

两种不同来源的 EBV LMP1 基因在 Balb/c 3T3 细胞中的表达

陈 元, 郭辉玉, 方丹云, 晏辉钧

(中山医科大学微生物学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究来源于鼻咽癌细胞株 SUNE1 及 EBV 标准株 B95-8 细胞中两种 EBV LMP1 基因在真核细胞 Balb/c 3T3 中的表达, 为进一步研究 EBV LMP1 基因的核酸疫苗打基础。【方法】将两种不同来源 EBV LMP1 基因的真核表达质粒, 经脂质体法转染 Balb/c 3T3 细胞后, 用 Western blot、免疫组化及 PCR 的方法检测不同转染细胞中 EBV LMP1 蛋白的表达及核酸片段。【结果】PCR 结果表明在两种不同来源 LMP1 转染细胞中均有 EBV LMP1 基因序列, 并均能表达 63 ku 的蛋白质, 经 Western blot 和免疫组化结果证实均为 EBV LMP1 蛋白。【结论】来源于 B95-8 细胞及鼻咽癌细胞 SUNE1 的两种 EBV LMP1 基因均能在真核细胞 Balb/c 3T3 中表达。

关键词: Epstein-Barr 病毒; 潜伏膜蛋白 1 基因; 鼻咽肿瘤

中图分类号: R 373.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)03-0205-04

The Expression of EBV LMP1 Isolated from Two Different Origins in Balb/c 3T3 Cell Line

CHEN Yuan, GUO Hui-yu, FANG Dan-yun, YAN Hui-jun

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

Abstract: 【Objective】To study the expression of two EBV LMP1 genes isolated from nasopharyngeal carcinoma cell line SUNE1 and EBV standard cell line B95-8 in the eukaryotic cells for further EBV LMP1 DNA immunization. 【Methods】Transfected two different origins LMP1 eukaryotic expression plasmid vector into Balb/c 3T3 cells by lipofectamin method and identified the expression of EBV LMP1 proteins in transfected cells by Western blot and immunohistochemistry. The polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the EBV LMP1 fragment in the transfected cells. 【Results】A 63 ku protein was observed by Western blot analysis and the positive staining of specific EBV LMP1 protein was detectable by immunohistochemical staining in both of the two LMP1 genetransfected cells. The EBV LMP1 fragment was detected in PCR products in both of these two transfected cells. 【Conclusion】Both EBV LMP1 genes from two different origins can express in Balb/c 3T3 cell lines.

Key words: Epstein-Barr virus; latent membrane protein 1 gene; nasopharyngeal carcinoma

EBV LMP1 是 Epstein-Barr 病毒 (Epstein-Barr Virus, EBV) 潜伏感染细胞及某些 EBV 相关肿瘤细胞中表达的一个主要 EBV 相关蛋白。现已发现, LMP1 能诱导宿主细胞 bcl-2、A20 等基因的表达, 具有激活 B 细胞表面粘附因子 LFA-1、LFA-3、ICAM-1 的表达, 使 B 细胞聚集等生物学活性^[1]。通过对 LMP1 基因转染细胞的实验表明, LMP1 具有改变成纤维细胞形态、降低细胞对血清依赖性以及导致接触抑制丧失能力, 转染了 LMP1 基因的细胞具有使

裸鼠致癌的能力, 还能影响上皮细胞的生长、分化^[2], 这些结果均表明 LMP1 在一定的作用环境下具有致癌能力, 可能是一种癌基因。EBV 的感染被认为是鼻咽癌 (NPC) 在发生发展过程中具有重要作用的一个关键因素。有报道 NPC 细胞中 EBV LMP1 基因与标准株相比在序列上有一定的差异^[3]。因此, 有必要对 NPC 来源的 EBV LMP1 基因在真核细胞中的表达情况作进一步研究。本实验通过脂质体转染的方法将两种不同来源的 EBV

收稿日期: 1999-11-01

基金项目: 中山医科大学科研基金项目 (5221116301035)

作者简介: 陈 元 (1969-), 男, 江苏兴化人, 博士, 讲师。

LMP1 基因导入 Balb/c 3T3 细胞中,并用 Western blot 及免疫组化的方法,探讨不同来源的 EBV LMP1 基因在真核细胞中的表达情况。

1 材料和方法

1.1 细胞来源

EBV 标准株 B95-8 细胞系由香港大学微生物学系惠赠;广东地区低分化鼻咽癌体外传代细胞株 SUNE1 由中山医科大学肿瘤研究所提供;Balb/c 3T3 小鼠成纤维细胞系由中山医科大学附属第一医院神经科陈国俊博士后提供。

1.2 主要试剂

脂质体转染试剂盒: Lipofectamine™ reagent kit (Gibco BRL 公司);免疫组化试剂盒: LSAB Kit (Dako 公司);EBV LMP1 单克隆抗体: CS1-4 (Dako 公司);pcDNA3 真核细胞克隆表达质粒 (Invitrogen 公司);G418 (Sigma 公司)。

1.3 EBV LMP1 真核细胞表达载体的构建

将标准株 B95-8 细胞及鼻咽癌 SUNE1 细胞株中 EBV LMP1 基因定向克隆至真核表达载体 pcDNA3 质粒中,得到两种不同来源 EBV LMP1 的真核细胞表达质粒 pcDNA3-BLMP1 (B95-8 来源)及 pcDNA3-SLMP1 (SUNE1 细胞来源),并通过测序鉴定。方法及结果见文献[4]。

1.4 脂质体法转染

将构建好的 EBV LMP1 表达质粒 pcDNA3-BLMP1, pcDNA3-SLMP1 及空质粒载体 pcDNA3 按 Lipofectamine™ reagent 试剂盒说明转染 Balb/c 3T3 细胞。细胞置 6 孔培养板中,48 h 后用 G418 筛选。15 d 后见有克隆形成,挑取克隆,扩大培养,收集细胞。

1.5 转染细胞中总蛋白提取及 Western blot 检测

Balb/c 3T3 转染细胞总蛋白提取参照文献[5]。提取的蛋白质行 SDS-PAGE 后,按常规方法转移至硝酸纤维素膜。用 1:20 稀释的 EBV LMP1 单克隆抗体 CS1-4 为第一抗体,1:50 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗羊鼠 IgG 为第二抗体进行酶联反应,DAB 显色。用未转染的 Balb/c 3T3 细胞作对照。

1.6 转染细胞中 LMP1 蛋白免疫组化检测

收集转染细胞并制成悬液,滴于无菌玻片上,37℃ φ=5% CO₂ 培养 36 h 后,经 PBS 洗涤,冷丙酮固定,微波处理后备用。将做好的细胞滴片按 LSAB 试剂盒的方法用 CS1-4 为第一抗体进行免疫组化染色后,显微镜下观察结果。

1.7 转染细胞中 EBV LMP1 基因检测

根据 EBV LMP1 标准株 B95-8 中 EBV LMP1 基因序列,设计一对引物:

P1 5' CCTACATAAGCCTCTCACACTG 3'

(169 548 nt ~ 169 527 nt) 22 bp

P2 5' CAGTAAATGGAGGGAGAG 3'

(168 094 nt ~ 168 111 nt) 18 bp

提取转染细胞 DNA 为模板,按常规 PCR 的方法扩增,产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

2 结果

2.1 两种不同来源 EBV LMP1 基因在转染细胞中 Western blot 检测结果

用未转染的 Balb/c 3T3 细胞为空白对照,转染载体质粒 pcDNA3 的 Balb/c 3T3 为阴性对照,将两种不同来源的 EBV LMP1 基因转染细胞后,经 G418 筛选,克隆,提取细胞总蛋白,将蛋白质量调整一致后,进行 Western blot 分析发现,在 63 ku 处,两株转染有 EBV LMP1 基因的转染细胞总蛋白中有明显的阳性条带,而其他细胞则为阴性(图 1)。

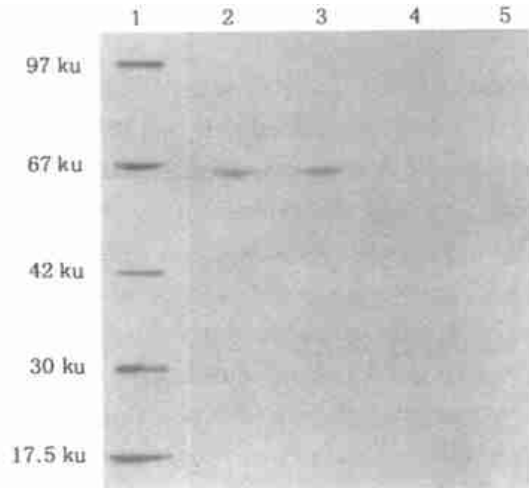


图 1 不同转染细胞 LMP1 基因表达 Western blot 分析

Fig. 1 Western blot analysis of expressed LMP1 in different transfected cells

Lane 1: low molecular protein marker; lane 2: SUNE1 LMP1 transfected cell; lane 3: B95-8 LMP1 transfected cell; lane 4: pcDNA3 vector transfected cell; lane 5: Balb/c 3T3 cell

2.2 转染细胞中 EBV LMP1 蛋白免疫组化检测

将转染有 EBV LMP1 基因的细胞及转染有载体质粒的细胞制成滴片,用 LSAB 免疫组化方法检测显示,在两株 EBV LMP1 基因转染的细胞浆及细胞膜上均有 EBV LMP1 蛋白的稳定表达,而空载体转染的细胞则为阴性(图 2)。

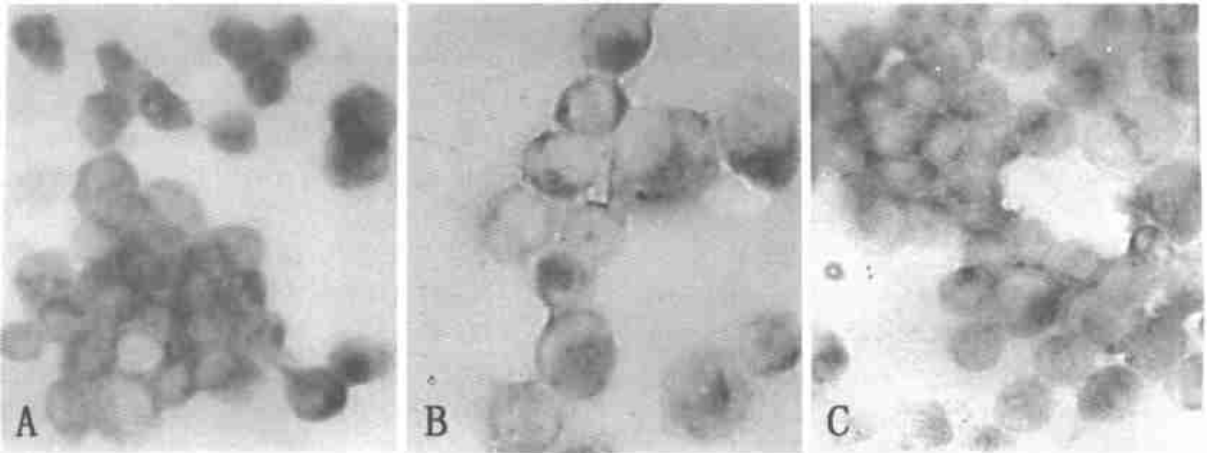


图2 不同转染细胞 LMP1 基因表达免疫组化染色

Fig. 2 Immunohistochemical staining results of LMP1 protein expression in different transfected cells (LSAB×100)

A: SUNE1 LMP1 transfected cells B: B95-8 LMP1 transfected cells C: pcDNA3 vector transfected cells

2.3 转染细胞中 EBV LMP1 基因的检测

对3种转染细胞PCR分析表明,在两种转染有EBV LMP1基因的细胞DNA中可以扩增出1.4 kb的特异性EBV LMP1基因片段,与预计的片段大小(169 548 nt~168 094 nt)相符,而空载体转染细胞中则无(图3)。

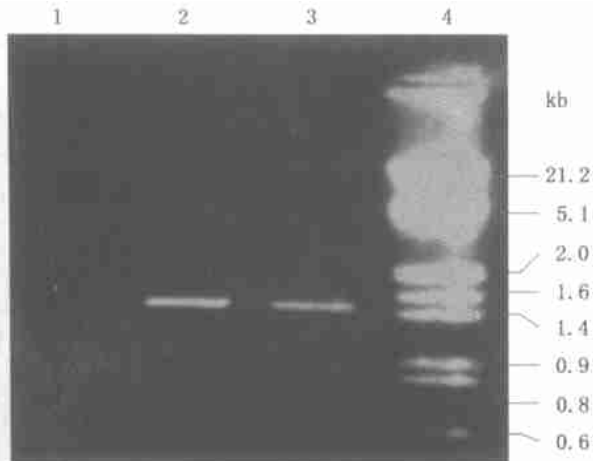


图3 不同转染细胞中 LMP1 基因片段 PCR 扩增

Fig. 3 PCR detection of LMP1 fragment in different transfected cells

Lane 1: pcDNA3 transfected cells, Lane 2: B95-8 LMP1 transfected cell, lane 3: SUNE1 LMP1 transfected cell, lane 4: DNA marker (λ DNA/*Hind* III+*Eco*RI)

3 讨论

EBV LMP1 是 EBV 潜伏感染细胞及某些 EBV 相关肿瘤细胞中表达的一个主要 EBV 相关蛋白,其 ORF 为 EBV 基因组 *Bam*HI Nhet 片段中左向读码框

架 BNLF-1, 包括 3 个外显子与 2 个内含子, 是一种完整的跨膜蛋白。已有资料证明, LMP1 在 EBV 转化细胞以及在其转染细胞的致瘤过程中起重要作用^[6,7], 而在 NPC 组织中 LMP1 又是 EBV 表达的一种最主要的蛋白质^[1]。对不同来源的 EBV LMP1 基因诱导细胞转化的研究发现, 来自于 NPC 患者中的 EBV LMP1 似乎具有更强的转化细胞活性⁸。SUNE 是从广东地区 NPC 病人组织中分离的 NPC 细胞株, 多项研究均已证实它携带有 EBV, 将其 EBV LMP1 基因转染人胚肾上皮细胞后接种于裸鼠体内, 可以诱发肿瘤的形成, 而且这种成瘤能力比 B95-8 细胞的 LMP1 成瘤能力强^{9,10}。我们前期的实验结果表明, 虽然 SUNE1 与 B95-8 的 EBV LMP1 在核苷酸序列上有 20 个碱基的差异, 但并无较早前国外报道的东南亚地区 NPC 来源的 EBV LMP1 中所存在的 C 末端 30 个碱基的缺失^[11], 它们核苷酸的同源性为 98.5%, 氨基酸序列上的同源性为 96%^[4]。本实验的结果表明, 这两种不同来源的 EBV LMP1 基因在转染小鼠成纤维细胞后, 均可在转染细胞的细胞膜及细胞浆中表达。因此我们认为, SUNE1 中 EBV LMP1 的强致瘤性可能与其核苷酸变异后导致其蛋白质在二维或三维空间构象的某些改变, 从而诱导了特异性的转录调控因子的表达有关。

本研究结果还证实, NPC 来源的 LMP1 与标准株来源的 LMP1 基因均可在哺乳动物真核细胞中表达, 这为发展 EBV LMP1 核酸疫苗以控制机体 EBV 感染及相关肿瘤的发生发展提供了另一条新思路。有关工作, 本实验室正在研究中。

参考文献:

- [1] Rickinson A B, Kieff E. Epstein-Barr virus. In Field's Virology[M]. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. 2397.
- [2] Zheng N, Yuan F, Chen L F, *et al*. Effect of a B-lymphocyte and NPC derived EBV-LMP1 gene expression on *in vitro* growth and differentiation of human epithelial cells[J]. Int J Cancer, 1994, 57(5): 747.
- [3] Siu T C, Leung S F, Lo K W, *et al*. Specific latent membrane protein gene sequences in type 1 and type 2 Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma in Hongkong[J]. Int J Cancer, 1998, 76(3): 399.
- [4] 陈元, 郭辉玉, 曹虹, 等. 鼻咽癌细胞株 SUNE1 中 EBV IMP1 基因克隆及部分序列分析[J]. 中华实验与临床病毒学杂志, 1999, 13(4): 217.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1995. 873~891.
- [6] Wang D. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells[J]. Cell, 1985, 43(4): 831.

- [7] Kevin H, Susan F, Mary H, *et al*. A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(7): 7207.
- [8] Fahraeus R, Rymo L, Rhim J S, *et al*. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the IMP gene of Epstein-Barr virus[J]. Nature, 1990, 345(6274): 447.
- [9] 吴荫棠, 汪慧民, 杨小平, 等. 鼻咽癌裸鼠移植瘤及其相应体外细胞株的建立与特性研究[J]. 癌症, 1995, 14(2): 83.
- [10] 陈宜芳, 郭辉玉, 汪慧民, 等. 鼻咽癌细胞系 SUNE1 中 EBV LMP1 基因对永生化人胚肾上皮细胞生长特性的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(5): 330.
- [11] Suet Y L, Siu T Y, Lap P C, *et al*. Prevalence of mutations and 30-bp deletion in the C-terminal region of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 oncogene in reactive lymphoid tissue and non-nasopharyngeal EBV-associated carcinomas in Hongkong Chinese[J]. Int J Cancer, 1997, 72(2): 225.

(编辑 张瑞敏)

(上接第 198 页)

状态。目前推测它是细胞周期 G₁/S 期转换过程的关键^[9]。已有许多研究表明 p21WAF1 的过度表达与细胞肥大、G₁ 期停滞有关^[3~5,9]。近期 Kuan CJ 等^[5]研究发现高浓度葡萄糖诱导系膜细胞肥大与 p21WAF1 表达水平增高有关。是否高糖作用下间皮细胞的肥大和 G₁ 期停滞也与细胞内 p21WAF1 表达增高有关, 目前国内外尚未见报道。我们用 RT-PCR 法检测不同浓度葡萄糖对 p21WAF1 mRNA 表达的影响, 发现空白对照组和甘露醇组几乎无 p21WAF1 mRNA 的表达, 而高浓度葡萄糖可刺激间皮细胞 p21WAF1 mRNA 的表达, 且随着含糖浓度增高而表达增高。这初步提示高糖可刺激间皮细胞表达 p21WAF1, 这一作用与葡萄糖的浓度有关, 而与葡萄糖产生的渗透压关系不大。本文研究结果初步提示高糖对间皮细胞增殖和形态学的改变可能与细胞周期的调控失衡有关。

参考文献:

- [1] Gotloib L, Wajsbrodt V, Shostak A, *et al*. Acute and long-term changes observed in imprints of mouse mesothelium exposed to glucose-enriched, lactated, buffered dialysis solutions[J]. Nephron, 1995, 70(2): 446.
- [2] Gotloib L, Shostak A, Wajsbist V, *et al*. High glucose induced a hypertrophic, senescent mesothelial cell phenotype af-

ter long *in vivo* exposure[J]. Nephron, 1999, 82(1): 164.

- [3] Shankland S J. Cell-cycle control and renal disease[J]. Kid Int, 1997, 52(2): 294.
- [4] Sheikh M S, Rochefort H, Gracia M, *et al*. Overexpression of p21WAF1/cip1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines[J]. Oncogene, 1995, 11(9): 1899.
- [5] Kuan C J, Al-Douahh M, Shankland S. The cyclin kinase inhibitor p21WAF1, cip1 is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy[J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9(3): 986.
- [6] Hjelle J H, Golinska B T, Waters D C, *et al*. Isolation and propagation *in vitro* of peritoneal mesothelial cells. Perit Dial Int, 1989, 9(2): 341.
- [7] Terada Y, Yanada T, Nakashima O, *et al*. Angiotensin II induced p21^{cip1} via JAK₂-STAT₁ pathway and caused hypertrophy in proximal tubular cells[J]. J Am Soc Nephrol, 1996, 7(10): 1776.
- [8] Sugiyama A, Nagaki M, Shidoji Y, *et al*. Regulator of cell cycle-related genes in rat hepatocytes by transforming growth factor β -1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238(2): 539.
- [9] Shankland S J. Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease[J]. Kid Int, 1999, 56(10): 1208.

(编辑 黄小延)