

鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1 激活 TRAFs 的初步研究*

王承兴, 李晓艳, 顾焕华, 邓锡云, 曹 亚

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

Preliminary Study on the Activation of TRAFs Mediated by Epstein-Barr Virus Encoded LMP1 in Nasopharyngeal Carcinoma

WANG Cheng-xing, LI Xiao-yan, GU Huan-hui, DENG Xu-yun, CAO Ya

(Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078 China)

Abstract: The present is aimed at identifying the activation of TRAFs in nasopharyngeal carcinoma (NPC) *in vitro*. The differential expression of TRAF2, TRAF3 was not detected in RNA and protein level, whereas the expression of TRAF1 in HNE2-LMP1 cell lines was much more abundant than that in HNE2 cell lines, suggesting that TRAF1 may be an inducible molecule; More importantly, TRAF1, TRAF2 or TRAF3 were activated in the HNE2-LMP1 cells, whereas TRAF1, TRAF2 or TRAF3 were not activated in HNE2 cells as detected by the immunoprecipitation-Western blotting assay. These data provide an experimental basis for our study beginning from the signal transduction pathway for the elucidation of the mechanism of LMP1 carcinogenesis in NPC.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Latent membrane protein 1; Tumor necrosis factor receptor associated factors; Signal transduction

摘要: 在 EB 病毒潜伏膜蛋白 LMP1 介导的信号传导通路中, TRAFs 作为 LMP1 活化的第一位信号分子, 可能扮演着重要的分子开关角色。令人关注的是, 在上皮性肿瘤 NPC 的发生中, EB 病毒 LMP1 能否激活重要的 TRAFs 信号分子? 究竟激活何种 TRAFs 信号分子, 激活的机制何在? 将 LMP1 cDNA 导入 LMP1 表达阴性的 HNE2 中, 建立稳定表达 LMP1 的鼻咽癌细胞系: HNE2-LMP1。以此为材料, 应用差异 RT-PCR 和 Western blotting 法证实, 无论在 RNA 水平, 还是蛋白水平上, TRAF1 在 HNE2-LMP1 中表达较 HNE2 强, 而 TRAF2 及 TRAF3 在 HNE2-LMP1 与 HNE2 细胞中表达无明显差异; 进一步用免疫共沉淀-Western blotting 证实 LMP1 可使 TRAF1、TRAF2、TRAF3 磷酸化而被活化。这些结果提示在鼻咽癌中, LMP1 可能诱导 TRAF1 表达, 而对 TRAF2 及 TRAF3 并不影响, 但 LMP1 可磷酸化 TRAF1、TRAF2、TRAF3 而使其功能性活化。

关键词: 鼻咽癌; 潜伏膜蛋白 1; 肿瘤坏死因子受体相关因子; 信号传导

中图分类号: R78 3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)01-0006-05

EB 病毒与鼻咽癌(Nasopharyngeal Carcinoma, NPC)的病因发病密切相关。但是, 其致瘤机制却远未被阐明。LMP1(Latent Membrane Protein 1)作为

EB 病毒编码的一种重要的具有瘤基因功能的基因, 一直是 EBV 致瘤机制研究领域中的焦点。

近年来, LMP1 介导的信号传导领域取得了非

收稿日期: 1999-10-28, 修回日期: 2000-04-29

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)“恶性肿瘤发生发展的基础研究”(G1998051201); 国家自然科学基金重点项目(398304111); 美国中华医学基金会(GMB96655)资助项目

作者简介: 王承兴(1966-), 男(上家族), 湖南籍, 主治医师, 博士, 主要从事鼻咽癌分子发病机制研究。

常令人感兴趣的进展。1995年 Kieff 提出一种新的 LMP1 作用机制,假定 LMP1 的作用类似肿瘤坏死因子受体家族的 CD40;通过模拟活化的 CD40, LMP1 介导信号传导而参与淋巴瘤的发生与发展^[1]。这为从信号传导途径深入了解 NPC 中 LMP1 致瘤机制提供了极为有意义的启示。

在 EB 病毒 LMP1 介导的信号通路中, TRAFs (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factors) 作为 LMP1 活化的第一位信号分子,可能扮演着重要的分子开关角色^[2]。TRAFs 是一类新的蛋白家族。迄今为止,已发现六种不同的 TRAFs。除 TRAF4 是一种核蛋白,定位于细胞核外,其余 TRAFs 均分布于细胞浆内。体外研究已证实 TRAF1、TRAF2、TRAF3 及 TRAF5 与 LMP1 作用是 LMP1 转化 B 淋巴细胞必不可少的条件^[3]。由于在不同的细胞类型中,与 LMP1 作用的 TRAFs 组成不同,所起的作用也不相同^[4]。令人关注的是,在上皮性肿瘤 NPC 的发生中,作为第一位 TRAFs 信号分子能否被鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1 所激活?究竟何种 TRAFs 信号分子被激活,激活的机制何在?

由于 TRAF2 与 TRAF5 作用相似,我们拟以 TRAF1, 2, 3 为核心来阐明这些问题。首先确定何种 TRAFs 信号分子在鼻咽癌中被激活,再进一步确定这种激活是否为鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1 所介导,最终确定其激活的机制。这将为我们进一步从信号传导途径阐明 LMP1 致瘤机制提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系

HNE2:为鼻咽低分化鳞癌细胞系, LMP1 阴性^[5]。

1.2 抗体与试剂

TRAF1 (G-20), TRAF2 (C-20), TRAF3 (H-20), 均为兔多克隆抗体,分别针对人 TRAF1 蛋白羧基末端的 6-25 位氨基酸、人 TRAF2 蛋白羧基末端的 478-497 位氨基酸、人 TRAF3 蛋白羧基末端的 8-27 位氨基酸。购自 Santa Cruz 公司;p-Tyr 鼠单克隆抗体(PY99)针对蛋白质中磷酸化的酪氨酸残基,购自 Santa Cruz 公司;LMP1(CS1-4)鼠单克隆抗体,针对 LMP1 疏水性的胞浆碳末端氨基酸,购自 Dako 公司;BCA Assay Reagent 为 Pierce Chemical

公司产品;免疫沉淀试剂盒(Immuno CATCHER kit)为 CytoSignal 公司产品;One-Step RT-PCR kit 为 Dako 公司产品。

1.3 差异 RT-PCR

RNA 抽提:按 TRIZOL kit 说明书提取 HNE2, HNE2-LMP1 RNA。引物由上海赛尔生物技术研究所合成^[6-7]: TRAF1 Forward 5'-GAGGTGGACTCT-CACCAAATGAGAAGA-3' Reverse 5'-CCCTTTGG-GGTTATACATTGCTCAGTGG-3'; TRAF2 Forward 5'-AAAGGGTCAGGAAGCCGTAG-3' Reverse 5'-CCGCACATAGGAATTCTTGG-3'; TRAF3 Forward 5'-AAGCAGACAGCATGAAGAGCA-3' Reverse 5'-GCTTGAATGCATCTCCCAAATG-3'; GAPDH Forward 5'-CCACCCATGGCAAATTCATG-GCA-3' Reverse 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGT-CCACC-3'。差异 RT-PCR(differential RT-PCR, d RT-PCR)首先用 DNase-I 消化 RNA 中痕量的 DNA,按 One-Step RT-PCR kit 说明书进行,PCR 反应条件和参数为:54℃ 30 s, 94℃ 3 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 35 个循环, 72℃ 10 min, 1 个循环。1.5% 琼脂糖凝胶电泳,上样品 10 μL, EB 染色,紫外灯下摄影。

1.4 Western blot

按《精编分子生物学技术》介绍方法操作^[8]。

1.5 免疫沉淀—Western blot

按 Immuno CATCHER kit 说明操作,将 TRAF1, TRAF2, TRAF3 兔多克隆抗体与 HNE2, HNE2-LMP1 细胞裂解物温育,12% SDS-PAGE 凝胶电泳,电转移至硝纤膜,再与 p-Tyr 抗体温育 12 h,抗鼠 IgG-HRP 温育 1 h, DAB 显色。

2 结果

2.1 建立和鉴定稳定表达 LMP1 的鼻咽癌细胞系

我们将野生性 B95-8 来源的 LMP1 cDNA 和新霉素选择标志 Neo 基因用电穿孔法共同导入 HNE2 中, G418 筛选,挑单个克隆, Western blot 鉴定,建立稳定表达 LMP1 的鼻咽癌细胞系:HNE2-LMP1(图 1)。

2.2 EB 病毒 LMP1 诱导 TRAF1 表达,而对 TRAF2 及 TRAF3 不影响

我们以稳定表达 LMP1 鼻咽癌细胞系 HNE2-LMP1 和无 LMP1 鼻咽癌细胞系 HNE2 为材料,用差异 RT-PCR 法、Western blotting 以检测 LMP1 可

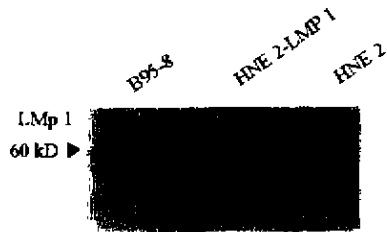


图1 HNE2-LMP1 细胞系中 LMP1 表达的 Western blot 分析
Fig.1 Western blot analysis of LMP1 in HNE2 cells after introducing LMP1 cDNA

B95-8 is an EBV-positive immortalized B-lymphocytic cell line that expresses LMP1. A lysate from B95-8 cells was used as the positive control. Results show the LMP1 was expressed in the HNE2-LMP1 cell lines.

能活化 TRAF1、TRAF2、TRAF3 信号分子。

按照已建立的差异 RT-PCR 方法,以 GAPDH 为对照,在 HNE2、HNE2-LMP1 细胞系中扩增 TRAF1、TRAF2 及 TRAF3,其大小分别为 744 bp、369 bp、503 bp。用 EAGLE EYE II 图像分析仪对结果进行强度、面积综合校正。结果表明:在 RNA 水平上,TRAF1 在 HNE2-LMP1 中表达较 HNE2 强,而 TRAF2 及 TRAF3 在 HNE2-LMP1 与 HNE2 细胞中表达无明显差异(图 2)。提示在鼻咽癌细胞系中,LMP1 可能诱导 TRAF1 mRNA 表达,而对 TRAF2 及 TRAF3 并不影响。

我们进一步用 Western blotting 证实了在 HNE2、HNE2-LMP1 细胞系中均表达 45 kDa TRAF1、56 kDa TRAF2 及 71 kDa TRAF3 信号分子。以丽春红染色蛋白为对照,用 EAGLE EYE II 图像分析仪

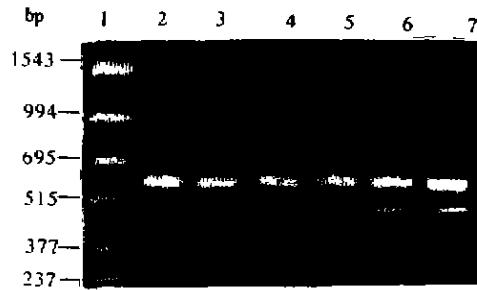


图2 HNE2-LMP1 和 HNE2 细胞系中 TRAF1、TRAF2 或 TRAF3 mRNA 表达的差异 RT-PCR 分析

Fig.2 Identification of TRAF1, TRAF2 or TRAF3 mRNA by differential RT-PCR in HNE2-LMP1 and HNE2 cell lines

The TRAF1, TRAF2 or TRAF3 were amplified in HNE2-LMP1 and HNE2 cell lines. The differential expression of TRAF2, TRAF3 were not detected in RNA level, whereas, The expression of TRAF1 in HNE2-LMP1 cell line was much more abundant than that in HNE2 cell lines. Amplification for GAPDH was simultaneously performed as controls, which generates a 597 bp fragment (1: PCR maker; 2, 4, 6; HNE2-LMP1; 3, 5, 7; HNE2)

对结果进行强度、面积综合校正。发现在蛋白水平上,TRAF1 在 HNE2-LMP1 中表达较 HNE2 强,而 TRAF2 及 TRAF3 在 HNE2-LMP1 与 HNE2 细胞中表达无明显差异(图 3)。从而进一步提示在鼻咽癌细胞系中,LMP1 可能诱导 TRAF1 蛋白表达,而对 TRAF2 及 TRAF3 并不影响。

2.3 鼻咽癌中 LMP1 磷酸化 TRAFs 信号分子

由于我们的实验已证实 EB 病毒 LMP1 可诱导 TRAF1 mRNA 及蛋白表达,但对 TRAF2 及 TRAF3 并不影响。这提示 LMP1 激活 TRAF2、3 信号分子并不表现为 RNA 及蛋白水平量的效应

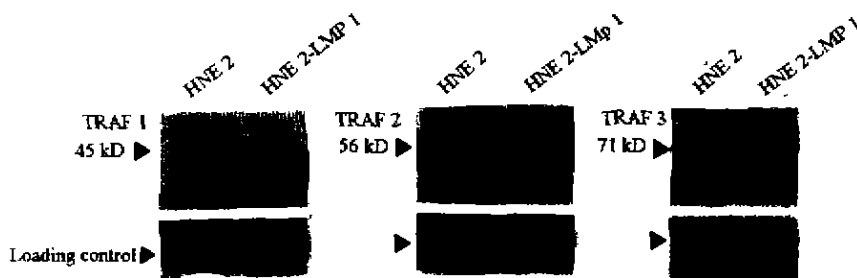


图3 HNE2-LMP1 和 HNE2 细胞系中 TRAF1、TRAF2 或 TRAF3 蛋白表达的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of TRAF1, TRAF2 or TRAF3 expression in HNE2-LMP1 and HNE2 cell lines. The TRAF1, TRAF2 or TRAF3 protein level was expressed in HNE2-LMP1 and HNE2 cell line. The differential expression of TRAF2, TRAF3 was not detected in protein level, whereas, The expression of TRAF1 protein in HNE2-LMP1 cell line was much more abundant than that in HNE2 cell line. The whole protein stained by the ponceau S was used as the loading control.

因此,我们进一步用免疫共沉淀-Western-blotting 方法探讨鼻咽癌中 LMP1 功能性活化 TRAFs 信号分子的可能性。

TRAFs 信号分子被活化的标志是证实其被磷酸化。我们以 HNE2, HNE2-LMP1 为材料,应用免疫共沉淀-Western-blotting 方法,利用 TRAF1, TRAF2, TRAF3 抗体从细胞裂解液中免疫共沉淀

下 TRAF1, TRAF2, TRAF3 信号分子,再用 p-Tyr 抗体进行 Western-blotting 杂交分析,以测定 TRAF1, TRAF2, TRAF3 是否被磷酸化。结果发现在 HNE2-LMP1 中 LMP1 可使 TRAF1、TRAF2、TRAF3 磷酸化,而 HNE2 为阴性(图 4)。这提示 LMP1 可磷酸化 TRAF1、TRAF2、TRAF3 而使其功能性活化。

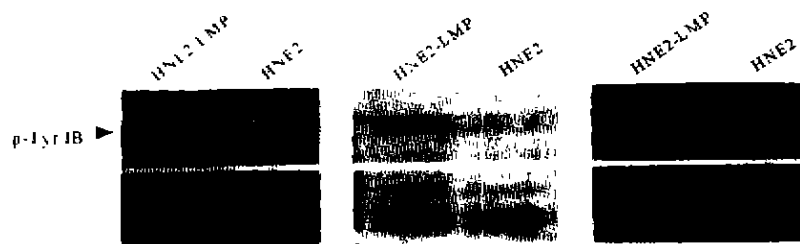


图 4 HNE2-LMP1 和 HNE2 细胞系中 TRAF1, TRAF2 或 TRAF3 蛋白被磷酸化的 Immunoprecipitation-western blot 分析

Fig. 4 Immunoprecipitation-western blot analysis of activated TRAF1, TRAF2 and TRAF3 from HNE2-LMP1 cell lines

Protein lysates from HNE2 and HNE2-LMP1 cell lines were immunoprecipitated with antibody against TRAF1, TRAF2 or TRAF3 and p-Tyr analyzed by western blot analysis. Results show: the TRAF1, TRAF2 or TRAF3 protein was expressed in HNE2-LMP1 and HNE2 cell line, whereas TRAF1, TRAF2 or TRAF3 were activated in the HNE2-LMP1 cell lines

3 讨论

作为 EB 病毒重要的致瘤蛋白, LMP1 在许多与 EB 病毒有关的疾病中扮演着重要角色,但是, LMP1 致瘤机制,尤其是在鼻咽癌中如何发挥作用,迄今,仍不清楚。近几年来,对 LMP1 功能的研究提示 LMP1 可能类似于一种活化的生长因子受体,在细胞信号转导途径中起着重要作用^[10]。其中, TRAFs 作为 LMP1 活化的第一位信号分子,可能扮演着重要的分子开关角色。

由于受体上与 TRAFs 结合的序列存在相当大的差异, TRAFs 对不同的受体也存在不同的亲和力,令人关注的是,在上皮性肿瘤 NPC 的发生中 LMP1 究竟聚集何种 TRAFs 信号分子,从而发挥其生物学效应。我们在稳定表达 LMP1 的鼻咽癌细胞系 HNE2-LMP1 和无 LMP1 表达的鼻咽癌细胞系 HNE2 中,用差异 RT-PCR 法和 Western blotting 证实在 HNE2-LMP1 细胞系中, LMP1 可能诱导 TRAF1 mRNA 及蛋白表达,而对 TRAF2 与

TRAF3 mRNA 和蛋白并不影响;这表明 LMP1 活化 TRAF2 与 TRAF3 并非 RNA 及蛋白水平量的效应。进一步用免疫共沉淀-Western-blotting 方法证实在 HNE2-LMP1 中 LMP1 可使 TRAF1、TRAF2、TRAF3 磷酸化。相反,在 HNE2 中,由于 LMP1 缺乏, TRAF1、TRAF2、TRAF3 没有被活化。这说明在鼻咽癌中, LMP1 表达可磷酸化 TRAF1、TRAF2、TRAF3 而使其功能性活化。对 TRAF1 的诱导不乏其例, Schweser R 等报道 TNF-R1 和 CD40 就具有这作用。至于 LMP1 如何诱导 TRAF1, LMP1 如何磷酸化 TRAF1、TRAF2、TRAF3 信号分子有待进一步研究。

目前,至少已知 LMP1 可通过 TRAFs 活化重要的核转录因子 AP-1 (Activator Protein1), NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) 及另一重要的信号分子 EGFR。TRAF1 是一种抗凋亡蛋白; TRAF2 可能是活化 AP-1 与 NF- κ B 的正向性调节子,调节靶基因表达,介导细胞增殖,转化效应^[6-11];而 TRAF3 对 LMP1 作用于上皮细胞促生长效应尤为重要,其中 EGFR

表达是增殖所必需的^[11]。我们对鼻咽癌中 LMP1 功能性活化 TRAF1, TRAF2, TRAF3 信号分子的实验证实, 将为进一步从信号传导途径探讨 LMP1 致癌机制提供重要的实验依据。

参考文献

- [1] Kieff E. Epstein-Barr virus-increasing evidence of a link to carcinoma[J]. *N Eng J Med*, 1995, 333(11):724-726.
- [2] Reinhard C B, Shamon V S, Williams J. T. Tumor necrosis factor α -induced activation of c-Jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2[J]. *EMBO J*, 1997, 16(5):1080-1092.
- [3] Liebowitz D. Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients[J]. *N Eng J Med*, 1998, 338(20):1413-1421.
- [4] Spenser D E, Lee S Y, Wong B, *et al.* A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cells[J]. *J Exp Med*, 1997, 185(9):1777-1783.
- [5] 祝和成, 姚开泰, 李桂源, 等. 4 株鼻咽癌上皮细胞株的建立及其生物学特性[J]. *湖南医科大学学报*, 1992, 17(2):103-107.
- [6] Elhopoulos A G, Stack M, Dawson C W, *et al.* Epstein-Barr virus encoded LMP-1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor-associated actors[J]. *Oncogene*, 1997, 14(16):2899-2916.
- [7] Siemienski K, Peters N, Scheurich P, *et al.* Organization of TRAF1 gene and mapping to chromosome 9q33-34[J]. *Gene*, 1997, 195(1):35-39.
- [8] 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998, 333-373.
- [9] Mackay J P, Rossley M. Zinc fingers are sticking together[J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(1):1-4.
- [10] Gires O, Strobl U Z, Gonnella R, *et al.* Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule[J]. *EMBO J*, 1997, 16(20):6131-6140.
- [11] Miller W E, Mosiakos G, Kieff E, *et al.* Epstein-Barr virus LMP1 induction of the EGFR is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF- κ B activation[J]. *J virol*, 1997, 71(1):586-594.
- [12] Huang S Y, Jiang Z, Li E, *et al.* Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b[J]. *Immunity*, 1997, 6(4):739-749.
- [13] Zchwenzer R, Siemienski K, Wajant H, *et al.* TRAF1 is up-regulated by cytokines of TNF ligand family and mediate TNF-induced activation of and c-Jun Nterminal kinase[J]. *J Biology Chemistry*, 1999, 274(27):19368-19374.