

鼻咽癌细胞 LMP1 的表达与其对 TRAIL 敏感性的关系

王 林,李仕晟,杨新明,尹丹辉,杨 涛,杨 咪,王 爽,刘家佳
(中南大学湘雅二医院 耳鼻咽喉头颈外科,湖南 长沙 410011)

摘 要: **目的** 探讨鼻咽癌(NPC)细胞 EBV 膜潜伏蛋白 1(latent membrane protein 1,LMP1)表达与其对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)敏感性的关系。**方法** 运用 RT-PCR、Western blot 分别检测 3 种不同的鼻咽癌细胞中 LMP1mRNA 和蛋白的表达情况,并运用 MTT 比色法、流式细胞术检测这 3 种细胞对 TRAIL 凋亡诱导作用的敏感性。**结果** C666-1 中 LMP1 mRNA 及蛋白表达最高,CNE-1 中 LMP1 mRNA 及蛋白表达最低。鼻咽癌细胞的存活率随 TRAIL 浓度提高或作用时间的延长而降低,凋亡率随 TRAIL 浓度提高或作用时间的延长而提高。CNE-1 对 TRAIL 的敏感性最高,而 C666-1 对 TRAIL 的敏感性最低。**结论** TRAIL 可以诱导鼻咽癌细胞发生凋亡;不同鼻咽癌细胞对 TRAIL 的敏感性与 LMP1 表达相关,提示 LMP1 可能是影响 TRAIL 敏感性的抗凋亡因子。

关 键 词:鼻咽癌;膜潜伏蛋白 1;TRAIL;凋亡
中图分类号:Q786;R739. 63 文献标识码:A 文章编号:1007-1520(2015)04-0275-05

Correlation of LMP1 expression with TRAIL sensibility in nasopharyngeal carcinoma cells

WANG Lin,LI Shi-sheng,YANG Xin-ming,YIN Dan-hui,YANG Tao,YANG Mi,WANG Shuang,LIU Jia-jia
(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between the expression of latent membrane protein 1 (LMP1) and the sensitivity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** RT-PCR and Western blot were used for detecting the expression of mRNA and protein of LMP1 in 3 NPC cell lines. Sensitivity of the cell lines to TRAIL was detected with MTT assay and flow cytometry. **Results** RT-PCR and Western blot showed the highest expression level of LMP1 in C666-1 and the lowest in CNE-1. The growth of the cells was inhibited following the rising of the concentration or the increasing of treatment time of the TRAIL. MTT assay and flow cytometry revealed the highest sensitivity to TRAIL in CNE-1 and the lowest in C666-1. **Conclusions** TRAIL can induce apoptosis of NPC cell lines. The sensitivity to TRAIL in NPC cell lines maybe negatively correlated with LMP1 expression, which indicates that LMP1 may be an anti-apoptosis factor via influencing sensitivity to TRAIL.

Key words: Nasopharyngeal neoplasm; Latent membrane protein 1; TNF-related apoptosis-inducing ligand; Apoptosis

鼻咽癌(NPC)为我国最常见的头颈恶性肿瘤,放射治疗是鼻咽癌首选的治疗手段。单独放疗对鼻咽癌的治疗效果仍较局限^[1]。因此,探索一种新的凋亡诱导治疗策略以协助提高鼻咽癌的放射治疗效果是临床上值得研究的重要课题。EB 病毒(epstein-barr virus,EBV)在鼻咽癌等多种恶性肿瘤的发病机制中发挥着重要的作用^[2]。LMP1 被公认为是 EBV 基因中最重要的癌基因^[3],对鼻咽癌的发生发展起调控作用,可能成为鼻咽癌治疗的靶点之一^[4]。目前有关凋亡疗法的重要进展之一就是肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的发现。TRAIL 能特异性地诱导恶性肿瘤细胞凋亡,而对正常组织细胞无明显毒性作用,因而在肿瘤研究中备受关注^[5-6]。

为了验证 LMP1 在鼻咽癌细胞株中的表达与对 TRAIL 敏感性的关系,我们运用 RT-PCR、Western

基金项目:国家自然科学基金(81402502)。
作者简介:王 林,男,硕士,住院医师。
通信作者:李仕晟,Email:lissdoctor@sina. com.

blot 检测对比3种不同的鼻咽癌细胞中 LMP1 mRNA 和蛋白的表达情况,并运用 MTT、流式细胞术检测这3种细胞对 TRAIL 凋亡诱导作用的敏感性。

1 材料与方法

1.1 材料

TRAIL 购自美国 Calbiochem 公司;1 640 含双抗(青霉素、链霉素)细胞培养基购自美国 Gibco 公司;胰酶细胞消化液(含 EDTA)、无噬菌体、低内毒素特级胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、胰酶细胞消化液(含 EDTA)、四甲基氮唑盐、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、Trizol(总 RNA 抽提试剂)、 $2 \times$ Tap PCR MasterMix 试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;LMP1 兔抗人多克隆抗体购自美国 Santa cruz 公司;BeyoRT cDNA 第一链合成试剂盒(RNase H-)购自美国 Invitrogen 生命技术有限公司; β -actin 大鼠抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

本研究选用 EBV 恒定表达的鼻咽癌细胞株 C666-1 购于上海细胞实验库;高分化鼻咽癌细胞株 CNE-1,低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2 取自湘雅二医院耳鼻咽喉科冻存细胞;CNE-1, CNE-2 为 EB 病毒阴性细胞。

1.2.1 细胞培养 鼻咽癌细胞株复苏后,培养于含 10% 胎牛血清完全培养基中,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱内培养,隔天换液。每 3~4 d 细胞对数生长期见融合度达 70% 左右时,传代 1 次。

1.2.2 MTT 比色法 【3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, MTT】取对数生长期的细胞以 5 000 个细胞/孔($100 \mu\text{L}$ /孔)种入 96 孔板,每孔设 3 个复孔。细胞贴壁后按照 0、20、40、60、100/ml 的 TRAIL 分别加入孵育 24 h 或加入 100 ng/ml 的 TRAIL 分别培养 2、4、6、12、18、24 h 后,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ 5 mg/ml MTT 溶液,继续培养 4 h,弃孔内培养液。每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,检测光波长 490 nm 各孔的吸光值。各组细胞存活率(%) = 实验组吸光度/对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞术 取对数生长期的细胞,制成细胞悬液以 2×10^5 个/孔加入 6 孔板,培养过夜细胞

贴壁后按照 0、20、40、60、100 ng/ml 的 TRAIL 分别加入孵育 24 h 后,收集细胞,500~1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。3 ml PBS 重悬 5 min,调整细胞浓度为 10^6 个/L。400 目的筛网过滤 1 次,500~1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS。加入 $195 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC,轻轻混匀。室温($20 \sim 25^{\circ}\text{C}$)避光孵育 10 min。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 $190 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 $10 \mu\text{L}$ 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。1 ml PI 孵育, 4°C 避光 30 min。流式细胞仪分析采用 Nidletri 法,汞激光激发波长为 488 nm,分析软件为 Cellquest 和 mcafit LT for machitash V1.01。

1.2.4 RT-PCR 检测基因 mRNA 的表达

1.2.4.1 提取总 RNA 和逆转录反应 Trizol 法提取总 RNA,按照 BeyoRT cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行 RNA 反转录反应,得到 cDNA, -20°C 保存备用。

1.2.4.2 引物设计的合成 LMP1 引物, Left primer: 5'-GGACAGGCATTGTACCTTGG-3', Right primer: 5'-GTCCTTGCGGAAGTCAATGT-3', 产物长度 527 bp;内参照 β -actin 引物, Left primer: 5'-GTACCTGAACCCGTGTTGCT-3', Right primer: 5'-GTCCTTGCGGAAGTCAATGT-3', 产物长度 486 bp。以上引物均按 $100 \mu\text{M}$ 浓度稀释备用。按碧云天公司 $2 \times$ PCR MasterMix 试剂盒说明书,建立 $20 \mu\text{L}$ 反应体系如下:双蒸水 $6.4 \mu\text{L}$ 、cDNA $2 \mu\text{L}$ 、引物混合液 $1.6 \mu\text{L}$ 、 $2 \times$ PCR Master Mix $10 \mu\text{L}$ 。进行 PCR 反应,取 $8 \mu\text{L}$ PCR 产物进行电泳。采用 Quantity One 凝胶成像分析系统对条带进行半定量灰度分析。实验重复 3 次,结果取平均灰度值。

1.2.5 Western blot 裂解细胞提取蛋白,测定蛋白浓度并取 $50 \mu\text{g}$ 的蛋白,10% 不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,60 V 恒压电流下转移 2 h 至 PVDF 膜。膜在室温下摇动封闭 1 h。将一抗用含 5% 脱脂奶粉稀释至适当浓度($1:1\,000 \sim 1:5\,000$)。膜于一抗中室温孵育 2 h 后回收一抗,在室温下漂洗。将辣根过氧化物酶标记的二抗稀释至 $1:1\,000$,膜于二抗中室温下孵育 2 h,室温下漂洗。ECL 显色,暗室曝光显影。蛋白的相对表达量取目的蛋白与 β -actin 的灰度比。

1.3 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多样本均数的方差检验(ANOVA)进

行分析。所有检验均为双侧检验,显著性检验水平 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同鼻咽癌细胞株中 LMP1 表达水平

提取 3 种鼻咽癌细胞株的 mRNA 进行 RT-PCR 扩增后检测,结果显示:C666-1 中 LMP1 mRNA 表达

最高,CNE-1 中 LMP1 mRNA 表达最低。将图片结果输入电脑,采用 Quantity One 软件进行分析 LMP1mRNA 相对表达量,结果见图 1。提取 3 种鼻咽癌细胞株的蛋白进行 Western blot 检测,结果显示:C666-1 中 LMP1 蛋白表达最高,CNE-1 中 LMP1 蛋白表达最低。将图片结果输入电脑,采用 Band-Scan 软件进行分析 LMP1mRNA 相对表达量,结果见图 2。

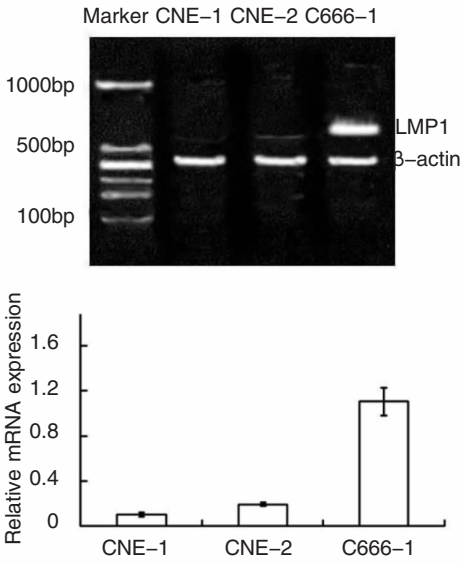


图 1 RT-PCR 检测 3 种鼻咽癌细胞株中 LMP1 mRNA 的表达

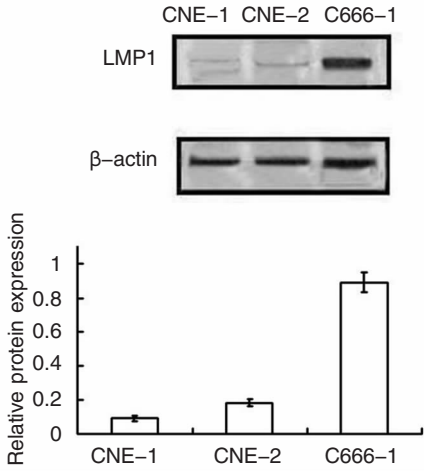


图 2 Western blot 检测 3 种鼻咽癌细胞中 LMP1 蛋白表达

2.2 TRAIL 对不同 NPC 细胞的生长抑制效果

TRAIL 处理的鼻咽癌细胞株 C666-1、CNE-1、CNE-2 与药物浓度相关。随 TRAIL 浓度提高,细胞存活率有下降趋势,且 CNE-1 存活率随 TRAIL 浓度提高而下降的趋势最为明显,而 C666-1 细胞存活率

随 TRAIL 浓度提高而下降的趋势不明显,结果见图 3。随 TRAIL 作用时间延长,细胞存活率有下降趋势,且 CNE-1 存活率随 TRAIL 作用时间延长而下降的趋势最为明显,而 C666-1 细胞存活率随 TRAIL 作用时间延长而下降的趋势不明显,结果见图 4。

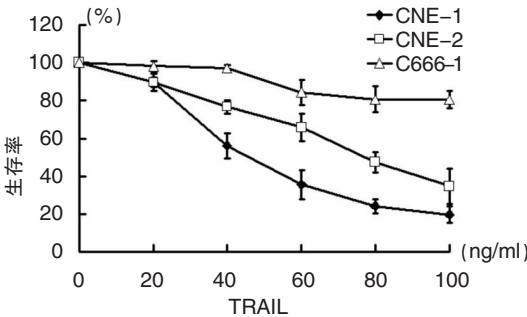


图 3 MTT 法检测不同浓度 TRAIL 干预 3 种鼻咽癌细胞的生长曲线

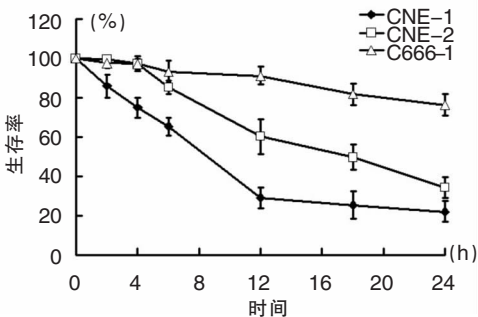


图 4 MTT 法检测不同时间 TRAIL 干预 3 种鼻咽癌

2.3 TRAIL 对不同 NPC 细胞的调控诱导效果

TRAIL 处理的鼻咽癌细胞株 C666-1、CNE-1、

CNE-2 凋亡率随药物浓度增加而提高。当 TRAIL 浓度为 40,60,80,100ng/ml 时,CNE-1 细胞凋亡率

最高,而 C666-1 细胞凋亡率最低,结果见图 5。图 6 显示 TRAIL 不同干预时间对鼻咽癌细胞的凋亡诱导作用。3 种鼻咽癌细胞凋亡率随 TRAIL 作用时间

的延长而提高,且 CNE-1 细胞凋亡率最高,而 C666-1 细胞凋亡率最低。

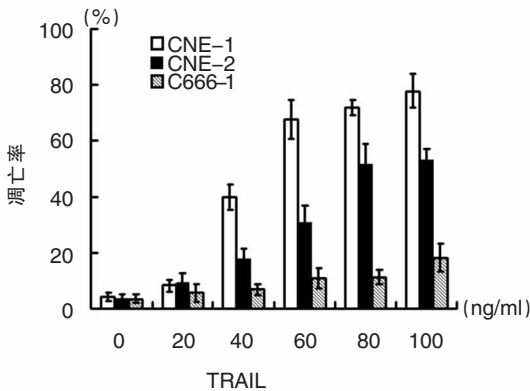


图 5 不同浓度 TRAIL 干预 3 种鼻咽癌细胞的凋亡率

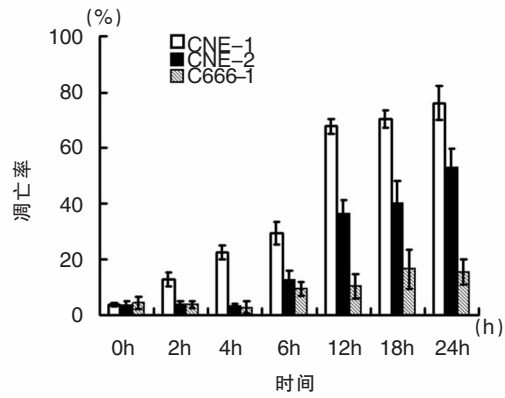


图 6 不同时间 TRAIL 干预 3 种鼻咽癌细胞的凋亡率

3 讨论

鼻咽癌(NPC)是我国南方省份最常见的头颈部恶性肿瘤,流行病学调查发现鼻咽癌在中国年发病率为 10~25/10 万^[1]。放射治疗被公认为鼻咽癌首选治疗方法。文献报道早期鼻咽癌患者放疗后 5 年生存率为 60%~70%,晚期患者为 30%~40%,其放疗失败主要原因是部分患者对放射治疗不敏感,病灶残留,导致放疗后复发^[1]。在放射肿瘤学领域,凋亡是一种重要的放射敏感性指标,细胞对放射的敏感性与对凋亡的反应程度一致。因此,探索一种新的凋亡诱导治疗策略以协助提高鼻咽癌的放射治疗效果是临床上值得研究的重要课题。

随着肿瘤分子靶向治疗的发展,凋亡诱导疗法已经成为肿瘤治疗新的研究方向。目前有关凋亡疗法的重要进展之一就是 TRAIL 的发现。TRAIL 对应受体分为两类:功能性受体死亡受体 4 (death receptor 4, DR4)、死亡受体 5 (DR5);无功能受体锚点受体 1 (Decoy Receptor1, DcR1)、锚点受体 2 (DcR2)、骨组织保护因子 (osteoprotegerin, OPG)。大量的研究发现 DR4, DR5 在多种肿瘤组织中的表达均高于正常组织,而 TRAIL 主要是通过特异性结合肿瘤细胞中的 DR4、DR5 来发挥其肿瘤细胞凋亡诱导作用的^[7]。TRAIL 受体的特性决定 TRAIL 能特异性地诱导恶性肿瘤细胞凋亡,而对正常组织细胞无明显毒性作用,因而 TRAIL 在肿瘤研究中备受关注。有研究发现 DR4、DR5 在鼻咽癌组织中表达

增高,而在周边正常组织中呈阴性表达,提示凋亡特异性诱导剂 TRAIL 有望运用于鼻咽癌的治疗。Chen 等^[8]通过体外实验发现 TRAIL 能有效的诱导鼻咽癌细胞株发生凋亡。本实验通过 MTT 和流式细胞术发现 TRAIL 能浓度依赖性、时间依赖性地抑制鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、C666-1 生长,并诱导其凋亡,为鼻咽癌的治疗提供实验基础。

虽然 TRAIL 在肿瘤凋亡诱导疗法方面具有其明显的优势,但近来有研究表明,某些肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡缺乏敏感性即存在 TRAIL 抵抗,并且其调控机制不明^[6]。同时有研究发现某些化疗药物、RNA 合成抑制剂或蛋白质合成抑制剂和 TRAIL 联合使用可以阻止肿瘤细胞发生 TRAIL 抵抗^[9]。因此,寻找影响 TRAIL 敏感性的抗凋亡因子并制定相应的靶向治疗方案是目前 TRAIL 研究的热点。有研究发现不同的鼻咽癌细胞对 TRAIL 的敏感性不同,甚至有某些鼻咽癌细胞存在 TRAIL 抵抗^[10]。在本课题中我们检测了 3 种鼻咽癌细胞对 TRAIL 的敏感性。首先用 MTT 法检测不同浓度及 TRAIL 不同干预时间对鼻咽癌细胞的生长抑制。结果表明,CNE-1 细胞对 TRAIL 最敏感,而 C666-1 细胞对 TRAIL 存在明显抵抗。为了进一步验证这种细胞生长抑制作用是否通过抑制 TRAIL 诱导的细胞凋亡引起的,笔者对细胞进行了 Annexin V/FITC 孵育标记流式细胞术检测,发现 CNE-1 细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡最为敏感,而 C666-1 细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感性最低。

EB 病毒 (epstein-barr virus, EBV) 在包括鼻咽

癌、胃癌、霍奇金淋巴瘤等多种恶性肿瘤的发病机制中发挥着重要的作用^[2]。LMP1 可以诱导啮齿类动物淋巴细胞和上皮细胞发生表型改变,因此被公认为 EBV 基因中最重要的癌基因^[3]。LMP1 在鼻咽癌组织中表达增高,并与鼻咽癌患者的预后相关性^[4],而 LMP1 对鼻咽癌细胞凋亡的调控作用却存在争议。2006 年, Snow 等^[11]实验发现 EBV 阳性的淋巴细胞对 TRAIL 的敏感性明显低于 EBV 阴性的淋巴细胞,提示 EBV 感染是影响细胞对 TRAIL 敏感性的重要因素。LMP1 做为 EBV 中重要的癌基因,可能抑制 TRAIL 的凋亡诱导作用,但目前无明确证据证明 LMP1 能够导致鼻咽癌细胞的 TRAIL 抵抗。为了验证鼻咽癌细胞中 LMP1 的表达与 TRAIL 敏感性的关系,实验通过 RT-PCR, Western blot 检测 3 种不同鼻咽癌细胞株中 LMP1 的表达。结果显示 LMP1 高表达的细胞株 C666-1 对 TRAIL 存在抵抗,而 LMP-1 阴性表达的 CNE-1、CNE-2 对 TRAIL 敏感。该结果可推测,不同鼻咽癌细胞对 TRAIL 的敏感性与 LMP1 表达存在负相关, LMP1 表达高,则对 TRAIL 的敏感性变低,而 CNE-1 与 CNE-2 对 TRAIL 的敏感性之间存在明显区别,并且均为 LMP-1 阴性表达。说明 LMP1 并不是唯一影响 TRAIL 敏感性因素^[10,12]。

综上所述, TRAIL 可以诱导鼻咽癌细胞发生凋亡,不同鼻咽癌细胞对 TRAIL 的敏感性与 LMP1 的表达存在负相关, LMP1 表达越高,对 TRAIL 的敏感性就越低。提示 LMP1 可能是影响 TRAIL 敏感性的抗凋亡因子;筛选出 LMP1 低表达的 TRAIL 敏感性,鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 LMP1 高表达的 TRAIL 抵抗性细胞株 C666-1 进行后续实验。

参考文献:

- [1] Lin JC, Jan JS, Hsu CY, Liang WM, Jiang RS, Wang WY. Phase III study of concurrent chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for advanced nasopharyngeal carcinoma: positive effect on overall and progression-free survival. *J Clin Oncol*, 2003, 21(4): 631 - 637.
- [2] Zhao Y, Yang LF, Ye M, Gu HH, Cao Y. Induction of apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via mitochondrial signal transduction pathway. *Preventive Medicine*, 2004, 39(6): 1172 - 1179.
- [3] Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 1985, 43(12): 831 - 840.
- [4] Shao JY, Ernberg I, Biberfeld P, Heiden T, Zeng YX, Hu LF. Epstein-Barr virus LMP1 status in relation to apoptosis, p53 expression and leucocyte infiltration in nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer research*, 2004, 24(4): 2309 - 2318.
- [5] Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, Burke JM, Sorger PK. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*, 2009, 459(7245): 428 - 432.
- [6] Ivanov VN, Bhoomik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene*, 2003, 22, (20): 3152 - 3161.
- [7] Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBOJ*, 1997, 16(17): 5386 - 5397.
- [8] Chen LC, Chung IC, Hsueh C, Tsang NM, Chi LM, Liang Y, Chen CC, Wang LJ, Chang YS. The antiapoptotic protein, FLIP, is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and correlates with poor overall survival of nasopharyngeal carcinoma patients. *Cell Death and Differentiation*, 2010, 17(9): 1463 - 1473.
- [9] Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, Asim M, Hafeez BB, Sarfaraz S, Mukhtar H. Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene*, 2008, 27(14): 2055 - 2063.
- [10] Li SS, Tang QL, Wang SH, Wang S, Yang XM. Simultaneously targeting bcl-2 and Akt pathways sensitizes nasopharyngeal carcinoma to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012, 27(1): 88 - 95.
- [11] Snow AL, Vaysberg M, Krams SM, Martinez OM. EBV + B Lymphoma Cell Lines from Patients with Post-Transplant Lymphoproliferative Disease Are Resistant to TRAIL-Induced Apoptosis. *American Journal of Transplantation*, 2006, 6(5): 976 - 985.
- [12] Li SS, Yang S, Wang S, Yang XM, Tang QL, Wang SH. Latent membrane protein 1 mediates the resistance of nasopharyngeal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncology Reports*, 2011, 26(6): 1573 - 1579.

(修回日期: 2015 - 06 - 17)