

EB 病毒潜伏膜蛋白 1 通过 TRAF/ TRADD 激活 JNK 信号途径*

胡 智 曾 亮 陶永光 唐发清 王 海 罗非君 易 薇 曹 亚**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为了探讨在鼻咽癌细胞中 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 激活 c-Jun 氨基端激酶 (JNK) 信号途径的分子机制, 利用可调控表达 LMP1 的鼻咽癌细胞系 L7, 蛋白质印迹检测, 发现 LMP1 能够促进 JNK 的活化; 利用稳定表达 LMP1 的鼻咽癌细胞系 HNE₂-LMP1 及其三种突变体 HNE₂-LMP1 Δ CTAR1、HNE₂-LMP1 Δ CTAR2、HNE₂-LMP1 Δ CTAR1, 2 及 LMP1 阴性的 HNE₂ 为材料, 采用蛋白质印迹和报告基因法分析 JNK 和活化蛋白 1 (AP1) 活化情况, 结果显示 HNE₂-LMP1 和 HNE₂-LMP1 Δ CTAR1 中磷酸化 JNK 蛋白表达量和 AP1 活性都无显著差异, 而与 HNE₂-LMP1 Δ CTAR2、HNE₂-LMP1 Δ CTAR1, 2、阴性对照 HNE₂ 及空白载体转染细胞的 JNK 蛋白表达和 AP1 活性具有显著差异; 进一步比较转染 TRAF、TRADD 显性负性突变体鼻咽癌细胞系 HNE₂-LMP1 中磷酸化的 JNK 量和 AP1 活性, 结果显示: TRAF-DN 和 TRADD-DN 的导入使活化的 JNK 蛋白和 AP-1 活性显著降低, 二者间无显著差异, 提示 TRAF 和 TRADD 可能参与了 LMP1 对 JNK 和 AP-1 的活化。以上结果提示在鼻咽癌细胞系中 LMP1 功能结构域 CTAR2 通过结合 TRAF/TRADD 激活 JNK 从而活化重要的转录因子 AP1。

关键词 鼻咽癌, EB 病毒, 潜伏膜蛋白 1, c-jun N 端激酶, 激活蛋白 1

学科分类号 R78.3

潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 已被确证为具有瘤基因功能的 EB 病毒编码的蛋白质, 其所介导的信号转导途径, 在细胞增殖、分化、转化与凋亡中发挥重要的生物学作用, 但其致癌机制远未阐明。LMP1 蛋白是含有 386 个氨基酸的跨膜蛋白, 其 C 端有两个重要的结构功能域 CTAR1 (carboxy-terminal activating region 1) 和 CTAR2 (carboxy-terminal activating region 2)^[1]。近年来研究证明, LMP1 诱导的核转录因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 活化部分介导 B 淋巴细胞转化, 激活蛋白 1 (activator protein 1, AP1) 作为 LMP1 介导的信号通路的一个重要效应因子参与 B 淋巴细胞转化^[2]。研究表明鼻咽癌细胞中 LMP1 通过激活 AP1 上游的关键激酶—— c-Jun 氨基端激酶 (JNK) 进而介导 AP1 的活化, 并且参与鼻咽肿瘤的恶性演进, 但 LMP1 的哪个结构功能域在此过程中起作用及相关机制仍不清楚^[3]。在此基础上, 进一步研究 LMP1 通过何种下游衔接分子活化 JNK, 参与其介导的信号传导途径, 将为深入探讨鼻咽癌细胞中 LMP1 激活 AP1 信号途径机制提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系

HNE₂-LMP1 及其突变体细胞系是在 LMP1 阴

性的鼻咽癌细胞系 HNE₂ 中导入野生型 LMP1 及其 CTAR1、CTAR2、羧基端胞浆区缺失型突变体, 稳定表达 LMP1 及其突变体的鼻咽癌细胞系。细胞培养液为含 15% 小牛血清的 RPMI-1640, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。

1.2 质粒

AP1 报告质粒是将一段胶原酶启动子区 (-73 到 +67) 其包含有一个 AP1 结合位点的序列, 插入到带有萤火虫荧光酶的 pG12 载体构建而成。TRAF 显性负性突变体、TRADD122~293 (缺乏死亡结构域和 TRAF 结合域)、TRADD122~312 (缺乏 TRAF₂ 结合域) 表达质粒氨苄抗性, 由德国 Wolfgang Nammerschmidt 大学 Kieser 博士赠送, 经 TG1 菌种转化, -70℃甘油保存。

1.3 抗体与试剂

磷酸化 JNK 抗体 (Thr183/Tyr185) 购自 New England Biolabs (Cat No. 9251S), 化学发光试剂盒: Supersignal West Dura Extended Duration Substrates (NO. 34075) 购自 Pierce 公司, DAB 购自上海华美公司。

* 国家重点基础研究发展规划“恶性肿瘤发生发展的基础研究”项目 (973) (G1998051201) 和国家自然科学基金项目 (30000087)。

** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2002-01-10, 接受日期: 2002-03-05

1.4 方法

1.4.1 LipofectAMINE 介导的瞬间细胞转染: 按 LipofectAMINE™ 转染说明书, 将 1×10^6 个处于对数生长期的鼻咽癌细胞接种于 100 ml 培养瓶中, 待细胞生长至 70% ~ 80% 融合度时弃培养基, 在两个 Eppendorf 管中各加 400 μ l 无血清培养基, 其中一管加 25 μ g TRAF 或者 TRADD 报告质粒, 另一管加 20 μ l LipofectAMINE 后混匀, 置室温下 45 min, 加入培养瓶中, 再补加 1 ml 无血清培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养条件下, 转染 5 h 后, 换含 10% 血清的培养基, 继续培养 24 h 后用于实验.

1.4.2 报告基因分析法: 用 AP1 报告质粒 pAP-1-Luc 的荧光素酶分析 AP1 的活性. 按 lipofectAMINE™ 转染说明书上的方法, 转染前 24 h, 将鼻咽癌细胞种植于 24 孔板培养, 待细胞生长至 70% ~ 80% 融合度时弃培养基, 将 pAP-1-Luc 质粒一过性转入细胞. 在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养条件下, 转染 5 h 后, 换含 10% 血清的培养基, 继续培养到 24 h 用于报道荧光酶活性分析实验. 按荧光素酶分析系统的说明 (Luciferase Assay System) 操作, 每孔加入 100 μ l $1 \times$ 裂解缓冲液 (lysis buffer), 室温下裂解 30 min, 用细胞刮子将细胞刮下, 吸至离心管内, 12 000 g 离心 15 s 收集蛋白裂解液, 取 20 μ l 上清液, 加入 100 μ l 反应底物 (luciferase-CoA), 迅速推入液闪仪 (BECKMAN LS5000 TA) 单光子档, 检测 cpm 值, 间隔 10 s, 每个样本读两个值, 取平均值, 每组取 3 个孔, 然后再取平均值, 最后, 根据所得的数据作图分析结果.

1.4.3 蛋白质印迹: 1×10^6 个细胞用细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 2% SDS, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF)) 裂解. 30 s 超声粉碎, 沸水浴变性 10 min, 13 000 g 离心去除细胞碎片, 上清液中蛋白质浓度用双喹啉甲酸 (BCA) (Pierce Chemical Co, Rockford, IL) 测定. 100 μ g 蛋白质用不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 膜与一抗孵育 12 h, 二抗孵育 2 h, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色或者化学发光法检测, 结果用转膜后丽春红 S 染色作为内对照校正.

2 结果

2.1 LMP1 的表达能够促进 JNK 的活化

在可受强力霉素衍生物 Dox 诱导表达 LMP1

的鼻咽癌细胞系 Tet-on-LMP1-HNE₂ 中用 Dox (6 mg/L) 诱导 LMP1 的表达, 用抗磷酸化的 JNK 抗体孵育, 蛋白质印迹检测, DAB 显色, 结果发现随着诱导时间的延长, 磷酸化的 JNK1 和 JNK2 量均明显增多, 尤以 12 h 后变化更趋显著, 到 24 h 达到最高. 此实验结果证明 LMP1 的表达促进 JNK 磷酸化 (图 1).

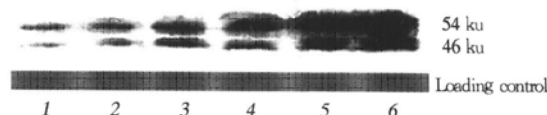


Fig. 1 Analysis of the phospho-JNK induced by LMP1 at different time with Western blotting

1: 1 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 18 h; 6: 24 h.

2.2 LMP1 CTAR2 激活 JNK 及其下游因子 AP1

在证实 LMP1 能够有效活化 JNK 的基础上, 为了进一步确定 LMP1 活化 JNK 的具体结构功能域, 应用蛋白质印迹检测 HNE₂-LMP1 及其突变体细胞系 HNE₂-LMP1 Δ CTAR1、HNE₂-LMP1 Δ CTAR2 中磷酸化 JNK 表达量的情况, 以 Dox 诱导的 Tet-on-LMP1-HNE₂ 为阳性对照, HNE₂ 为阴性对照, 结果可见: HNE₂-LMP1 Δ CTAR2 细胞系中其 JNK 磷酸化水平明显下调, 而 CTAR1 缺失的细胞系其磷酸化的 JNK 水平未见改变. 提示 LMP1 CTAR2 是活化 JNK 的主要结构功能域 (图 2).

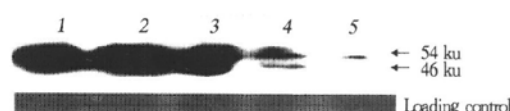


Fig. 2 The variation of phospho-JNK in different nasopharyngeal carcinoma cell lines

1: Tet-on-LMP1-HNE₂; 2: HNE₂-LMP1; 3: HNE₂-LMP1 Δ CTAR1; 4: HNE₂-LMP1 Δ CTAR2; 5: HNE₂.

利用脂质体介导瞬间转染 AP1 报告质粒, 报告基因分析结果显示, 与阴性对照 HNE2 比较, HNE2-LMP1 活化 AP1 约为 9 倍, HNE2-LMP1 Δ CTAR1 约 8 倍, 而 HNE2-LMP1 Δ CTAR2 和羧基端缺失相似, 约为空白载体和 HNE2 的 1.1 ~ 1.2 倍, CTAR2 缺失的 LMP1 活化 AP1 活性较 CTAR1 缺失的明显减弱. 结果表明, CTAR2 是活化 AP1 的主要功能域 (图 3).

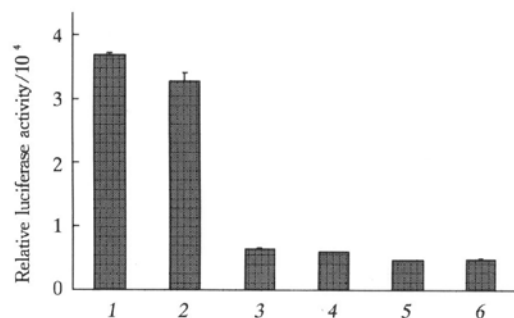


Fig. 3 Mutational analysis of LMP1 functional regions with respect to AP1 activation

1: HNE₂LMP1; 2: HNE₂LMP1 Δ CTAR1; 3: HNE₂LMP1 Δ CTAR2; 4: HNE₂LMP1 Δ CTAR1, 2; 5: HNE₂pSG5; 6: HNE₂.

2.3 LMP1 通过 TRAF/TRADD 复合物激活 JNK

用蛋白质印迹检测转染导入 TRAF 显性负性突变体、TRADD122~293、HNE₂LMP1 和 Tet-on LMP1-HNE₂ 中磷酸化 JNK 表达情况, 结果可见: 导入 TRAF 显性负性突变体、TRADD122~312 的细胞系中磷酸化 JNK 蛋白表达量显著降低, 提示 LMP1 活化 JNK 可能通过 TRAF/TRADD 复合物 (图 4)。

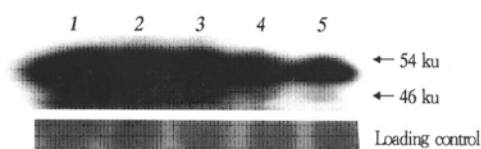


Fig. 4 Expression of phospho-JNK in the HNE₂LMP1 cells after transfection with TRADD DN or TRAF DN plasmids

1: Tet-on LMP1-HNE₂; 2: HNE₂LMP1; 3: HNE₂LMP1 Δ CTAR1; 4: HNE₂LMP1+ TRAF DN; 5: HNE₂LMP1+ TRADD DN.

将 TRAF、TRADD 显性负性突变体分别与

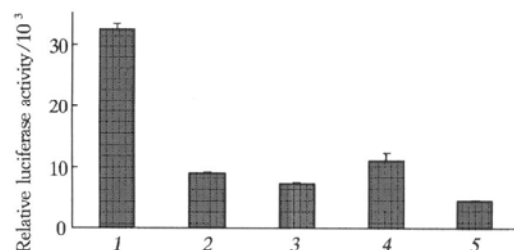


Fig. 5 Analysis of AP1 activity after transfection with TRADD DN and TRAF DN plasmids

1: HNE₂LMP1; 2: TRADD (122~314); 3: TRADD (122~293); 4: TRAF DN; 5: HNE₂.

AP1 报告质粒共转染 HNE₂LMP1 中, 通过报告基因分析, 结果显示: 导入 TRADD (122~312) 显性负性突变体使 AP1 的活性下调了 3.6 倍, TRADD (122~293) 下调了 4.5 倍, TRAF2 的显性负性突变体下降约为 3 倍, 提示 LMP1 可能通过 TRAF/TRADD 复合物活化 AP1 (图 5)。

3 讨 论

大量研究显示 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 在 EB 病毒致癌过程中发挥着重要作用。而位于 LMP1 羧基端 194~231 位氨基酸的 CTAR1 和位于 351~386 位氨基酸 CTAR2 两个功能域, 与 LMP1 功能的发挥密切相关。

肿瘤坏死因子受体相关因子 (tumor necrosis factor receptor associated factor, TRAF) 是一类重要的联结蛋白 (adaptor protein) 家族, 在淋巴细胞系中, TRAF1、2、3 可直接结合 LMP1-CTAR1 的 PXQXTA 结构域而激活下游信号分子, 包括 I κ B 的磷酸化, 从而介导 NF- κ B 活化。LMP1-CTAR2 不能直接结合 TRAF 而可与肿瘤坏死因子受体相关死亡域蛋白 (TNF receptor associated death domain protein, TRADD) 直接结合, 并聚集 TRAF2 进而激活 NF- κ B 和 AP1。故 LMP1 与 TRAF 和 TRADD 的结合在 LMP1 介导的信号通路中具有重要意义^[7,8]。研究已证实了在鼻咽癌细胞中 LMP1 可与磷酸化 TRAF1、2、3 直接或间接作用而形成免疫共沉淀复合物^[4]; 并进一步发现 LMP1 通过 TRAF1、2 或 3 调控 NF- κ B, TRAF1、2 主要通过 CTAR1 发挥作用, TRAF2 作用主要通过 CTAR1、2 介导^[5,6]。

研究发现 LMP1 活化核转录因子 AP1 的信号通路在 EB 病毒相关肿瘤发生和发展中具有重要意义。我室研究也证实 LMP1 在鼻咽癌细胞中可通过 JNK 介导 AP1 活化, 但机制不明。本研究中, 首先利用 LMP1 受强力霉素衍生物诱导表达的鼻咽癌细胞系 L7 诱导 LMP1 的表达^[9], 结果显示 LMP1 的表达促进了 JNK 的活化, 并且具有时间效应。在此基础上, 进一步探讨 LMP1 活化 JNK 的功能域, HNE₂LMP1 及其三种突变体的鼻咽癌细胞系 CTAR1 缺失型 (HNE₂LMP1 Δ CTAR1)、CTAR2 缺失型 (HNE₂LMP1 Δ CTAR2), 羧基端胞浆区缺失型 (HNE₂LMP1 Δ CTAR1, 2) 提供了较好的研究工具, 利用蛋白质印迹和报告基因分析

法分析 HNE₂-LMP1 及其三种突变体的鼻咽癌细胞系中磷酸化 JNK 蛋白表达和 AP1 活性变化情况. 结果显示, HNE₂-LMP1 和 HNE₂-LMP1 Δ CTAR1 中磷酸化 JNK 蛋白表达和 AP1 活性无显著差异 ($P > 0.05$), 而与 HNE₂-LMP1 Δ CTAR2、HNE₂-LMP1 Δ CTAR1, 2、阴性对照 HNE2 及空白载体转染细胞的活化 JNK 蛋白量和 AP1 活性具有显著差异 ($P < 0.01$), 后 4 种细胞株的 JNK 蛋白表达和 AP1 活性无显著差异 ($P > 0.05$), 即在 CTHNE₂-LMP1 Δ CTAR2、HNE₂-LMP1 Δ CTAR1, 2 中存在 JNK 表达和 AP1 活性平行升高, 结果提示 LMP1CTAR2 功能区在 LMP1 激活 JNK 和 AP1 中起主要作用.

进一步将 TRAF 和 TRADD 显性负性突变体 (TRAF-DN、TRADD-DN) 分别导入 HNE-LMP1 细胞中, 结果发现 TRAF-DN 和 TRADD-DN 的导入使磷酸化的 JNK 蛋白和 AP1 活性显著降低, 此二者间无显著差异, 提示 TRAF 和 TRADD 参与了 LMP1 对 JNK 和 AP1 的活化.

本研究首次发现在鼻咽癌细胞中 LMP1CTAR2 通过 TRAF/TRADD 激活 JNK 介导的 AP1 信号途径, 此实验结果是对 LMP1 介导的鼻咽癌发生机制研究的进一步深入. 但 LMP1 与 TRAF 和 TRADD 之间, 以及 TRAF、TRADD 通过何种上游激酶参与活化 JNK 及其下游的重要靶转录因子 AP-1 仍需进一步阐明.

参 考 文 献

- 1 Floettmann J E, Eliopoulos A G, Jones M, *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein -1 (LMP1) signaling is distinct from CD40 and involves physical cooperation of its two C-terminus functional regions. *Oncogene*, 1998, **17** (18): 2383~ 2392
- 2 Liljeholm S, Hughes K, Grundstrom T, *et al.* NF- κ B only partially mediates Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of B cells. *J Gen Virol*, 1998, **79** (9): 2117~ 2125
- 3 罗非君, 胡 智, 曹 亚, 等. EB 病毒 LMP-1 在鼻咽癌细胞中通过 JNK 介导 AP-1 活化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17** (3): 381~ 385
- 4 Luo F J, Hu Z, Cao Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, **17** (3): 381~ 385
- 5 王承兴, 李晓燕, 顾焕华, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 在鼻咽癌中结合磷酸化的 TRAFs. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17** (1): 110~ 114
- 6 Wang C X, Li X Y, Gu H H, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, **17** (1): 110~ 114
- 7 王承兴, 李晓艳, 曹 亚, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 通过结合 TRAFs 调控 NF κ B. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (2): 240~ 245
- 8 Wang C X, Li X Y, Cao Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (2): 240~ 245
- 9 廖 伟, 唐 敏, 邓锡云, 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
- 10 Liao W, Tang M, Deng X Y, *et al.* *Chin J Virol*, 2000, **16** (3): 198~ 202
- 11 Miller W E, Cheshire J L, Nancy R T, *et al.* Interaction of tumor necrosis factor receptor-associated factor signaling proteins with the LMP1 PXQXT motif is essential for induction of the EGFR expression. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (5): 2835~ 2844
- 12 Arich R H, Gedrich R W, Thompson C B. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAFs): A family of adaptor proteins that regulates life and death. *Genes Development*, 1998, **12** (4): 2821~ 2830
- 13 廖 伟, 易 红, 曹 亚, 等. Tet 调控的 EB 病毒 LMP1 基因导入鼻咽癌细胞系表达的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (3): 309~ 312
- 14 Liao W, Yi H, Cao Y, *et al.* *Acta Biochem Biophys*, 1999, **31** (3): 309~ 312

EB Virus-encoded Latent Membrane Protein 1 Activates The JNK Signalling Pathway via a Mechanism Involving TRADD and TRAF in Nasopharyngeal Carcinoma Cell^{*}

HU Zhi, ZENG Liang, TAO Yong-Guang, TANG Fa-Qing, WANG Hai, LUO Fei-Jun, YI Wei, CAO Ya^{**}

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

Abstract In order to illustrate the mechanism of AP1 signalling pathway mediated by latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by EB virus, the expression of phospho-JNK in Tet-onr-LMP1-HNE₂ cell line (L7) was determined at different time by Western blotting, JNK activation increased with the induction of LMP1 in a time dependant manner was abserved. The expression of phospho-JNK and AP1 activity were analyzed by Western blotting and reporter gene in nasopharyngeal carcinoma cell lines which stably expressing LMP1 and the three kinds of its mutants containing different mutation in carboxyterminal activating region. The result showed

that no difference existed between HNE₂-LMP1 and HNE₂-LMP1 Δ CTAR1, but significant difference between HNE₂-LMP1 Δ CTAR2 and HNE₂-LMP1, HNE₂-LMP1 Δ CTAR1. 2. The phospho-JNK expression and AP1 activity of HNE₂-LMP1 cell lines were individually transfected by dominant negative TRAF (TRAF-DN) and dominant negative TRADD (TRADD-DN). The results showed that the transfection of TRAF-DN or TRADD-DN made JNK expression and AP1 activity decreased significantly. The results suggested that the functional domain CTAR2 of LMP1 encoded by EB virus can mediate JNK signalling pathway through cooperation with TRAF/TRADD complex.

Key words nasopharyngeal carcinoma, Epstein-Barr virus (EB virus), latent membrane protein 1, c-Jun N-terminal kinase, activator protein 1

* This work was supported by grants from Special Funds for Major State Basic Research of China (1998051201) and The National Natural Sciences Foundation of China (30000087).

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

Received: January 10, 2002 Accepted: March 5, 2002

欢迎订阅 欢迎投稿 《应用与环境生物学报》(双月刊)

刊号: ISSN 1006-687X 邮发代号: 62-15
CN51-1482/Q

本刊是中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版、国内外公开发行的全国性学术科技期刊(学报级),是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或述评。读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部。本刊获中国科学院科学出版基金资助。

《应用与环境生物学报》为双月刊(1999年由季刊改为双月刊),双月25日出版,每期96页,2001年起改为大16开,高档铜板纸印刷。定价仍为每期11.00元,年定价66.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可向本刊编辑部补购1995、1996、1997、1998、1999、2000、2001年各卷(卷价分别为32.00元、44.00元、44.00元、44.00元、66.00元、66.00元、66.00元和66.00元)。以及1999年增刊(环境微生物学研究),订价每册22.00元。

编辑部地址:成都市人民南路4段9号,中国科学院成都生物研究所学报编辑部。

邮编:610041

电话:028-85229903, 85237341(联系人:刘东渝)

E-mail: biojaeb@cib.ac.cn; http://biojaeb.yeah.net