

2000, 15(3)

①

R373.9

R739.62

EB病毒4种反义寡核苷酸片段对
鼻咽癌 SUNE-1 细胞株的影响*朱振宇¹, 周元平², 张清秀¹, 高国全¹, 邓诣群¹, 马润泉¹¹(中山医科大学生物化学教研室, 广州 510089)²(中山医科大学附属三院传染科, 广州 510630)

摘要:用不同浓度的 EB 病毒 4 种(BHRF1、DNA 酶、核抗原-1 及胸苷激酶)反义寡核苷酸片段, (antisense oligodeoxynucleotide, ASO)分别与含 10% 胎牛血清或不含胎牛血清的人低分化鼻咽癌细胞株(SUNE-1)共同培养 48 h。结果仅适当浓度的 BHRF1-ASO 能引起无血清培养的 SUNE-1 细胞株增殖明显受抑制,透射电镜及琼脂糖凝胶电泳检测结果发现与 SUNE-1 细胞发生凋亡有关;而相同浓度的 DNA 酶、核抗原 1 和胸苷激酶基因的 ASO 则无类似作用。

关键词:EB 病毒;反义寡核苷酸;细胞凋亡

中图分类号:R373.9 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2000)03-0209-05

95% 以上的低分化鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)细胞中有 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)基因组存在^[1],本室曾已报道在人低分化鼻咽癌细胞株(SUNE-1)DNA 中可扩增出 EB 病毒(BHRF1、DNA 酶、核抗原-1 及胸苷激酶)4 种全基因片段^[2],但其对于宿主 SUNE-1 细胞增殖的影响尚未见报道。已有文献报道 EBV 的核抗原 1(nuclear antigen-1, EBNA1)基因的反义寡核苷酸片段(antisense oligodeoxynucleotide, ASO)可抑制 EBV 对 B 淋巴细胞的转化及增殖^[3]。细胞凋亡(apoptosis)受抑制可能是肿瘤发生、发展的重要原因,而促进肿瘤细胞的凋亡已成为治疗肿瘤的重要手段之一^[4]。已证实 Bcl-2 蛋白质具有拮抗多种因素引起细胞凋亡^[5]。EBV-BHRF1 基因产物与 Bcl-2 有 38% 同源性^[6],而 EBV-DNA 酶及胸苷激酶(thymidine kinase, TK)则是 EBV 复制等所必需的^[7,8]。本研究分别用不同浓度 EBV-BHRF1、DNA 酶、EBNA-1 及 TK 基因的 ASO 来影响 SUNE-1 增殖,初步探讨该 4 种基因在 NPC 中的作用。

1 材料与方方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人低分化鼻咽癌细胞株(SUNE-1),由本校肿瘤研究所提供。

1.1.2 EBV 的 4 种反义寡核苷酸片段(均为 20 bp),由本室根据 EBV 的 172,282 bp 全基因序列^[6]设计,由基因公司合成。其序列如下:

收稿日期:1998-03-16,修回日期:2000-05-20

* 基金项目:广东省科委青年基金(950355);华南生物中心及广东省卫生厅资助课题

作者简介:朱振宇(1966年-),男,医学博士,教授,主要研究 EB 病毒及鼻咽癌的分子生物学

EBNA1-ASO:5'-GTAGAAGGCCATTTTTCCAC-3'; DNase-ASO:5'-AGATGGCCGACGTGGATGAG-3';

TK-ASO:5'-CAACTGCATCCTAGTCCCGA-3'; BHRF1-ASO:5'-AGGAAGACACTAATCTATAC-3'

1.1.3 RPMI-1640 培养液购自 GIBCO 公司。胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购自本校微生物教研室。

1.1.4 $^3\text{H-TdR}$, 购于中国原子能研究所, 放射比强度为 $0.6 \mu\text{Ci/nmol}$ 。

1.2 方法

1.2.1 细胞的传代及分组 SUNE-1 细胞株按常规方法隔天胰酶消化及传代。于细胞对数生长期常规收集细胞, 计数后分为 A、B、C 和 D, 共 4 组, 每组各 8 瓶细胞(10% FCS 组和无 FCS 组各 4 瓶), 每瓶细胞数均为 5×10^5 。

1.2.2 4 种 EBV-ASO 的加入 A、B、C 和 D 组的细胞分别加入 EBNA1、DNA 酶、TK 和 BHRF1-ASO。每瓶内 4 瓶细胞的各种 ASO 终浓度均分别为 0、10、20 和 $40 \mu\text{mol/L}$ (10% FCS 组和无 FCS 组相同)。

1.2.3 $^3\text{H-TdR}$ 掺入 各瓶内均加入 $^3\text{H-TdR}$ $2 \mu\text{Ci}$; 继续培养 48 h(实验重复 4 次)。

1.2.4 SUNE-1 细胞株增殖情况的检测^[7] 各组细胞经磷酸盐缓冲液洗涤 3 遍后, 分别将其中一半收集在纤维滤纸上, 烘干后检测其 cpm 数值。

1.2.5 细胞凋亡及其程度的检测 另一半细胞按照本室方法^[8,9], 进行透射电镜观察及 DNA 的抽提、琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 SUNE-1 增殖情况

不同浓度、不同种类的 EBV-ASO 对 SUNE-1 细胞株增殖的影响结果见表 1。从表 1 可见在实验浓度范围内, EBV 的 4 种 ASO 在有 10% FCS 培养条件下对 $^3\text{H-TdR}$ 的掺入影响不大; 在无 FCS 的培养条件下, BHRF1-ASO 能显著抑制 $^3\text{H-TdR}$ 掺入 SUNE-1 细胞, 且浓度越高, 抑制作用越明显。各种浓度的其它 EBV-ASO 则无显著的抑制作用。

表 1 EBV 4 种 ASO 对 $^3\text{H-TdR}$ 的掺入 SUNE-1 细胞株的影响

Table 1 Four kinds of EBV-ASOs affect $^3\text{H-TdR}$ incorporation of SUNE-1 cell line

组别 Groups	4 种 EBV-ASO 的浓度($\mu\text{mol/L}$), 10% 胎牛血清组 Concentration ($\mu\text{mol/L}$) of EBV-ASOs with 10% FCS				P1*	4 种 EBV-ASO 的浓度($\mu\text{mol/L}$), 无胎牛血清组 Concentration ($\mu\text{mol/L}$) of EBV-ASOs without FCS				P2*
	0	10	20	40		0	10	20	40	
NAI-ASO	30031 ± 1904	31271 ± 1435	27013 ± 812	26512 ± 1342	>0.05	11021 ± 1440	12300 ± 2146	10676 ± 980	9990 ± 1325	>0.05
DNase-ASO	30860 ± 982	30877 ± 3505	27013 ± 2097	28643 ± 2521	>0.05	10650 ± 743	8729 ± 737	9805 ± 152	11967 ± 656	>0.05
TK-ASO	27789 ± 1450	29271 ± 546	28225 ± 3906	25135 ± 954	>0.05	10322 ± 963	9460 ± 1112	9286 ± 555	9853 ± 531	>0.05
BHRF1-ASO	29051 ± 906	23044 ± 2009	24210 ± 2393	23045 ± 1511	>0.05	12212 ± 1446	6319 ± 372	5297 ± 49	4358 ± 324	<0.01

* : P1、P2 值: 分别指含 10% FCS 组和不含 FCS 组中, 4 种 EBV-ASO 各浓度组分别与其不含 ASO 的正常对照组比较的结果, 实验重复 4 次。

* : P1、P2: Experiment groups incubated with different concentrations of four kinds of EBV-ASOs compare with control groups with (P1) or without (P2) FCS respectively. The experiment repeats 4 times.

2.2 SUNE-1 的电镜观察

经不同浓度 EBV-ASO 处理的 SUNE-1 细胞株, 仅 BHRF1-ASO 组经无 FCS 培养 48 h 在常规透射电镜下可见较多数目不等的凋亡细胞, 即出现细胞核凝缩、线粒体及细胞膜等结构尚完整, 呈现细胞凋亡的典型特征(图 1); 而含 10% FCS 组细胞形态基本保持正常, 很少见到典型的凋亡细胞。



图1 SUNE-1 细胞的电镜观察

无 FCS, 含 BHRF1-ASO 20 $\mu\text{mol/L}$, 培养 48 h 的 SUNE-1 细胞, 常规透射电镜显示 SUNE-1 细胞核凝缩, 线粒体及细胞膜等基本保持完整, 呈现较典型的凋亡形态学改变。

Fig 1. Electron microscopy of SUNE-1 cell incubating with 20 $\mu\text{mol/L}$ BHRF1-ASO and absent FCS for 48 h.

2.3 SUNE-1 的 DNA 电泳结果

经不同 EBV-ASO(均为 20 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h 后 SUNE-1 细胞的 DNA, 在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳时, 仅 BHRF1-ASO 可出现细胞凋亡特征性的“梯形”(ladder)的 DNA 降解片段(图 2)。

3 讨论

EBV 与 NPC 的发生、发展及转归密切相关。95% 以上的低分化 NPC 细胞中有 EBV 基因组存在^[1], 而以 SUNE-1 细胞 DNA 为模板, PCR 可扩增出 EBV 的上述 4 种全基因片段^[2], 但对宿主细胞增殖的影响尚未见报道。正常组织可通过细胞凋亡这种独特的细胞死亡方式来清除对机体无益的某些细胞。细胞凋亡无论是在生物个体生长发育过程中, 还是在保持机体正常组织的平衡、稳定方面均具有重要作用。人类的多数肿瘤之所以能够发生、发展及转移, 其重要原因之一是肿瘤细胞对多种诱导细胞凋亡的因素丧失了反应性^[4]。EBV 的 BHRF1 蛋白质与 Bcl-2 有 38% 同源性^[5], 且在细胞中的定位也相同, 但是否与 Bcl-2 蛋白质一样具有拮抗多种因素引起的细胞凋亡的作用则尚未有定论。我室已有的实验结果显示, 多种 EBV-BHRF1 基因阳性细胞株(B95-8、Raji 及 SUNE-1)比阴性的 K562、YAC 细胞株对无血清培养、43 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 min 或由地塞米松所引起的细胞凋亡具有较强的抵抗能力^[10]。本研究结果初步显示, 单独用无血清培养或分别加入 EBV 的 4 种 ASO, 均无显著抑制 SUNE-1 细胞株增殖的

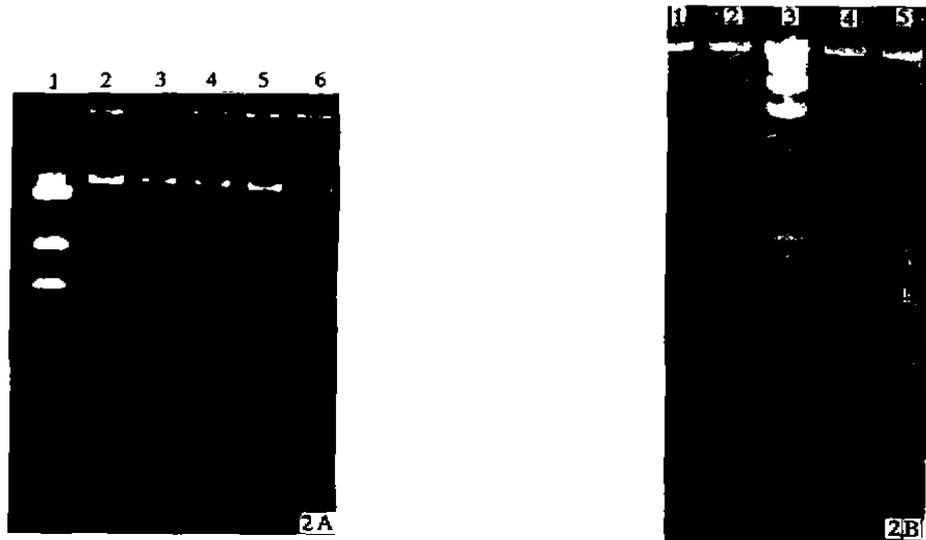


图2 经4种EBV-ASOs处理48h的SUNE-1细胞DNA,1.2%琼脂糖凝胶电泳图

A:含10% FCS培养组 B:无FCS培养组

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from SUNE-1 cell line cultured with 4 kinds of EBV-ASOs for 48 h

A:SUNE-1 cells cultured with 10% FCS

lane 1: λ DNA/*Hind* III Marker

lane 2~5: with DNase-ASO, TK-ASO, EBNA1-ASO

and BHRF1-ASO (20 μ mol/L respectively);

lane 6: no any EBV-related-ASO

B:SUNE-1 cells cultured without FCS

lane 3: λ DNA/*Hind* III Marker

lane 1, 2, 4, 5: with DNase-ASO, TK-ASO, NA1-ASO
and BHRF1-ASO (20 μ mol/L respectively);

作用,细胞发生凋亡的数目很少。无胎牛血清培养时,只有适当浓度的 BHRF1-ASO 可导致 SUNE-1 细胞株发生凋亡而显著抑制细胞增殖,提示无血清培养时 BHRF1 基因的表达产物在抑制宿主细胞的凋亡方面起着重要作用,而 EBV 其它 3 种基因产物可能与其宿主细胞的增殖无关。

参 考 文 献

- [1] Wolf H, Zur HH, Becker V, *et al.* EB-virus genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Nature New Biol*, 1973, 244(2):245
- [2] 朱振宇,陈尚武,戴克胜,等. EB病毒3种全基因的扩增、克隆及表达[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(1):4
- [3] Roth G, *et al.* Epstein-Barr viral nuclear antigen antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-immortalized B cells [J]. *Blood*, 1994, 84:582
- [4] Hickman JA, Potten CS, Merritt AJ, *et al.* Apoptosis and cancer chemotherapy [J]. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1994, 345: 319
- [5] Henderson S, Huen D, Rowe M, *et al.* Epstein-Barr virus-code BHRF1 protein, a viral homologue of bcl-2, protects human B cells from programmed cell death [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:8479

- [6] Bear R, Bankier AT, Biggin M, *et al.* DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 1984, 310:207
- [7] 朱振宇, 简志瀚, 李树浓. 裸鼠荷人鼻咽癌细胞株后免疫状态的动态观察[J]. 中国病理生理学杂志, 1992, 8(5):585
- [8] 朱振宇, 潘景轩, 赵群, 等. 地塞米松诱导裸鼠脾细胞凋亡的研究[J]. 中国病理生理学杂志, 1996, 12(2):131
- [9] 潘景轩, 朱振宇, 李惠玲, 等. 糖皮质激素诱导大鼠胸腺细胞程序性死亡研究[J]. 中国免疫学杂志, 1996, 14(2):228
- [10] 朱振宇, 黄必军, 张清秀, 等. EBV-BHRF1 基因阳性与阴性细胞株对3种诱导凋亡因素抵抗性差异的研究[J]. 肿瘤, 1998, 18(3):129

Four Kinds of EBV-Antisense Oligodeoxynucleotides Effect on Proliferation of EBV Containing SUNE-1 Cell Line

ZHU Zhen-yu, ZHOU Yuan-ping*, ZHANG Qing-xiu,
GAO Guo-quan, DENG Yi-qun, MA Juan-quan

(*Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of
Medical Sciences, Guangzhou 510089, China*)

Abstract: Poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma (SUNE-1) cell line was cultured with Epstein-Barr virus (EBV) BHRF1, DNase, thymidine kinase (TK) and nuclear antigen-1 (EBNA1) antisense oligodeoxynucleotide (ASO) for 48 h respectively. Inhibited proliferation of SUNE-1 was only observed in the absence of fetal calf serum (FCS) and exposed to EBV-BHRF1-ASO. The results from electron microscopy and agarose gel electrophoresis indicated that apoptosis only appeared in SUNE-1 cells exposed to BHRF1-ASO and absence of FCS. The other 3 kinds of EBV-ASOs had not the similar effects at the same concentration.

Key words: Epstein-Barr virus; Antisense oligodeoxynucleotide; Apoptosis