE2 为母本细胞, 结合 Tet-on/Tet-off 高效基因诱导表达系统, 电穿孔法导入外源质粒, 两轮筛选后, 建立了一株 LMP1 表达受四环素衍生物强力霉素 (doxycycline) 严密调控的稳定克隆 Tet-onr-LMP1-HNE2, 该细胞系中 LMP1 被较好地诱导表达, 随着强力霉素的诱导剂量增加, LMP1 呈现相应程度的表达增强<sup>[5]</sup>。HNE2-LMP1del (187~ 351) (CTAR1 缺失型)、HNE2-LMP1 (1~ 231) (CTAR2 缺失型)、HNE2-LMP1 (1~ 185) (羧基胞浆端缺失型) 的三种 LMP1 缺失型细胞系及 HNE2-LMP1 (野生型)、HNE2-pSG5 (空白载体型) 鼻咽癌细胞系<sup>[6]</sup>: 利用 LMP1 CTAR1 缺失、或 CTAR2 缺失、或 CTAR1、CTAR2 同时缺失的三种 LMP1 突变体及野生型 LMP1、空白载体 pSG5 导入鼻咽癌细胞 HNE2, 稳定筛选, 建成体外稳定细胞系。

**1.1.3 抗体:** 抗 CyclinD1 抗体 (H-295, 多克隆兔源性抗体, Santa Cruz 公司); 华美公司所产 HRP 标记的抗兔 IgG。以上抗体均用于蛋白质印迹实验。

**1.1.4 硫代磷酸化寡聚核苷酸 (phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides, PS-ODNs) 正义 (sense)、反义 (antisense) LMP1 及 CyclinD1 的设计<sup>[7]</sup> (表 1)。**

**Table 1 The sequences of sense, antisense LMP1 and Cyclin D1**

PS-ODNs	sequences
antisense LMP1	5'-GAA CAG TTC GTC CAC ATG GG-3'
sense LMP1	5'-GCC ATG TGG ACG AAC TGT TG-3'
antisense cyclinD1	5'-AGG AGC TGG TGT TCC ATG-3'

以上 PS-ODNs 序列均针对相应的靶基因的启动子, 由美国国立癌症研究院寡聚合成室黎民敬博士合成, 使用浓度为 20 mg/L。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 细胞用含 15% 小牛血清的 1640 培养基, 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的条件下进行培养。

**1.2.2 细胞总蛋白抽提及蛋白质浓度测定:** 细胞总蛋白质的抽提按《分子克隆》介绍的方法略作修改。1 × 10<sup>6</sup> 个细胞用 1 × PBS 洗涤后, 细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L PMSF) 裂解, 沸水浴中变性。最大功率超声粉碎 30 s。10 000 r/min 离心去除细胞碎片, 留含总蛋白质的上清液。蛋白质浓度用 BCA 分析试剂盒 (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA) 测定。

**1.2.3 蛋白质印迹:** 100 μg 总蛋白质在 10% 不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 中电泳分离后, 电转移至硝酸纤维素膜, 丽春红 S 染色后, 膜在抗 cyclinD1 抗体中孵育过夜, 1 × PBS 洗涤后, HRP 标记的二抗温育, DAB 显色检测。棕黄色条带为阳性信号。结果以 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质为标准, 确定分子质量大小 (上海丽珠东风生物技术有限公司)。进一步用 Pharmacia Biotech 公司的 ImageMaster<sup>TM</sup> 软件, 对结果进行强度、面积综合校正<sup>[4]</sup>, 将 LMP1 未经诱导时 cyclinD1 的表达定义为 1.00, 计算校正值, 数据用 Excel7.0 进行作图分析。

**1.2.4 流式细胞仪分析:** 2 × 10<sup>6</sup> 细胞于 70% 的乙醇中, 4℃ 中固定 30 min 后, 1 × PBS 洗 1 次, 800 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 0.2 mol/L 柠檬酸/柠檬酸钠高渗处理 30 min, 1 × PBS 洗 2 次, 0.1% Triton/PBS 洗 1 次, 再用 10 mg/L 碘化丙啶 (PI) 和 100 mg/L RNA 酶于室温, 避光 30 min。应用 FACSsort (Becton Dickison) 检测, CELLQuest 软件分析。

**1.2.5 脂质体 (LipofecTAMINE) 介导的瞬间转染:** 按脂质体转染 (Gibco) 说明书, 转染前 18 h 将细胞种植于 24 孔细胞培养板中培养, 待细胞生长至 50% ~ 80% 的融合度时弃培养基, 两个 eppendorf 管分别加入 100 μl 孔无血清培养基, 其中一管再加入 2 μg/孔 pDI-Luc, 另一管加入 6 μl (12 μg) /孔脂质体, 分别混匀后, 将两管混合, 室温下置 45 min。每孔细胞加入 400 μl 无血清培养基, 再将 DNA-脂质体混合物加入, 5% CO<sub>2</sub> 培箱,

37℃培养 2~ 24 h 后, 加入 2 倍血清完全培养基, 18~ 24 h 后, 检测荧光素酶活性. 每次每组设四个平行组, 重复三次.

**1.2.6 荧光素酶 (luciferase) 活性检测:** 用脂质体方法将报道基因质粒 pD1-Luc 瞬间转染入细胞后, 转染 24~ 48 h 后, 按荧光素酶检测系统 (luciferase assay system, Promega 公司) 说明, 每孔转染细胞加入 100  $\mu$ l 1 $\times$  裂解缓冲液, 室温下裂解 15 min, 用细胞刮子将细胞刮下, 吸至 eppendorf 管内, 室温离心 12 000 r/min, 15 s, 取 20  $\mu$ l 上清, 加入 100  $\mu$ l 反应底物, 迅速推入液闪仪单光子档 (BECKMAN LS5000 TA), 检测 cpm 值. 间隔 10 s, 每一样本测四个平行孔, 每孔读两个数值, 取均值.

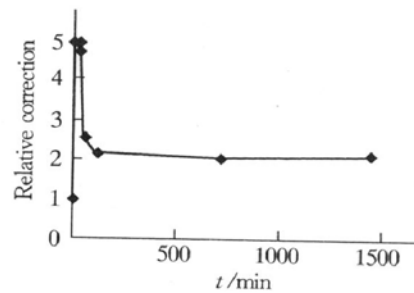
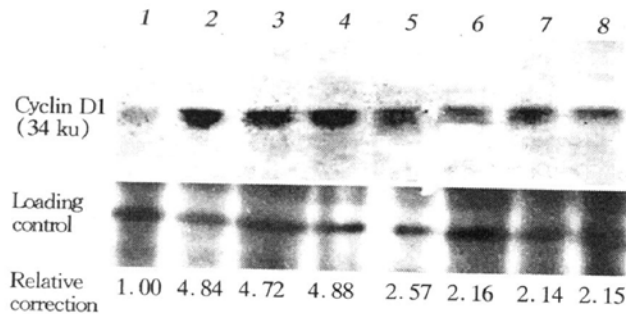
**1.2.7 细胞软琼脂克隆形成率测定:** 配制 0.5% 的琼脂, 以该琼脂为底层; 将 PS-ODNs 处理 24 h 后的 HNE2-LMP1 的鼻咽癌细胞系,  $2 \times 10^4$  细胞加入培养基, 再用此培养基稀释 0.5% 的琼脂到 0.33%, 作为上层琼脂. 每组种三个平皿, 置 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培育 10 d, 倒置显微镜下观察集落 (8 个细胞以上为一个集落) 的数目和大小. 用随机取样法数出每一平皿 5 个 1 cm<sup>2</sup> 内克隆数, 求出其平均克隆数, 乘以平皿底面积, 再除以每个平皿种植的细胞数, 即得出细胞集落形成率. 将每种细胞三个平皿的细胞集落形成率取均值, 为该种细胞的集落形成率.

## 2 结 果

### 2.1 LMP1 促进 CyclinD1 表达的表达式动力学特征

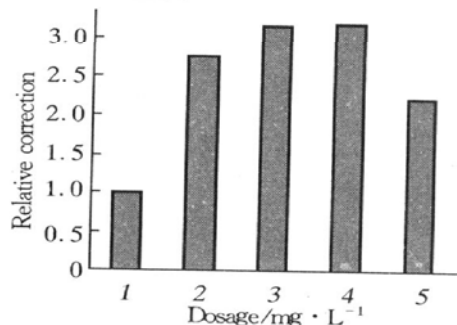
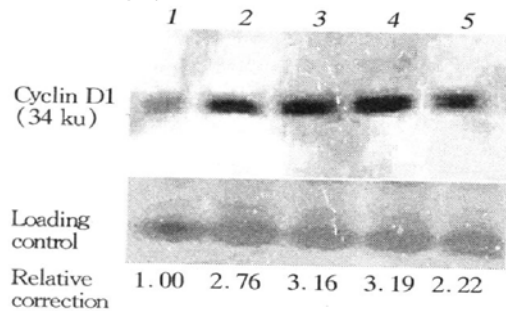
首先确定 LMP1 可以诱导 cyclinD1 蛋白质的表达. 利用 LMP1 表达受强力霉素严密调控的鼻咽癌细胞系 Tet-*on*-LMP1-HNE2, 文献报道<sup>[5]</sup>, Tet-*on*-LMP1-HNE2 6mg/L 强力霉素时诱导 LMP1 表达最强, 因此, 观察 6 mg/L 诱导剂量时, LMP1 诱导 cyclinD1 表达的时间动力学特征 (图 1), 可见, 15 min 内 cyclinD1 的表达 (分子质量为 34 ku) 开始升高, 为未经诱导时的 4.84 倍, 在高水平维持 45 min 后, 表达开始下降, 但仍较未经诱导高, 1 h 后逐渐到达平台期, 且一直维持在高水平表达, 为未经诱导时的 2 倍左右, 直到 24 h, 提示 LMP1 诱导 cyclinD1 的表达具有时间依赖性.

参考时间动力学曲线, 选择诱导表达到达平台期的时间 12 h, 进一步分析 LMP1 诱导 cyclinD1 表达的剂量效应, 蛋白质印迹结果表明, 随着 LMP1 被不同剂量的强力霉素诱导表达, cyclinD1 表达增强, 为未经诱导时的 2~ 3 倍, 且随着诱导剂量的增加, cyclinD1 的表达逐渐增强, 强力霉素为 0.6 mg/L 时, cyclinD1 表达最强, 但是当诱导剂量为 6 mg/L 时, cyclinD1 表达反而有所降低, 但仍是未经诱导时的 2.22 倍, 提示 LMP1 确实可以诱导 cyclinD1 的表达, 且诱导具有剂量依赖性 (图 2).



**Fig. 1 LMP1 induces CyclinD1 expression in a time dependent manner by Western blotting**

1: Dox (-); 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 45 min; 5: 60 min; 6: 120 min; 7: 720 min; 8: 1 440 min.



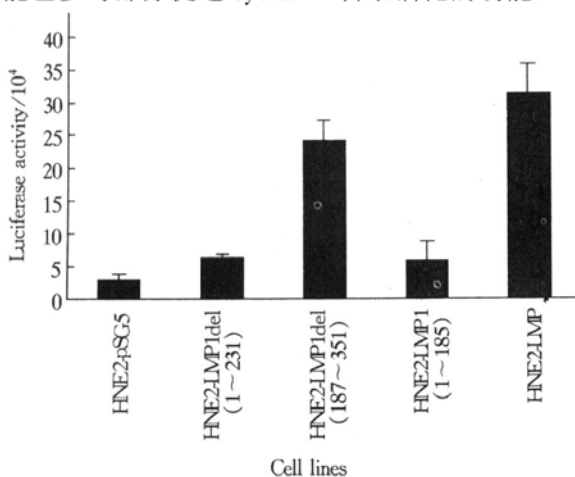
**Fig. 2 LMP1 induces cyclinD1 expression in a dosage dependent manner by Western blotting**

1: Dox (-); 2: 0.006 mg/L; 3: 0.06 mg/L; 4: 0.6 mg/L; 5: 6 mg/L.

## 2.2 LMP1 促进 cyclinD1 mRNA 转录的结构域

萤虫酶报道基因系统, 可以通过分析报道基因与基因转录活性之间的相关性进行基因表达调控研究. 利用该系统, 结合已建立的细胞系 HNE-LMP1 及空白载体细胞系 HNE2-pSG5, 发现与空白载体细胞系比较, 野生型 LMP1 可反式激活 cyclinD1 报道基因活性约 11.2 倍, 提示 LMP1 上调 cyclinD1 蛋白质表达的部分机制为上调 cyclinD1 的 mRNA 转录.

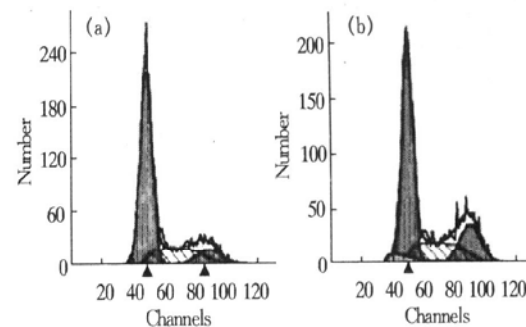
确定了 LMP1 不但可以从蛋白质水平, 而且可以从 mRNA 水平上调 cyclinD1 的表达后, 进一步明确 LMP1 诱导 cyclinD1 表达的结构域. 利用 HNE2-LMP1del (187~351) (CTAR1 缺失型)、HNE2-LMP1 (1~231) (CTAR2 缺失型)、HNE2-LMP1 (1~185) (羧基胞浆端缺失型) 的三种 LMP1 缺失型细胞系及野生型 HNE2-LMP1、空白载体型 HNE2-pSG5 这些良好的细胞模型, 结合报道基因检测, 结果如图 3 所示. 较野生型 LMP1 比较, CTAR1 缺失导致 CyclinD1 活性下降 23.6%, CTAR2 缺失导致 cyclinD1 活性下降约 80.7%, 提示 LMP1 CTAR1 及 CTAR2 均可从转录水平反式激活 cyclinD1 的表达, 主要激活 cyclinD1 表达的功能结构域为 CTAR2, 且 CTAR1 与 CTAR2 的功能可能有部分重叠. 同时, 结果还显示, C 端均缺失时 cyclinD1 活性还有野生型的 17.7%, 是空白载体的 2 倍, 由此可以推测, 除了 CTAR1 和 CTAR2 外, LMP1 的跨膜区及 N 端可能也参与部分促进 cyclinD1 转录活化的功能.



**Fig. 3** LMP1 has two essential signaling domains with the carboxy terminus, termed C terminal activation regions1 (CTAR1) and CTAR2. With cell lines stably expressed wild type LMP1, the vector or various deletion mutants and reporter gene assay, the activation essential domains of LMP1 activation cyclinD1 was identified

## 2.3 LMP1 活化 cyclinD1 表达与细胞周期行进

为了进一步确定 LMP1 上调表达的 cyclinD1 为有功能的细胞周期调节因子, 利用 Tet-*on* LMP1-HNE2 细胞系, 结合剂量效应及时间效应实验结果, 选择未经强力霉素诱导的, 及诱导剂量为 0.06 mg/L, 诱导时间为 12 h 时的细胞, 进行流式细胞仪分析, 比较细胞周期分布. 图 4 表示: 较未经诱导的细胞, 诱导后 CyclinD1 高表达的细胞停留于 G0/G1 期明显减少, 从 66.42% 减至 56.55%, 而进入 S 期及 G2/M 期的细胞明显增多.



**Fig. 4** LMP1 activated cyclinD1 expression, promoted cell cycle progression

(a) Dox (-); (b) Dox (+); 0.06 mg/L, 12 h.

## 2.4 LMP1 活化 CyclinD1 表达, 影响细胞软琼脂集落形成率

硫代磷酸化修饰的寡聚脱氧核苷酸是进行反义核酸干预的有效方法, 通过与 mRNA 上特定的靶序列互补或“反义”, 可阻断 mRNA 的转录, 调节从基因到蛋白质的信息传递, 抑制蛋白质表达. 设计针对相应的靶基因, 即 LMP1, 及 cyclinD1 启动子的反义硫代磷酸化寡聚核苷酸, 以正义 LMP1 为对照, 在 LMP1 稳定表达的 HNE2-LMP1 中, 分别从转录水平阻断 LMP1, cyclinD1 的表达后, 以软琼脂集落形成率为指标, 观察细胞恶性表型改变 (图 5). 结果显示: 较正义 LMP1 比较 (30.48%), 反义 LMP1 PS-ODNs 及反义 cyclinD1 的使用, 可以使细胞软琼脂集落形成率明显降低 (15.21%, 21.76%).

因此, 本研究从基因诱导表达及基因表达阻断两个方面分别提示: LMP1 上调的 cyclinD1 表达为有功能的 cyclinD1, 参与鼻咽癌细胞周期行进及细胞恶性表型.

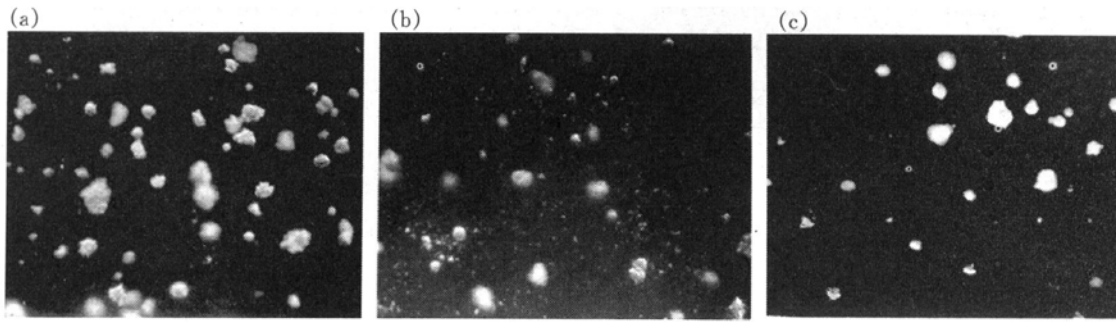


Fig. 5 Colony forming of HNE2-LMP1 cells treated conditions with (a) + PS ODN LMP1 sense; (b) + PS ODN LMP1 antisense; (c) + PS ODN cyclinD1 antisense

The clones were counted in two independent experiments.

### 3 讨 论

肿瘤是一类细胞周期病。我们先前的研究已经提示 LMP1, 做为大分子 DNA 致癌病毒 EBV 唯一确定的致瘤膜蛋白, 可能可以上调 cyclinD1 的表达。本文对此进行了进一步的探讨。

首先利用 LMP1 表达受强力霉素严密调控的鼻咽癌细胞株 Tet-on-LMP1-HNE2, 确定 LMP1 确实可以上调 cyclinD1 的表达。利用这一良好的体外模型体系, 从 LMP1 诱导 cyclinD1 蛋白质表达的动力学特征方面着手, 结果显示, 当加入 6 mg/L 强力霉素后, 随着时间的推移, cyclinD1 的表达迅速升高, 45 min 到达峰值, 1 h 后逐渐下降, 且在高水平平台上维持, 为未诱导时的 2 倍左右。结合时间曲线, 选择诱导 12 h 时, 观察 LMP1 诱导 cyclinD1 表达的剂量效应, 发现, 随着强力霉素剂量增加, cyclinD1 表达增强, 0.6 mg/L 的强力霉素对 cyclinD1 的表达诱导最显著, 6 mg/L 反而有所下降, 但仍是未经诱导时的 2 倍左右, 提示 LMP1 诱导 cyclinD1 的表达, 在动力学特征上表现为时间依赖性及剂量依赖性。

mRNA 转录增多是蛋白质表达上调的机制之一。报道基因法可以利用分析报道基因与基因转录活性之间的相关性, 间接反映基因的转录水平。同时对 LMP1 分子解剖研究的突破性进展表明: LMP1 C 端的两个重要的结构功能域, CTAR1 和 CTAR2, 在 LMP1 介导的各种生物学功能中发挥着不同的作用<sup>[8]</sup>。因此利用已建株的含野生型 LMP1 或三种 LMP1 突变体的鼻咽癌细胞系, 以空白载体 pSG5 导入的鼻咽癌细胞为对照, 结合报道基因分析法, 从转录水平上确定 LMP1 可以上调 cyclinD1 的表达, 结果显示, 较空白载体细胞系比

较, 野生型 LMP1 反式激活 cyclinD1 11.2 倍, 提示 LMP1 上调 cyclinD1 蛋白质表达的部分机制为上调 cyclinD1 的 mRNA 转录。进一步确定 LMP1 发挥这种生物学作用的结构域。结果显示, 较野生型 LMP1 比较, CTAR1 缺失导致 CyclinD1 活性下降 23.6%, CTAR2 缺失导致 cyclinD1 活性下降约 80.7%, 提示 LMP1 调节 cyclinD1 表达的结构域为以 CTAR2 为主, 且 CTAR1 与 CTAR2 的功能有部分重叠。同时, 结果还显示, C 端均缺失时 cyclinD1 活性还有野生型的 17.7%, 是空白载体的 2 倍, 由此可以推测, 除了 CTAR1 和 CTAR2 外, LMP1 的跨膜区及 N 端可能也参与部分促进 cyclinD1 转录活化的功能。

在确定了 LMP1 可以上调 cyclinD1 的表达后, 利用流式细胞仪观察细胞周期的改变, 软琼脂集落形成率观察细胞恶性表型的变化, 进一步确定被 LMP1 上调表达的 cyclinD1 为有功能的细胞周期调节因子。结果显示, 强力霉素诱导状况下, LMP1 活化 cyclinD1 表达, 促进细胞从 G0/G1 期进入 S 期 (G0/G1 期细胞从 66.42% 减至 56.55%), 促进鼻咽癌细胞周期行进。硫代磷酸化修饰的寡聚脱氧核苷酸进行反义核酸干预, 阻断基因的表达, 结果显示: 较正义 LMP1 比较 (30.48%), 反义 LMP1 PS-ODNs 及反义 cyclinD1 的使用, 可以使细胞软琼脂集落形成率明显降低 (15.21%, 21.76%)。

因此, 本研究从基因诱导表达及基因表达阻断两个方面分别提示: LMP1 上调 cyclinD1 的表达, 且上调的 cyclinD1 为有功能的细胞周期调节因子, 参与鼻咽癌细胞周期行进及细胞恶性表型。

新近, 对 LMP1 介导的信号转导途径的研究取得了突破性进展, 揭示 LMP1 介导的信号转导途径主要包括 NF- $\kappa$ B、AP-1 及 JAK/STAT 等<sup>[1]</sup>,

进一步研究显示, cyclinD1 的启动子上有 NF- $\kappa$ B、AP-1 的结合位点<sup>[9-11]</sup>, 因此提示有必要从信号转导途径对 LMP1 上调 cyclinD1 表达的机制进行深入探讨.

**致谢** 同济医科大学医学分子中心龚建平教授, 陶德定老师免费提供流式细胞仪测试及结果分析指导, 美国 DNA Recombinant Laboratory, NCI, Frederick, LEO Lee 博士免费合成反义硫代磷酸化寡聚核苷酸, 特此感谢!

### 参 考 文 献

- Farrell P J. Signal transduction from the Epstein Barr virus LMP-1 transforming protein. *Trends Microbiol*, 1998, **6** (5): 175~177
- Sherr J. Cancer cell cycle. *Science*, 1996, **274** (5293): 1672~1677
- Motokura T, Arnold A. Cyclins and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1155** (1): 63~78
- 赵晓荣, 顾焕华, 翁新究, 等. CyclinD 在鼻咽癌中表达及功能初步分析, *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32** (2): 194~196  
Zhao X R, Gu H H, Weng X X, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2000, **32** (2): 194~196
- 廖伟, 唐敏, 曹亚, 等. 一株受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, Tang M, Cao Y, *et al.* *Chin J Biochem Mole Biol*, 1999, **15** (1): 132~135
- 王承兴. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 在鼻咽癌中的作用及其机制探讨: [博士学位论文]. 长沙: 中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 2000  
Wang C X. Role of Epstein-Barr virus encoded Latent Membrane Protein-1 in the development of Nasopharyngeal Carcinoma and the mechanisms involved: [Ph. D thesis]. Changsha: Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Southern Central University, 2000
- Stein C A, Cheng Y C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents Is the bullet really magical? *Science*, 1993, **261** (5124): 1004~1012
- Muller W E, Mosialos G, Elliott K, *et al.* Epstein-Barr virus LMP1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF- $\kappa$ B activation. *J Virology*, 1997, **71** (1): 586~594
- Guttridge D C, Albanese C, Reuther J Y, *et al.* NF- $\kappa$ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of CyclinD1. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (8): 5785~5799
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, *et al.* NF- $\kappa$ B function in growth control: regulation of cyclinD 1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (4): 2690~2698
- Horber B, Truss M, Beato M, *et al.* Inducible regulatory elements in the human cyclinD1 promoter. *Oncogene*, 1994, **9** (4): 1295~1304

## The Epstein-Barr Virus Encoded Latent Membrane Protein 1 (EBV-LMP1) Activates Expression of CyclinD1\*

ZHAO Xiao-Rong\*\*, WANG Cheng-Xing, LUO Fei-Jun, GU Huan-Hua, TANG Min, XIA Lin-Qing, DENG Lin, YI Wei, DENG Xi-Yun, CAO Ya\*\*

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

**Abstract** Although LMP1 is expressed in the majority of Nasopharyngeal carcinoma (NPC), the effect of LMP1 on cellular gene expression and its contribution to the cell growth and the development of malignancy is largely unknown. CyclinD1 expression activated by LMP1 was studied. A dual-stable LMP1 integrated NPC cell line with Tet-on regulating system, designated as Tet-on-LMP1 HNE2 was used to gain insight into the cell kinetics of the induction of cyclinD1 with Western blotting. The expression of LMP1 in Tet-on-LMP1-HNE2 was tightly regulated by tetracycline or its derivation, doxycycline. LMP1 has two essential signaling domains with the carboxy terminus, termed C-terminal activation regions1 (CTAR1) and CTAR2. With cell lines stably expressed wild type LMP1, the vector or various deletion mutants and reporter gene assay, the activation essential domains of LMP1 activation cyclinD1 was also identified. The progression of cell cycle was determined by flow cytometry and soft agar assay was done to indicate that the cyclinD1 induced by LMP1 is functional. The results indicates that LMP1 induced cyclin D1 protein expression in both dose-dependent and time-dependent manner with Western blotting analysis in Tet-on-LMP1-HEN2 cell line. Reporter gene assay revealed that wild type LMP1 also can induce cyclinD1 expression at the transcriptional level via trans-activation compared to the control (11.2 fold). LMP1 deletion mutants lacking either CTAR1 or CTAR2 or both the

CTAR1 and CTAR2 deletion mutants had a decreased ability to induce cyclin D1 expression (76.4%, 19.3%, 17.7%). The results of flow cytometry analysis pointed to a cell cycle arrest at the G0/G1 phase compared to doxycycline negative Tet-on LMP1-HNE2 (66.42% to 56.55%). Compared with cultured with sense PS-ODN-LMP1 (30.48%), cultured with antisense PS-ODN-LMP1 and cyclinD1 showed profound decrease in colony formation (15.21%, 21.76%). This is the first report showing that cyclin D1 expression could be activated by a viral protein, LMP-1. This novel finding may thus represent a direct link between LMP1 and cell cycle regulator, CyclinD1.

**Key words** epstein-barr virus, latent membrane protein 1, cyclin D1

\* This work was supported by NSFC Distinguished Young Scholars Fund (39525022) and State Key Program of Basic Research (G1998051201).

\*\* Corresponding author.

Zhao Xiao-Rong Tel: 86-731-4805448, E-mail: xrzhao@163.net; Cao Ya Tel: 86-731-4805448, E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

Received: November 16, 2000 Accepted: December 12, 2000

## 欢迎订阅 欢迎投稿 《昆虫知识》(双月刊)

国际刊号: ISSN 0452-8255, 国内刊号: CN 11-1829/Q

国内邮发代号: 2-151, 国外邮发代号: BM 407

《昆虫知识》是中国昆虫学会和中国科学院动物研究所主办, 国内外公开发行的综合性通报类学术期刊, 是生物学和植物保护领域的国家核心期刊。该刊是以报道昆虫学研究领域最新科研成果、交流新技术新方法、普及基础知识、提高基础理论水平、促进学术交流为主要办刊宗旨。辟有专论与综述、研究报告、研究简报、基础知识、技术与方法、信息与动态、学术讨论、书刊评介等栏目。内容包括农、林、牧、医、仓储、检疫等重要害虫的发生与防治, 资源、食用、药用、天敌昆虫等益虫的利用与开发。涉及昆虫生态、行为、生理、生化、毒理、信息素等多个分支学科。读者对象主要是从事昆虫学研究的科技人员、大专院校师生、有关的组织管理人员以及中学师生和昆虫爱好者。

《昆虫知识》被美国《化学文摘》(CA)、《昆虫学文摘》、《生物学文摘》、《动物学记录》, 英国《CAB 文献数据库》、《应用昆虫学》、《应用昆虫学年评》, 联合国粮农组织《Agrindex》等 10 余种国际重要检索机构和国内《中国科学引文索引》、《中国科学文献数据库》、《万方数据库》等几十种检索机构收录。

《昆虫知识》为双月刊, 16 开, 80 页/期, 12 元/期, 全年定价为 72 元, 全国各地邮局均可订阅。新订户可向本刊编辑部补订 1999、2000、2001 年各卷, (卷价分别为 54 元、54 元和 72 元)。地址: 北京海淀中关村路 19 号, 中国科学院动物研究所《昆虫知识》编辑部, 邮政编码: 100080。

电话: (010) 62552266 传真: (010) 62569682 E-mail: wangj@panda.ioz.ac.cn

欢迎订阅, 欢迎投稿, 欢迎刊登广告。封 3 整版 1500 元, 封 4 整版 2000 元, 内页整版 800 元, 彩色另加 1000 元, 连续刊登优惠 10%~20%。