

EB 病毒潜伏膜蛋白 1 介导 c-Jun/JunB 活性异源二聚体形成*

宋 鑫 陶永光 谭运年 黎民敬 邓锡云 吴 乔 曹 亚**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; Laboratory of Molecular Technology SAIC-Frederick, National Cancer Institute, Frederick MD 21702, USA; 厦门大学生命科学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 可以活化 AP-1 转录因子, 其中 c-Jun 和 JunB 的相互关系和复杂作用一直是人们关注的焦点. 以 Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞系为动态研究模型, 主要应用 c-Jun/Jun B 双染色间接免疫荧光法联合激光共聚焦荧光显微镜技术、Western blot 方法、免疫共沉淀-Western blot 方法以及 Super-EMSA 方法, 同时, 结合信号转导通路研究中的阻断策略, 研究证实 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 介导 c-Jun/Jun B 异源二聚体形成, 而且该二聚体具有与 DNA 结合活性. 该研究为 LMP1 调控下, AP1 二聚体家族成员在不同时空信号传导通路中的动态组合和作用模式提供了新的机制.

关键词 LMP1 JunB c-Jun 异源二聚体 DNA 结合活性

潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1) 为 EB 病毒编码的重要癌基因, 包括亲水性氨基端胞浆区、6 个不同的疏水性跨膜区和亲水性羧基端胞浆区 3 个不同的结构域, 其中羧基末端位于 351~386 位的羧基末端激活区 2 (carboxy terminal activating region2, CTAR2) 结构域与 AP1 活化密切相关^[1], LMP1 通过 c-Jun 末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 活化 AP1, 以调控相关靶基因的转录, AP1 具

有介导细胞异常增殖的重要作用, 是 LMP1 信号传导途径的重要枢纽^[2].

AP1 为重要的核转录调控因子, 由同源二聚体和/或异二聚体组成, 组成成员包括 c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2 Fos 家族成员, c-Jun, Jun B, JunD Jun 家族成员和 ATF2, ATFa 和 ATF3 等碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)蛋白. Jun 定位在参与人体肿瘤形成诸多信号传导通路末端, 其特殊定位使它在不同

2003-10-22 收稿, 2004-04-28 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划(973)项目(批准号:G1998051201)、国家自然科学基金项目(批准号: 30300403, 30100005, 30000087)和国家杰出青年科学基金项目(批准号: 39525022)资助

** 联系人, E-mail: Ycao98@public.cs.hn.cn

的肿瘤发生机制中扮演重要角色, 而 Jun 家族成员 c-Jun 和 Jun B 在信号传导通路中的相互关系和复杂作用正在成为研究的热点.

研究表明, 在不同的环境因素作用下, 不同的细胞系中, c-Jun 既可促进细胞增殖和恶性转化, 增加肿瘤细胞的侵袭性, 抑制细胞凋亡^[3,4], 也可促进细胞凋亡^[5]. Jun B 则具有抑制细胞增殖^[6]、减少肿瘤细胞的侵袭性^[7]和促进分化^[8,9]的作用, 长期以来一直被认为是抑制性 AP1 转录因子^[10]. 然而, 也有研究表明, Jun B 促进肿瘤的发生^[11], 抑制细胞分化^[12], 加速肿瘤恶性演进^[13]. 进一步的研究表明, AP1 亚基 c-Jun 和 Jun B 拮抗调控细胞增殖、恶性转化、分化和 AP1 依赖性靶基因的表达^[14-17], 发挥拮抗作用的部分机制可能是 Jun B 与 c-Jun 形成无活性异源二聚体, 抑制 c-Jun 的作用^[18]. 然而, 新近的研究表明, c-Jun 和 Jun B 协同调节 AP1 依赖性靶基因, 促进细胞异常增殖和转化^[19,20].

我们最新的研究工作证实, 在 Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞^[21]中, 随着四环素衍生物强力霉素 (doxycycline, DOX) 诱导剂量增大和时间延长, LMP1 表达逐渐加强, AP1 呈明显的时效和量效关系^[22]. 用 AtlasTM Apoptosis cDNA Expression Array 检测 DOX 诱导前后 Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞基因的变化, 发现 JunB 和 c-Jun 呈时间和剂量依赖性动力学变化^[23]. 相反, 用胞浆锚蛋白 JIP-1(JNK interacting protein-1)抑制 JNK 核移位明显阻断 AP1 功能性活化, 引起鼻咽癌细胞增殖减弱^[24]. 进一步的研究确定了 LMP1 结构域 CTAR2 可能通过结合 TRADD/TRAF2 信号分子, 引起一系列级联反应, 活化 JNK, 从而激活 AP1 的两个重要组分 c-Jun 和 c-Fos, 提供了 LMP1 导致 AP1 信号传导途径的异常激活并且在鼻咽癌的发病中可能具有重要作用的实验依据^[22,25].

在此基础上, 我们试图研究在信号转导通路中, c-Jun 和 JunB 是否存在动态组合以及拮抗和/或协同发挥作用模式. 发现 LMP1 介导 c-Jun/JunB 活性异源二聚体形成, 而且该二聚体具有与 DNA 结合活性, 这使我们从一个新的角度重新审视 c-Jun/JunB 异源二聚体的作用, 为 AP1 二聚体家族成员在信号转导通路中的动态组合和作用模式提供了新的机制.

1 材料与方法

1.1 细胞株和培养条件

鼻咽癌细胞系 HNE2 为本研究所建立的 EB 病毒阴性的低分化鳞癌细胞系. HNE2 细胞经两轮稳定的转染, 导入四环素基因调控系统和 LMP1 表达质粒, 从而成功构建了受四环素衍生物强力霉素诱导 LMP1 表达的鼻咽癌细胞系 Tet-on-LMP1 HNE2^[21]. 该细胞培养液为 15% 小牛血清的 RPMI 1640(Sigma 公司), 37 °C, 5% CO₂, 并维持在 200 mg/L G418(Sigma 公司)和 50 mg/L 潮霉素(Sigma 公司)药物筛选浓度下进行培养. 该细胞系中, LMP1 能被很好地诱导表达, 随着四环素及衍生物强力霉素(doxycycline, Dox, Sigma 公司)浓度的增加, LMP1 呈现相应的表达增加.

1.2 细胞总蛋白和核蛋白的抽提

取对数生长期的 Tet-on LMP1 HNE2 细胞, 用含 0.02% EDTA 和 0.25% 胰酶消化, 计数, 10⁵ /mL 细胞接种于培养瓶中, 贴壁生长后, 按实验所需分别加入不同浓度 Dox 进行处理. 根据文献抽取细胞总蛋白^[26]和细胞核蛋白^[27]于 -70 °C 贮存. 用 BCA(Pierce)检测蛋白质浓度.

1.3 Western blot 分析

取 100 μg 蛋白在不连续 SDS-PAGE 胶电泳, 电转移至硝酸纤维素膜(0.45 μm, Schleicher & Schuell)上, 再相应地加入一抗和二抗孵育, 然后, 用 ECL 发光试剂(Pierce)检测(在 50 °C 水浴中, 将硝酸纤维素膜在 2% (w/v) SDS, 62.5 mmol/L Tris·HCl, 100 mmol/L β-巯基乙醇, pH 6.8 的溶液中孵育 30 min 剥脱一抗后可用于二次发光^[28]), X 线片曝光, 显影, 定影. 抗体使用如下: LMP1 抗体购自 DAKO 公司(CS1-4); Phospho-JNK 抗体 (9251S)、Phospho-c-Jun(Ser63)抗体 (#9261S)、Phospho-c-Jun(Ser73)抗体 (#9164S)购自 Cell Signaling Technology 公司; c-Jun 抗体(sc-1694)、JunB(sc-8051)和 α-tubulin 抗体(sc-5286)购自 Santa Cruz 公司; Flag 抗体(F3165)购自 Sigma 公司.

1.4 质粒抽提和瞬间转染

将质粒经挑单克隆、扩增后, 采用 Tip100 柱

(Qiagen)抽提质粒,经0.7%琼脂糖电泳鉴定和紫外分光光度计(Pharmacia)测浓度,确保质粒的质量优良方可用于转染。按照 SuperFect[®]转染试剂(QIAGEN 公司)操作在60 mm培养碟中进行,pRSV β -gal 表达质粒:JIP 表达质粒为1:9,pRSV β -gal 表达质粒作为内标,按实验设计需要分别加入或不加DOX进行诱导,培养24 h后收获。同时按 β -galactosidase 活性检测试剂盒(Promega)以校正转染效率。有关质粒的使用:JIP(JNK-interacting protein)表达质粒系R. J. Davis 博士惠赠^[29]; β -galactosidase 表达质粒(pRSV β -gal)由N. Perkins 博士惠赠^[30]。

1.5 激光共聚焦荧光显微镜检测

用0.6 μ g/mL DOX 诱导 Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞,在0, 2, 4, 8, 12, 24 h不同的时间点收获,PBS漂洗,4 预冷的3.7%多聚甲醛固定细胞30 min;0.25% PBS-Triton X-100 漂洗,均以1:400 稀释度将JunB 和 c-Jun 两种抗体混合,4 湿盒过夜;均以1:400 稀释度将针对 c-Jun FITC 标记(F1202, Sigma)和针对 JunB CY3 标记(C2181, Sigma)的二抗混合,37[°] 孵育3 h;封闭剂(含猝灭剂)封片,激光共聚焦荧光显微镜下(Laser confocal fluorescence microscope, LCFM, Bio-Rad, MRC 1024ES)观察,Lasersharp 软件对结果进行分析处理。

1.6 免疫共沉淀(immunoprecipitation, IP)-Western blot 方法^[28]

将20 μ g 蛋白、20 μ L Protein A Sepharose CL-4B(Pharmacia Biotech 公司)、5 μ L c-Jun/JunB 抗体(未经免疫的同类IgG作为阴性对照)和含1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 1 μ g/mL aprotinin 和1 μ g/mL leupeptin 蛋白酶抑制剂的1 \times PBS 混合至60 μ L,4 摇动过夜,10000 r/min 离心,PBS 洗涤,再悬于16 μ L 1 \times PBS 液中,加6 \times SDS 上样缓冲液70 $^{\circ}$ 水浴10 min,14000 离心。取上清上样,在不连续 SDS 变性凝胶中分离,然后转蛋白于NC膜,加JunB/c-Jun 的一抗孵育过夜,针对抗 JunB/c-Jun 的二抗室温孵育,ECL 试剂检测,X 线片曝光,显影,定影。

1.7 凝胶电泳移动迁移率检测(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)

根据 LightShift[™] 化学发光凝胶电泳移动迁移率检测试剂盒(Pierce, No.20148,)进行操作,根据文献设计 AP1 双链探针(5'-TTCCGGCTGACTCATCAAGCG-3')序列^[31,32]和 SP1 双链探针(5'-ATTCGATCGGGCGGGGCGAGC-3')序列^[32,33],由美国国立癌症研究院 SAIC-Frederick 分子技术实验室合成并用生物素在探针3'末端标记。以不加相应抗体的体系作为阴性对照,转录因子DNA结合活性则用SP1多聚寡核苷酸一致序列探针(5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3')作为校正实验(结果未显示)。c-Jun(sc-1694)和 JunB(sc-8051) 抗体购自 Santa Cruz 公司; Phospho-c-Jun(Ser63) 抗体(#9261S)和 Phospho-c-Jun(Ser73) 抗体(#9164S)购自 Cell Signaling Technology 公司。

2 结果

2.1 EB病毒LMP1调控c-Jun及JunB表达水平的变化

在前期研究工作基础上,以 Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞为材料,采用 Western blot 方法,检测细胞在0.006, 0.06, 0.6, 6 μ g/mL DOX 剂量诱导下LMP1 表达,结果表明LMP1 表达在0.6 μ g/mL 剂量诱导下达到高峰;6 μ g/mL 剂量诱导下LMP1 表达维持在几乎同样水平(结果未显示),因此,我们以0.6 μ g/mL 的DOX 为诱导剂量,检测细胞在不同时间的DOX 诱导下,随着LMP1 表达变化,JNK 和 c-Jun(Ser 63, Ser 73) 的磷酸化程度改变,以及 c-Jun 和 JunB 蛋白表达改变(图1)。

结果表明,EB病毒LMP1 蛋白表达呈时间依赖性表达增强,JNK 的磷酸化水平在DOX 未诱导时很低,在DOX 诱导后0.5 h开始增强,2 h达到高峰并维持在较高水平;c-Jun 蛋白 Ser63 位磷酸化水平在0.5~2 h 逐渐增强,4 h 达到高峰并维持在较高水平;c-Jun 蛋白 Ser73 位磷酸化水平在0.5~4 h 逐渐增强,4 h 达到高峰,从8 h开始逐渐降低,但是,c-Jun 和 JunB 的表达却逐渐减弱。

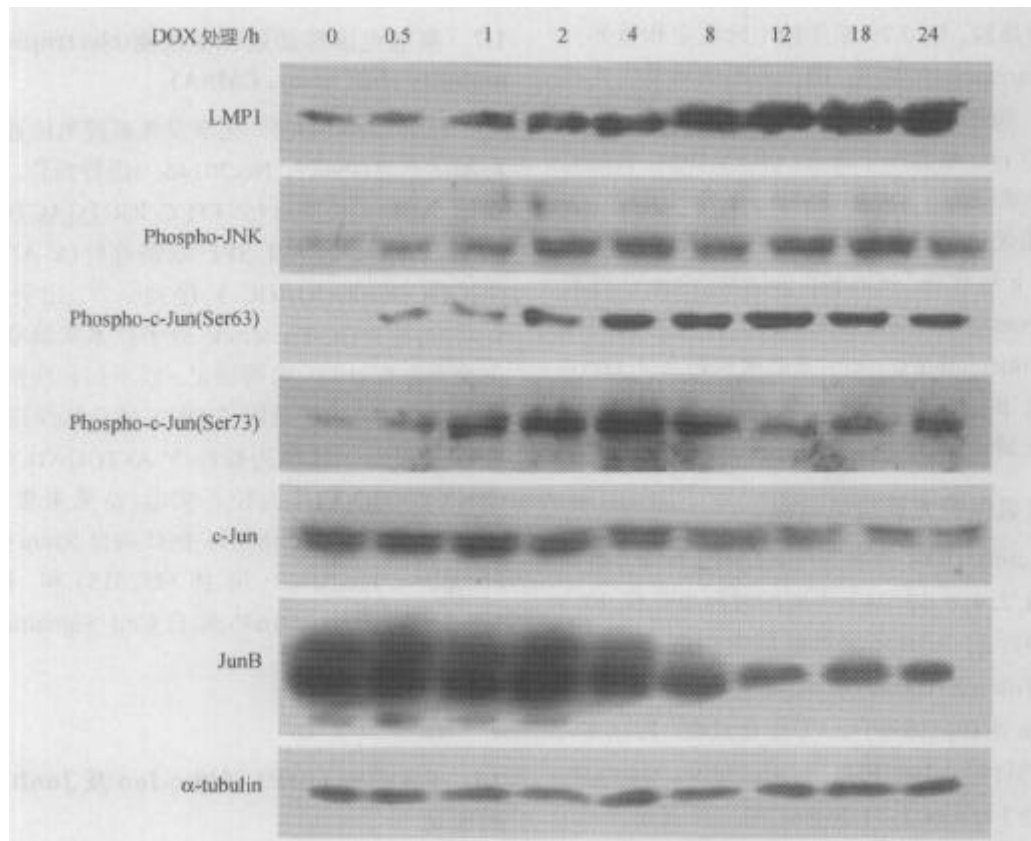


图 1 Western blot 方法分析 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞中 LMP1 在不同时间点引起 Phospho-JNK, -Jun 和 JunB 的变化
Tet-on LMP1 HNE2 细胞加入 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox 处理不同时间, 抽提总蛋白用于 Western blot, 检测 Phospho-JNK, c-Jun(ser63, ser73), c-Jun 和 JunB.
 α -tubulin 为内对照校正实验

2.2 EB 病毒 LMP1 介导 c-Jun/JunB 异源二聚体形成

(1) 利用荧光双色标记联合 LCFM 技术, 确定 c-Jun 和 JunB 在细胞内的共同定位: c-Jun 和 JunB 同属于 AP1 家族成员, 而 AP1 作为重要的核转录因子, 通常以二聚体形式发挥其转录活性. 因此, 我们采用 c-Jun/JunB 荧光双色标记联合激光共聚焦荧光显微技术, 检测 DOX 诱导前后 c-Jun/JunB 在细胞核共定位改变, 以提供 LMP1 介导 c-Jun/JunB 二聚体形成的实验依据.

CY3 标记的 JunB 蛋白在激光共聚焦荧光显微镜下发出红色荧光, FITC 标记的 c-Jun 蛋白在激光共聚焦荧光显微镜下发出绿色荧光. 在 DOX 未诱导的 Tet-on LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞中, 两种荧光在细胞

核中集中分布, 无叠加现象的发生, 而在 2, 4, 8, 12 和 24 h 四个时间点诱导过程中, 呈现出相互叠加的黄色荧光(图 2). JunB 和 c-Jun 共定位提示: 可能存在 c-Jun/JunB 异二聚体形成.

(2) 利用 IP-Western blot 方法进一步确定 c-Jun/JunB 异源二聚体形成及其动力学特征: 用抗 c-Jun 抗体沉淀核蛋白(未经免疫的同类 IgG 作为阴性对照), 然后用 Western blot 方法检测 JunB 的表达, 结果显示, 随着 DOX 诱导时间的延长, AP1 组分中 JunB 蛋白表达 2 h 开始增加, 8 h 达到高峰, 然后呈下降的趋势(图 3(a)), 同时, 我们用抗 JunB 抗体沉淀核蛋白, 然后用 Western blot 方法检测 c-Jun 的表达, 结果表明, 随着 DOX 诱导时间的延长, AP1 组分中 c-Jun 蛋白也呈现出相似的表达趋势, 2 h 开始增加, 8~12 h 达到高峰,

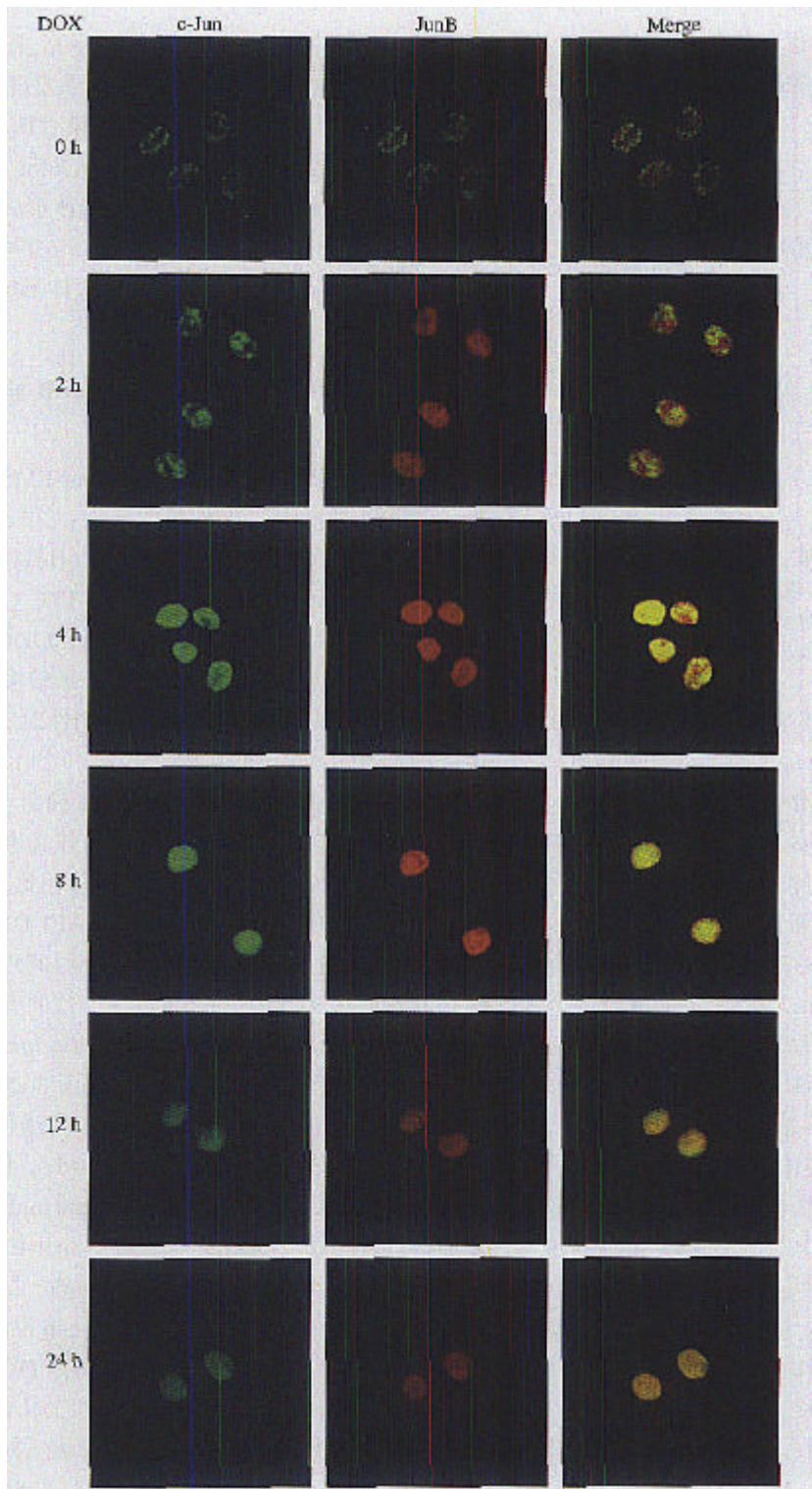


图 2 LMP1 诱导 c-Jun 和 JunB 在不同时间点 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞核中的共同定位

在不同时间段, 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox 处理 Tet-on LMP1 HNE2 细胞, 绿色荧光为 FITC 示 c-Jun 蛋白, 红色荧光 CY3 示 JunB 蛋白, 以激光共聚焦显微镜观察 c-Jun 和 JunB 蛋白的共定位, 若共定位则表现为黄色的叠加信号

然后下调(图 3(b)). 进一步提示: 在 LMP1 介导下, c-Jun/JunB 可能以二聚体形式发挥作用.

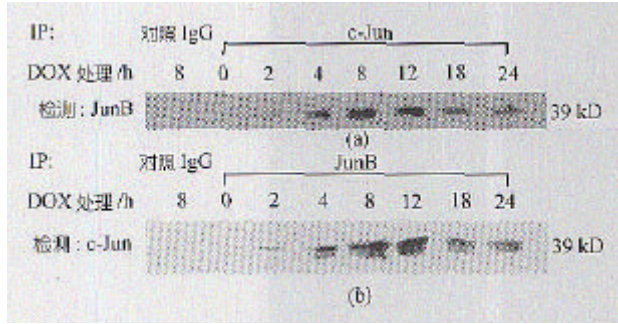


图 3 IP-Western blot 方法分析 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞中 LMP1 对 c-Jun 和 JunB 在不同时间点的相互作用. 抽提相应时间点的总蛋白, 分别以 c-Jun, JunB 抗体免疫沉淀的蛋白(未经免疫的同类 IgG 作为阴性对照)后进行 Western blot 分析, 以 JunB 或 c-Jun 进行分析.

(3) LMP1 调控下 c-Jun Ser63 和 Ser73 磷酸化与 c-Jun/JunB 二聚体形成的关系: 进一步用 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 诱导 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞 12 h 后, 提取核蛋白, 用抗 c-Jun, Phospho-c-Jun(Ser63)和 Phospho-c-Jun(Ser73)抗体分别沉淀核蛋白, 然后进行 JunB Western blot 方法分析, 结果并未显示 c-Jun/JunB 二聚体存在 c-Jun Ser63 和 Ser73 位点磷酸化(图 4(a)). 同时, 我们用抗 JunB 抗体沉淀核蛋白, 然后进行 c-Jun Western blot 方法分析, 结果发现, c-Jun/JunB 二聚体存在 c-Jun Ser63 和 Ser73 位点磷酸化(图 4(b)). 上述结果提示: c-Jun Ser63 和 Ser73 位点磷酸化可能促使 c-Jun/JunB 二聚体的形成.

JNK 相互作用蛋白(JIP)作为一种新型胞浆锚蛋白, 选择性地与 MAPK 中的 JNK 结合, 相对特异地阻断 AP1 功能性活化^[29], 因此, 为了进一步确定 LMP1 调控下 c-Jun Ser63 和 Ser73 磷酸化水平与 c-Jun/JunB 二聚体形成的相关性, 我们用 JIP-1 表达质粒阻断磷酸化 JNK 核移位, 从而阻断 c-Jun Ser63 和 Ser73 磷酸化, 探讨 c-Jun/JunB 二聚体形成改变.

我们在 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞中转染带有 Flag 标签的 JIP 表达质粒后, 用 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 诱导 Tet-on-LMP1-HNE2 细胞 12 h, 在确定细胞已经转染

JIP 的情况下(结果未显示), 采用同一批蛋白进行 Western blot 方法分析. 结果发现, 转染 JIP 表达质粒后, 其表达水平较未转染有明显降低(图 4(c)). 在此基础上, 进行 IP-Western blot 方法分析, 发现与未转染比较, c-Jun/JunB 二聚体形成明显减少(图 4(d)和图 4(e)). 上述实验提示: Ser 63/73 位磷酸化水平变化对于 c-Jun/JunB 异源二聚体形成起着十分重要的作用.

2.3 LMP1 激活 c-Jun/JunB 异源二聚体上调 AP1 DNA 结合活性

我们进一步利用 Super-EMSA 方法鉴定 c-Jun/JunB 异源二聚体是否与 DNA 结合以及结合能力改变. 根据文献^[31,32]针对 TRE 位点(共同序列 TG AC/GTCA)设计 AP1 探针, 序列为 5'-TTC CGG CTG ACT CAT CAA GCG -3'. 提取 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 诱导 12 h(图 3 证实 c-Jun/JunB 二聚体形成需较多的时间)的细胞核蛋白, 以不加相应抗体作为阴性对照; 以 DOX 未诱导, 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 诱导 4, 12 和 24 h 作为实验组, 用 SP1 多聚寡核苷酸一致序列探针^[32,33](5'-ATTTCGATC-GGGGCGGGGCGAGC-3')作为校正实验(结果未显示). 结果表明, 与未诱导时相比, c-Jun/JunB 异源二聚体组分 JunB 和 c-Jun 与 AP1 DNA 结合活性在 0, 4, 12 h 时间点逐渐升高, 12 h 时间点至 24 h 时间点逐渐下降, c-Jun 和 JunB 呈现一致的变化趋势(图 5(a)), 与 IP-Western blot 结果显示的 c-Jun/JunB 二聚体形成呈现一致的时间动力学特征(图 3(a)和(b)).

Ser63, Ser73 位 c-Jun 磷酸化与 c-Jun/JunB 二聚体形成密切相关(图 4(a)~(d)), 因此, 我们选择 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 诱导 12 h(c-Jun/JunB 二聚体形成较多的时间)作为诱导时间, 用 Super-EMSA 方法进一步研究 DOX 诱导前后 c-Jun/JunB 二聚体中 c-Jun Ser63, Ser73 位磷酸化是否促进 c-Jun/JunB 二聚体与 AP1 DNA 结合能力. 结果表明, DOX 诱导后, Ser63, Ser73 位 c-Jun 磷酸化与 AP1 DNA 结合能力明显增加(图 5(b)). 同时, 用 JIP-1 表达质粒阻断磷酸化 JNK 核移位, 从而阻断 c-Jun Ser63 和 Ser73 磷酸化, 结果显示, 转染后 JunB 和 c-Jun 失去了与 AP1 DNA 结合能力, 因此, 从反面进一步验证了 c-Jun Ser63 和 Ser73

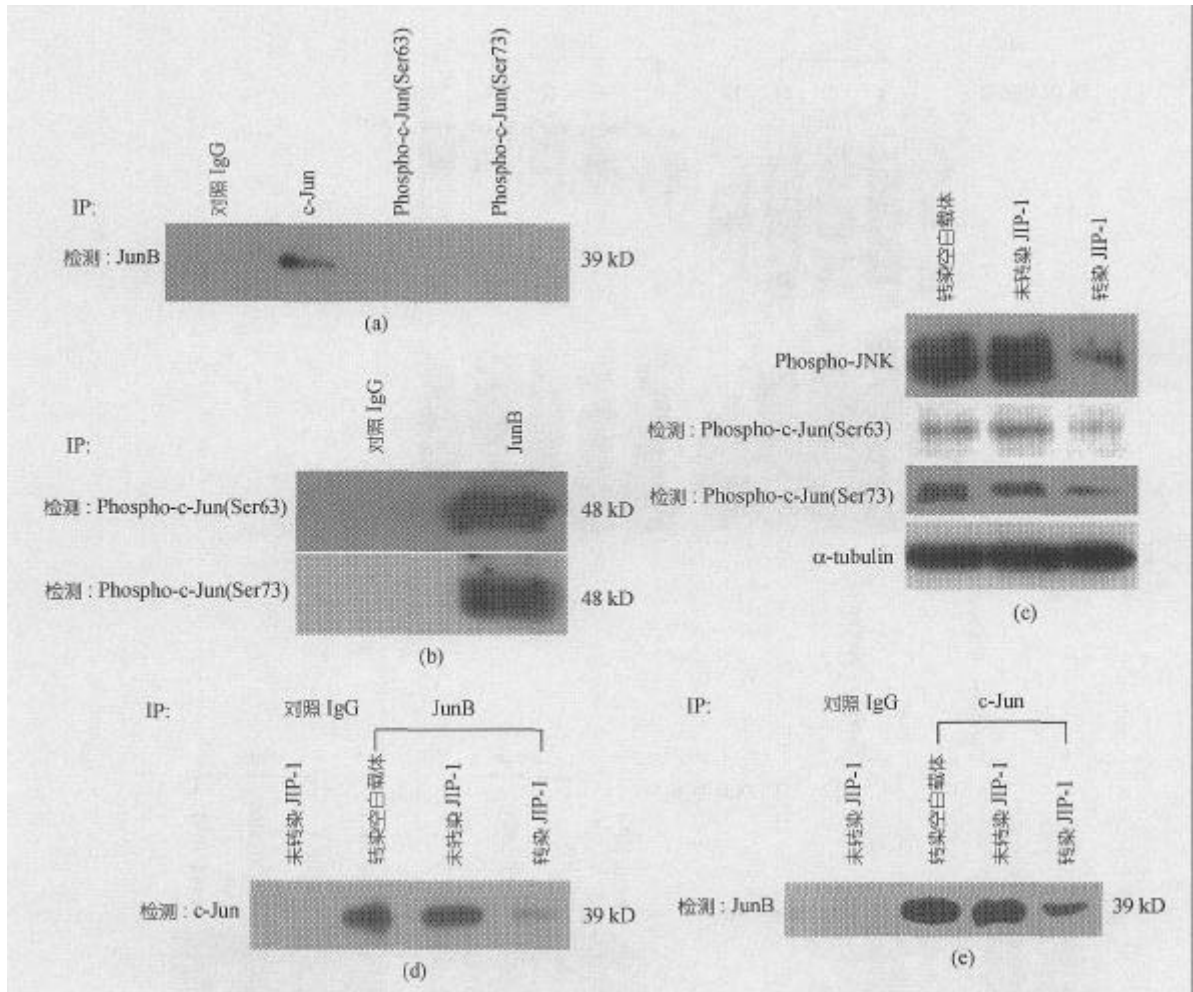


图 4 c-Jun Ser63 和 Ser73 磷酸化与 LMP1 介导的 c-Jun/JunB 二聚体形成

Tet-on-LMP1 HNE2 细胞中用 0.6 μg/mL DOX 诱导 LMP1 表达 12 h 后, 抽提总蛋白。分别用于: (a) 用 c-Jun, Phospho-c-Jun (ser63) 和 Phospho-c-Jun (ser73) 抗体分别沉淀, 再用 Jun B 抗体用于 Western blot; (b) 先用 Jun B 抗体沉淀蛋白, 再用 c-Jun, Phospho-c-Jun (ser63) 和 Phospho-c-Jun (ser73) 抗体来检测蛋白; (c) 细胞经转染 JIP-1 诱导 LMP1 表达后抽提总蛋白, Western blot 分析 JNK 和 c-Jun 磷酸化水平; (d) 细胞转染 JIP-1 诱导 LMP1 表达后抽提核蛋白, 先用 Jun B 抗体沉淀蛋白, 再用 c-Jun 抗体检测其水平; (e) 细胞转染 JIP-1 后诱导 LMP1 表达, 先用 c-Jun 抗体沉淀核蛋白后再用 JunB 抗体检测其水平

磷酸化与二聚体与 AP1 DNA 结合能力密切相关(图 5(c))。

3 讨论

我们前期的研究工作已经证实, 在 Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞中, LMP1 结构域 CTAR2 通过结合 TRADD/TRAF2 信号分子引起一系列级联反应, 活化 JNK, 上调 AP1 活性^[22,25,30]。我们新近的研究工作提示, LMP1 致癌机制与 AP1 家族重要成员 JunB 和

c-Jun 密切相关^[23]。以前文献研究认为, JunB 氨基末端具有泛素化 d 样结构域(锚着位点), 但是缺少磷酸化受体位点, 因此, 可与 JNK 结合, 但是不能使之磷酸化^[34,35], 推测 JunB 可能通过泛素化引发的蛋白小体依赖性降解途径降解^[36]。c-Jun Ser63, 73 位的磷酸化对 c-Jun 的功能至关重要^[37], 可使其免于泛素化引发的蛋白小体依赖性降解, 使其稳定性增加^[36]。令人关注的是, 新近的研究表明, JNK 在肿瘤的发生发展中起着重要作用^[38], JNK 是脯氨酸导向的 Ser/Thr 激

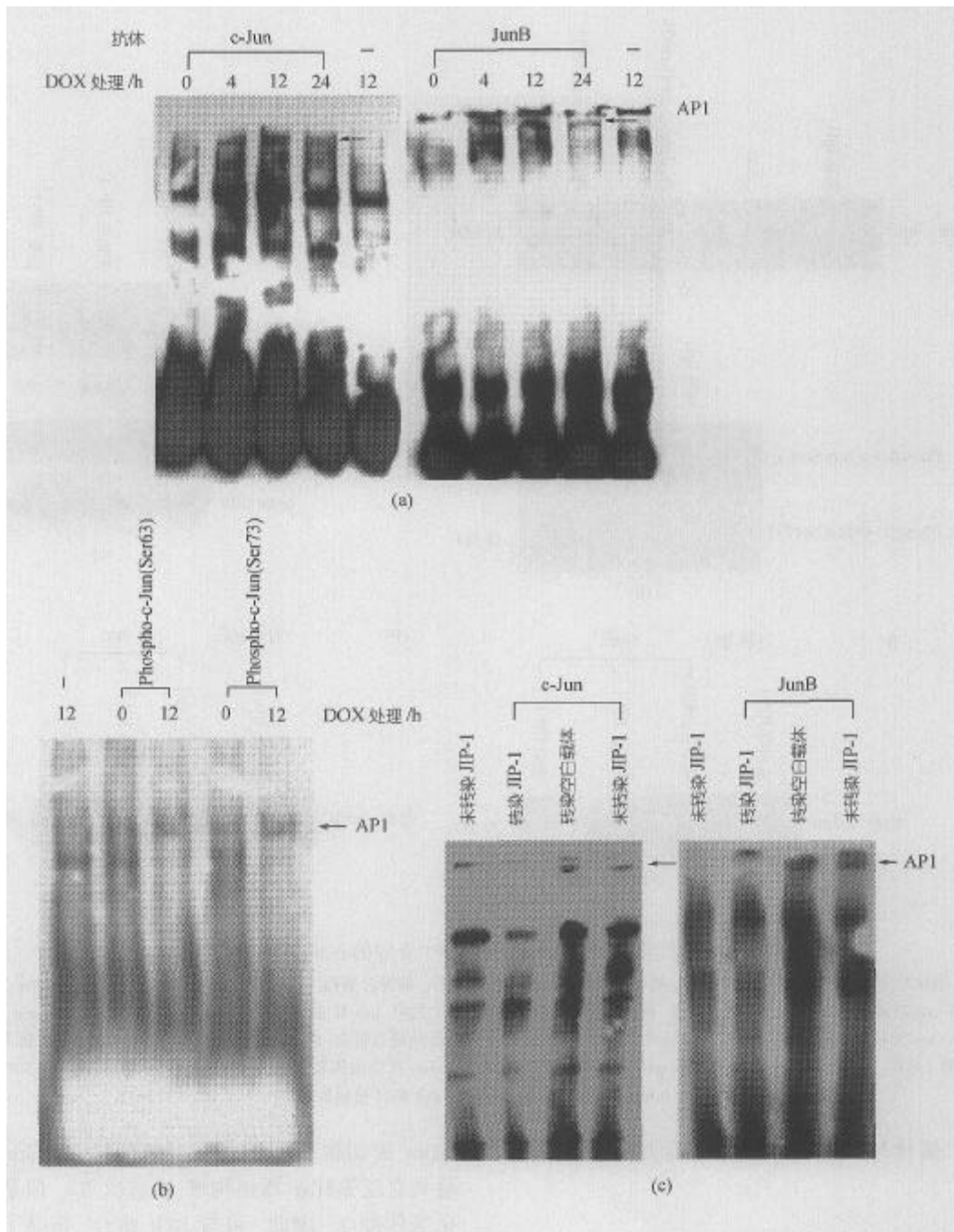


图 5 LMP1 介导 c-Jun/JunB 异源二聚体形成后上调其与 DNA 结合的能力

(a) Tet-on LMP1 HNE2 细胞用 0.6 $\mu\text{g/mL}$ Dox 在不同时间点诱导 LMP1 表达后抽提核蛋白, 5 μg 核蛋白和 20 fmol 3' 末端生物素标记 AP1 双链探针孵育, c-Jun 或 JunB 抗体加入反应体系中. 箭头 Super-shift 带形. (b) Tet-on LMP1 HNE2 细胞诱导 LMP1 表达后抽提核蛋白, 采用 Phospho-c-Jun(Ser63)和 Phospho-c-Jun(Ser73)抗体用于 Super-shift 分析. (c) Tet-on LMP1 HNE2 细胞转染 JIP-1 质粒诱导 LMP1 表达, 抽提核蛋白, 用 c-Jun 和 JunB 抗体用于 Super-shift 分析

酶^[39],具有使底物磷酸化和泛素化的双重作用^[36],c-Jun和JunB是JNK的有效底物,JNK可磷酸化JunB Thr102和Thr104位点,可能通过与c-Jun竞争JNK结合位点,导致c-Jun磷酸化水平降低,从而增加自身DNA结合和转录活性^[8]。

AP1活性主要是由其不同亚基蛋白表达的丰度和磷酸化状态决定的,AP1作为重要的核转录因子,通常以二聚体形式发挥其转录活性。在不同的环境因素作用下,不同的时空,AP1不同组分可能通过重新组合形成新的二聚体,用以调节与DNA的结合并进而影响靶基因的转录^[40]。因此,我们推测,在鼻咽癌细胞中,EB病毒LMP1通过TRADD和TRAF激活JNK^[41],从而磷酸化c-Jun和JunB^[40],介导c-Jun/JunB AP1新的二聚体形成,用以调控相关靶基因的转录。

结果表明,LMP1在0.6 μg/mL DOX剂量诱导高表达情况下,随着DOX诱导时间的延长,EB病毒LMP1蛋白表达呈时间依赖性表达增强,出乎意料的是,c-Jun和JunB的表达却逐渐减弱,但是,随着JNK磷酸化水平逐渐增强,Ser63和Ser73位点的c-Jun磷酸化水平也逐渐增强(图1)。虽然目前缺乏特异针对JunB特定位点磷酸化的抗体,使JunB磷酸化的研究受到了很大限制,但是,我们用JunB抗体检测发现,出现了较慢迁移的JunB泛磷酸化免疫条带,因为研究表明把核提取物用磷酸酶处理后电泳,该条带消失^[40],这在一定程度上说明LMP1诱导下JunB磷酸化调节在AP1信号传导通路中发挥着重要的作用。上述结果表明,c-Jun和JunB作为重要的AP1转录因子,LMP1对其活性的调节主要是在翻译后磷酸化水平的调控上^[42]。

为了更进一步研究DOX诱导下JunB和c-Jun的功能以及它们之间的相互关系,我们采用c-Jun/JunB荧光双色标记联合LCFM技术,发现DOX诱导下,c-Jun/JunB在细胞核中出现共定位(图2),同时,利用IP-Western blot方法,采取信号传导通路中的阻断策略,进一步证明LMP1调控下c-Jun与JunB形成异源二聚体(图3(a)和3(b)),而且c-Jun Ser63和Ser73磷酸化与c-Jun/JunB二聚体形成紧密相关(图4(a)~(e))。

AP1二聚体功能性活化的重要证据是其与靶基

因启动子结合,反式激活靶基因转录,调控靶基因的表达,从而发挥细胞增殖、凋亡和分化等生物学效应。然而,令人关注的是,以前的研究认为:JunB被认为是c-Jun的拮抗因子,可与c-Jun形成没有结合和转录活性的异源二聚体,抑制c-Jun的转录活性,抑制细胞增生^[18]。很多实验也表明,Jun蛋白转录区的磷酸化不能改变DNA结合特性,但是,可增加其转录活性^[37,42]。因此,我们利用Super-EMSA方法进一步鉴定c-Jun/JunB异源二聚体是否与DNA结合以及结合能力改变。实验发现,DOX诱导后,c-Jun/JunB异源二聚体与AP1 DNA结合能力明显增加(图5(a)),而且c-Jun Ser63和Ser73蛋白磷酸化水平与c-Jun/JunB异源二聚体AP1 DNA结合能力密切相关(图5(b)和(c))。

更为重要的是,在LMP1调控下,c-Jun/JunB异源二聚体作为AP1家族成员中重要的转录因子,其功能性活化体现在它对靶基因的调控作用。因此,寻找c-Jun/JunB异源二聚体具体调控的靶基因,已经成为我们下一步深化研究该二聚体功能的重要内容。

致谢 感谢美国国立医学中心 Beckman 研究所李建博士和美国 Minnesota 大学 Hormel 肿瘤研究所董志刚教授在结果分析方面提出的建设性意见。

参 考 文 献

- 1 Eliopoulos A G, Young L S. Activation of the c-JunN-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein1(LMP1). *Oncogene*, 1998, 16: 1731~1742
- 2 Vogt P K. Jun, the oncoprotein. *Oncogene*, 2001, 20: 2365~2377
- 3 Wisdom R, Johnson R S, Moore C. C-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanism. *EMBO J*, 1999, 18: 188~197
- 4 Smith L M, Wise S C, Hendricks D T, et al. C-Jun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*, 1999, 18: 6063~6070
- 5 Wang N P, Verna L, Hardy S, et al. C-Jun triggers apoptosis in human vascular endothelial cells. *Circulation Research*, 1999, 85: 387~393
- 6 Passegue E, Wagner E F. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16^{INK4a} expression. *EMBO J*, 2000, 19: 2969~2979
- 7 Hulboy D, Matrisian L M, Crawford H C. Loss of Jun B activity enhances stromelysin 1 expression in a model of the epithelial-to-mesenchymal transition of mouse skin tumors. *MCB*, 2001, 21: 5478~5487
- 8 Baiyong Li, Cathy Tournier, Roger J, et al. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell dif-

- ferentiation. *EMBO Journal*, 1999, 18: 420~432
- 9 Jacobs-Helber S M, Abutin R M, Tian C, et al. Role of Jun B in erythroid differentiation. *JBC*, 2002, 277: 4859~4866
- 10 Passegue E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, et al. Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking Jun B expression in the myeloid lineage. *Cell*, 2001, 104: 21~32
- 11 Mao X, Orchard G, Lillington D M, et al. Amplification and overexpression of JunB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*, 2003, 101: 1513~1519
- 12 Chalaux E, Lopez-Rovira T, Rosa J L, et al. Jun B is involved in the inhibition of myogenic differentiation by bone morphogenetic protein-2. *JBC*, 1997, 272: 537~543
- 13 Robinson C M, Prime S S, Huntley S, et al. Overexpression of JunB in undifferentiated malignant rat oral keratinocytes enhances the malignant phenotype *in vitro* without altering cellular differentiation. *Int J Cancer*, 2001, 91: 625~630
- 14 Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, et al. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*, 2000, 103: 745~755
- 15 Chiu R, Angel P, Karin M. Jun B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell*, 1989, 59: 979~986
- 16 Bakiri L, Lallemand D, Ella B W, et al. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J*, 2000, 19: 2056~2068
- 17 Schlingensiepen K H, Schlingensiepen R, Kunst M, et al. Opposite functions of Jun B and c-Jun in growth regulation and neuronal differentiation. *Dev Genet*, 1993, 14: 305~312
- 18 Deng T, Karin M. JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev*, 1993, 7: 479~490
- 19 Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, et al. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J*, 2002, 21: 4104~4113
- 20 Leaner V D, Kinoshita I, Birrer M J. AP1 complexes containing c-Jun and JunB cause cellular transformation of rat fibroblasts and share transcriptional targets. *Oncogene*, 2003, 28: 5619~5629
- 21 廖伟, 易红, 曹亚, 等. 一株受四环素及其衍生物调控的 Tet-on 鼻咽癌细胞株. *中国生物化学与分子生物学学报*, 1999, 15: 132~136
- 22 罗非君, 胡智, 曹亚, 等. EB 病毒 LMP1 上调鼻咽癌细胞系 AP1 活性. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2000, 16: 551~555
- 23 唐发清, 唐敏, 曹亚, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 调控细胞凋亡的 cDNA 阵列分析. *病毒学报*, 2001, 17: 97~102
- 24 Hu Z, Tao Y G, Cao Y, et al. Effect of JIP on the proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells through interaction with JNK mediated pathway. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2003, 30(4): 579~585
- 25 罗非君, 胡智, 曹亚, 等. EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞系中通过 JNK 介导 AP1 活化. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2001, 17: 381~385
- 26 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 27 Andrews N C, Faller D V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19: 2499
- 28 Ausubel F M, Roger B, Kingston R E, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*(Volume 4). New York: John Wiley & Sons, Inc. Press, 1994
- 29 Dickens M, Rogers J S, Cavanagh J, et al. A Cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*, 1997, 277: 693~696
- 30 Chapman N R, Perkins N D. Inhibition of the RelA(p65) NF-kappaB subunit by Egr-1. *J Biol Chem*, 2000, 275: 4719~4725
- 31 Lee W, Mitchell P, Tjian R. Purified transcription factor AP1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, 1987, 49: 741~752
- 32 Briggs M R, Kadonaga J T, Bell S P, et al. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science*, 1986, 234: 47~52
- 33 Vallone D, Battista S, Pierantoni G M, et al. Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the JunB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product. *EMBO J*, 1997, 16: 5310~5321
- 34 Gupta S, Barrett T, Whitmarsh A J, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*, 1996, 15: 2760~2770
- 35 Kallunki T, Deng T, Hibi M, et al. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*, 1996, 87: 929~939
- 36 Fuchs S Y, Xie B, Adler V, et al. C-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors. *J Biol Chem*, 1997, 272: 32163~32168
- 37 Wisdom R. AP1: One switch for many signals. *Exp Cell Res*, 1999, 253(1): 180~185
- 38 Behrens A, Jochum W, Sibilina M, et al. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene*, 2000, 19: 2657~2663
- 39 Kyriakis J M, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem*, 1990, 265: 17355~17363
- 40 Berry A, Goodwin M, Moran C L, et al. AP1 activation and altered AP1 composition in association with increased phosphorylation and expression of specific Jun and Fos family proteins induced by vinblastine in KB-3 cells. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 62: 581~591
- 41 Hu Z, Zheng L, Tao Y G, et al. EB virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK signaling pathway via a mechanism involving TRADD and TRAF in nasopharyngeal carcinoma cell. *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29: 562~566
- 42 Pulverer B J, Kyriakis J M, Avruch J, et al. Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 1991, 353: 670~674