

## EBV-LMP1 促 CNE2 细胞迁移的作用机制

张志伟,贺智敏\*,周敏,丁渭,余艳辉,陈主初  
(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所,长沙 410078)

**[摘要]** 目的:探讨 EBV-LMP1 对鼻咽癌细胞 CNE2 迁移表型的影响及作用机制。方法:用 RV-LNSX, RV-LMP1 和 RV-LMP1<sup>TRADD</sup> 逆转录病毒分别感染 CNE2 细胞, G418 筛选后,观察和检测转基因细胞的形态学特点,在基质中的运动迁移能力以及 E-钙黏蛋白(E-Cadherin)表达的变化;用 pLNSX, pLNSX-LMP1 和 pLNSX-LMP1<sup>TRADD</sup> 质粒分别与 E-Cadherin 报告基因共转染 293 细胞,检测 LMP1 对 E-Cadherin 启动子活性的影响。结果:与 CNE2 和 CNE2-LNSX 细胞相比, CNE2-LMP1 在培养过程中由扁平、鹅卵石状上皮细胞形态逐渐演变为细胞间接触消失的长梭状纤维细胞形态,相对迁移明显增大( $n=3, P<0.05$ ),且 E-Cadherin 表达明显下调或缺失;随着共转染野生型 LMP1 (pLNSX-LMP1) 剂量的增加(0.2, 0.6, 1.0  $\mu\text{g}$ ),对 E-Cadherin 启动子转录活化的抑制率增加,呈明显浓度依赖性; LMP1<sup>TRADD</sup> 不改变 CNE2 细胞形态学及迁移表型,对 E-Cadherin 启动子的转录活性及蛋白表达亦无明显影响。结论:抑制 E-Cadherin 启动子活化可能是 EBV-LMP1 下调 E-Cadherin 蛋白表达、促 CNE2 细胞迁移的机制之一,位于 LMP1 羧基端的 TRADD 可能是其促迁移的主要活性部位。

**[关键词]** EB 病毒; 潜伏性膜蛋白; 细胞转化; E-钙黏蛋白; 迁移

**[中图分类号]** R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)04-0470-05

### Mechanism of migration in CNE2 cells promoted by EBV-LMP1

ZHANG Zhi-wei, HE Zhi-min\*, ZHOU Min, DING Wei, YU Yan-hui, CHEN Zhu-chu

(Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the mechanism of migration phenotype change induced by EBV-LMP1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE2. **Methods** Retroviruses RV-LNSX, RV-LMP1, and RV-LMP1<sup>TRADD</sup> prepared previously were used to infect CNE2 cells. After selection with G418, the morphology, the ability of motion and migration in extracellular matrix, expression of LMP1 and E-Cadherin in transgenic cells were observed or detected. Meanwhile, pEcad-luc was respectively co-transfected with pLNSX, pLNSX-LMP1, and pLNSX-LMP1<sup>TRADD</sup>, to examine the effect of LMP1 on the transcriptional activity of E-Cadherin promoter in 293 cells. **Results** Compared with CNE2 and CNE2-LNSX cells, CNE2-LMP1 cells morphologically changed from typical epithelial appearance to long-spindle fibroblastic morphology with the concomitant loss of cell-to-cell contact, and relative migration of CNE2-LMP1 cells obviously increased ( $n=3, P<0.05$ ), while the expression of E-Cadherin was negative in CNE2-LMP1 cells. The transcriptional activity of E-Cadherin promoter and the expression of E-Cadherin was suppressed by LMP1, and the level of suppression was correlated with the concentration of pLNSX-LMP1 (0.2, 0.6 and 1.0  $\mu\text{g}$ ). LMP1<sup>TRADD</sup> didn't induce the changes of morphology and migration phenotype, nor suppress the transcriptional activity of E-Cadherin promoter and the expression of E-Cadherin in CNE2 cells. **Conclusion** EBV-LMP1 promotes the migration and down-regulates the expression of E-Cadherin in CNE2 cells.

The mechanism is that EBV-LMP1 suppresses the transcriptional activity of E-Cadherin promoter. TRADD of carboxyl terminus of LMP1 may be the main active domain to promote the migration in NPC cells.

**Key words:** Epstein-Barr virus; LMP1; cell transformation; E-Cadherin; migration

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2006,31(4):0470-05]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是东南亚和我国南方地区高发的恶性肿瘤,早期淋巴结转移是其主要特征。许多研究表明,EB病毒与鼻咽癌病因发病关系密切,尤其是未分化鼻咽癌,几乎100%存在EB病毒感染<sup>[1]</sup>。EB病毒编码的潜伏性膜蛋白1(latent membrane protein 1, LMP1)是病毒基因组中具有促细胞癌变作用的瘤蛋白<sup>[2]</sup>,其在EB病毒介导的B淋巴细胞增殖和永生生化以及鼻咽癌、何杰金氏病和伯基特淋巴瘤等疾病的发生中起重要作用。近年研究发现LMP1还参与宿主肿瘤细胞的侵袭转移<sup>[3]</sup>,但具体作用机制不十分清楚。E-钙黏蛋白(E-Cadherin)是一种促相关肿瘤侵袭转移的上皮细胞间黏附的靶分子,在维持上皮表型中起关键作用<sup>[4]</sup>。许多伴有浸润转移的恶性肿瘤均存在E-Cadherin表达下调<sup>[5]</sup>,因而E-Cadherin可能是一种浸润转移抑制基因<sup>[6]</sup>。本研究拟探讨鼻咽癌细胞系CNE2中LMP1与E-Cadherin表达的关系,以进一步阐述EB病毒在肿瘤转移中的作用和机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 质粒 *pLNSX* 和 *pEcad-luc* (含E-Cadherin启动子序列的荧光素酶表达质粒)由香港大学曹亮博士赠送,*pLNSX-LMP1* 和 *pLNSX-LMP1<sup>TRADD</sup>* (羧基末端 aa384 ~ aa386 TNFR 相关死亡区 TRADD 由 YYD→ID 的突变型 LMP1)<sup>[7]</sup> 本室构建保存。

1.1.2 细胞 EB病毒阴性的低分化鳞状细胞鼻咽癌细胞系CNE2(由中国医学科学院肿瘤研究所建系),PA317-LNSX,PA317-LMP1和PA317-LMP1<sup>TRADD</sup>(分别包装RV-LNSX,RV-LMP1和RV-LMP1<sup>TRADD</sup>逆转录病毒),B95-8细胞和293细胞为本室保存。上述细胞采用含10%小牛或胎牛血清(杭州四季青公司)的RPMI1640培养基(日本株式会社)或DMEM培养基(GIBCO)培养。

1.1.3 试剂 荧光素酶检测试剂盒购自Promega,G418和Fuge 6购自GIBCO,抗LMP1单抗

S<sub>12</sub>由香港大学曹亮博士赠送,抗E-Cadherin单抗购自Transduction,纤维连接蛋白(Fn)与小牛血清蛋白(BSA)购自Sigma,Matrigel购自Collaborative Research。

### 1.2 方 法

1.2.1 CNE2细胞感染<sup>[7]</sup> 将CNE2细胞以1×10<sup>5</sup>细胞/孔接种于6孔板培养,当细胞长至60%~80%融合时,用临时过滤孵育8~12h的PA317-LNSX,PA317-LMP1,PA317-LMP1<sup>TRADD</sup>3种PA317细胞上清和8mg/Lpolybrene分别感染细胞2次(2mL/孔/次,间隔8~12h),800mg/L的G418筛选,2~3w后汇合克隆扩增培养,分别获CNE2-LNSX,CNE2-LMP1和CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup>细胞。

1.2.2 细胞迁移实验 参考文献并改进<sup>[8]</sup>,在6孔板中加入基底膜溶液(10g/LBSA,6mg/LMatrigel,10mg/LFn)500μL/孔,以BSA为对照,4℃过夜后,加入无血清培养基(含10g/LBSA)50μL/孔,加入2×10<sup>5</sup>细胞/孔(每组3孔)。待细胞融合至80%~90%时,用黄色移液器滴头呈“一”字划痕,镜下(10×20)记录划痕宽度,每6h观察、照相并测量,连续观察24h至细胞长满为止。然后计算相对迁移距离:相对迁移距离=初始宽度-测量值,本实验独立进行3次。

1.2.3 Western印迹检测<sup>[9]</sup> 分别抽提转化的CNE2细胞蛋白,以50μg蛋白质/孔道于10%聚丙烯酰胺中电泳分离,转膜(硝酸纤维素膜),100g/L脱脂牛奶封闭后,用抗LMP1单抗(S<sub>12</sub>)和抗E-Cadherin单抗分别标记,然后用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:1000)标记,洗膜后,曝光,显影定影,分别检测LMP1和E-Cadherin的表达。

1.2.4 LMP1对E-Cadherin启动子的活性调节<sup>[9]</sup>

将0.2μg*pEcad-luc*分别与不同量的*pLNSX-LMP1*(0.2,0.6,1μg)和*pLNSX-LMP1<sup>TRADD</sup>*(0.6,1μg)共转染CNE2细胞(6孔板中培养,每组3孔),每孔转染总量为1.2μg,不足部分用*pLNSX*补齐。单光子检测仪分别检测荧光值,以平行孔的均数和标准差表示*pEcad-luc*的相对活性,本实验独立进行3次。

1.3 统计学处理 组间比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 LMP1 对 CNE2 细胞形态学的影响 逆转录病毒感染后导入野生型 LMP1 的 CNE2 细胞 (CNE2-LMP1), 随着筛选和传代, 由扁平、鹅卵石样典型上皮形态 (图 1A) 逐渐演变成细胞间接触减少的长梭状纤维细胞样形态 (图 1B); 而导入突变型 LMP1 的 CNE2 细胞 (CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup>) 的形态 (图 1C) 未发生明显改变; 但是 3 组细胞的生长速率并无明显差异 (资料未显示)。

2.2 转化细胞的 LMP1 表达 Western 印迹检测显示 CNE2-LMP1 和 CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup> 细胞中 LMP1 片段大小无明显区别 (图 2), 且与 EBV 阳性的 B95-8 细胞一致。

2.3 LMP1 对 CNE2 细胞迁移的促进作用 以 CNE2 细胞为对照, 观察不同时间段 LMP1 对 CNE2 细胞迁移的影响, 发现 CNE2-LMP1 在 6, 12 和 18 h 的相对迁移率均大于 CNE2, CNE2-LNSX 和 CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup> 3 种细胞 ( $P < 0.05$ ), 而 CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup> 与亲本细胞 CNE2 相似 (图 3), 提示 LMP1 参与 CNE2 细胞的转移, 其中 TRADD 是 LMP1 引起 CNE2 细胞行为改变的重要部位。

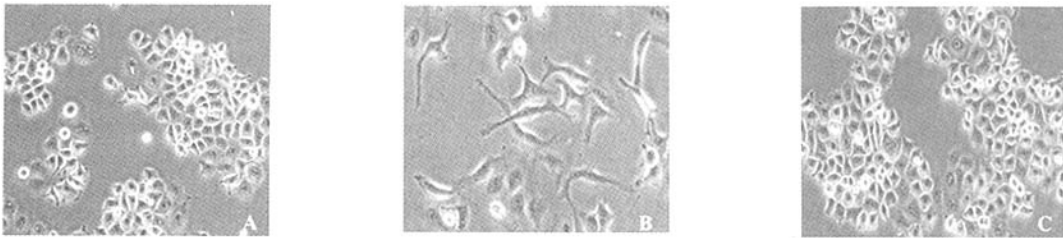


图 1 CNE2-LMP1 细胞的形态学改变 A: CNE2-LNSX; B: CNE2-LMP1; C: CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup>

Fig. 1 Morphological transformation of CNE2 cells by LMP1 A: CNE2-LNSX; B: CNE2-LMP1; C: CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup>

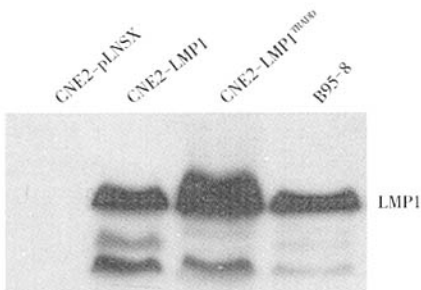


图 2 Western 印迹检测 LMP1 在转化 CNE2 细胞的表达

Fig. 2 Expression of LMP1 in infected CNE2 cells by Western blot

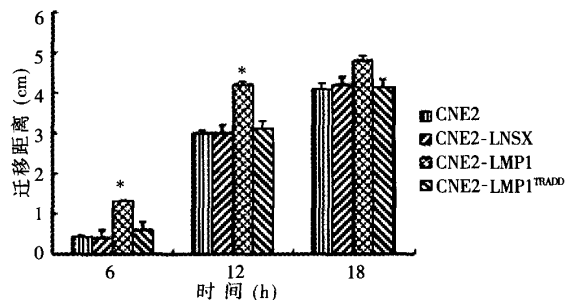


图 3 LMP1 对 CNE2 细胞迁移的影响 ( $n = 3$ ) 与其他 3 组细胞比较, \*  $P < 0.05$

Fig. 3 Effects of LMP1 on migration in CNE2 cells ( $n = 3$ ) Compared with CNE2, CNE2-LNSX and CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup>, \*  $P < 0.05$

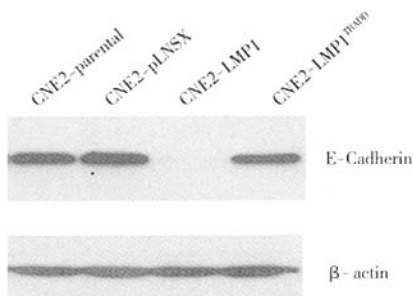


图 4 Western 印迹检测 E-Cadherin 在转化细胞的表达

Fig. 4 Expression of E-Cadherin in infected CNE2 cells by Western blot

2.4 转化细胞 E-Cadherin 表达 Western 印迹检测 CNE2-LNSX 和 CNE2-LMP1<sup>TRADD</sup> 细胞与亲本 CNE2 细胞 E-Cadherin 的表达量无明显区别, 而 CNE2-LMP1 细胞 E-Cadherin 表达呈阴性 (图 4), 提示 LMP1 能下调 CNE2 细胞 E-Cadherin 的表达, 而 LMP1<sup>TRADD</sup> 却无此作用。

2.5 LMP1 对 E-Cadherin 启动子的负性调节作用 pEcad-luc 报告基因检测发现 LMP1 能明显抑制 E-Cadherin 启动子的转录活化, 并呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ , 图 5); LMP1<sup>TRADD</sup> 对其的抑制作用几乎丧失 ( $P > 0.05$ , 图 5)。提示 LMP1 下调 E-Cadherin 表达与抑制其启动子活化有关, TRADD 是 LMP1 发挥这一作用的重要活性部位。

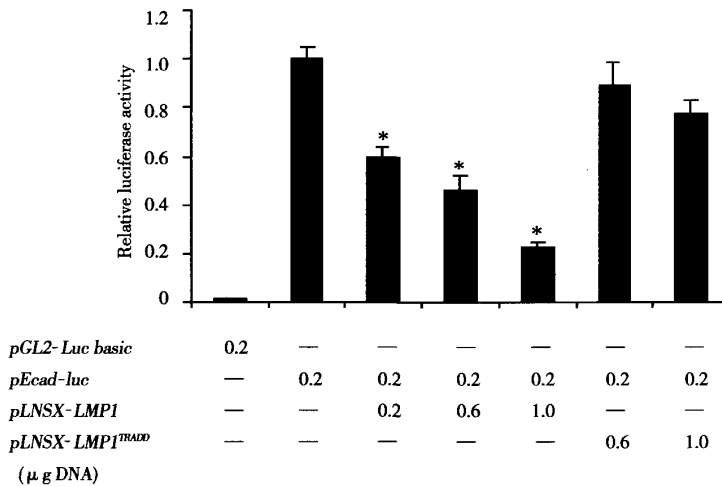


图5 LMP1 对 CNE2 细胞 E-Cadherin 启动子转录活性的影响 与 pEcad-Luc 组比较, \*  $P < 0.05$

Fig.5 Effects of LMP1 on transcriptional activity of E-cadherin promoter in CNE2 cells Compared with pEcad-Luc group, \*  $P < 0.05$

### 3 讨 论

EB 病毒与 NPC 的病因学联系以及病毒瘤基因 *LMP1* 在大多数 NPC 组织的表达均提示, *LMP1* 在 NPC 发生发展中具有重要作用。以往的许多研究已为 *LMP1* 在不同上皮源性细胞中的致瘤作用提供了充分证据, 如 *LMP1* 体外转化的人角质细胞系 BHEK-1 不仅产生了形态学改变<sup>[10]</sup>, 而且获得了体内致瘤的恶性表型<sup>[11]</sup>; *LMP1* 表达阳性的人鳞癌细胞系 SCC12 的分化受到明显抑制<sup>[12]</sup> 以及 *LMP1* 能致肾上皮细胞 (MDCK) 产生形态学转化和浸润性生长<sup>[13]</sup> 等, 但是 *LMP1* 表达对 NPC 上皮细胞的上述影响一直不十分清楚。本研究选择一株低分化, EB 病毒阴性, 具有典型上皮形态和 E-Cadherin 表达的 NPC 细胞系 CNE2 进行研究, 发现 *LMP1* 转化的 CNE2 (CNE2-LMP1) 细胞呈现结构松散的长纺锤形 (图 1B), 即产生了由典型上皮样向纤维样转化的形态学改变, 提示细胞间黏附状态发生了改变 (与前述报道结果相似); *LMP1* 对 CNE2 细胞相对迁移的改变较亲代细胞 CNE2 大 (图 3), 提示 *LMP1* 参与促 CNE2 细胞的迁移, 这些结果一方面表明 *LMP1* 对上皮细胞形态影响可能是一种普遍现象, 另一方面提示 *LMP1* 可能直接参与了 NPC 的发生发展与侵袭转移。

E-Cadherin 是一种能维持上皮形态和功能的上皮细胞黏附分子, 作为一种浸润抑制分子<sup>[14]</sup>, 其表达的下调与不同种类癌症的浸润能力相关<sup>[15]</sup>, 而功能的丢失与体内癌细胞的浸润、转移和去分化有关<sup>[16]</sup>。为探讨 CNE2-LMP1 细胞的形态变化是否与 E-Cadherin 的表达相关, 本研究采用 West-

ern 印迹检测发现 CNE2 和对照组 CNE2-LNSX 细胞均高水平表达 E-Cadherin, 而 CNE2-LMP1 细胞中的表达几乎被完全抑制 (图 4), 结合 CNE2-LMP1 细胞形态学的改变 (可能代表一种间质移位) 提示 *LMP1* 可能通过下调 E-Cadherin 的表达在 EB 病毒相关的 NPC 的浸润和转移中起重要作用。

调节 E-Cadherin 表达的反式活化通路受阻<sup>[17]</sup> 是 E-Cadherin 基因在人类癌细胞中转录水平灭活方式之一。为阐述 *LMP1* 下调 CNE2 细胞中 E-Cadherin 表达的信号过程, 本研究采用启动子报告基因实验探讨 E-Cadherin 基因启动子转录活性。当 *LMP1* 在 CNE2 细胞中表达时, 启动子的这种转录活性被有效抑制 (图 5)。上述结果表明: E-Cadherin 启动子的转录抑制是 *LMP1* 中介的 E-Cadherin 下调的主要机制之一。

*LMP1* 作为 EB 病毒公认的唯一致瘤蛋白, 参与介导多条信号通路的活化, 其中 TRADD 结合区起十分重要的作用, 如野生型 *LMP1* 活化 NF- $\kappa$ B 的 75%<sup>[18]</sup>。 *LMP1*<sup>TRADD</sup> 突变体对 NF- $\kappa$ B 的调节作用降低 80%, 对 AP-1 的作用则几乎完全丧失<sup>[7]</sup>。 *LMP1*<sup>TRADD</sup> 突变体既不影响 CNE2 细胞的形态 (图 1C), 又不影响 E-cadherin 的转录表达 (图 4), 且细胞的运动迁移率较野生型 *LMP1* 明显降低 (图 3), 提示 TRADD 结合位点是 *LMP1* 导致 CNE2 细胞迁移表型改变和 E-cadherin 表达抑制的功能区域。 *LMP1* 作为一种膜蛋白, 似乎不能与 E-Cadherin 启动子直接结合, 那么 *LMP1* 怎样实现对该启动子的抑制呢? 这是令人感兴趣的问题。 E-Cadherin 启动子在上皮特异组织中具有正调节作用的 3 个顺式作用元件 (E-pal, ccaat-box 和 cc-富含区)

已被识别<sup>[19]</sup>,体内印迹分析揭示这些调节元件在 E-Cadherin 表达的细胞系中能被特异性结合并被转录因子保护<sup>[20]</sup>,其中包含 2 个 AP-1 结合位点的 GC-富含区,能以一种在 E-Cadherin 表达调节中重要的串联排列方式结合 AP-1 或 AP-1 相关因子<sup>[21]</sup>,因此 LMP1 行使功能的可能机制是干扰转录因子与 E-Cadherin 启动子的结合。

#### 参考文献:

- [1] Curran JA, Lavery FS, Campbell D, et al. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein-1 induces epithelial cell proliferation and sensitizes transgenic mice to chemical carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(18):6730-6738.
- [2] Li HP, Chang YS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions[J]. *J Biomed Sci*, 2003, 10(5):490-504.
- [3] Murono S, Yoshizaki T, Sato H, et al. Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(8):2555-2561.
- [4] Nawrocki-Raby B, Gilles C, Birembaut P, et al. E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells[J]. *Am J of Pathol*, 2003, 163(2):653-661.
- [5] Oesterreich S, Deng W, Jiang S. Estrogen-mediated down-regulation of E-Cadherin in breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17):5203-5208.
- [6] Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells[J]. *J Cell Biol*, 1991, 113(1):173-185.
- [7] 贺智敏, 陈主初. EB 病毒潜伏性膜蛋白 CTAR-2 突变体的构建及功能分析[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(3):261-265.
- [8] Lu J, Chua HH, Chen SY, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Epstein-Barr virus proteins 1[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(1):256-262.
- [9] He ZM, Xin BZ, Cao L. Nuclear factor- $\kappa$ B activation is involved in LMP1-mediated transformation and tumorigenesis of rat-1 fibroblasts 1[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7):1845-1848.
- [10] Fahraeus R, Rymo L, Rhim JS, et al. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus[J]. *Nature*, 1990, 345(6274):447-449.
- [11] Hu LF, Chen F, Zheng X, et al. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1[J]. *Oncogene*, 1993, 8(6):1575-1583.
- [12] Dawson CW, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation[J]. *Nature*, 1990, 344(6268):777-780.
- [13] Kim KR, Yoshizaki T, Miyamori H, et al. Transformation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induces expression of Ets1 and invasive growth[J]. *Oncogene*, 2000, 19(14):1764-1771.
- [14] Vleminckx K, Vakaet L, Mareel JM, et al. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role[J]. *Cell*, 1991, 66(1):107-119.
- [15] Mareel M, Bracke M, Roy F. Cancer metastasis: negative regulation by an invasion-suppressor complex[J]. *Cancer Detect Prev*, 1995, 19(5):451-464.
- [16] Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma[J]. *Nature*, 1998, 392(6672):190-193.
- [17] Ji X, Woodard AS, Rimm DL, et al. Transcriptional defects underlie loss of E-cadherin expression in breast cancer[J]. *Cell Growth Differ*, 1997, 8(7):773-778.
- [18] Izumi KM, Kieff ED. 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- $\kappa$ B[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(23):12592-12597.
- [19] Behrens J, Lowrick O, Klein-Hitpass L, et al. The E-cadherin promoter: functional analysis of a G. C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88(24):11495-11499.
- [20] Hennig G, Behrens J, Truss M, et al. Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo[J]. *Oncogene*, 1995, 11(3):475-484.
- [21] Hennig G, Lowrick O, Birchmeier W, et al. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(1):595-602.

(本文编辑 郭征)