

EB 病毒潜伏性膜蛋白 1 促原代 MEF 细胞永生化的作用及机制*

贺智敏**, 张志伟, 杨芳, 余艳辉, 欧阳咏梅, 陈主初

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所 湖南长沙 410078)

Action and Mechanism of Epstein Barr virus Latent Membrane Protein1 induced Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts*

HE Zhi-min**, ZHANG Zhi-wei, YANG Fang, YU Yan-Hui, OUYANG Yong-mei, CHEN Zhu-Chu
(Cancer Research Institute, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract : To investigate the action and mechanisms of Epstein Barr-virus(EBV) latent membrane protein1(LMP1) in stimulating the proliferation of primary mouse embryonic fibroblast (MEF) cells the retrovirus (RV) containing wild type LMP1(wt-LMP1) and mutant type LMP1(mt-LMP1), which replaced YYD with ID in tumor necrosis factor receptor associated death domain(TRADD)-binding site, were constructed and used to infect the MEF cells, respectively. Then cytokinetic and morphologic changes from infected cells at the course of passage were observed and found that control cells (MEF-LNSX) showed an apparent growth arrest from passages 8 (P8). In contrast, mt-LMP1 prolonged the cell (MEF-LMP1^{TRADD}) doubling time since P10 and arrested growth at P19, while the MEF-LMP1 cell with wt-LMP1 had an accurate doubling time and displayed a immortalization. Meantime, the expression of cyclinA had a decrease in MEF-LNSX and MEF-LMP1^{TRADD} after P4 and P10 respectively. while in MEF-LMP1, cyclinA increased from P10 and kept at a high level. These results suggested that LMP1 can stimulate proliferation of MEF cells and induce their immortalization, while LMP1^{TRADD} only induces an early proliferation of MEF cells. It is implied that TRADD domain might involve in LMP1-induced MEF cells immortalization.

Key words : Epstein Barr-virus (EBV) ; LMP1 ; Mutation ; MEF ; Immortalization

摘要 : 为了探讨 EB 病毒潜伏性膜蛋白 1 (LMP1) 促原代小鼠胚胎成纤维 (MEF) 细胞增殖规律及作用机制, 构建包含野生型 LMP1 和其 TNFR 相关死亡区 (TRADD) 结合区即羧基末端 384~386 氨基酸置换 (YYD ID) 的突变型 LMP1 逆转录病毒, 感染原代培养的 MEF 细胞, 动态观察各细胞在传代培养过程中细胞动力学和形态学变化。发现对照细胞 (MEF-LNSX) 传至 P8~P10 时出现明显的生长阻滞; 携突变型 LMP1 的细胞 (MEF-LMP1^{TRADD}) 自 P10 起倍增时间逐渐延长, P19 时出现明显生长阻滞; 而携野生型 LMP 的细胞 (MEF-LMP1) 倍增时间逐渐降低并发生了永生。Western blot 检测发现 MEF-LNSX 细胞 CyclinA 表达自 P4 起明显降低, MEF-LMP1^{TRADD} 细胞自 P10 显著增高后快速降低, MEF-LMP1 自 P10 显著增高后一直维持在较高水平。结果表明: LMP1 能促进 MEF 细胞增殖并诱导体外永生; LMP^{TRADD} 则仅能诱导 MEF 细胞的早期增殖。提示羧基末端区 (TRADD) 是 LMP1 促 MEF 细胞永生的重要活性部位, 上调 CyclinA 表达可能是其作用机制之一。

关键词 : EB 病毒; 潜伏性膜蛋白 1; 突变; MEF 细胞; 永生

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0016-05

EB 病毒 (Epstein Barr-Virus, EBV) 是一种人类 - 疱疹病毒, 也是最早被识别的人类肿瘤病毒

[1], 与许多淋巴增生性疾病如传染性单核细胞增多症、X-连锁的淋巴增生综合征以及恶性肿瘤如伯基

收稿日期: 2005-06-27, 修回日期: 2005-09-07

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30470668); 美国中华医学基金会 (CMB) 资助

** 通信作者: 贺智敏 (1956-), 男, 湖南省籍, 教授, 博士, 研究方向为病毒致癌机制。

Corresponding author. Tel: 0731-2355041, Fax: 0731-2355041, E-mail: Hezhimin2001@yahoo.com.cn

特淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、鼻咽癌等的病因发病有关^[2]。EBV 潜伏性膜蛋白 1 (Latent Membrane Protein1, LMP1) 是 EBV 促 B-淋巴细胞永生化的重要因素^[3], 并能单独促进体外永生化的啮齿类纤维细胞^[4] 或永生化上皮细胞^[5] 的恶性转化, 因而被公认为病毒基因组编码的唯一具有细胞转化作用的癌蛋白。但 LMP1 单独诱导原代细胞连续增殖的国内外报道很少。本研究拟通过观察 LMP1 对原代小鼠胚胎成纤维 (MEF) 细胞增殖的影响及作用规律, 为 LMP1 在正常细胞癌变中的作用提供更直接的证据; 同时比较某些功能缺失的突变型 LMP1 (LMP1^{TRADD}) 与野生型 LMP1 对原代 MEF 细胞作用的区别, 探讨可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

病毒包装细胞 PA317 购自美国 ATCC, B_{95.8} 细胞 (含 EBV) 为实验室保存, 均于含 10% 胎牛血清 (GIBCO) 的 DMEM 培养基中培养; 为了制备实验所用原代小鼠胚胎纤维 (MEF) 细胞, 取怀孕 14 d 的 Balb/c 小鼠 (本校实验动物中心提供) 胚胎, 去除头部和带血组织后在无血清 DMEM 中剪碎, 0.25% 胰酶 (GIBCO) 于 37℃ 消化 30min, 低速离心后收集细胞悬液, 沉淀组织继续按上法消化, 离心 3~4 次, 集中所得悬液, 置直径 100mm 培养碟贴壁培养 (培养基同上), 并以此计为第一代 (Passage 1, P1), 将去除红细胞和杂质、扩大培养的 P2 细胞消化后部分冻存, 部分直接用于转化实验。续后每消化贴壁一次, 细胞代数计数依次增加。

1.2 质粒重组

逆转录载体 pLNSX 由香港大学微生物系 Dr. Cao L 提供, pcDNA₃LMP1 和 pcDNA₃LMP1^{TRADD} 由本实验室构建^[6], 用限制性内切酶 ClaI (NEB) 切割 pLNSX (37℃, 4h), 65℃, 15min 灭活后加 dNTP (Promega) 和 Klenow (B.M.) 补齐粘端形成钝端 (37℃, 30min), 再用 HindIII (NEB) 行二次切割, 电泳回收、纯化酶切载体; 用限制酶 HindIII 和 EcoR (钝端) 分别切割质粒 pcDNA₃LMP1 和 pcDNA₃LMP1^{TRADD}, 回收纯化后分别与前述纯化的载体在 T4 连接酶作用下连接 (14℃ 过夜); 转化 DH5 (本室储存), PCR 和酶切鉴定获得重组病毒载体 pLNSX-LMP1 和 pLNSX-LMP1^{TRADD}。

1.3 病毒制备

将上述重组质粒 (以空白质粒 pLNSX 为对照)

按操作说明书分别与脂质体 Lipofectimine (GIBCO) 混合并转染包装细胞 PA317, 48h 后用 800mg/L G418 (GIBCO) 筛选 2~3 周, 获得耐 G418 的产病毒细胞系。每次在新鲜培养基中培养该细胞系 12~24h 后, 0.45μm 过滤器 (QIAGEN) 过滤含感染性逆病毒的培养液并加 8mg/L 无菌 Polybrene (Sigma) 用于 MEF 细胞感染。

1.4 MEF 细胞感染

将培养的 P2 MEF 细胞消化后按 1×10^5 /孔分置 6 孔板培养 (P3), 当细胞长至 80% 汇合时, 用含 2mL/孔上述含病毒培养基先后孵育 2 次 (每次 3~4h, 间隔 8~12h), 在不筛选的条件下连续按 1:2 传代, 观察、记录并冻存各代细胞。实验分 3 组 (RV-LNSX、RV-LMP1、RV-LMP1^{TRADD} 感染组), 共独立进行 2 次, 每次每组设 3 个平行孔。

1.5 细胞生长状态观察

自 P3 起, 密切观察细胞增殖速率和形态变化, 倒置显微镜下拍摄各种典型的细胞图片, 并连续记录各组细胞传代次数与时间的关系。当细胞长至 P8 和 P16 时, 分别取各组细胞按 2×10^3 /孔置 24 孔板培养, 分别于 2、4、6、8、10 d 胰酶消化, 台盼蓝计数, 每组每次计数 3 孔, 用得到的均数和标准差绘制细胞生长曲线。

1.6 免疫印迹分析

收集 P8 MEF-LNSX, MEF-LMP1, MEF-LMP1^{TRADD} 细胞检测 LMP1 表达 (以含 EBV 的 B_{95.8} 细胞为阳性对照), 另收集 P2、P4、P6、P8 MEF-LNSX 细胞, P2、P4、P6、P8、P10、P12、P15 MEF-LMP1 及 MEF-LMP1^{TRADD} 细胞, 按照本实验室成熟的方法^[6]裂解, 离心获取蛋白并测定浓度, 各取 100 μg 蛋白质与样本缓冲液共煮沸 5min, 于 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离、转膜, P8 3 种细胞蛋白印迹膜先后标记抗 LMP1 单抗和 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (Santa Cruz), 其它各组细胞印迹膜先后标记抗 cyclin A 单抗 (Santa Cruz) 和 HRP 标记的二抗, ECL (Promega) 检测试剂处理后压片曝光。取后一张硝酸纤维素膜变性处理, 按上述方法重新标记抗 β -actin 抗体 (sigma) 和二抗。

2 结果

2.1 被诱导 MEF 细胞的早期生长特征

用 RV-LNSX、RV-LMP1 和 RV-LMP1^{TRADD} 感染的 MEF 细胞 P6 前的生长速度及形态学无明显差别。P6 以后 MEF-LNSX 细胞生长速度逐渐减慢, P8 明显下降 (图 1), P10 时生长完全阻滞, 光镜

下显示细胞胞浆折光性增强，胞体大而扁平，呈现多角、伪足等衰老形态（图 2）；而 MEF-LMP1 和 MEF-LMP1^{TRADD} 细胞此阶段生长速度无明显区别（图 1），形态上亦保持类似的致密和增殖活跃状态（图 2），可见 TRADD 突变的 LMP1 与野生型 LMP1 一样，能诱导原代 MEF 细胞早期的生长增殖。

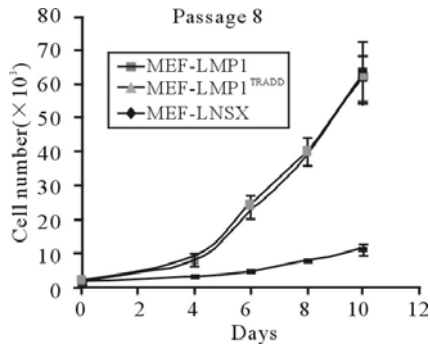


图 1 3 种转化 MEF 细胞（第 8 代）的生长曲线

Fig.1 Growth curve of P8 MEF-LNSX, MEF-LMP1 and MEF-LMP1^{TRADD} cells

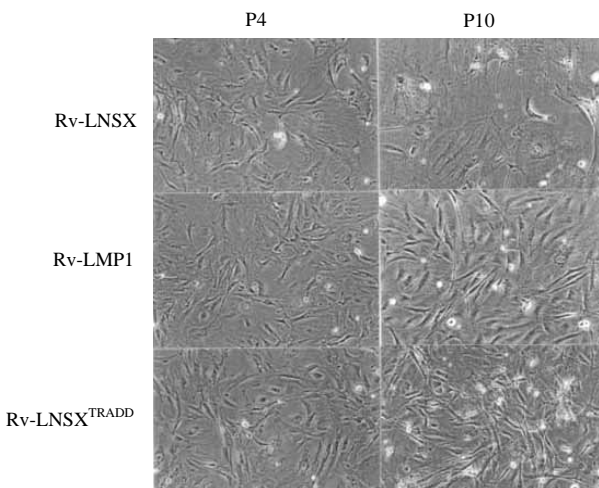


图 2 第 4 代和第 10 代转化 MEF 细胞的生长形态

Fig.2 Morphology of P4 and P10 MEF-LNSX, MEF-LMP1 and MEF-LMP1^{TRADD} cells

2.2 被诱导 MEF 细胞的表达特征

图 3 为 MEF-LNSX, MEF-LMP1 和 MEF-LMP1^{TRADD} 3 种细胞处于 P8 时的免疫印迹检测结果。与 EBV 阳性的 B95-8 细胞一样，感染细胞存在完整 LMP1(66KD)的表达（43KD 带为降解的 LMP1 分子），并在不经筛选情况下保持较高水平表达，且 LMP1^{TRADD} 的表达强弱及分子量大小与野生型 LMP1 无任何区别。

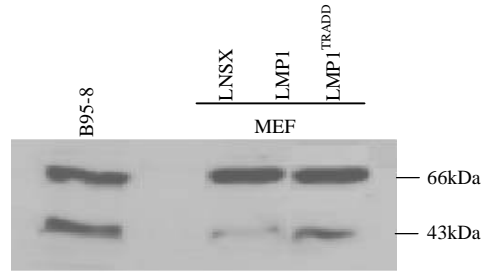


图 3 LMP1 在转化 MEF 细胞（第 8 代）中的表达

Fig.3 Expression of LMP1 in P8 MEF-LMP1 and MEF-LMP1^{TRADD}

2.3 被诱导 MEF 细胞的长期生长状况

自 P10 起，MEF-LMP1 细胞的增殖速度（3d 传代 1 次）逐渐快于 MEF-LMP1^{TRADD} 细胞（4d 传代 1 次），随后其倍增时间进一步降低并从 P15 起一直稳定在 2d，往后 2 个月的 30 次传代中未见任何生长抑制现象，意味着细胞产生了永生性；相反 MEF-LMP1^{TRADD} 细胞倍增时间逐渐延长，从 P10

P19，足足经历了 3 个月时间，最短的传代时间为 4d，最长的为 22d；至 P16，MEF-LMP1^{TRADD} 的增殖速度明显低于 MEF-LMP1（图 4）；至 P19，细胞分裂增殖完全终止，细胞体积变大，呈多边形且伸出多个伪足，与 MEF-LNSX 细胞 P10 时基本一致（资料未显示）。可见 LMP1^{TRADD} 不能诱导 MEF 细胞体外长期生长和永生性。图 5 显示了 3 种细胞传代次数和时间间隔。

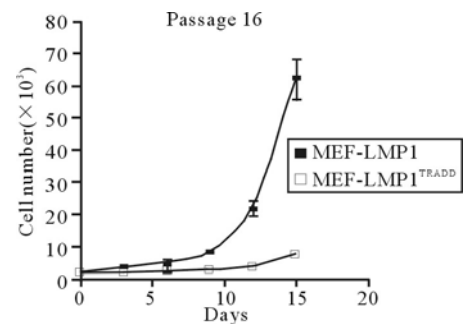


图 4 MEF-LMP1 和 MEF-LMP1^{TRADD} 细胞（第 16 代）的生长曲线

Fig.4 Growth curve of P16 MEF-LMP1 and MEF-LMP1^{TRADD} cells

2.4 被诱导 MEF 细胞 cyclin A 的表达

图 6 显示 MEF-LNSX 细胞 cyclin A 表达自 P4 起明显降低；MEF-LMP1^{TRADD} 细胞的开始并不降低，P10 后逐渐降低，而 MEF-LMP1 细胞随细胞传

代和增殖速率增加, cyclin A 表达逐渐有所增强, P10 及以后各代呈稳定性增强, 显示其表达水平与细胞生长状态有一定相关关系。

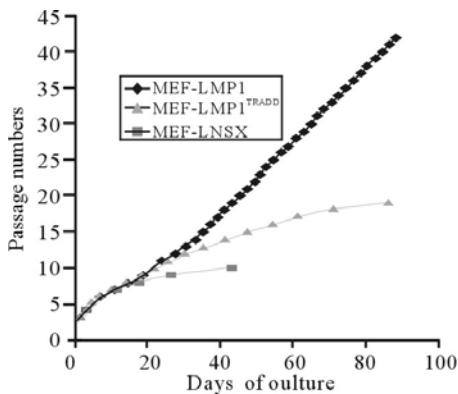


图 5 3 种转化 MEF 细胞的生长代数 and 传代时间

Fig.5 Passage numbers and interval time of MEF-LNSX, MEF-LMP1 and MEF-LMP1^{TRADD} cells

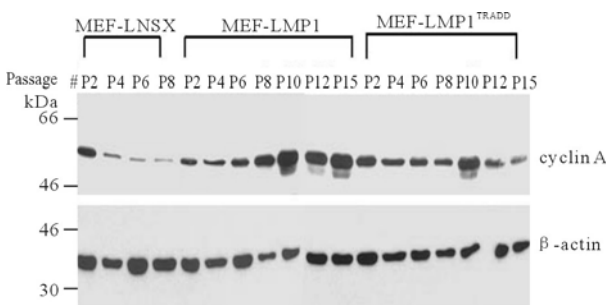


图 6 MEF-LNSX、MEF-LMP1 和 MEF-LMP1^{TRADD} 细胞 cyclin A 的表达

Fig.6 Expression of cyclin A in MEF-LNSX,MEF-LMP1 and MEF-LMP1^{TRADD} cells

3 讨论

原代小鼠胚胎成纤维 (MEF) 细胞取自正常小鼠胚胎组织, 能在体外稳定培养 10~12 代, 且无任何遗传突变, 因而是研究癌基因促细胞增殖和转化作用的理想模型^[7]。本研究采用感染和整合率较高的逆转录病毒系统将目的基因导入该细胞, 不经任何药物筛选, 使被感染细胞既能较高水平表达 (图 3), 又能免受各种损伤因素影响, 因而能客观反映实验结果; 研究中用 RV-LNSX 对照病毒感染的 MEF-LNSX 细胞在传至第 8 代 (P8) 时生长速率明显降低 (图 1) 形态出现变异, 传至 P10 时细胞生长阻滞并出现不可逆衰老 (图 2) 的结果与文献报道相似^[7], 说明本实验方法建立的细胞模型稳

定可靠。

许多资料显示 EBV 不仅与伯基特淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、鼻咽癌^[2], 而且与胃癌、乳腺癌、肝癌等^[8]多种恶性肿瘤的发病有关, 但证据多限于病毒基因在癌组织的阳性表达及血清流行病学调查结果。本研究以原代 MEF 细胞为模型, 观察到 LMP1 能单独诱导该细胞增殖并获得永生化表型, 虽然细胞未获得恶性表型, 但较之以往的研究如 LMP1 需协同其它病毒基因才能促 B 淋巴细胞体外转化^[3]以及能单独促进具有遗传改变的永生化细胞系恶性转化^[4,5]等, 本结果能更直接阐述 LMP1 的瘤基因功能和 EBV 在恶性肿瘤发生中的病因学意义。

蛋白序列分析表明^[9], LMP1 由 386 个氨基酸 (aa) 组成, 包括短的氨基端胞浆区 (1-23aa) 6 个跨膜区 (24~186aa) 和长的羧基端胞浆区 (187~386aa) 三部分结构。在羧基端胞浆区尾端具有能与肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF) 和肿瘤坏死因子受体相关死亡区 (TRADD) 结合的二个功能区域。前者能介导 25% 转录因子 NF- κ B 的活化^[10], 后者能介导 75% NF- κ B 活化并通过 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 介导另一转录因子 AP-1 的活化^[11]。本所最近的一些研究显示, LMP1 促细胞恶性转化、参与细胞周期信号调控等功能均与这些转录因子的活化有关^[6]。LMP1 诱导原代 MEF 细胞永生化的作用是否与其介导的转录因子活化有关? 为了回答这一问题, 本研究构建了 LMP1 TRADD 结合区突变的逆病毒载体 (pLNSX-LMP1^{TRADD}), 对照野生型 LMP1 (pLNSX-LMP1) 和空白载体 (pLNSX), 比较观察其对 MEF 细胞生物学特性的影响, 发现 LMP1^{TRADD} 与 LMP1 一样能诱导 MEF 细胞的早期增殖, 但却不能诱导其长期增殖和永生化。此结果与 Izumi^[11]和 Kaye^[12]等用 LMP1^{TRADD} 促体外 B 淋巴细胞增殖的结果一致。结合他们的分析和 LMP1 的结构特点可以推测: 活化 25% NF- κ B 的 TRAF 仅能启动 MEF 细胞增殖, 而活化 75% NF- κ B 和 100% AP-1 的 TRADD 才是 LMP1 促 MEF 长期增殖和细胞永生化的重要功能部位。本实验还发现 Cyclin A 的表达水平与转化细胞的增殖速率呈正相关, 提示上调 Cyclin A 表达可能是 LMP1 促 MEF 细胞增殖和永生化的机制之一。但 NF- κ B 及 AP-1 与 Cyclin A 之间是否存在某种联系尚需进一步探讨。

Reference

[1] Epstein M, Achong B, Barr Y. Virus particles in cultured

- lymphoblasma from Burkitt's lymphoma[J]. *Lancet*. 1964, 1:702~703.
- [2] Rickinson A B, Kieff E. Epstein-Barr Virus[M]. In: Fields B N, Knipe D M, and Howley P M, *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, 2397~2446.
- [3] Kaye K M, Izumi K M, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993, 90:9150~9154.
- [4] Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells[J]. *Cell*. 1985, 43:831-840.
- [5] Hu L F, Chen F, Zheng X, *et al*. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1[J]. *Oncogene*. 1993, 8:1575-1583.
- [6] He Z M, Chen Z C(贺志敏, 陈主初)*et al*. Construction and Function Analysis of a CTAE-2 Region Mutant of the Epstein-Barr Virus-encoded Latent Membrane Protein-1[J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica (生物化学与生物物理学报)*, 2005, 20:341-345.
- [7] Zindy F, Quelle D E, Roussel M F, *et al*. Expression of the p16^{INK4} tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging[J]. *Oncogene* 1997, 15:203-211.
- [8] Herrmann K, Niedobitek G. Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction[J]. *J Pathol*. 2003, 199:140-145.
- [9] Fennewald S, van Santen V, Kieff E. Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein[J]. *J Virol*. 1984, 51:411-419.
- [10] Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, *et al*. The Epstein-Barr virus transforming proteins LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family[J]. *Cell*. 1995, 80:389-399.
- [11] Izumi K M, Kieff E D. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF- κ B[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1997, 94:12592-12597.
- [12] Kaye K M, Izumi K M, Li H, *et al*. An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation[J]. *J Virol*, 1999, 73:10525-10530.

PI Recruitment

Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences

Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences (CAS) founded in 1956 is the only comprehensive institute carrying out fundamental researches on virology in CAS with scientific research elitists. Wuhan Institute of Virology has recently extended its emphasis from general virology to medical virology and emerging infectious diseases. The institute invites applications for multiple principle investigator positions, including CAS Hundred Talents Program. Our priority is for candidates interested in viral immunology, virus-host interaction, HIV/AIDS, epidemiology and emerging infectious diseases, vaccines and antiviral drugs, but we will consider strong applications in all areas of virology. These positions offer the opportunity to join a rapidly growing group of virologists on an institute that focuses on the research on virology and provides a highly interactive, interdisciplinary research environment and excellent research support facilities.

The successful candidates will receive attractive startup packages, spaces and highly competitive salaries that are commensurate with experiences and qualifications. All appointments require a Ph.D. and /or M.D. degree, strong publications and evidence of outstanding research potential and the ability to develop a vigorous, independently funded program. Applicant under the age of 45 has priority for consideration.

Interested applicants should submit a complete CV, a copy of certification for the Ph.D. degree, a copy of appointment for the current position, and five representative publications, a two-page summary of research interests related to the applied position and three letters of recommendation by March 25, 2006. Review of applications will begin after that date and will continue until the positions are filled.

The institute anticipates additional hires in these and related areas this year and for the next several years for the level of associate and assistant professors for existing research programs that include tumor virology, hepatitis, influenza virus, viral zoonosis, *etc*.

Further information can be reviewed at website: <http://www.whiov.ac.cn>

Applicants are encouraged to contact the institute.

Contact : Ms. Naxin Shang , Dr. Zhiming Yuan

Address: Personnel Office, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, 44 Xiao Hongshan Middle District, Wuhan 430071, China.

Tel : 86-27-87199413 , 86-27-87199145

Fax : 86-27-87198072

E-mail : shang@pentium.whiov.ac.cn yzm@wh.iov.cn