DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201803006

· 鼻咽癌专栏 ·

LMP1 诱导鼻咽癌细胞发生 TRAIL 抵抗的体外实验

李京鲲,尹丹辉,王　爽,李　平,杨新明,李仕晟

(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 EBV 膜潜伏蛋白 1(latent membrane protein 1,LMP1)基因过表达后对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand,TRAIL)凋亡诱导作用和凋亡信号传导的影响。**方法**　利用脂质体介导的 pGL6-LMP1 上调 LMP1 低表达的 TRAIL 抵抗性鼻咽癌细胞 CNE-1 中 LMP1 的表达;通过 MTT 比色法、流式细胞术观察 LMP1 过表达后对 CNE-1 细胞 TRAIL 敏感性的影响;流式细胞术、Western blot、线粒体膜电位检测观察 LMP1 过表达后对死亡受体表达、细胞内外凋亡信号通路激活、线粒体膜电位改变的影响。**结果**　死亡受体荧光标记后流式细胞术检测发现 CNE-1 和 CNE-1-LMP1 之间细胞膜蛋白死亡受体 4(death receptor 4,DR4),死亡受体 5(death receptor,DR5)表达差异无统计学意义($P>0.05$)。Western blot 结果显示 TRAIL(100 ng/ml)分别作用 2、4、6、12 h 后,CNE-1 细胞中 caspase-8 p43/p41,p18 亚单位蛋白和 caspase-3 p17,p10 亚单位蛋白表达明显高于 CNE-1-LMP1 细胞,而 Bcl-2 相互作用域死亡激动蛋白的截短形式(truncated form of Bid,tBid)和 caspase-9 p35 亚单位蛋白表达无明显改变,且两个细胞株间也无明显区别。JC-1 线粒体膜电位检测法结果显示 TRAIL 干预后,线粒体膜电位无明显改变,且两个细胞株间也无明显区别。**结论**　LMP1 过表达抑制 TRAIL 对鼻咽癌细胞的凋亡诱导作用和其细胞外凋亡信号的传导,提示 LMP1 是通过抑制细胞外信号通路激活诱导鼻咽癌细胞发生 TRAIL 抵抗。

关　键　词:LMP1 基因;TRAIL;凋亡;抵抗

中图分类号:R739.63　　**文献标识码:**A　　[中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017,23(3):219 – 225]

In vitro study of LMP1-induced TRAIL resistance in nasopharyngeal carcinoma cells

LI Jing-kun, YIN Dan-hui, WANG Shuang, LI Ping, YANG Xin-ming, LI Shi-sheng

(*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha* 410011, *China*)

Abstract:　Objective　To observe the effect of latent membrane protein 1 (LMP1) over-expression on TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)-induced apoptosis and TRAIL-activated apoptotic pathway. **Methods**　LMP1 expression in CNE-1 which was TRAIL-resistant LMP1 low expressive nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell was up-regulated by liposome mediated pGL6-LMP1. The TRAIL sensitivities of CNE-1-LMP1 and CNE-1 were measured by MTT and flow cytometry. The expression of death receptor (DR), activation of apoptotic pathway and mitochondrial transmembrane potential were detected by flow cytometry, Western blot and JC-1 assessment, respectively. **Results**　Flow cytometry showed no significant differences in expressions of DR4 and DR5 between CNE-1 and CNE-1-LMP1 cell lines (all $P>0.05$). Moreover, after TRAIL (100 ng/ml) administration for 2, 4, 6, 12 hours, the expressions of caspase-8 p43/p41, tathmin/oncoprotein 18p18 and caspase-3 p17, p10 in CNE-1 were higher than those in CNE-1-LMP1. However, there were no significant differences in expressions of tBid and caspase-9 p35 between this two cell lines. JC-1 assessment showed that TRAIL administration could not affect the mitochondrial transmembrane potential and there was no significant difference in mitochondrial transmembrane potential between CNE-1 and CNE-1-LMP1. **Conclusion**　LMP1 over-expression can inhibit apoptosis and extracellular apoptotic pathway, which indicates LMP1 may induce TRAIL-resistance in NPC cell through inhibiting extracellular apoptotic pathway.

Key words:LMP1 gene; TRAIL; Apoptosis; Resistance

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery,2017,23(3):219 – 225]

鼻咽癌是我国最常见的头颈恶性肿瘤之一,其首选的治疗手段为放疗。但是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

基金项目:国家自然科学基金(81402502)。
作者简介:李京鲲,男,在读博士研究生。
通信作者:李仕晟,Email:lissdoctor@csu.edu.cn

床上值得研究的重要课题. 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 apop-tosis-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[2-3]。

TRAIL的凋亡信号需要通过多个因子环节传导,各个环节均可以影响肿瘤细胞对其的敏感性。TRAIL主要通过与DR-4、DR-5结合传导凋亡信号。凋亡通过两条信号通路传导凋亡信号:①细胞外凋亡信号通路(cell-extrinsic apoptosis pathway),又称线粒体非依赖性通道:该通道由caspase-8得到启动后直接活化下游的caspase-3,导致细胞凋亡[4];②细胞内凋亡信号通路(cell-intrinsic apoptosis pathway),又称线粒体依赖性通道,即活化的caspase-8启动促凋亡成员Bid,引起线粒体跨膜电位降低或破坏,促使caspase-9活化分解,启动caspase-3导致凋亡[5]。

我们前期的研究结果显示不同鼻咽癌细胞中EBV膜潜伏蛋白1(latent membrane protein1,LMP1)表达和TRAIL敏感性呈负相关,提示LMP1可能抑制TRAIL的凋亡诱导作用[6]。因此,在这个实验中我们以LMP1低表达的TRAIL敏感性鼻咽癌细胞株CNE-1为研究对象,构建其LMP1稳定表达的细胞株,观察上调鼻咽癌细胞中LMP1是否能抑制TRAIL的凋亡诱导作用,以及对TRAIL凋亡信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

TRAIL购自美国Calbiochem公司;1640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;二甲基亚枫(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×Tap PCRMasterMix试剂盒、Western及IP细胞裂解液、质粒转换抽提转染相关试剂及耗材购自上海碧云天生物技术有限公司;pGL6-LMP1氨苄抗性质粒由上海吉凯基因化学技术有限公司;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、caspase-3、caspase-8、caspase-9大鼠人多克隆抗体均购自美国Santa cruz公司;Bid,tBid兔多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。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

1.2.1 细胞培养 本研究选用的鼻咽癌细胞株CNE-1取自本课题组前期实验筛选出的LMP1低表达的TRAIL敏感性细胞株。鼻咽癌细胞株复苏后,培养于含10%胎牛血清的1640培养基中,置于37℃,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 质粒转化抽提及细胞转染

1.2.2.1 质粒转化 pGL6-LMP1氨苄抗性质粒由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。新鲜感受态DH5a甘油菌200 μl置于1.5 ml离心管中,每管中分别加入pGL6-LMP1和pGL6质粒100 ng,混匀后冰浴30 min,42℃热休克90 s,冷却20 min。每管加LB培养基800 μl,37℃摇床温和摇动45 min,将菌液平铺于含氨苄青霉素的琼脂平板表面,37℃平放20 min后倒置培养10 h。观察菌落克隆形成。

1.2.2.2 质粒提取 挑取菌落克隆,加入3 ml氨苄青霉素抗性的LB培养基中,37℃摇菌过夜,次日收集细菌沉淀。按照质粒中量抽提试剂盒说明书提取质粒。测定浓度和纯度,-20℃保存。

1.2.2.3 细胞转染、稳定细胞株的筛选 将CNE-1细胞悬液接种于24孔板中,调整细胞数量为1×10^5个/孔,使细胞汇合度达到90%~95%。用50 μl的1640分别稀释0.8 μg质粒和2 μl Lipofectamine2000,混匀后室温孵育5 min,将Lipofectamine2000稀释液加入已稀释的质粒中,使混合液终体积为100 μl,室温孵育20 min,将100 μl的混合液加入24孔板孔中,37℃孵育48 h后加入含G418(浓度为800 μg/ml)的培养液进行筛选。3周后待抗性单克隆形成后,挑取单克隆,扩大培养。以pGL6(Mock)质粒为转染对照。

1.2.2.4 细胞毒性指数的测定(MTT法) 取对数生长期的细胞,制成细胞悬液以5 000个细胞/孔(100 μl/孔)加入96孔板,每孔设3个复孔。置于培养箱培养。培养过夜细胞贴壁后按照0、20、40、60、80、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,每孔加入20 μl MTT溶液(5 mg/ml),孵育4 h,每孔加入150 μl DMSO,置于摇床上低速振荡10 min。490 nm处测量各孔的吸光值。各组细胞存活率

(%)=实验组吸光度/对照组吸光度×100%。

1.2.2.5　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,置于培养箱培养。培养过夜细胞贴壁后按照 0、20、40、60、80、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,收集各组细胞,500 ~ 1000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。3 ml PBS 洗 3 次,离心去 PBS,加入冰预冷的 70% 的乙醇 4℃ 固定 24 h 以上。离心弃去固定液,3 ml PBS重悬5 min,调整细胞浓度为10^6 个/ml。400 目的筛网过滤 1 次,500 ~ 1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS。

①细胞膜 DR4、DR5 表达检测:加入 5 μl DR4、DR5 一抗冰上孵育 1 h,3 ml PBS 洗 3 次,离心去 PBS,加入 5 μl 对应的 FITC 耦合的二抗冰上避光孵育 1 h。PBS 清洗后重悬细胞,流式细胞仪上机检测。

②凋亡率检测:加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μl Annexin V-FITC,轻轻混匀。室温(20 ~ 25℃)避光孵育 10 min。1 000 r/min离心 5 min,弃上清,加入 190 μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 10 μl 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测,Annexin V-FITC 为绿色荧光,碘化丙啶为红色荧光。流式细胞仪分析采用 Nicdletri 法,汞激光激发波长为 488 nm,分析软件为 Cellquest 和 mcafit LT for machitash V1.01。

1.2.2.6　细胞线粒体膜电位检测(JC-1 染色法)　对数生长期的细胞以 2×10^5 个/孔加入 6 孔板,置于培养箱培养 24 h。待细胞贴壁后,弃除培养液。加入新鲜培养液后按照 100 ng/ml 的 TRAIL 分别干预 2、4、6、12 h 后收集各组细胞,500 ~ 1 000 r/min 离心 5 h,弃去培养液。3 ml PBS 洗 3 次,离心去 PBS,加 PBS,调整细胞浓度为 10^6 个/ml。加入终浓度为 5 μg/ml 的 JC-1,37℃ 恒温箱避光温育10 min,用 PBS 洗涤 1 次除去游离的多余染料后,用 PBS 重悬沉淀,上流式细胞仪检测。激发波长488 nm,应用前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)设门后,通过荧光通道 FL1(绿)和 FL2(红)检测荧光强度,每份细胞悬液标本获取 10 000 个细胞。应用 CellQuest 软件获取和分析数据,用发绿色荧光细胞的百分率表示线粒体膜电位下降细胞比例。

1.2.2.7　RT-PCR　①Trizol 法提取总 RNA:取对数生长期的细胞,以冰冷 PBS 洗涤 2 次,加入 Trizol,充分吹打混匀。将裂解液吸至 1.5 ml 离心管中,加入 0.2 倍体积氯仿(200 μl/ml Trizol),充分振荡摇匀,室温下放置 5 min。4℃,12 000 r/min 离心15 min。将上清移至离心管中。加入等体积异丙醇,振荡摇匀,室温沉淀 10 min。4℃,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清。加入 75% 乙醇 1ml 洗涤沉淀,4℃,12 000 r/min 离心 5 min。室温下空气挥发残存乙醇。将总 RNA 沉淀溶于 50 μl DEPC 处理的水中,-80℃保存备用。取 1 μl 稀释 100 倍后经紫外分光光度计测定浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 的完整性。

②逆转录反应:按照 BeyoRT cDNA 第一链合成试剂盒说明书,取总 RNA 样品 1 μg,加入 1 μl OligodT,70℃变性 10 min,冰浴 1 min,然后加入 $MgCl_2$ 4 μl、10 × RNA PCR 缓冲液 2 μl、RNA 酶抑制剂 0.5 μl、dNTP 2 μl、AMV 逆转录酶 1 μl、无 RNA 酶灭菌水终体积 20 μl。将混合液于 PCR 仪上 42℃反应 60 min,然后 99℃ 5 min 灭活逆转录酶,合成 cDNA。逆转率产物 -20℃保存备用。

③半定量 PCR: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 μM 浓度稀释备用。按碧云天公司 2 × PCR MasterMix 试剂盒说明书,溶解并混匀 PCR 反应所需的各种溶液。将 2 × PCR Master Mix 置于冰浴上。建立 20 μl 反应体系如下:双蒸水6.4 μl、cDNA 2 μl、引物混合液 1.6 μl、2 × PCR Master Mix 10 μl。取 8 μl PCR 产物电泳。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。

1.2.2.8　Western blot　裂解细胞提取蛋白,测定蛋白浓度并取 50 μg 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 ~ 1∶5 000)。膜于一抗中室温孵育 2 h,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　统计学方法

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　LMP1 高表达的鼻咽癌 CNE-1 细胞株 CNE-1-LMP1 构建成功

我们以 pGL6-LMP1 质粒根据预实验所得的最适转染条件转染 CNE-1 细胞，荧光显微镜下观察细胞能获得 85% 以上的转染率，且细胞状态良好（图 1）。由于质粒载体携带了 G418 抗性基因，并用800 μg/ml的 G418 持续筛选 3 周，以获得稳定表达 LMP1 序列及空白质粒对照序列的 CNE-1 细胞株。此时，行 RT-PCR 结果显示 LMP1 mRNA 的表达效率达 200% 以上（$P < 0.05$）（图 2），Western blot 结果显示 LMP1 蛋白的上调效率亦达 150% 以上（$P < 0.05$）（图 3）。将 LMP1 基因稳定表达的 CNE-1细胞株定义为 CNE-1-LMP1，转染空白质粒对照细胞定义为 CNE-1-pGL6。

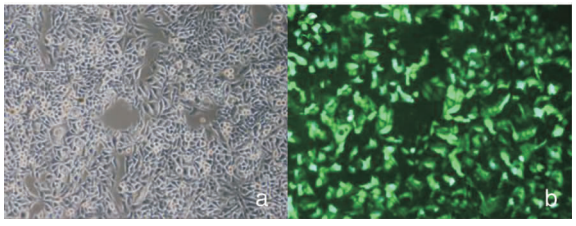

图 1　荧光显微镜下判定 pGL6-LMP1 转染 CNE-1 的转染效率　a：倒置显微镜；b：荧光显微镜　（× 20）

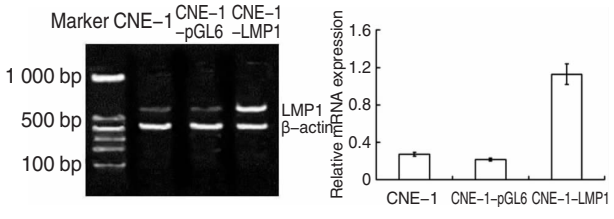

图 2　RT-PCR 判定 pGL6-LMP1 转染 CNE-1 的转染效率

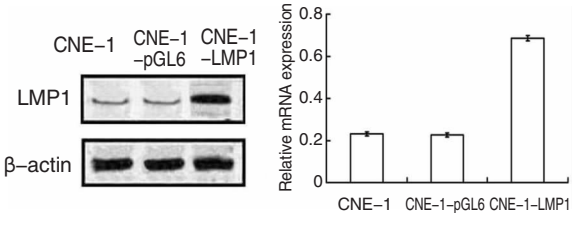

图 3　Western blot 检测 pGL6-LMP1 转染 CNE-1 的转染效率

2.2　CNE-1 和 CNE-1-LMP1 对 TRAIL 的敏感性

我们课题组的前期实验结果发现鼻咽癌细胞对 TRAIL 的敏感性可能与 LMP1 表达水平相关，因此我们构建了 LMP1 高表达细胞株 CNE-1-LMP1 及其空白质粒对照细胞 CNE-1-pGL6 进行后续试验。

2.2.1　CNE-1、CNE-1- pGL6、和 CNE-1-LMP1 对不同浓度 TRAIL 的敏感性　CNE-1、CNE-1-pGL6、存活率随 TRAIL 浓度提高而下降的趋势较 CNE-1-LMP1 明显，且当 TRAIL 浓度为 40、60、80、100 ng/ml 时，CNE-1、CNE-1-pGL6 存活率明显低于 CNE-1-LMP1（$P < 0.01$）（图 4）。TRAIL 处理后鼻咽癌细胞株与药物浓度正相关地出现凋亡率升高。当 TRAIL 浓度为 40、60、80、100 ng/ml时，CNE-1、CNE-1-pGL6 细胞凋亡率明显高于 CNE-1-LMP1（图 5）。

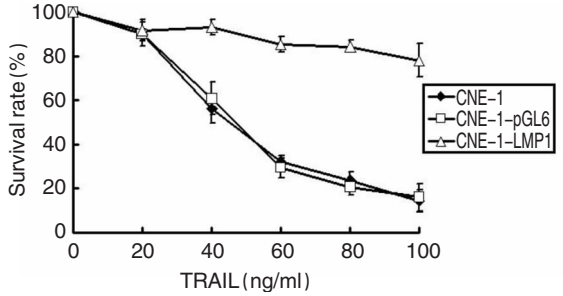

图 4　不同浓度 TRAIL 干预 CNE-1、CNE-1-pGL6、CNE-1-LMP1 的生长曲线

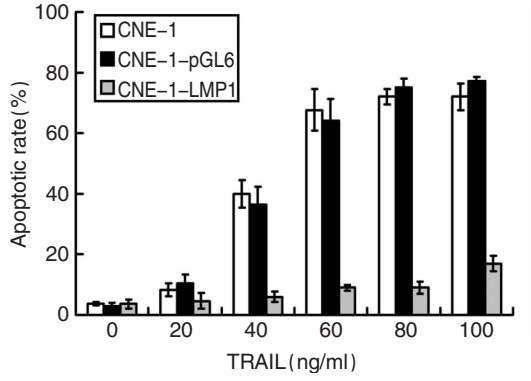

图 5　不同浓度 TRAIL 干预 CNE-1、CNE-1-pGL6、CNE-1-LMP1 的凋亡率　（$P < 0.01$）

2.2.2　CNE-1、CNE-1- pGL6、和 CNE-1-LMP1 对 TRAIL 不同作用时相的敏感性　MTT 检测相同浓度 TRAIL（100 ng/ml）分别作用 0.2、4、8、12、16、24 h 后鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-1-pGL6、CNE-1-LMP1 存活率，结果发现细胞存活率随 TRAIL 作用时间的延长而呈下降趋势。以存活率为纵坐标，以 TRAIL 终浓度为横坐标作图，各个时间点CNE-1、

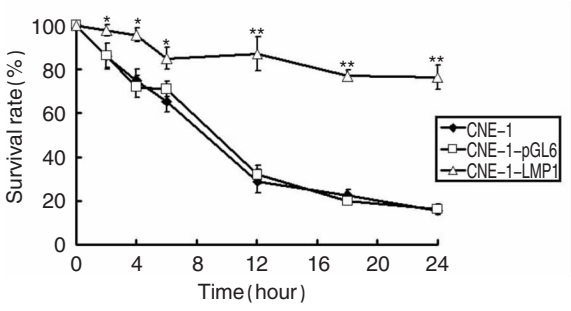

图 6　不同 TRAIL 干预时间 CNE-1、CNE-1-pGL6、CNE-1-LMP1 的生长曲线

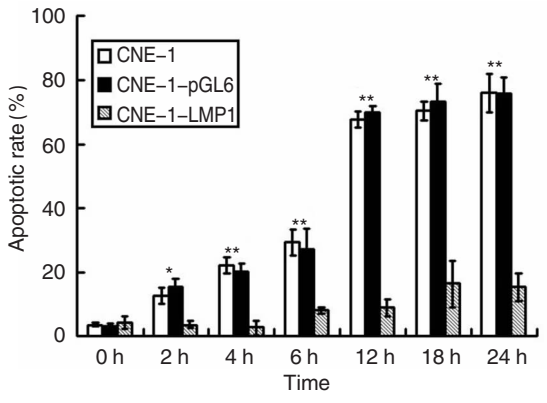

图 7　不同 TRAIL 干预时间 CNE-1、CNE-1-pGL6、CNE-1-LMP1 的凋亡率

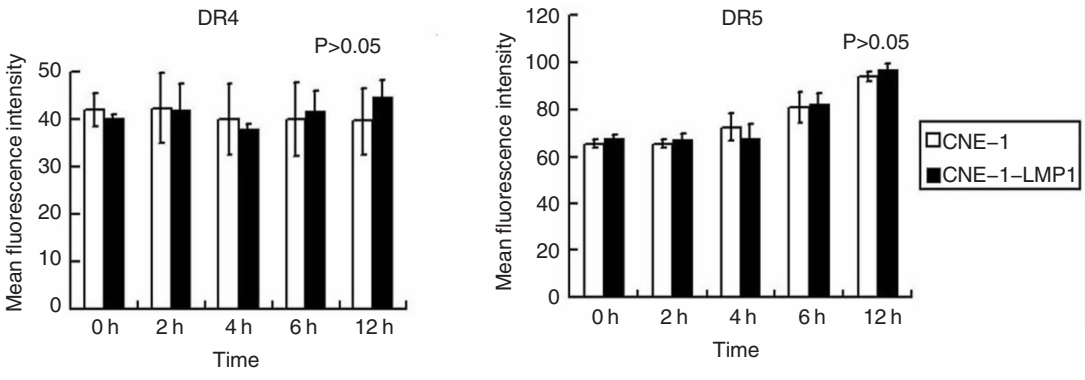

图 8　TRAIL 分别作用不同时间后 CNE-1、CNE-1-LMP1 细胞 DR4、DR5 的表达

CNE-1-pGL6 存活率均低于 CNE-1-LMP1（$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）（图 6）。TRAIL（100 ng/ml）分别作用 0.2、4、8、12、16、24 h 后，流式细胞术检测发现细胞凋亡率随 TRAIL 作用时间的延长而呈上升趋势，各个时间点 CNE-1、CNE-1-pGL6 细胞凋亡率明显高于 CNE-1-LMP1（$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）（图 7）。

2.3　LMP1 过表达对 TRAIL 特异性死亡受体的影响

流式细胞术结果发现 CNE-1 和 CNE-1-LMP1 中 DR4、DR5 的表达无明显差异。TRAIL（100 ng/ml）分别作用 0.2、4、6、12 h 后，流式细胞术检测发现 CNE-1 和 CNE-1-LMP1 中 DR4、DR5 的表达无明显改变，且两者之间差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 8。

2.4　LMP1 过表达对细胞外凋亡通路的影响

Western blot 结果显示 TRAIL（100 ng/ml）分别作用 0.2、4、6、12 h 后，CNE-1 中 caspase-8 p43/p41，p18 亚单位和 caspase-3 p17，p10 亚单位蛋白表达明显多于 CNE-1-LMP1（图 9）。

2.5　LMP1 过表达对细胞内凋亡信号通路的影响

Western blot 结果显示 TRAIL 干预后，tBid 和 caspase-9 p35 亚单位蛋白表达无明显改变，且两个细胞株间也无明显区别（图 10、11）。结果显示 TRAIL 干预后，线粒体膜电位无明显改变，且两个细胞株间也无明显区别（$P>0.05$），见图 12。

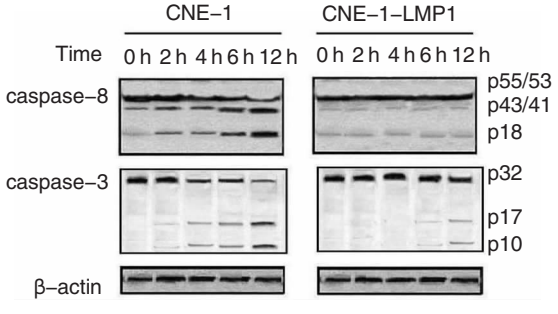

图 9　Western blot 检测 TRAIL 干预后 CNE-1、CNE-1-LMP1 细胞外凋亡信号通路标志物 caspase-8 和 caspase-3 分解活化产物

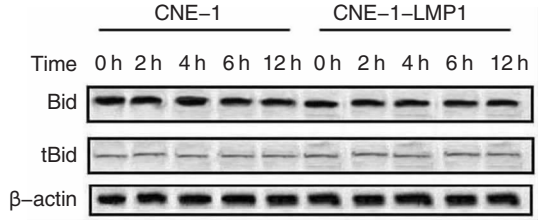

图 10　Western blot 检测 TRAIL 干预后 CNE-1、CNE-1-LMP1 细胞内凋亡信号通路标志物 Bid 分解活化产物

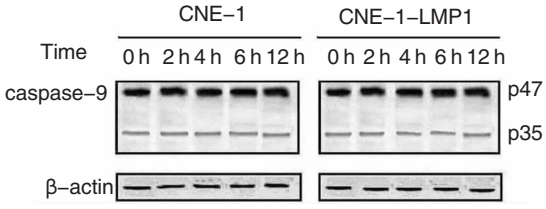

图 11　Western blot 检测 TRAIL 干预后 CNE-1、CNE-1-LMP1 细胞内凋亡信号通路标志物 caspase-9 分解活化产物

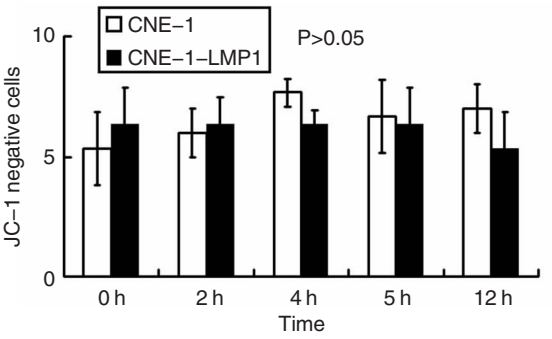

图 12　Western blot 检测 TRAIL 干预后 CNE-1、CNE-1-LMP1 细胞线粒体膜电位的改变

3　讨论

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凋亡诱导配体[7]。TRAIL 能特异性地诱导恶性肿瘤细胞发生凋亡，而对正常组织细胞无明显毒性作用[7]，因此逐渐受到肿瘤研究工作者的重视。在国外某些药理研究所，TRAIL 已经进入了临床前期研究，且对原发肿瘤的抑制效果明显[8]。虽然 TRAIL 在肿瘤凋亡诱导疗法方面具有其明显的优势，但近来许多研究表明，仍有肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡作用不敏感即发生 TRAIL 抵抗，但具体机制不明[3]。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，寻找诱导细胞发生 TRAIL 抵抗的因子并制定相应的靶向治疗方案是目前国际肿瘤界研究的热点。

LMP1 在鼻咽癌组织中表达增高，且与鼻咽癌患者预后有相关性[10]，但 LMP1 对鼻咽癌细胞凋亡的调控作用却存在争议。1996 年，Fries 等[11]在肺癌细胞株中观察到 LMP1 可以上调另一个抗凋亡基因 A20 而抑制 p53 介导的凋亡。因此 LMP1 曾一度被认为是抗凋亡基因。但 1996 年，Floettmann 等[12]的研究却提出了相反的观点，他们发现同样是在 B 细胞中，LMP1 的大量表达能使细胞阻滞于 G2/M 期，发生增殖阻滞，而抑制细胞生长。我校曹亚教授[13]在鼻咽癌细胞株中已证实 LMP1 高表达启动 NF-κB 介导半胱氨酸水解酶（caspase3）的表达，促进细胞凋亡；LMP1 低表达抑制细胞凋亡。然而曹亚教授在后期研究中又发现，LMP1 高表达的鼻咽癌细胞株对放疗、化疗药物等促凋亡治疗具有抵抗作用[14]。上述研究的结果说明了 LMP1 和细胞凋亡关系的复杂性，因此学术界达成共识：LMP1 对于细胞凋亡可能具有促进和抑制双重效应。但 LMP1 对 TRAIL 相关性凋亡的影响却无相关文献报道，因此本文我们着重研究鼻咽癌细胞中 LMP1 过表达对 TRAIL 相关性凋亡的影响。

我们前期实验提示 LMP1 可能是影响 TRAIL 敏感性的抗凋亡因子，为了进一步验证 LMP1 在 TRAIL 凋亡通路中的实际作用，我们构建了 LMP1 高表达鼻咽癌细胞株。我们将 pGL6-LMP1 转染至鼻咽癌细胞 CNE-1 中经 800 μg/ml G418 筛选 3 周后获得稳定过表达 LMP1 的细胞克隆并进行培养扩增。经半定量 RT-PCR 及 Western-blot 方法分别检测转染前后 LMP1mRNA 及蛋白表达，发现转染 pGL6-LMP1 后的 CNE-1-LMP1 细胞中 LMP1 mRNA 及蛋白表达较未转染组和转染空白载体组明显增高，证明成功构建 LMP1 高表达鼻咽癌细胞株。继而我们观察了 LMP1 转染对 CNE-1 细胞 TRAIL 的敏感性的影响，结果发现，转染 CNE-1-LMP1 细胞对 TRAIL 凋亡诱导作用的敏感性无论从剂量依赖性还是时间依赖性上均比 CNE-1 和转染空白载体的细胞高。此结果说明 LMP1 诱导鼻咽癌细胞发生 TRAIL 抵抗。

TRAIL 与细胞膜上 DR-4，DR-5 结合后，导致受体发生三聚体化，结合具有死亡结构的 Fas 相关蛋白（fas associated protein with death domain，FADD）。FADD 以其死亡效应结构域（death effector domain，DED）结合胱氨酸蛋白酶-8（caspase-8）的 DED 形成

一个由 Fas-FADD-caspase-8 组成的死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex, DISC)[15],继而通过两种信号通路传导凋亡信号:①细胞外凋亡通路;②细胞内凋亡通路。在整个凋亡信号通路中的各个环节均可以影响肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性。本部分的研究已经证实 LMP1 可以抑制 TRAIL 对鼻咽癌细胞的凋亡诱导作用,但目前无文献报导阐明 LMP1 在 TRAIL 凋亡信号通路的哪一个环节影响凋亡信号的传导。因此我们上调 LMP1 后,检测两条凋亡信号通路中各个环节代表因子的活化改变,从而定位 LMP1 影响 TRAIL 凋亡信号的作用位点。细胞外凋亡信号通路是 DISC 形成后,caspase-8 得到启动后直接活化下游的 caspase-3,导致细胞凋亡[1],因此 caspase-3、-8 的分解活化传递的程度代表了细胞外凋亡信号启动的情况。caspase-3 通过分解为 p17,p10 亚单位得到活化,caspase-8 通过分解为 p43/p41,p18 亚单位得到活化。我们的研究发现 TRAIL 干预后,CNE-1-LMP1 细胞中 caspase-3、-8 活化分解明显低于 CNE-1 细胞,说明 LMP1 可以抑制 TRAIL 对细胞外信号通路的启动。除了细胞外凋亡信号通路,TRAIL 也可以通过细胞内凋亡信号通路诱导细胞发生凋亡。活化的 caspase-8 启动 Bid 是细胞内凋亡信号通路的启动环节。Bid 分解为 tBid 后,引起线粒体跨膜电位降低或破坏,促使 caspase-9 活化分解为 p35 亚单位,最终启动 caspase-3 导致凋亡。因此 Bid、caspase-9 分解活化及线粒体膜电位去极化的程度代表了细胞内凋亡信号通路启动的情况。我们的实验结果显示 TRAIL 干预后的鼻咽癌细胞未见明显的 Bid、caspase-9 活化分解和线粒体膜电位改变,说明 TRAIL 并不能启动鼻咽癌细胞 CNE-1 中的细胞内信号通路。同时 CNE-1、CNE-1-LMP1 之间 Bid、caspase-9 活化分解和线粒体膜电位改变却无明显差异,说明 LMP1 并不影响 TRAIL 启动的细胞内信号通路。

综上所述,我们的结果证实 LMP1 可以通过抑制 caspase-3、-8 活化分解抑制 TRAIL 启动细胞外信号通路诱导鼻咽癌细胞 CNE-1 发生 TRAIL 抵抗。

参考文献:

[1] Lin JC, Jan JS, Hsu CY, et al. Phase III study of concurrent chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for advanced nasopharyngeal carcinoma: positive effect on overall and progression-free survival[J]. J Clin Oncol,2003,21(4): 631 - 637.

[2] Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, et al. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis[J]. Nature, 2009,459(7245): 428 - 432.

[3] Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis[J]. Oncogene, 2003,22,(20):3152 - 3161.

[4] Green DR, Evan GI. A matter of life and death[J]. Cancer Cell, 2002, 1(1): 19 - 30.

[5] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1): 42 - 49.

[6] 王林,李仕晟,杨新明,等. 鼻咽癌细胞 LMP1 的表达与其对 TRAIL 敏感性的关系[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015,21(4): 275 - 279.
Wang L, Li SS, Yang XM, et al. The relationship between the expression of LMP1 and the sensitivity to TRAIL in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery,2015,21(4): 275 - 279.

[7] Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, et al. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis[J]. Nature, 2009, 459 (7245): 428 - 432.

[8] Griffith TS, Stokes B, Kucaba1 TA, et al. TRAIL gene therapy: from preclinical development to clinical application[J]. Curr Gene Ther, 2009, 9 (1): 9 - 19.

[9] Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, et al. Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis[J]. Oncogene, 2008, 27 (14): 2055 - 2063.

[10] Shao JY, Ernberg I, Biberfeld P, et al. Epstein-Barr virus LMP1 status in relation to apoptosis, p53 expression and leucocyte infiltration in nasopharyngeal carcinoma[J]. Anticancer Res, 2004, 24 (4): 2309 - 2318.

[11] Fries KL, Miller WE, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene[J]. J Virol, 1996, 70 (12): 8653 - 8659.

[12] Floettmann JE, Ward K, Rickinson AB, et al. Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines[J]. Virology, 1996, 223 (1): 29 - 40.

[13] Liao W, Tang M, Yin LQ, et al. Regulation of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 on the expression of p53 in human nasopharyngeal carcinoma[J]. Expert Rev Mol Med,2001, 23 (3): 199 - 201.

[14] Yan Z, Yong-Guang T, Fei-Jun L, et al. Interference effect of epigallocatechin-3-gallate on targets of nuclear factor kappaB signal transduction pathways activated by EB virus encoded latent membrane protein 1[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36 (8): 1473 - 1481.

[15] Pan G, ORourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. Science, 1997, 276 (5309): 111 - 113.

(收稿日期:2017 - 08 - 02)