

## EB 病毒潜伏膜蛋白 1 基因对上皮细胞增殖的影响\*

陈宜芳<sup>1</sup> 郭辉玉<sup>2</sup> 汪慧民<sup>3</sup> 李满枝<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中山医科大学 孙逸仙纪念医院 <sup>2</sup> 微生物教研室 <sup>3</sup> 肿瘤研究所 广州 510120)

**摘 要** 为了研究 EB 病毒潜伏膜蛋白 1(LMP1)基因对上皮细胞增殖的影响,探索 LMP1 在上皮细胞肿瘤发生中所起的作用。用 LMP1 基因真核表达质粒转染人胚肾上皮细胞,检测了转染细胞中 LMP1 的表达,观察细胞在软琼脂中的集落形成能力、MTT 吸收能力以及 PCNA 的表达情况。结果显示,被 LMP1 基因转染的细胞生长旺盛,能在软琼脂中形成多个集落,MTT 吸收能力增强,PCNA 的表达水平增高。因此认为 LMP1 基因能明显改变上皮细胞的生物学行为,促进细胞的生长、增殖和转化,使转染的上皮细胞获得肿瘤细胞的生长特征。

**关键词** EB 病毒,潜伏膜蛋白 1,上皮细胞,增殖

**分类号** Q939.4 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0205-08

EB 病毒(Epstein-Barr Virus, EBV)能够长期潜伏感染人及某些灵长类 B 淋巴细胞,使受染细胞增殖和转化。EBV 的潜伏感染与多种人类肿瘤有关,最先是非洲儿童的淋巴组织肿瘤中培养出这种病毒,后来发现它与鼻咽癌密切相关,近年文献报道 EBV 与扁桃腺、唾液腺、肺、胃等上皮细胞癌均有一定关系<sup>[1~4]</sup>。在潜伏状态时,至少有 11 种基因表达,其中 EBV 潜伏膜蛋白 1(Latent membrane protein 1, LMP1)在细胞转化和肿瘤形成中的作用尤为重要<sup>[5]</sup>,故 LMP1 基因已被公认为是病毒的一种癌基因,对 LMP1 基因结构与功能的研究已成为肿瘤的病毒病因学研究热点。虽然 EBV-LMP1 对 B 淋巴细胞的转化作用已有较多实验<sup>[6~8]</sup>,但关于 LMP1 对上皮细胞的影响认识尚浅。本文从 EBV 原型株 B95-8 细胞中扩增出 EBV-LMP1 全基因(包括调控序列及完整编码序列)、建立了 LMP1 全基因的真核表达质粒并转染到人胚肾上皮细胞,观察 LMP1 基因对上皮细胞增殖的影响,旨在探索 LMP1 在上皮细胞肿瘤发生中所起的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 EBV-LMP1 基因真核表达质粒 pcDNA3-LMP1

由本室制备。根据 Gene Bank 公布的 EBV 基因序列<sup>[9]</sup>,利用 National Biosciences 公司编制的 Oligo 引物分析软件电脑辅助设计一对引物,用长片段 DNA PCR 扩增试剂盒(Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim 公司产品)从 B95-8 细胞(本室保存)DNA 中扩增出 LMP1 全基因,长度为 3426bp,相当于 EBV 基因组上的位置为 166608nt~170033nt,包括 LMP1 基因的上游调控序列、LMP1 编码序列的三个外显子、

\* 本课题受美国中华医学基金会资助(No. 90-529),为博士学位论文部分工作

收稿日期:1998-03-18,修回日期:1998-10-20

两个内含子及下游 polyA 信号序列。先将该片段连接于 pUC18 载体的 Bam HI 位点,再定向亚克隆于真核细胞表达载体 pcDNA3。

## 1.2 真核细胞表达质粒转染 293 细胞

293 细胞为永生化的人胚肾上皮细胞,由预防医学科学院曾毅院士惠赠。于 25cm<sup>2</sup> 塑料培养瓶中接种  $5 \times 10^5$  个细胞,用 1640 培养液培养 24h,细胞约为 30%~50% 汇合。用无血清、无双抗培养液轻洗单层细胞 2 遍。用 Lipofectin reagent(Gibco 公司产品)将质粒 DNA 转染入 293 细胞,传代于含 200 $\mu$ g/mL G418 的选择培养液中(使未转染的 293 细胞全部死亡的 G418 浓度作为抗性质粒转染细胞的筛选浓度),直到抗性细胞克隆形成。挑取单个细胞克隆,用选择培养液扩增培养。

## 1.3 免疫组化染色检测转染细胞中 LMP1 蛋白的表达

贴壁细胞经 EDTA 消化、收获,配成浓度为  $1 \times 10^6$ /mL 的细胞悬液,取 0.1mL 滴加于无菌载玻片上,培养 24h 后自然风干,冷丙酮固定。用 EBV-LMP1 单克隆抗体(CS1~4:由英国伯明翰大学肿瘤研究所姚庆云教授惠赠),按 LSAB 试剂盒(Dako 公司产品)说明书操作。最后用 2% 甲基绿复染 1min。

## 1.4 软琼脂细胞集落形成试验

在六孔细胞培养板中,每孔先加 0.5% 的下层琼脂 3mL(1.5mL 1% 的琼脂冷却至 45℃ 左右,与 1.5mL 37℃ 预温的  $2 \times 1640$  培养液混匀),冷至凝固后,加入 0.33% 的含  $5 \times 10^4$  个细胞的顶层琼脂 2mL/孔,每种细胞均做复孔。置湿盒,37℃、CO<sub>2</sub> 孵箱培养及观察 14d。

## 1.5 MTT 试验

分别用  $10^5$ /mL 的转染及未转染的 293 细胞悬液。接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 $\mu$ L 重复 10 孔,培养 48h 后每孔加 20 $\mu$ L MTT(5mg/mL 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma 公司产品),继续培养 4h。吸弃培养液,加 100 $\mu$ L DMSO,稍加振荡后立即在酶标仪上测定 570nm、630nm 波长的 OD 值。求出每种细胞 10 个复孔的平均 OD 值,绘制直方图。

## 1.6 免疫组化染色检测培养细胞中的 PCNA

按 LSAB 试剂盒(Dako 公司产品)说明书操作。最后用 2% 甲基绿复染 1min。

# 2 结果

## 2.1 重组质粒转染 293 细胞抗性克隆的建立

重组质粒 pcDNA3-LMP1 及空白载体 pcDNA3 分别导入 293 细胞,经 G418 选择培养,10d 后可见抗性细胞克隆出现(图版 I-1),说明转染成功,转染后的 293 细胞分别命名为 LMP1-293 及 VLM-293 细胞。

## 2.2 转染细胞中 LMP1 蛋白的表达

免疫组化染色显示,LMP1-293 细胞呈阳性反应,LMP1 主要分布于胞浆及膜上(图版 I-2),而 V-293 细胞及未转染 293 细胞均为阴性。

## 2.3 软琼脂集落形成能力

培养 7d 左右即可见 LMP1-293 细胞形成多个集落,至 14d 时集落明显增大,集落数

目增多(图版 I-3)。而 V-293 及未转染 293 细胞仅偶见个别较小集落,且在早期即停止生长。

#### 2.4 MTT 试验

由图 1 可见, LMP1-293 细胞的 MTT 吸收值明显大于 V-293 及未转染 293 细胞。

#### 2.5 培养细胞中 PCNA 的检测

对三种细胞的检测结果分别进行观察,每种细胞均在显微镜下随机选取 10 个视野进行计数,记录所计细胞总数及 PCNA 阳性细胞数(表 1,图版 I-4a,4b)。

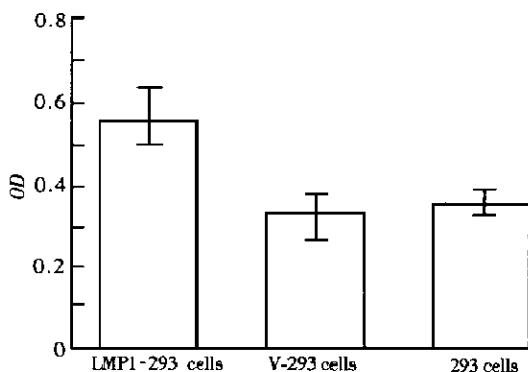


图 1 MTT 实验

Fig.1 MTT test

表 1 培养细胞中 PCNA 表达的检测

Table 1 Detection of PCNA expressed in cultured cells

组别 Groups	细胞总数 Total cell number	PCNA 阳性细胞数 PCNA positive cell number	阳性率 Positive rates / %	卡方检验* X <sup>2</sup> test
LMP1-293 cells	3775	3021	80.0	p < 0.01
V-293 cells	4213	2574	61.1	
293 cells	3691	2301	62.3	

\* LMP1-293 分别与 V-293 及 293cells 作卡方检验

X<sup>2</sup> test between LMP1-293 and V-293, LMP1-293 and 293cells

### 3 讨论

已经公认 EB 病毒的潜伏感染与人类肿瘤密切相关,EBV 的某些潜伏期基因产物能够在体外引起细胞转化。EBV-LMP1 是多种 EBV 相关肿瘤中表达的与细胞转化有关的潜伏期基因产物<sup>[10]</sup>,表达 LMP1 的细胞显示较高的增生能力及较低的分化程度<sup>[11]</sup>。学者已大量研究了 LMP1 对 B 淋巴细胞的转化作用,但其对上皮细胞的作用认识尚浅。文献报道,在鼻咽、肺、胃等上皮细胞癌中均有 LMP1 的表达<sup>[1-4]</sup>,我们认为深入研究 LMP1 对上皮细胞的作用将更能贴近于探讨 LMP1 与上皮细胞肿瘤的关系,因此建立了 LMP1 基因的真核细胞表达质粒,并转染到人胚肾上皮细胞中得到良好表达。

我们发现,LMP1 基因转染的上皮细胞呈现生长旺盛,失去接触抑制,在软琼脂中能够形成多个细胞集落。MTT 实验结果表明 LMP1 基因转染后的细胞增殖功能增强。PCNA 的检测结果表明,LMP1 基因转染细胞的 PCNA 阳性率(80.0%)明显高于空载体转染及未转染细胞(分别为 61.1%和 62.3%),显著性检验 p < 0.01。PCNA 为一种核内蛋白质,它的出现明显与细胞增殖有关,且其量的变化与 DNA 合成相一致<sup>[12]</sup>。近年来,PCNA 的免疫组织化学方法已被较成熟地用于研究细胞的增殖状态。

几项指标综合表明,LMP1 基因的转染能明显改变上皮细胞的生物学行为,促进细胞的生长、增殖和转化,使转染的上皮细胞获得肿瘤细胞的生长特征。我们已用 LMP1-293 细胞接种到裸鼠皮下,发现在促癌物 TPA 的协同作用下能在裸鼠体内成瘤,瘤组织的免疫病理

结果显示,瘤细胞的增殖状态及瘤体的生长活力与 LMP1 的表达水平有关(详细资料另文报道)。该结果提示 EBV-LMP1 在上皮细胞肿瘤发生中起有一定作用。

### 参 考 文 献

- [1] Weiss L M, Gaffey M J, Shibata D. *American Journal of Clinical Pathology*, 1991, **43**:574.
- [2] Tokunaga M, Uemura Y, Tokudome T *et al.* *Acta Pathologica Japonica*, 1993, **43**:574.
- [3] Yamamoto N, Tokunaga M, Uemura Y *et al.* *Cancer*, 1994, **74**:805.
- [4] Pittaluga S, Wong MP, Chung LP *et al.* *American Journal of Clinical Pathology*, 1993, **17**:678.
- [5] Szekeily L, Pokrovskaja K, Jiang W Q *et al.* *Oncogene*, 1995, **10**:1869~1874.
- [6] Wang F, Gregory C, Sample C *et al.* *Journal of Virology*, 1990, **64**:2309.
- [7] Peng M, Lundgren E. *Oncogene*, 1992, **7**:1775~1782.
- [8] Wang D, Liebowitz D, Wang F *et al.* *Journal of Virology*, 1998, **62**:4173~4184.
- [9] Baer R, Barkier A T, Biggin M D. *Nature*, 1984, **310**(19):207.
- [10] Elliott K. Epstein-Barr Virus and Its Replication. In: BN Field ed. *Fields Virology*. Volume 2. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. 2343.
- [11] Zheng X, Yuan F, Hu L *et al.* *International Journal of Cancer*, 1994, **57**:747.
- [12] Olins D E, Olins A L, Cacheiro L H *et al.* *Journal of Cell Biology*, 1989, **109**:1399.

## INFLUENCE OF EBV LATENT MEMBRANE PROTEIN 1 GENE ON THE PROLIFERATION OF EPITHELIAL CELLS

Chen Yifang Guo Huiyu Wang Huimin Li Mangzhi

(Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences,

Guangzhou 510120)

**Abstract** In order to study the influence of EBV latent membrane protein (LMP1) gene on the proliferation of epithelial cells and the role of LMP1 creating to epithelial cell carcinomas, EBV LMP1 gene eukaryotic expression plasmid was transfected into human embryo kidney epithelial cells. The expression of LMP1 protein in transfected cells was detected. Observing the formation of colonies in soft agar, the value of MTT absorbed and the expression of PCNA, the results showed that the transfected cells grew vigorously and formed more colonies in soft agar, the MTT uptake and PCNA expression were apparently increased. The conclusion was that LMP1 gene could alter the biological behaviours of epithelial cells, promote cell growth, proliferation and transformation and endowed the transfected cells with growth characteristics like tumor cells.

**Key words** Epstein-Barr virus, Latent membrane protein 1, Epithelial cell, Proliferation

### 图 版 说 明

Explanation of plate

1. LMP1-293 抗性细胞克隆(5×10); 2. LMP1-293 细胞表达 LMP1 阳性(5×20); 3. LMP1-293 细胞的软脂胶集落形成实验(5×4); 4. PCNA 在培养细胞中的表达(a. LMP1-293 细胞; b. V-293 细胞)(5×10)。

1. Resistant LMP1-293 cell colony; 2. LMP1-293 cells showing LMP1 positive; 3. Colony formation of LMP1-293 cells on soft agar; 4. Expression of PCNA in cultured cells (a. LMP1-293 cells; b. V-293 cells).