鼻咽癌中 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 启动子的突变

王凤伟, 刘文举, 廖奕佶, 邓海霞, 陈诗萍, 买世娟*, 谢 丹
(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心实验研究部, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】检测 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 远端启动子 L1-TR 在鼻咽癌(NPC)组织中的突变情况并探讨突变对启动子活性的影响。【方法】用聚合酶链反应(PCR)方法分别扩增出 B95.8 细胞和新鲜鼻咽癌组织细胞中 EB 病毒(EBV)的 L1-TR 片段, 并测序比较其核苷酸序列的差异。构建含原型和突变型 L1-TR 启动子的荧光素酶报告质粒并分别转染 HaCat 细胞、B95.8 细胞和 C666-1 细胞,比较两种启动子的活性。【结果】和 B95.8 原型比较,鼻咽癌组织中的 EB 病毒 L1-TR 启动子区域有多处缺失、插入和点突变,且启动子活性明显降低($P < 0.05$)。【结论】鼻咽癌组织中 LMP1 启动子 L1-TR 的活性与 B95.8 原型相比明显降低,这在 EB 病毒的免疫逃避机制中可能有一定的意义。

关键词 EB 病毒潜伏膜蛋白 1; 启动子; 突变
中图分类号: R73-3 **文献标志码**: A **文章编号**: 1672-3554(2011)02-0182-04

Mutations of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Promoter in Nasopharyngeal Carcinoma

WANG Feng-wei, LIU Wen-ju, LIAO Yi-ji, DENG Hai-xia, CHEN Shi-ping, MAI Shi-juan*, XIE Dan
(Department of Experimental Research, State Key Laboratory of Oncology in Southern China // Cancer Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To investigate the mutation of latent membrane protein 1 (LMP1) distal promoter L1-TR in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissue and the influence on promoter activity. 【Methods】 The L1-TR fragments of Epstein-Barr virus (EBV) genome in B95.8 cells and fresh NPC tissue cells were amplified by using polymerase chain reaction (PCR) and the difference between their nucleotides sequence were compared by direct sequencing. The luciferase reporter containing mutant or prototype L1-TR promoter was constructed and transfected into the HaCat, B95.8, and C666-1 cells respectively to compare the transcriptional activity. 【Results】 The nucleotides insertion, deletion and point mutations were found in L1-TR promoter derived from NPC tissue compared with B95.8 prototype, and activity of the mutant L1-TR promoter was reduced markedly ($P < 0.05$). 【Conclusions】The activity of the LMP1 promoter in NPC tissue is significantly lower than that of B95.8 prototype L1-TR, which might contribute to the immune evasion mechanism of EBV.

Key words: latent membrane protein 1; promoter; mutation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(2): 182-185]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国最常见的恶性肿瘤之一。目前其发病机制尚不清楚, 可能是遗传因素和 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV) 以及其它环境因素共同作用的结果。EB 病毒在鼻咽癌细胞中主要表达 EB 病毒核抗原 1(EBNA1)、潜伏膜蛋白 1(LMP1)等基因。其中 LMP1 是 EB 病毒最重要的癌蛋白,在体外能恶性转化原代 B 细胞、鼠成纤维细胞和人上皮细胞[1]。LMP1 的编码基因位于 EBV 基因组的 U5-TRBamH Ⅰ Nhet 区域,由两个左向的启动子控制转

收稿日期: 2010-10-28
基金项目: 国家重点基础研究计划(973)项目(2006CB910104); 国家自然科学基金(81072222)
作者简介: 王凤伟, 硕士研究生, E-mail: wangfw@sysucc.org.cn; * 通信作者: 买世娟, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: maishj@sysucc.org.cn

录,一是近侧启动子 ED-L1, 位于 BamHI N-EcoRI D 片段; 另一个是远端启动子 ED-L1E (又称 L1-TR 或 LT-R1),在 ED-L1 上游约 500 位碱基处,位于末端重复区内[2]。在体外 EB 病毒转化的淋巴母细胞系中,病毒呈Ⅲ型潜伏感染,LMP1 基因由 ED-L1 启动子转录激活,并受到 EBNA2 和其他细胞转录因子的调控[3-4]。而在鼻咽癌细胞中,LMP1 主要由 L1-TR 启动转录[5]。L1-TR 启动子不受 EBNA2 的调控,但可以被细胞转录因子特异性蛋白 1/3(SP1/3)[6]或信号传导蛋白和转录激活物 3(STAT3)[7] 调节。启动子区域调控是蛋白表达调控的重要机制, 该区域的突变尤其是转录因子直接结合区域的突变可能会明显影响启动子的活性及其蛋白的表达。目前尚未见关于 EB 病毒 LMP1 基因启动子区序列变异的报道。本研究发现与 B95.8 原型 EB 病毒相比, 鼻咽癌组织中 EB 病毒 LMP1 启动子 L1-TR 的序列有多处变异,并对其转录活性有明显影响。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　*主要试剂*　鼻咽癌细胞系 C666-1 持续携带了 GD1 亚型 EB 病毒,枭猴 B 淋巴细胞系 B95.8 含有伯基特淋巴瘤来源的 EB 病毒,本实验室收藏有 C666-1 和 B95.8 细胞系。人永生化上皮细胞系 HaCat 购自中山大学医学院实验动物中心。胎牛血清购自 Hyclone 公司,DNA 抽提试剂盒购自 Qiagen 公司, 聚合酶链反应试剂购自 Takara 公司,质粒构建所用载体、海肾荧光素酶 pRL-TK 质粒和双荧光素酶报告基因分析系统购自 Promega 公司,转染试剂 Lipofectamine™2000 购自Invitrogen 公司。

1.1.2　*细胞培养*　所有培养细胞均使用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养。

1.2　方　法

1.2.1 *聚合酶链反应*　首先用试剂盒提取 B95.8 细胞和新鲜鼻咽癌组织(取自广东地区鼻咽癌患者)的 DNA。用聚合酶链反应(PCR)方法扩增 L1-TR 片段, 引物序列为 5′-tgaagcttgtgacgaagcagcagac-3′(正向)和 5′-agtagatctccctcatcacggtcac-3′(反向),该产物与 B95.8 细胞中 EB 病毒基因组的第 169 518 至 169 861 位核苷酸相对应, 即相对 L1-TR 转录起始位点的 + 119 至 −225 位核苷酸片段。经测序获得 PCR 产物的碱基序列,并比较它们之间的序列差异。

1.2.2　*质粒构建*　以 B95.8 细胞及新鲜鼻咽癌组织的 DNA 为模板,用含有 BglⅡ 及 HindⅢ内切酶酶切位点的引物(同上 PCR 引物)分别扩增出 L1-TR 序列, 并连接到 pGL3-basic 载体的 BglⅡ及 HindⅢ酶切位点之间。分别获得含反向插入的 B95.8 原型及突变型 L1-TR 启动子序列的荧光素酶报告质粒 pGL3-pTR(原型)和 pGL3-vTR(突变型)重组质粒,并经酶切和测序鉴定。

1.2.3　*荧光素酶活性检测*　转染前 24 h 分别接种 HaCat 细胞 10×10^4/孔、B95.8 细胞 20×10^4/孔以及 C666-1 细胞 30×10^4/孔于 24 孔板中, 每种质粒设三个复孔。参照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行转染。每孔转染 0.4 μg 原型或突变型荧光素酶报告质粒,同时每孔转染 20 ng 海肾荧光素酶 pRL-TK 质粒作为内参。用 pGL3-basic 空载体做阴性对照。转染 48 h 后用 1 × PLB 裂解细胞,裂解液用单管式发光仪(Sirius Luminometer V3.1)检测。双荧光素酶活性检测按照双荧光素酶报告基因分析系统操作手册进行。

2　结　果

2.1　L1-TR 在鼻咽癌组织细胞中有 24 处碱基突变

聚合酶链反应 (PCR) 扩增出鼻咽癌组织与 B95.8 细胞中 EB 病毒 LI-TR 区域的碱基序列,测序后比较发现有 24 处突变,包括 4 处缺失突变、6 处插入突变和 14 处点突变(图 1)。为了排除 PCR 及测序可能引起的突变,我们重复 3 次 PCR 并测序,结果一致。

2.2　突变型 L1-TR 启动子转录活性与原型相比明显降低

分别将原型 (pGL3-pTR) 和突变型(pGL3-vTR)荧光素酶报告质粒转染 HaCat 细胞。为了研究在 EB 病毒感染的细胞环境下两种启动子亚型的活性改变, 我们以同样条件转染了 B95.8 细胞和 C666-1 细胞。在这三种细胞系中,突变型 L1-TR的转录活性与原型相比均明显降低($P < 0.05$, t 检验;图 2)。在不含 EB 病毒的 HaCat 细胞中,突变型 L1-TR 的活性比原型降低了 84.57%,在含有原型 EB 病毒的 B95.8 细胞和含有突变型 EB 病

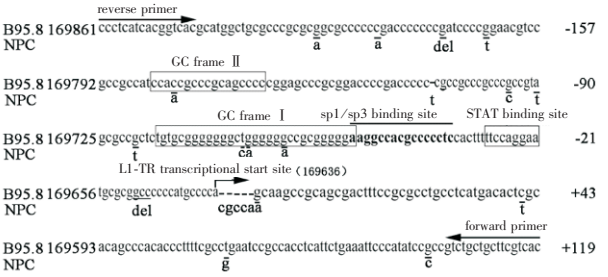


图 1 LMP1 启动子 L1-TR 在 B95.8 细胞及鼻咽癌组织中的碱基序列对比

Fig.1 Comparison of L1-TR promoter sequences in B95.8 cell line and NPC biopsy

The nucleotide sequence of L1-TR fragment of Epstein-Barr virus (EBV) in B95.8 cells and fresh NPC biopsy were analyzed by using PCR and direct sequencing. The mutation sites of the promoter in NPC were underlined. NPC: nasopharyngeal carcinoma. Del: deletion.

毒的 C666-1 细胞中，则分别降低了 46.84%和 46.99%。

3 讨 论

本研究首次检测了广东地区鼻咽癌患者癌组织中 EB 病毒癌基因 LMP1 启动子 L1-TR 的序列突变情况和启动子活性。Rothenberger 等人检测了 7 例淋巴增殖性病例中 LMP1 启动子 ED-L1 的序列，发现与 B95.8 原型相比，其-298 至+29 区域有 9.3%的序列变异。他们的研究还显示突变启动子 ED-L1 的活性明显降低，含有突变型启动子的标本中 LMP1 转录物含量也明显减少[8]。我们的研究首次发现在鼻咽癌组织中 EB 病毒 L1-TR 启动子-209 至 + 102 片段的核苷酸序列与 B95.8 原型

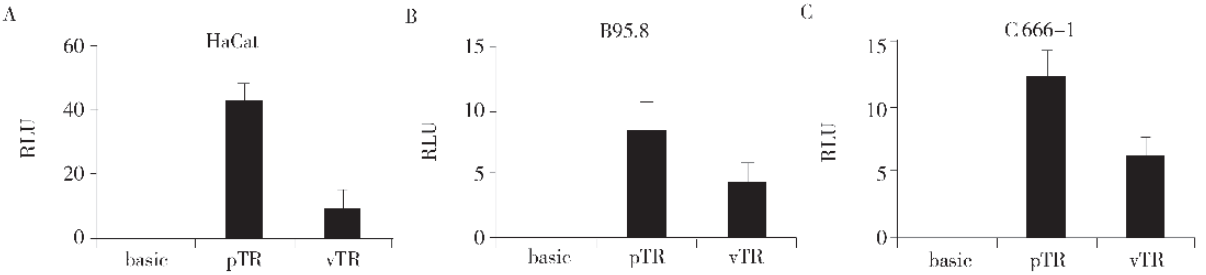


图 2 pGL3-pTR 和 pGL3-vTR 两种报告质粒转录活性的差异

Fig.2 The difference of the transcriptional activity between pGL3-pTR and pGL3-vTR reporter genes

pGL3-basic, pGL3-pTR, and pGL3-vTR were transfected into HaCat (A), B95.8 (B) and C666-1 (C) cell lines respectively. The relative luciferase activity in cell lines was measured to compare the transcriptional activity of prototype and mutant L1-TR in different cellular context. The result was expressed as the mean of three independent experiments ± SD. RLU: relative luciferase activity; basic: pGL3-basic; pTR: pGL3-pTR; vTR: pGL3-vTR.

相比大约有 7.7%的序列变异，通过荧光素酶活性检测实验证实突变后的 L1-TR 启动子转录活性与 B95.8 原型相比明显降低。

在鼻咽癌细胞中，LMP1 基因由启动子 L1-TR 转录激活。L1-TR 序列中含有大量的 GC 富集区，形成潜在的 SP1 转录因子结合位点[9]。其中 GC 框Ⅰ和 GC 框Ⅱ区域均含有数个与 Sp1 基序 5′-GGGGCGGGGC 有 70%同源性的重叠元件。Sp1 可能通过与 GC 框Ⅰ和 GC 框Ⅱ区域结合而增强启动子 L1-TR 的活性[10]。Tsai 等人通过最小启动子区域分析发现在-48 至-33 区域还有一个 GC 框，可以与 Sp1 和 Sp3 结合并激活 L1-TR 启动子的转录活性[6]。与 Sadler 等人的报道相矛盾的是，Tsai 等人的研究显示-423 至-48 序列的缺失突变并不能明显影响启动子活性，其中的 GC 富集区，即潜在的 Sp1 结合序列并不是必须的，而只有-48 至-33 区域 GC 框的缺失突变能显著降低启动子的活性。

本研究发现鼻咽癌组织中，启动子 L1-TR -51 至-36 区域的 GC 框（对应 Tsai 等人发现的 GC 框）没有序列变异，而在其上游的 GC 框Ⅰ和 GC 框Ⅱ区域则分别有 3 处和 1 处点突变。此外，在-51 至-209 区域还有 8 处碱基突变。CpG 序列在 EB 病毒基因表达调控中起非常重要的作用[11]。启动子通过 CpG 序列与细胞因子 Sp1 结合，阻止邻近的序列被甲基化，从而使自身处于未甲基化状态，保持转录活性。如果 GC 框Ⅰ和 GC 框Ⅱ区域有 Sp1 结合活性，那么这一区域发生的突变有可

能降低其与 Sp1 的结合能力，从而影响启动子的活性。

本研究还发现在 L1-TR 启动子转录起始位点上游-11 碱基处有 gcc 连续 3 个碱基的缺失突变，在+1 碱基后有 cgcca 5 个碱基的插入突变。鼻咽癌细胞中突变型启动子 L1-TR 的转录调控机制有待进一步的深入研究。

由于 LMP1 蛋白的半衰期非常短,启动子转录活性的改变对细胞中 LMP1 蛋白含量会产生明显的影响。有研究显示高表达的 LMP1 蛋白对鼻咽癌和其他上皮细胞系有毒性作用[12-13],并且细胞中 LMP1 蛋白高表达也会激发宿主的免疫反应。因此,LMP1 蛋白高表达可能不利于鼻咽癌细胞的生长和 EB 病毒的潜伏感染。用免疫学方法只能检测到 20%～60%的鼻咽癌组织标本中有 LMP1 表达[14],而低水平的 LMP1 蛋白表达足以诱导鼻咽上皮细胞的恶性转化和表型改变[15]。本研究发现鼻咽癌细胞中 LMP1 启动子 L1-TR 的序列变异可以明显降低 50%以上的启动子转录活性，这可能是鼻咽癌组织 LMP1 蛋白表达水平低的原因之一。而 LMP1 的低表达可能通过减少其本身的细胞毒性和逃避机体的免疫监控等机制而有利于 EB 病毒的潜伏感染,进而促进了鼻咽上皮的恶性转化。

参考文献：

[1] Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells [J]. Cell, 1985, 43 (3 Pt 2): 831-840.

[2] Chang MH, Ng CK, Lin YJ, et al. Identification of a promoter for the latent membrane protein 1 gene of Epstein-Barr virus that is specifically activated in human epithelial cells [J]. DNA Cell Biol, 1997,16 (7): 829-837.

[3] Abbot SD, Rowe M, Cadwallader K, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein [J]. J Virol, 1990, 64 (5): 2126-2134.

[4] Wang L, Grossman SR, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(1): 430-435.

[5] Tao Q, Young LS, Woodman CB, et al. Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers -- genetics,epigenetics,pathobiology and novel therapeutics [J]. Front Biosci, 2006,11:2672-2713.

[6] Tsai CN, Lee CM, Chien CK, et al. Additive effect of Sp1 and Sp3 in regulation of the ED-L1E promoter of the EBV LMP 1 gene in human epithelial cells [J]. Virology, 1999, 261(2):288-294.

[7] Chen H, Lee JM, Zong Y, et al. Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors [J]. J Virol, 2001,75(6): 2929-2937.

[8] Rothenberger S, Bachmann E, Knecht H. Molecular and functional analysis of the Epstein-Barr virus LMP1 oncogene promoter in lymphoproliferative diseases [J]. Exp Hematol, 1997,25(13):1326-1332.

[9] Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter [J]. Cell, 1983, 35(1):79-87.

[10] Sadler RH, Raab TN. The Epstein-Barr virus 3.5-kilobase latent membrane protein 1 mRNA initiates from a TATA-Less promoter within the first terminal repeat [J]. J Virol, 1995,69(7):4577-4581.

[11] Bakos A, Banati F, Koroknai A, et al. High-resolution analysis of CpG methylation and in vivo protein-DNA interactions at the alternative Epstein-Barr virus latency promoters Qp and Cp in the nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 [J]. Virus Genes, 2007, 35(2):195-202.

[12] Hammerschmidt W, Sugden B, Baichwal VR. The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels [J]. J Virol, 1989, 63(6): 2469-2475.

[13] Liu Y, Wang X, Lo AK, et al. Latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus inhibits cell growth and induces sensitivity to cisplatin in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Med Virol, 2002,66(1):63-69.

[14] Sarac S, Akyol MU, Kanbur B, et al. Bcl-2 and LMP1 expression in nasopharyngeal carcinomas [J]. Am J Otolaryngol, 2001, 22(6):377-382.

[15] Tsao SW, Wang X, Liu Y, et al. Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1590(1-3):150-158.

(编辑　张恩健)