

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0237-06

EB 病毒 LMP1 通过 NF- κ B 介导的 HSV-tk/GCV 治疗 EBV 相关肿瘤的研究

杨力芳, 王承兴, 胡 智, 唐 敏, 顾焕华, 翁新究, 易 薇, 曹 亚 (中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

[摘 要] **目的:** 研究 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 (EBV-LMP1) 通过活化 NF- κ B 反式激活 HIV-LTR 进而启动自杀基因 HSV-tk 在 EBV 相关肿瘤治疗中的作用, 为进一步开展肿瘤治疗提供科学的实验依据。 **方法:** 以鼻咽癌细胞为实验模型, 将 HSV-tk 基因置于 HIV-LTR 调控序列之下, 构建 LMP1 调控且依赖于 NF- κ B 的 HSV-tk/GCV 系统, 采用同位素方法检测 tk 活性来研究 LMP1 通过 NF- κ B 调控 HSV-tk 转录的靶向性和表达特征, MTT 方法检测在 GCV 处理下肿瘤细胞的生长状况。 **结果:** 成功构建受 LMP1 调控且依赖于 NF- κ B 的 HSV-tk 表达质粒, 发现其在 GCV 处理下, 表达 LMP1 的肿瘤细胞的生长有显著的抑制。 **结论:** 携带有 LMP1-HSV-tk 的细胞对 GCV 治疗高度敏感, 显示这一肿瘤治疗系统在 EBV 相关肿瘤中具有一定的应用前景。

[关键词] EBV-LMP1; NF- κ B; HSV-tk/GCV; 肿瘤治疗

[中图分类号] R73.36+2; R739.63 [文献标识码] A

Role of HSV-tk/GCV System Mediated by EBV-LMP1/NF- κ B in the Therapy of EBV-Associated Carcinoma

YANG Li-fang, WANG Cheng-xing, Hu Zhi, TANG Min, GU Huan-hua, WENG Xin-xian, YI Wei, CAO Ya (Cancer Reserch Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effect of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus (EBV-LMP1) on HIV-LTR through the NF- κ B and role of the expression of suicide gene in cancer therapy. **Methods:** Nasopharyngeal carcinoma cells were used. HSV-tk gene was inserted into HIV-LTR regulated sequence to construct the HSV-tk/GCV system containing two NF- κ B binding motifs regulated by LMP1; activity of TK was evaluated by isotopic labeling; MTT method was used to observe the growth of LMP1-expressing carcinoma cells treated by GCV. **Results:** The HSV-tk/GCV system containing two NF- κ B binding motifs regulated by LMP1 was successtully constructed, carcinoma cells were significantly inhibited after treated by GCV. **Conclusions:** The cells expressing both LMP1 and HSV-tk genes were highly sensitive to GCV treatment, this suggest that this system is promising in the therapy of EBV associated cancers.

[**Key words**] EBV-LMP1; NF- κ B; HSV-tk/GCV; cancer therapy

* 自杀基因是目前肿瘤基因治疗中广泛应用并具有较好临床前景的方法。自杀基因单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(herpes simplex virus-tk, HSV-tk) 的转染能够导致细胞对药物(gancyclovir, GCV) 的敏感性, 其在细胞中可使 GCV 单磷酸化, 然后通过细胞激酶转为毒性的三磷酸盐, GCV 的三磷酸盐干扰细胞 DNA 的合成, 使细胞死亡。另外, HSV-tk/GCV 不仅有直接杀伤作用, 还通过旁观者效应杀伤肿瘤细胞。HSV-tk 在肿瘤的治疗中虽有一定的效果, 但在肿瘤基因治疗中缺乏靶向性及体内 tk 低表达这两大缺陷严重阻碍了其应用

前景^[1-2]。因此, 探讨如何改进 HSV-tk/GCV 体系以提高其靶向性及 tk 表达是 HSV-tk/GCV 治疗策略中急需解决的关键问题。

新近的研究发现 EB 病毒编码的致瘤蛋白(latent membrane protein 1, LMP1) 通过激活 NF- κ B 而参与肿

* [基金项目] 国家自然科学基金(20000204) 项目资助

[作者简介] 杨力芳(1969-), 男, 湖北黄石人, 博士生, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。

[通讯作者] 曹 亚, E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

瘤的发生与发展, LMP1 不仅促进 NF- κ B 功能性活化, 而且调节 NF- κ B 的 DNA 结合活性^[3,4], LMP1 可通过 NF- κ B 与人类 I 型免疫缺陷病毒长末端重复序列 (HIV-LTR) 的 2 个 NF- κ B 位点结合, 反式激活 HIV-LTR。HIV-LTR 是类似于 SV40 启动子的区域, 能有效地介导基因转录, 将 HIV-LTR 中 NF- κ B 位点的突变或缺失, 可以消除其反式激活作用, 从而提示 LMP1 在 HIV-LTR 表达中的调控与 NF- κ B 活性的诱导相关^[5]。

在本研究中, 我们构建了受 LMP1 调控且依赖于 NF- κ B 的 HSV-tk/GCV 系统以探寻治疗 EBV 相关肿瘤的可能性。将 HSV-tk 基因置于 HIV-LTR 调控序列之下, LMP1 通过活化 NF- κ B 而反式激活 HIV-LTR, 从而启动 HSV-tk 基因, 在 GCV 处理下, 杀死表达 LMP1 的肿瘤细胞。由于 LMP1 仅局限于 EBV 相关肿瘤细胞中而不在正常细胞内表达, 因而这一治疗策略将有助于解决 HSV-tk/GCV 靶向性的问题, 同时也由于 LMP1 在肿瘤细胞中促进 NF- κ B 活性提高, 因而将进一步提高细胞内受 NF- κ B 调控的 tk 表达, 从而更有效地杀死肿瘤细胞。

1 材料与方法

1.1 质粒

pGN-LTR: HIV-LTR 调控 LacZ 质粒; pGN-M- κ B: 含 NF- κ B 位点突变的 HIV-LTR 及 LacZ 质粒, 由 Dr. Chang YS, Chang-Gung University, Taiwan 惠赠。pHSV-106: 含 HSV-tk 质粒, 由中国医学科学院唐浪逐博士惠赠。pRSV β -gal: β -galactosidase 报道质粒, 由 Dr. Neil Perkins, University of Dundee, Scotland, UK 惠赠。

1.2 细胞系

CNE1: EB 病毒阴性的鼻咽低分化鳞癌细胞株, 该细胞 LMP1 表达阴性。CNE1-LMP1 和 HNE2-LMP1: 稳定表达 EB 病毒 LMP1 (B95-8 来源) 的鼻咽癌细胞系。Tet-on--LMP1-HNE2(L7): 湖南医科大学肿瘤研究所建立的一株 LMP1 (B95-8 来源) 表达受四环素及其衍生物诱导的鼻咽癌细胞系^[6]。B95-8: ATCC CRL-1612 EB 病毒转化的 B 淋巴细胞, 培养中释放高滴度的 EB 病毒。以上细胞采用培养基 1640 + 15% FCS, 在 37°C 5% CO₂ 条件下进行培养。

1.3 质粒构建

用 Bg III/Nco I 双酶切 pHSV-106 质粒 (内含 HSV-tk) 得到 1 478 bp 的 HSV-tk, EcoR I/Sma I 双酶切去除 pGN-LTR 中 LacZ, 然后两者钝端连接成 pLTR-tk (内含 HIV-LTR 及 HSV-tk)。将构建的质粒经 Hind III/Xho I 双酶切鉴定, 并经 Sph I 酶切鉴定目的片段的插入方向后, 在 API 自动测序仪测序, 重组 pLTR-tk 质粒

的插入片段的全长测序由上海基康生物技术有限公司完成。

1.4 RT-PCR

为了证实实验细胞系 CNE1, CNE1-LMP1, HNE2-LMP1 中 LMP1 mRNA 水平的表达状态, 按 RNA 提取试剂 Trizol 说明书, 提取上述细胞系中总 RNA。用 DNaseI 消化 gDNA, 取 5 μ l RNA, 用 MMV 酶 50°C, 60 min 逆转录为 cDNA。取 1 μ l cDNA 进行 PCR 扩增。从 Gene Bank 调出 Wild Type LMP1 序列, 使用 Primer3 软件, 设计 LMP1 扩增引物: (F) 5'-TTGTCCTCTATTCCTTTGCTCTC-3'; (R) 5'-TCAACCAATAGAGTCACCACTT-3', 扩增区段为 LMP1 基因 158-509 核苷酸残基之间, 片段长度为 352 bp; 内参对照 β -Actin 的上游引物: 5'-GTGGGG CGCAGGCACCA-3', 下游引物: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT TTC-3', 片段长度为 548 bp, 引物由上海生工生物工程公司合成。以释放高滴度 EB 病毒的 B95-8 细胞 cDNA 为阳性对照, 在 20 μ l 的 PCR 反应体系中, 加入 1 μ g cDNA、1.5 μ l MgCl₂ (25 mmol/L)、2 μ l dNTP (10 \times)、2 μ l 反应缓冲液 (10 \times)、1 U Taq 酶和上、下游引物各 10 pmol。置 PCR 仪 94°C 变性 5 min, 进行 35 个循环 (94°C 变性 45 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s), 最后 72°C 延伸 10 min。

1.5 Western blot 分析 LMP1 的表达

进一步使用 Western blot 分析细胞中 LMP1 的蛋白质表达状态, 细胞全蛋白的提取按分子克隆介绍的方法略作修改。取上述已处理的各组细胞 1 \times 10⁶, 用 PBS 洗 3~4 次后, 细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L PMSF) 裂解。沸水浴变性 5 min, 冰上复性 5 min, 30 s 超声粉碎。13 000 r/min 离心去细胞碎片。留含全蛋白的上清液。用 BCA assay reagent (Pierce Chemical Co. Rockford) 测定蛋白浓度。取各组细胞 100 μ g 全蛋白质在不连续 SDS-PAGE 胶电泳, 电转移至硝酸纤维素膜上, 加抗 LMP1 单克隆抗体, 孵育 15 h, 洗膜, 加兔抗鼠 IgG-HRP 二抗, 孵育 2 h。以 B95-8 细胞全蛋白为阳性。化学发光法显色目的条带, X-光片显影。结果用 β -actin 作为内对照校正。

1.6 SuperfectTM 介导的瞬间细胞转染

转染前 24 h, 将细胞种植于 6 孔板培养, 待细胞生长至 70%~80% 融合时弃培养基 (RPMI-1640), 加无血清培养基洗 2 次。在 2 个 Eppendorf 管中各加 100 μ l 无血清培养基, 其中一管加 5 μ g 质粒, 另一个 Eppendorf 管加 10 μ l SuperFect (QIAGEN Cat#: 301307 美国) 后混合均匀, 置室温下 45 min, 平均加入转染细胞孔后, 再补加 200 μ l/孔无血清培养基, 在 37°C 5% CO₂

条件下培养,转染 6 h 后,用 $1 \times$ PBS 洗 2 遍,换新鲜完全培养基,继续培养 12 h 后用于实验。

1.7 β -gal 活性检测

为了确定 LMP1 的稳定表达将通过活化 NF- κ B 而介导 HIV-LTR-LacZ 转录,使用含 HIV-LTR 调控 LacZ 的质粒和含突变 NF- κ B 位点的 HIV-LTR 及 Lac 质粒在细胞中的 β -gal 活性检测来确定 LMP1 稳定表达将通过活化 NF- κ B 而介导 HIV-LTR-LacZ 转录。按 1.5 方法,以 CNE1 为对照,将质粒 pGN-LTR(含 HIV-LTR 调控 LacZ)和 pGN-M- κ B(含突变 NF- κ B 位点的 HIV-LTR 及 LacZ)各自同 β -gal 报道质粒 pRSV β -gal,共转染 Tet-on--LMP1-HNE2(L7)细胞,并以单独的 β -gal 报道质粒 pRSV β -gal 为空白对照,共转染同时以 0.005 mg/ml,0.05 mg/ml,0.5 mg/ml 的浓度梯度加入 Dox 进行诱导,培养 48 h 后,在细胞的培养基中收获细胞,加 200 μ l 的裂解缓冲(50 mmol/L Tris-cl;pH7.5,1 mmol/L EDTA,2% SDS)到细胞悬液中,混合,冰置 30 min,4 $^{\circ}$ C 离心 12 000 r/min 2min,取 50 μ l 上清到 96 孔板中,使用 β -galactosidase Enzyme Assay System(Promega Cat#:E2000 美国),按使用说明书进行检测。

1.8 TK 活性检测

在已确定 LMP1 通过活化 NF- κ B 而介导 HIV-LTR-LacZ 转录的基础之上,为了进一步确定 LMP1 通过 NF- κ B 调控 HSV-tk 的靶向性及 tk 表达特征,按 1.5 方法,将质粒 pLTR-tk 转染入实验细胞系 CNE1,HNE2-LMP1,HNE2-LMP1 中,48 h 后,在细胞的培养基中收获细胞,按 1.6 方法裂解细胞,取 20 μ l 细胞裂解液,加入 100 μ l 3H 胸苷 TK 活性检测反应液(125 mmol/L Tris-cl;pH7.8,2 mmol/L MgCl₂,200 mmol/L KCl,100 mmol/L NH₄Cl,4 mmol/L 巯基乙醇,2 mmol/L ATP,0.5 mg/ml 小牛血清, 3×10^{-7} mol/L [³H]胸苷 10 Ci/mmol/L-北京原子能研究所),37 $^{\circ}$ C 温育反应 30 min,将 50 μ l 的反应液点在 Whatman DE-81 滤纸上,用 95% 的乙醇洗 3 次,各 5 min,置干后,每片滤纸上加 5 ml 液闪液,使用液闪计数仪(BECKMAN LS-5000 TD 美国)检测 cpm 值。

1.9 MTT 法检测细胞对 GCV 敏感性

在已确定 LMP1 通过 NF- κ B 调控 HSV-tk,促使 tk 基因表达的基础之上,利用 MTT 法以确定 LMP1 调控下的 HSV-tk-GCV 系统体外抑制实验细胞生长作用。取对数生长期的实验细胞系 CNE1,HNE2-LMP1,HNE2-LMP1,用 0.02% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶消化后计数,调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml,48 孔培养板接种,各孔细胞数调整为 2×10^4 个/孔,贴壁生长后到 50% ~ 80% 融合,按 1.5 方法,将质粒 pLTR-tk 瞬时转

染细胞后,8 孔为 1 个平行组,以 10 μ g/ml,50 μ g/ml,150 μ g/ml,200 μ g/ml,300 μ g/ml 的浓度梯度加入 GCV。继续培养 3 d 后,各加 5 mg/ml 的 MTT40 μ l 于各孔中,再培养 4 h,弃培养板中的培养液,各孔加 200 μ l DMSO,轻轻振动混合后,用酶标仪(BIO-TEK ELX800 美国)波长 570 nm 测定各孔的 OD 值,以每组 8 个孔 OD 的平均值作为各组的平均 OD 值,比较细胞的增殖状态。

2 结果

2.1 pLTR-tk 质粒的构建

将构建的质粒 pLTR-tk(内含 HIV-LTR 及 HSV-tk)的 3 个阳性克隆经 Hind III 和 Xho I 双酶切鉴定,可见 1 700 bp 的插入片段(见图 1),并经 Sph I 酶切鉴定其片段的插入方向,存在一个正向插入的克隆,被 Sph I 酶切产生 2 个片段:3 605 bp,1 103 bp;而 2 个反向插入的克隆被 Sph I 酶切产生 2 个片段:4 198 bp,510 bp(见图 2)。重组 pLTR-tk 质粒的插入片段的测序结果显示全长为 1 708 bp,其中 HIV-LTR 为 230 bp,HSV-tk 1 478 bp,在 HIV-LTR 序列中含有 2 个 NF- κ B 的 DNA 结合位点,分别位于插入片段的 126 ~ 134 和 211 ~ 219(见图 3)。

图 1 重组 pLTR-tk 质粒 Hind III/Xho I 双酶切鉴定

Fig.1 Enzyme digestion analysis of recombination pLTR-tk

Lane 1: Before digestion; Lane 2,3,4: Digested by Hind III and Xho I; Lane 5: λ DNA/Hind III maker

2.2 RT-PCR 检测 LMP1 mRNA

RT-PCR 实验结果证实,在细胞系 CNE1-LMP1,HNE2-LMP1 的模板中扩增出长度为 350 bp 大小的目的 cDNA 片段,细胞系 CNE1 未见扩增片段,证实 CNE1 细胞 LMP1 mRNA 水平的表达阴性,而 CNE1-LMP1,HNE2-LMP1 为 EB 病毒 LMP1 表达阳性的细胞系(见图 4)。

2.3 Western blot 分析 LMP1 的表达

Western blot 实验结果进一步证实,在细胞系 CNE1-LMP1,HNE2-LMP1 中可检出 62 kD 大小的目的

LMP1 蛋白,细胞系 CNE1 未见目的 LMP1 蛋白,证实 CNE1 细胞 LMP1 表达阴性,而 CNE1-LMP1, HNE2-LMP1 为 EB 病毒 LMP1 表达阳性的细胞系(见图 5)。

现随着 DOX 诱导的 LMP1 的增加, β -gal 活性也呈相应的变化。LMP1 的表达阴性的对照细胞在转染 pGN-M- κ B 质粒(其 HIV-LTR 序列中 NF- κ B 结合位点突变)的细胞中 β -gal 活性无明显的变化,证实了 LMP1 的稳定表达将通过活化 NF- κ B 介导 HIV-LTR-LacZ 转录,并且通过 NF- κ B 结合位点的诱导是特异的(见图 6)。

2.5 转染 HSV-tk 细胞中的 tk 活性

如图 7 所示,CNE2 细胞系在转染 HSV-tk 后,胸苷激酶活性与未转染的细胞无明显的差异,cpm 都在 1×10^5 左右,说明内源性 tk 表达的存在并维持在一个较低的水平;而 CNE2-LMP1, HNE2-LMP1 细胞系在转染 pLTR-tk 后,与未转染 HSV-tk 的细胞比较,胸苷激酶活性有显著性的差异,激酶活性扩大 3 倍以上,显示 LMP1 通过 NF- κ B 调控能使 HSV-tk 的表达有明显的提高(见图 7)。

2.6 MTT 法检测细胞对 GCV 敏感性

进一步应用 MTT 法检测细胞对 GCV 的敏感性结果,使用 $10 \mu\text{g/ml}$ 和 $50 \mu\text{g/ml}$ GCV 浓度时,CNE1-LMP1 和 HNE2-LMP1 细胞生存百分比为 90% 左右,在使用了 $150 \mu\text{g/ml}$ 和 $200 \mu\text{g/ml}$ 的 GCV 时,大约 40% 的 LMP1 和 HSV-tk 阳性的细胞即 CNE1-LMP1 和 HNE2-LMP1 细胞被杀死,而使用 $300 \mu\text{g/ml}$ 的 GCV 大约 80% 的 CNE1-LMP1 和 HNE2-LMP1 细胞被杀死。而 LMP1 阴性的 CNE1 细胞中,细胞的生存率的变化不大。结果显示携带有 LMP1-HSV-tk 的细胞对 GCV 治疗高度敏感(见图 8)。

2.4 LMP1 介导的 NF- κ B 的转录激活

Tet-on-LMP1-HNE2 是一株 LMP1 表达受四环素(DOX)诱导的鼻咽癌细胞系,其 LMP1 的表达在 DOX 小于 6 mg/ml 的条件下,随着 DOX 诱导浓度的增加而提高^[6],结果发现,在表达了 LMP1 的 Tet-on-LMP1-HNE2 细胞中存在 β -gal 活性的明显增加,同时可以发

图 2 重组 pLTR-tk 质粒 Sph I 酶切鉴定目的片段的插入方向

Fig.2 Identify orientation of insert gene in recombination plasmid by Sph I

1,2: Antisense orientation of insert gene in recombination plasmid by Sph I 4 198 bp,510 bp; 3:Sense orientation of insert gene in recombination plasmid by Sph I 3 605 bp, 1 103 bp, 4: λ DNA/Hind III maker

图 3 重组 pLTR-tk 质粒部分测序分析图

Fig.3 Sequence of the insert gene of recombination plasmid pLTR-tk show: Insert gene is 1 708 bp, HSV-tk is 1 478 bp, HIV-LTR is 230 bp which contained two copies of the NF- κ B motif

图4 RT-PCR 检测细胞中 LMP1 mRNA**Fig.4 RT-PCR result of LMP1 mRNA**

1: Negative control; 2: CNE1 cell; 3: CNE1-LMP1 cell;
4: HNE2-LMP1 cell; 5: B-958 cell; 6: PCR maker

图5 Western blot 分析细胞中 LMP1 的表达**Fig.5 Western blot result of LMP1 protein**

1: B-958 cell; 2: CNE1 cell; 3: CNE1-LMP1 cell;
4: HNE2-LMP1 cell

图6 LMP1 介导的 NF- κ B 的转录激活**Fig.6 β -galactosidase relative activity**

1: CNE1/pGN-M- κ B/pRSV β -gal; 2: CNE1/pGN-LTR/
pRSV β -gal; 3: L7/pGN-M- κ B /pRSV β -gal/DOX, 0 mg/ml;
4: L7/pGN-LTR/pRSV β -gal/DOX, 0.005 mg/ml;
5: L7/pGN-LTR/pRSV β -gal/DOX, 0.05 mg/ml;
6: L7/pGN-LTR/pRSV β -gal/DOX, 0.5 mg/ml

3 讨论

近年来,针对 HSV-tk/GCV 靶向性问题,取得了一些有意义的进展。许多肿瘤自身特异性的肿瘤标志物,如原发性肝癌的甲胎蛋白(AFP)、人成神经细胞瘤的 NCX 基因、大肠癌的癌胚抗原(CEA)、黑色素瘤的酪氨酸激酶(Tyr)、前列腺癌中的 PSA 和小细胞肺癌的

myc-max 反应元等,利用基因启动子的表达受该肿瘤特异调控的特征,将 HSV-tk 基因置于此类基因启动子之下,可使 HSV-tk 选择性地在该肿瘤细胞中表达,达到杀死肿瘤细胞目的^[7-9]。另外,有报道使用肝细胞癌中的 AFP 基因的增强子序列选择性表达 HSV-tk 基因,发现了有意义的结果^[10]。最近还提出了一种针对 EBV 相关肿瘤的治疗策略是用定位于 EBV 基因组的 orip 区域附近 30 bp 重复序列为启动子调控单位,由于此序列能够特异地受 EBV 表达的 EBNA1 分子活化,因此下游治疗基因的表达只特异性在 EBV 阳性的细胞中表达,这一策略也取得了良好的效果^[11]。这些进展提示,发现新的靶向表达的特异性调控序列在肿瘤的基因治疗中具有积极意义。

图7 不同鼻咽癌细胞系转染 HSV-tk 后的 tk 活性变化**Fig.7 Thymidine kinase activity of CNE1, CNE1-LMP1, HNE2-LMP1 after transfection HSV-tk****图8 MTT 法检测不同细胞系转染****HSV-tk 后对 GCV 敏感性****Fig.8 The survival rate of cells treated by GCV**

已有的研究表明,EB 病毒是与人类多种恶性肿瘤如鼻咽癌、何杰金氏病、伯基特淋巴瘤、移植术后淋巴瘤,肺癌,胃癌甚至乳腺癌等多种肿瘤的发生密切相关的 DNA 致癌病毒,在鼻咽癌及其它与 EBV 相关的恶性肿瘤的瘤细胞中证实了 EBV 瘤蛋白 LMP1 的表达,LMP1 基因的转录由位于启动子 ED-L1 的 500 bp 上游区域的 ED-L1 启动优先指导,

通过对 LMP1 功能的深入研究,发现 LMP1 通过激活 NF- κ B 的信号转导在肿瘤的发生与发展中有重要意义^[12]。NF- κ B 能够通过许多基因的启动子区域中的多个拷贝的结合位点来调节靶基因表达,因而在 EBV 的相关肿瘤中,可能会通过这个信号转导通路使治疗基因如 HSV-tk 基因获得较高的肿瘤特异性表达。

在本研究中,为了更准确地探讨 LMP1 的稳定表达将通过活化 NF- κ B 介导 HIV-LTR-LacZ 转录,使用了两种 LMP1 稳定表达的细胞系(HNE2-LMP1, CNE1-LMP1),并通过 RT-PCR 和 Western-blot 检测实验细胞系中 LMP1 的表达。在 β -gal 活性检测实验中,由于 Tet-on-LMP1-HNE2 是一株 LMP1 表达受四环素(DOX)诱导的鼻咽癌细胞系,其 LMP1 的表达具有在 DOX 小于 6 mg/ml 的条件下,随着 DOX 诱导浓度的增加而提高的特点^[6],因此在研究 LMP1 的稳定表达是否通过活化 NF- κ B 介导 HIV-LTR-LacZ 转录,并且这种 LacZ 的转录是否与 LMP1 的表达量有关时,此细胞系是良好的细胞模型。实验结果说明 LMP1 的稳定表达通过活化 NF- κ B 介导 HIV-LTR-LacZ 转录并且随着 LMP1 表达量的提高,LacZ 转录活性也成正相关的变化,具有明显的剂量效应;而且发现 NF- κ B 位点的突变会丧失这种调控,说明通过 NF- κ B 结合位点的诱导是特异的,而不是 HIV-LTR 的其他序列。

TK 活性检测实验的结果显示 LMP1 通过 NF- κ B 调控 HSV-tk 存在很好的靶向性,且对 tk 的表达有明显的诱导作用。在已确定 LMP1 通过 NF- κ B 调控 HSV-tk,促使 tk 基因表达的基础之上,利用 MTT 实验我们确定 LMP1 调控下的 HSV-tk-GCV 系统具有体外抑制实验细胞生长作用,说明特异性表达 LMP1 和 HSV-tk 基因的肿瘤细胞对 GCV 治疗高度敏感和特异。根据这些实验结果,我们认为这一肿瘤治疗系统在 EBV 相关肿瘤中具有一定的应用前景。

在上述研究中,体外实验已证实 EB 病毒潜伏膜蛋白 1(EBV-LMP1)通过活化 NF- κ B 反式激活 HIV-LTR 进而启动自杀基因在 EBV 相关肿瘤中的杀伤作用,这为进一步开展 EBV 相关肿瘤治疗提供科学的实验依据,为进一步发展新的靶基因治疗打

下基础。

[参考文献]

- [1] Singhal S. Cancer chemotherapy using suicide genes[J]. Surg Oncol Clin N Am, 1998, 7(3): 505-36.
- [2] Loimas S, Toppinen MR, Visakorpi T, et al. Human prostate carcinoma cells as targets for herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(2): 137-144.
- [3] 王承兴,曹亚. EB 病毒潜伏膜蛋白-1 介导的信号传导[J]. 生物化学与生物进展, 1999, 26(6): 528-530
- [4] 潘雷,顾焕华,曹亚,等. EB 病毒 LMP1 促进鼻咽癌中 NF- κ B 表达的实验研究[J]. 中国耳鼻喉科颅底外科学杂志, 1999, 2(3): 54-57.
- [5] Bruder JT, Heidecker G, Tan TH, et al. Oncogene activation of HIV-LTR-driven expression via the NF-kappa B binding sites[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(22): 5229-5234.
- [6] 廖伟,易红,曹亚,等. Tet-on 调控的 LMP1 基因导入鼻咽癌细胞的研究[J]. 生物物理和生物化学学报, 1999, 31(3): 256-260
- [7] Narita M, Bahar R, Hatano M, et al. Tissue-specific expression of a suicide gene for selective killing of neuroblastoma cells using a promoter region of the NCX gene[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(12): 997-1002.
- [8] Yu D, Chen D, Chiu C, et al. Prostate-specific targeting using PSA promoter-based lentiviral vectors[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(9): 628-635.
- [9] Tanaka S, Iwai M, Harada Y, et al. Targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cholangiocarcinoma cells by polyamidoamine dendrimer-mediated transfer of an Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vector carrying the CEA promoter[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(9): 1241-1250.
- [10] Cao G, Kuriyama S, Gao J, et al. Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene-expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promoter[J]. Eur J Cancer. 2001, 37(1): 140-147.
- [11] Li JH, Chia M, Shi W, et al. Tumor-targeted gene therapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 2002, 62(1): 171-178.
- [12] Rothenberger S, Bachmann E, Knecht H, et al. Molecular and functional analysis of the Epstein-Barr virus LMP1 oncogene promoter in lymphoproliferative diseases[J]. Exp Hematol, 1997, 25(13): 1326-1332

[收稿日期] 2002-05-05

[修回日期] 2002-08-10

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》!