

Epstein-Barr 病毒潜伏蛋白 1 通过核转录因子 κ B 诱导鼻咽上皮细胞表达端粒酶活性*

杨 静 邓锡云 唐 敏 吴尚辉 顾焕华 易 薇 曹 亚**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 利用已建立的原代人鼻咽上皮细胞和 Tet-on-LMP1 系统等良好的实验模型, 采用荧光酶报道基因分析法和端粒酶 TRAP-ELISA 技术, 分别检测 EB 病毒潜伏蛋白 1 (LMP1) 诱导的核转录因子 κ B (NF κ B) 活性和端粒酶活性, 从 LMP1 介导 NF κ B 信号传导途径角度, 探讨 LMP1 诱导端粒酶表达的分子机制. 结果表明, LMP1 可诱导鼻咽上皮细胞表达端粒酶活性, 将 LMP1 羧基端胞浆区突变后, 可同时下调 NF κ B 活性和端粒酶活性. 在 Doxycycline 诱导 LMP1 表达状态下, NF κ B 反式激活活性增强, 同时端粒酶活性升高; 进一步应用硫代磷酸化修饰的反义 NF κ B p65 寡脱氧核苷酸和 I κ B α 的显性负性突变体分别阻断 NF κ B 活性, 可降低由 LMP1 诱导的端粒酶活性. 因此, NF κ B 作为 LMP1 信号传导途径上的枢纽, 可能介导了 LMP1 对端粒酶的表达调控.

关键词 Epstein-Barr 病毒, 潜伏蛋白 1, 核转录因子 κ B (NF κ B), 端粒酶, 永生化

学科分类号 R73

多种恶性肿瘤来源于上皮细胞, 上皮细胞永生化是体外研究各种调控因子时空效应的良好实验体系, 对其分子机制的研究是进一步阐明肿瘤发病机制的基础. 新近研究表明, 人染色体端粒程序性缩短是阻止细胞永生化的结构障碍^[1]. 端粒位于染色体末端, 由 6 bp 串联的短片段重复序列 (TTAGGG)_n 及一些结合蛋白组成. 每次细胞分裂, 端粒丢失约 50~200 个核苷酸. 当端粒缩短至一定限制长度时, 细胞脱离细胞周期而停止生长. 端粒序列的复制依赖于细胞内端粒酶作用. 端粒酶由 RNA 及相关蛋白组成, 是一种逆转录酶, 它以自身 RNA 为模板逆转录合成端粒重复序列以维持端粒长度. 研究表明, 端粒酶的重新激活与细胞永生化和肿瘤发生、发展密切相关^[2]. 新近发现, DNA 致癌病毒可通过激活端粒酶活性诱导细胞永生化^[3], 但其诱导端粒酶活化的分子机制尚未清楚.

Epstein-Barr (EB) 病毒是一种 DNA 致癌病毒, 与人 Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌、胃癌等肿瘤的发病密切相关, 但迄今为止, EB 病毒致癌机制仍未阐明. 在 EB 病毒编码基因中, EB 病毒潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 已被确证具有瘤基因功能, 在 EB 病毒致癌过程中扮演着重要的角色, 它可体外转化成纤维细胞; 参与 B 淋巴细胞永生化和诱导人角化上皮细胞 RHEK-1 形态学转化等^[4], 但促进人鼻咽上皮细胞永生化的作用机理缺乏直接、有力的证据.

LMP1 是一个由 386 个氨基酸残基组成的跨膜蛋白, 可通过其羧基端胞浆区结合 TNF 受体相关因子 (tumor necrosis factor receptor associated factors, TRAFs)、受体相关死亡结构域 (TNF receptor associated death domain TNF, TRADD) 等分子而活化核转录因子 NF κ B, 介导信号传导途径^[5], 参与细胞转化等过程. NF κ B 属于一个高度保守的反式激活因子家族, 处于 LMP1 所介导的信号转导枢纽, 可调节多种基因的表达. NF κ B 家族由多个成员组成, 包括 Dif、Dorsal、Relish、 ν -rel、 c -rel、p50 (NF κ B1)、p65 (RelA)、RelB 和 p52. 研究表明, 在鼻咽癌细胞中, LMP1 活化了 p65 后, 促使 NF κ B 由胞浆转位入胞核, 启动具有 κ B 结合位点的基因转录表达^[6]. 此外, NF κ B 活性受胞浆内抑制蛋白 I κ Bs 调节, I κ Bs 蛋白通过遮蔽 NF κ B 的核转位信号区, 使 NF κ B 不能进入核内而抑制其发挥转录活性. I κ B α 存在两个特异磷酸化位点 Ser32、Ser36, 突变后能阻断 I κ B α 磷酸化, 将这样的 I κ B α 显性负性突变子 (DNM I κ B α) 导入肿瘤细胞中能完全阻断组成性的或诱导性的 NF κ B 活性^[7].

新近我们发现, 人鼻咽上皮细胞永生化的过程中, EB 病毒诱导端粒酶表达, 本文在此基础上,

* 国家重点基础研究发展规划 (973)“鼻咽癌发生发展的基础研究” (G1998051201) 和国家自然科学基金杰出青年基金 (39525022) 资助.

** 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

利用四环素诱导表达 LMP1 的鼻咽癌细胞系、LMP1 羧基端缺失的鼻咽癌细胞系以及 I κ B α 显性负性突变体鼻咽癌细胞系等良好的实验体系, 探讨 EB 病毒 LMP1 通过 NF κ B 诱导人鼻咽上皮细胞端粒酶表达的分子机制。

1 材料与方法

1.1 原代人鼻咽上皮细胞及鼻咽癌细胞系培养

6 个月水囊引产胚胎 6 例 (由长沙市妇幼保健院及长沙市第四人民医院妇产科提供)。无菌分离鼻咽粘膜, 按已建立的方法^[8]将 1 mm³ 的组织块接种于 35 mm 培养皿中, 加入含 1.5% 胎牛血清 (GIBCO BRL 公司) 的 K-SFM (GIBCO BRL 公司) 培养液, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养两周, 获得原代人鼻咽上皮细胞。

将四环素基因调控系统 (Tet-on) 和 LMP1 基因共同导入鼻咽癌细胞 HNE2, 构建鼻咽癌细胞系 pTet-on-LMP1 HNE2, 在该细胞系中, LMP1 能受四环素及其衍生物强力霉素 (doxycycline, Dox) 诱导表达, 即随着 Dox 浓度的增加, LMP1 呈现相应的表达增加^[9]。此外, 分别将 B95-8 来源的全长 LMP1 cDNA 和 LMP1 羧基端胞浆区缺失的 LMP1 突变体 (Δ 1-185) cDNA 与 *Neo* 基因共同导入 HNE2 中, 建立稳定表达全长 LMP1 的鼻咽癌细胞系 (野生型) 和表达羧基端胞浆区缺失的突变体 LMP1 的鼻咽癌细胞系 (突变型)^[10]。另外, 将显性负性突变 I κ B α (DNM I κ B α) cDNA 导入表达全长 LMP1 的鼻咽癌细胞系 (野生型) 细胞中, 构建稳定表达 DNM I κ B α 鼻咽癌细胞系^[7]。这些细胞系均在含 15% 小牛血清 (华美公司) 的 RPMI1640 (GIBCO BRL 公司) 培养液中、置 37 °C, 5% CO₂ 培养, 并维持相应的筛选药物浓度。

1.2 硫代寡脱氧核苷酸

硫代修饰的寡脱氧核苷酸也是进行反义核酸干预的有效方法。根据文献设计针对 NF κ B p65 的 3' 端硫代修饰的有义和反义寡脱氧核苷酸, NF κ B p65 有义寡脱氧核苷酸: 5'-CGGCCATGGACGA-ACTGTTG-3', 反义寡脱氧核苷酸: 5'-GAACA-GTTCGTCCACATGGCCCACTTC-3'。两者均由美国国立癌症研究院寡核苷酸合成室合成, 使用浓度为 20 mg/L。

1.3 一过性转染实验

将原代培养的人胚鼻咽上皮细胞分为两组, 一组为转染 LMP1 基因的实验组, 另一组为未转染

的对照组。转染前 24 h 在 35 mm 培养皿上种植 1×10^5 个人胚鼻咽上皮细胞, 应用 EffecteneTM Transfection Reagent (QIAGEN 公司) 将 LMP1 基因一过性转染入人胚鼻咽上皮细胞, 具体操作按厂家提供的方法进行。另外, 转染前 24 h 在 6 孔板上种植 5×10^4 个 pTet-on-LMP1 HNE2 细胞, 按照 GIBCO BRL 公司提供的 LipofectAMINE 转染程序, 分别将 2 μ g 质粒 DNA 转染入细胞中, 3 h 后加入 Dox, 37 °C, 5% CO₂ 诱导培养 24 h 后检测。

1.4 人胚鼻咽上皮细胞形态学观察

人胚鼻咽上皮细胞一过性转染 48 h 后, 在相差显微镜下观察细胞形态学变化。

1.5 蛋白质印迹分析 LMP1 表达

细胞裂解液 (50 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L EDTA, 2% SDS, 5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 10 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF)) 裂解 3×10^6 个细胞, 沸水变性 10 min, 超声波粉碎 30 s, 13 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取上清, BCA assay reagent 测定蛋白质浓度。100 μ g 蛋白用不连续 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 LMP1 单克隆抗体 (DAKO 公司) 4 °C 孵育过夜, 再与羊抗鼠 IgG (华美公司) 37 °C 孵育 2 h, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色检测棕黄色条带。结果用转膜后丽春红 S 染色作为内对照校正。

1.6 端粒酶活性检测

端粒酶 PCR-ELISA 法是一种定量检测端粒酶活性的方法, 按照 Roche Molecular Biochemicals 公司提供的操作方法进行, 即每份样本收获 2×10^5 个鼻咽癌细胞, 用 200 μ l 裂解液裂解细胞, 取 3 μ l 的细胞裂解上清液 (相当于 3000 个细胞的蛋白质质量), 以试剂盒提供的引物和 PCR 程序进行端粒序列扩增。将扩增产物与地高辛标记的探针杂交, 通过生物素抗生物素包被于 96 孔板中, 再经显色反应在波长 450 nm 和 690 nm 处分别读取 A 值, $A_{450} - A_{690}$ (A_{690} 是空白校正值) 即为端粒酶的吸光度。当阳性对照吸光度大于 1.5 及阴性对照吸光度小于 0.25 时, 操作系统成立, 此时, 样本的吸光度大于 0.2 时为端粒酶活性阳性, 反之为阴性。在本实验中, 我们以试剂盒提供的 293 细胞裂解上清液为阳性对照, 以经 RNase 处理的 293 细胞裂解上清液为阴性对照。每份样本重复三次, 并进行统计学处理。此外, 原代人胚鼻咽上皮细胞转染 LMP1 基因、培养 48 h 后, 收获 2×10^5 个细胞,

按上述方法进行 PCR 扩增后, 扩增产物在 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 用 1% AgNO₃ 染色, 定性检测端粒酶活性, 并以 293 细胞为阳性对照, 以经 RNase 处理的 293 细胞为阴性对照.

1.7 NFκB 报道基因分析

用 NFκB 报道基因质粒 pNFκB-*luc* 的荧光素酶表达分析 NFκB 的活性. pNFκB-*luc* 包含 蛾科荧光素基因, 它的表达受 *CMV* 启动子调控, 在 *CMV* 启动子中插入来源于 HIV LTR 的 κB 元件. 将 pNFκB-*luc* 质粒以及 RSV β-Gal 质粒同时转染入细胞, 转染 24 h 后按荧光素酶表达分析系统 (Promega 公司) 的说明, 加入 100 μl 1× 裂解缓冲液, 室温下裂解 30 min, 用细胞刮子刮下细胞, 吸至离心管内, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 20 μl 上清液, 加入 100 μl 反应底物荧光素辅酶 A (luciferyl-CoA), 迅速推入单光子检测仪, 检测相对光单位 (relative light unit, RLU) 值为 NFκB 的活性. 间隔 10 s, 每个样本读两个数值, 取均值. 转染效率的校正按 β-Galactosidase Enzyme Assay System (Promega 公司) 说明, 取细胞裂解上清液 50 μl 加入 96 孔板, 加入 50 μl 反应底物混匀, 37 °C 孵育 30 min 后, 加入 150 μl 碳酸钠终止反应, 酶标仪检测波长 420 nm 时的读数. 同时, 取 1 μg ssDNA 作为无关 DNA, 瞬间转染入细胞, 同样进行报道基因分析, 其结果为报道基因分析的内对照. 每份样本重复三次, 并进行统计学处理.

2 结 果

2.1 LMP1 诱导鼻咽上皮细胞表达端粒酶活性

前期我们发现, EB 病毒可诱导人胚鼻咽上皮细胞表达端粒酶活性, 从而促使细胞进入永生. 作为重要的 EB 病毒编码产物, LMP1 在细胞转化过程中具有重要的作用, 因此, 我们对 LMP1 与端粒酶活性的关系进行探讨. 将 LMP1 基因一过性转染原代培养的人胚鼻咽上皮细胞, 培养 48 h 后, 利用相差显微镜观察细胞形态, 发现转染细胞生长活跃, 分裂相增多, 细胞立体感增强 (图 1b). 收获 2 × 10⁵ 个转染细胞定性检测端粒酶活性, 结果表明, 转染细胞的 PCR 产物电泳后呈现典型的 DNA 梯状条带, 与阳性对照细胞一致, 相反未转染细胞不呈现梯状条带 (图 1c), 提示 LMP1 可诱导人胚鼻咽上皮细胞表达端粒酶活性. 进一步利用 Tet-on-LMP1 HNE2 定量检测在不同浓度 Dox 诱导下的端粒酶活性变化. 结果表明,

随着 Dox 浓度增加, LMP1 蛋白表达水平升高 (图 2a), 在相应浓度 Dox 诱导下, 细胞在波长 450~690 nm 时的吸收率分别为 1.052 ± 0.088, 1.385 ± 0.383 和 2.854 ± 0.206 (图 2b), 提示 LMP1 促进 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞表达端粒酶活性.

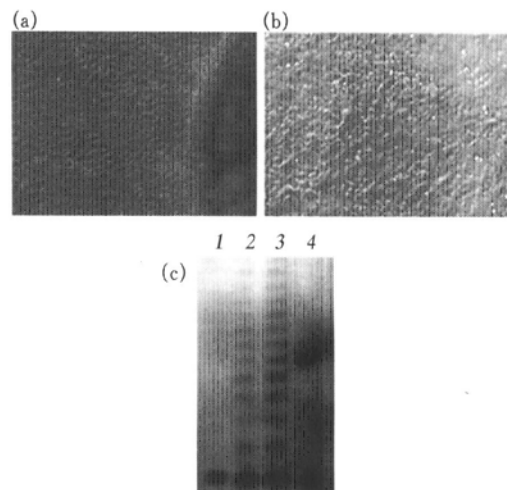


Fig. 1 LMP1 induces telomerase activity of primary nasopharyngeal epithelial cells

(a) the morphology of primary nasopharyngeal epithelial cells; (b) the morphology of transfected nasopharyngeal epithelial cells by LMP1; (c) the PCR product of transfected cells was stained by 1% AgNO₃. 1: non-transfected cells; 2: transfected cells; 3: 293 cells as positive control; 4: 293 cells treated with RNase A as negative control.

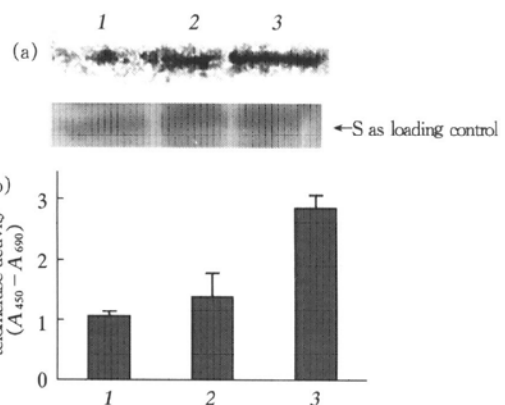


Fig. 2 Telomerase activity of Tet-on-LMP1 HNE2 cells was increased by LMP1

Different doses of doxycycline were added to the culture medium of Tet-on-LMP1 HNE2 cells. After 24 h the cells were harvested for Western blotting and PCR-ELISA assay. (a) Western blotting for the LMP1 protein levels; (b) PCR-ELISA assay for telomerase activity. 1: 0 mg/L doxycycline; 2: 0.6 × 10⁻³ mg/L doxycycline; 3: 0.06 mg/L doxycycline.

2.2 LMP1 羧基端胞浆区通过 NFκB 激活端粒酶

LMP1 分子羧基端胞浆区与 LMP1 介导 NFκB

信号传导途径、参与细胞转化密切相关, 利用 NF κ B 荧光酶报道基因分析含有野生型 LMP1 和突变型 LMP1 的细胞表达 NF κ B 活性. 可以看到, 野生型 LMP1 诱导的 NF κ B 活性是仅导入载体的 7.75 倍, 而突变型 LMP1 诱导 NF κ B 活性是仅导入载体的 1.09 倍 (图 3), 表明 LMP1 羧基端胞浆区活化 NF κ B. 进一步定量检测含有野生型 LMP1 基因 (全长 LMP1) 和突变型 LMP1 基因 (羧基端胞浆区缺失) 的鼻咽癌细胞端粒酶活性. 结果显示, 野生型 LMP1 细胞有较高的端粒酶活性, 是仅导入载体的 20.50 倍, 而突变型 LMP1 细胞表达端粒酶活性较低, 是仅导入载体的 4.20 倍 (图 3), 表明羧基端胞浆区缺失可降低 LMP1 诱导的端粒酶活性, 也提示 LMP1 诱导端粒酶表达可能与核转录因子 NF κ B 相关.

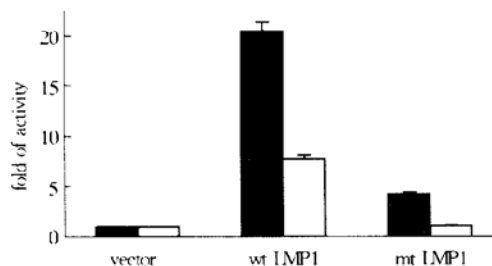


Fig. 3 Both of NF κ B activity and telomerase activity were induced by C terminal of LMP1

■: telomerase; □: NF κ B.

2.3 LMP1 通过 NF κ B 调控端粒酶活性

为了确证 NF κ B 在 LMP1 激活端粒酶中的作用, 我们首先分析在 LMP1 不同表达水平下 NF κ B 活性的变化. 结果表明, 在 LMP1 表达状态下, NF κ B 活性增强, 并且可随着 Dox 浓度增加逐步升高, 其报道基因活性分别为 (1570 \pm 113.137)、(2640 \pm 254.558) 和 (10800 \pm 395.980) (图 4a).

我们从阻断 NF κ B 活性的角度进行探讨. p65 是 NF κ B 家族的重要成员. 在鼻咽癌细胞中, LMP1 主要通过激活 p65 活化 NF κ B, 因此, 我们应用 p65 的有义和反义寡脱氧核苷酸, 以 20 mg/L 浓度加入 Dox 诱导下的 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞中, 分别检测 NF κ B 报道基因活性和端粒酶活性. 可以看到, 在 Dox (+)、Dox (+) 加有义 p65 寡脱氧核苷酸和 Dox (+) 加反义 p65 寡脱氧核苷酸的状态下, NF κ B 活性分别是 Dox (-) 的 4.746 倍、7.27 倍和 1.836 倍, 它们表达端粒酶活性的吸

收率分别为 Dox (-) 的 2.308 倍、2.744 倍和 1.492 倍, 结果表明, 反义 p65 寡脱氧核苷酸阻断 NF κ B 活性, 同时抑制了由 LMP1 诱导表达的端粒酶活性 (图 4b). 另外我们应用能完全阻断 NF κ B 活性的 DNM I κ B α , 分别检测 NF κ B 报道基因活性和端粒酶活性, 进一步确认 NF κ B 的作用. 结果表明, 含有 LMP1 的鼻咽癌细胞表达 NF κ B 报道基因活性是仅导入载体的 7.85 倍, 端粒酶活性是 8.79 倍; 而导入 DNM I κ B α 后细胞表达 NF κ B 活性下降 (报道基因活性是载体的 2.58 倍), 同时其端粒酶活性也下降, 端粒酶活性是载体的 1.58 倍 (图 4c), 表明 DNM I κ B α 抑制由 LMP1 诱导的 NF κ B 活性, 进而抑制端粒酶活性, 提示 LMP1 可通过 NF κ B 调控端粒酶表达.

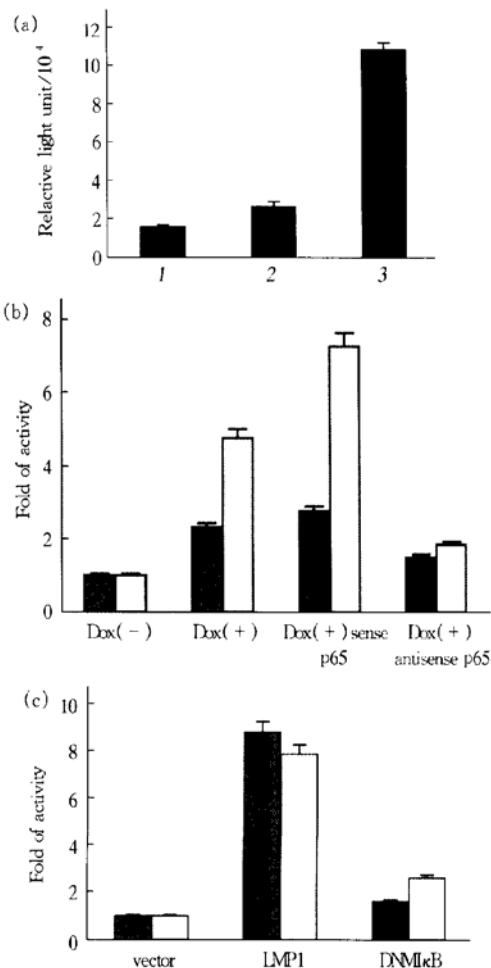


Fig. 4 LMP1 induces telomerase activity through NF κ B

(a) LMP1 increases NF κ B transactivity in Tet-on-LMP1 HNE2 cells. 1: 0 mg/L doxycycline; 2: 0.6×10^{-3} mg/L doxycycline; 3: 0.06 mg/L doxycycline. (b) telomerase activity was inhibited by antisense oligodeoxynucleotides of p65; (c) telomerase activity was inhibited by domain negative mutant (DNM) of I κ B α that inhibited. ■: telomerase; □: NF κ B.

3 讨 论

近年来细胞永生化分子机制研究取得了突破性进展, 端粒酶重新激活被认为是防止人染色体端粒程序性缩短、促使体外细胞永生化以及体内细胞癌变的关键环节之一^[2]. 一些致癌蛋白, 如 HPV E6、SV40 T 抗原等可诱导端粒酶表达, Veldman 等^[11]报道, HPV 16 E6 诱导人角化细胞和卵巢上皮细胞表达端粒酶活性, 维持染色体端粒长度. Sugimoto 等^[12]观察到 EB 病毒转化 B 淋巴细胞过程中, 端粒酶活性表达的 B 淋巴细胞可永生化, 端粒酶活性不表达的细胞不能永生化. 我们也观察到, EB 病毒诱导人鼻咽上皮细胞端粒酶活性表达, 并发现 LMP1 激活的端粒酶活性在鼻咽上皮细胞永生化过程中具有重要作用^[13], 提示 LMP1 诱导的端粒酶活化是重要的 EB 病毒致癌机制之一. 但是, LMP1 是跨膜蛋白, 它如何激活端粒酶活性? 其分子机制如何? 至今未见报道.

细胞永生化过程涉及多种因素改变, LMP1 介导的信号传导途径可能是其中一个关键环节. Uchida 等提出, LMP1 功能类似于肿瘤坏死因子家族成员 CD40, 通过介导的信号传导途径参与细胞转化. 目前已知 LMP1 至少与三条信号途径有关: NF κ B 途径、AP-1 途径和 JAK-STAT 途径, 其中 NF κ B 信号途径尤为重要, LMP1 通过其羧基端胞浆区的 CTAR1 和 CTAR2 两个功能域反式激活 NF κ B. 我们设想, LMP1 是否通过 NF κ B 信号传导途径诱导端粒酶表达? 因此, 我们采用原代人胚鼻咽上皮细胞和 Tet-on-LMP1 HNE2 等良好的实验模型, 探讨 LMP1 诱导端粒酶活化的分子机制. 结果表明, LMP1 可诱导原代人胚鼻咽上皮细胞表达端粒酶活性, 并且端粒酶活性可随着 LMP1 表达水平的升高而增加. 实验发现, LMP1 羧基端胞浆区介导的 NF κ B 信号传导途径参与端粒酶的活化. 进一步研究表明, 随着 LMP1 表达增加, NF κ B 活性增强, 同时端粒酶活性升高, 利用 p65 反义寡脱氧核苷酸和 I κ B α 的显性负性突变体分别阻断 NF κ B 活性, 均可下调 LMP1 诱导的端粒酶活性, 提示 LMP1 通过反式激活 NF κ B 活性而诱导端

粒酶表达. 由此我们确认, NF κ B 作为信号传导途径的枢纽, 可能介导 LMP1 对端粒酶活性调节.

参 考 文 献

- 1 Klingelutz A J. The roles of telomeres in cellular immortalization and the development of cancer. *Anticancer Res*, 1999, **19** (6A): 4823~ 4830
- 2 Cerni C. Telomeres, telomerase, and myc. *Mutat Res*, 2000, **462** (1): 31~ 47
- 3 Montalto M C, Phillips J S, Ray F A. Telomerase activation in human fibroblasts during escape from crisis. *J Cell Physiol*, 1999, **180** (1): 46~ 52
- 4 Fahraeus R, Rymo L, Rhim J S, *et al.* Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP1 gene of Epstein-Barr virus. *Nature*, 1990, **345**: 447~ 449
- 5 Kieser A, Kaiser C, Hammerschmidt W, *et al.* LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J*, 1999, **18** (9): 2511~ 2521
- 6 廖伟, 唐敏, 曹亚, 等, EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞中调控核转录因子 κ B 活性研究. *病毒学报*, 2000, **16** (3): 198~ 202
Liao W, Tang M, Cao Y, *et al.* *Chin J Virol*, 2000, **16** (3): 198~ 202
- 7 Yin L Q, Liao W, Cao Y, *et al.* LMP1 activates NF- κ B via degradation of I κ B α in nasopharyngeal carcinoma cells. *Chinese Medical Journal*, 2001, **114** (7): 718~ 722
- 8 杨静, 唐发清, 曹亚, 等, EB 病毒介导人鼻咽上皮细胞永生化早期阶段的生物学观察. *实验生物学报*, 2001, **34** (2): 89~ 99
Yang J, Tang F Q, Cao Y, *et al.* *Acta Biol Experi Sin*, 2001, **34** (2): 89~ 99
- 9 廖伟, 易红, 曹亚, 等, Tet 调控 EB 病毒 LMP1 基因导入鼻咽细胞系表达的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (3): 309~ 312
Liao W, Yi H, Cao Y, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 1999, **31** (3): 309~ 312
- 10 王承兴, 李晓燕, 曹亚, 等, EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞系中通过 TRAF2 活化 NF κ B. *癌症*, 2000, **19** (6): 517~ 520
Wang C X, Li X Y, Cao Y, *et al.* *Chin J Cancer*, 2000, **19** (6): 517~ 520
- 11 Veldman T, Horikawa I, Barrett J C, *et al.* Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*, 2001, **75** (9): 4467~ 4472
- 12 Sugimoto M, Ide T, Goto M, *et al.* Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mech Ageing Dev*, 1999, **107** (1): 51~ 60
- 13 杨静, 邓锡云, 曹亚, 等, EB 病毒潜伏膜蛋白 1 诱导人鼻咽上皮细胞端粒酶的表达. *实验生物学报*, 2001, **34** (3): 207~ 211
Yang J, Deng X Y, Cao Y, *et al.* *Acta Biol Experi Sin*, 2001, **34** (3): 207~ 211

Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Telomerase Activity of Nasopharyngeal Epithelial Cells Through NF κ B*

YANG Jing, DENG Xi-Yun, TANG Min, WU Shang-Hui, GU Huan-Hua, YI Wei, CAO Ya**
(Cancer Research Institute, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract To confirm whether Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induced telomerase activity of nasopharyngeal epithelial cells through nuclear factor-kappa B (NF κ B), NF κ B activity analysis was performed with pNF κ B-luc reporter plasmid and telomerase activity was tested by PCR-ELISA in primary nasopharyngeal epithelial cells and Tet-on-LMP1 HNE2 cells and other cellular model. The results showed that LMP1 could induce telomerase activity and the C terminus of LMP1 could promote both of NF κ B transactivity and telomerase activity. In addition, phosphorothioate oligonucleotides of antisense NF κ B p65 and dominant negative mutant of I κ B α could inhibit telomerase activity that was induced by LMP1. It was implicated that LMP1 could regulate telomerase activity via NF κ B in nasopharyngeal epithelial cells.

Key words Epstein-Barr virus, latent membrane protein 1, nuclear factor-kappa B (NF κ B), telomerase, immortalization

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1998051201) and The Youth Fund of National Science Foundation of China (395250022).

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

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