

EB 病毒潜伏膜蛋白 1 调节 EGF 受体核移位*

陶永光^① 宋 鑫^① 谭运年^① 林晓峰^② 赵 燕^①
曾 亮^① 唐 敏^① 李 崑^① 吴 乔^② 曹 亚^{①**}

(^①中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; ^②厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

摘要 EB 病毒编码的病毒潜伏膜蛋白 1(LMP1)是重要的致瘤蛋白, 一直以来是 EB 病毒致瘤机制的研究核心. 传统的受体学说认为, 细胞膜受体作为第一信使, 在细胞膜上与其配体结合发挥生物学效应. 但近年来, 对 EGFR 家族成员受体核移位基因表达调控中意义的研究, 拓宽了人们对细胞膜受体生物学功能的认识. 利用我们建立的 Tet-on 系统调控 LMP1 表达的细胞系, 采用 Western blot 和激光共聚焦显微镜等技术证实, LMP1 可调控 EGFR 的核移位, 并呈一定的剂量效应. 通过 GFP 与 EGFR 及不同突变体的融合蛋白在细胞内的表达发现, EGFR 的核定位信号在其核移位过程中起着一定的作用, 并初步发现 LMP1 调控 EGFR 核移位为配体非依赖性.

关键词 EB 病毒 潜伏膜蛋白 1 EGF 受体 核定位

EB 病毒是一种与人 Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌、Hodgkin 病, 甚至胃癌、肺癌等多种肿瘤发病相关的 DNA 致癌病毒^[1]. EB 病毒可编码多种瘤蛋白, 其中 EB 病毒潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1)被认为是重要的致瘤蛋白. LMP1 是由 386 个氨基酸残基组成的分子量大小为 62 kD 的跨膜蛋白, 一直以来是 EB 病毒致瘤机制的研究核心. LMP1 通过其羧基端活化域 CTAR1(carboxyterminal activating region 1), CTAR2, CTAR3 等功能域, 介导 NF κ B, AP-1 和 STAT 信号转导通路及通路, 从而调节表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)^[2]、基质金属蛋白酶(MMP9)^[3]、细胞周期素 D1(cyclin D1)^[4]、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)^[5]等多种基因的表达, 进而介导细胞的增殖、分化和凋亡等多种生物学功能^[1,6].

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族属 I 型酪氨酸激酶细胞膜受体, 包括 EGFR, c-erbB-2 (HER-2/Neu), c-erbB-3, c-erbB-4 等 4 个成员. 目前认为, EGFR 磷酸化在调节细胞增殖及分化中起着至关重要的作用^[7,8], EGFR 主要通过 Ras \rightarrow Raf \rightarrow MAPK 及 PLC γ -PI3K-AKT/PKC 两条途径将信号传递入核, 激活 AP-1 等转录因子^[9]. 研究表明, EGFR 在大多数肿瘤中存在过表达, 并通过信号转导级联反应导致细胞生长失控和恶性转化. EGFR 过表达肿瘤患者预后较差, 患者肿瘤转移率和复发率高, 复发间期和存活期短, 说明 EGFR 在肿瘤转移中具有重要的作用, 与肿瘤的发生、发展及预后有着密切的关系, 已成为抗信号转导治疗肿瘤的重要分子靶^[10].

近年来, 对 EGFR 家族成员受体核移位基因表达调控中意义的研究, 大大地拓宽了人们

2003-06-26 收稿, 2003-08-13 收修稿稿

* 国家杰出青年基金项目(批准号: 39525022)和科学技术部恶性肿瘤发生与发展的基础性研究项目(批准号: G1998051201)资助

** 联系人, E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

对细胞膜受体生物学功能的认识,并引起了人们的高度关注^[11].据报道,在配体 HRG 刺激下,c-erbB3 通过其羧基端核定位序列(nuclear location sequence, NLS)可全部移位入核^[12],而 c-erbB4 通过 Presenilin 依赖性 γ -secretase 的作用,其胞浆部分移位入核^[13].在口腔癌及乳腺癌等细胞中,均存在 EGFR 核移位,且 EGFR 移位后作为一种新型的转录因子,结合 cyclinD1 启动子中 AT 富含序列,具有反式激活功能^[14].这些研究结果提示 EGFR 在外界刺激下可发生核移位.

本研究利用我们建立的 Tet-on 系统调控 LMP1 表达的细胞系^[15,16],试图研究 LMP1 对 EGFR 核移位的调控作用,并分析了 EGFR 的 NLS 的作用.研究结果显示,LMP1 可调控 EGFR 的核移位,并呈一定的剂量效应,且为配体非依赖性.同时,还发现 EGFR 的 NLS 在 LMP1 调控 EGFR 核移位的过程中起一定的作用.

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^[15,16].该细胞培养液为 15%小牛血清的 RPMI 1640,37℃,5%CO₂,并维持 200 mg/L G418 和 50 mg/L 潮霉素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)浓度的增加,LMP1 呈现相应的表达增加.鼻咽癌细胞系 CNE2 也为本所建立的 EB 病毒阴性的低分化鳞癌细胞系,培养条件为 15%小牛血清的 RPMI 1640,37℃,5% CO₂.

1.2 细胞裂解和 Western blot

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,分别加入 0,0.006,0.06,0.6 和 6 μ g/mL Dox 进行处理 24 h.参照 Lin 等人^[14]方法,取上述各组已加 Dox 的 Tet-on LMP1 HNE2 细胞,用 1 \times PBS 洗 3~4 次后,胰酶消化收集.非核部分细胞裂解液(20 mmol/L HEPES, pH 7.0, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.5% Nonidet P40, 10 mmol/L PMSF, 1 \times Protein Inhibitor Mix, 2.5 mmol/L Sodium Orthovanadate)经匀浆器匀浆 30 次,1500 \times g 离心 5 min 以收集胞核部分.上清部分以 15000 \times g 离心 15 min 收集上清即胞浆蛋白.沉淀部分用非核分细胞裂解液中加入终浓度为 0.5 mol/L NaCl 后以抽提胞核蛋白,以 15000 \times g 离心 15 min 收集上清即胞核蛋白. BCA assay reagent 测定各组成部分的蛋白浓度,用于 Western blot 分析.取各组细胞 50 μ g 蛋白在不连续 SDS-PAGE 胶电泳,电转移至硝酸纤维膜上,再相应地加入一抗、二抗,EGFR 抗体针对 EGFR 羧基端(sc-03-G, Santa Cruz),LMP1 抗体购自 DAKO 公司(CS1-4).ECL 试剂(Pierce)显示蛋白带.

1.3 免疫荧光分析

Tet-on LMP1 HNE2 细胞在盖玻片上贴壁生长后,加入 0,0.006,0.06,0.6 和 6 μ g/mL Dox 处理 24 h,盖玻片经 PBS 洗涤后再经 4%多聚甲醛固定,然后与抗 EGFR 羧基端抗体(sc-03-G, Santa Cruz)温育,再后对应的连接 FITC 的抗 IgG 抗体作为二抗使其着色.以 50 μ g/mL 碘化丙啶(PI)衬染胞核.在激光扫描共聚焦显微镜(Bio-Rad MRC-1024ES)下观察已染色的细胞并进行图像分析.

1.4 质粒构建

全长 EGFR 的 GFP 融合表达质粒的构建: 直接从 pcDNA3.1-EGFR 表达质粒中经 *Xho* I 酶切获得 EGFR 全长序列, 去磷酸化后插入 pEGFP-C2(Clontech), 经 *Bgl* II 酶切鉴定所获得的质粒为正向插入即为 pEGFP-C2-Full EGFR 质粒. 含核定位序列(Nuclear localization sequence, NLS)和不含 NLS 质粒的构建: 根据 EGFR 基因的酶切分析图谱和 pEGFP-C2(Clontech)的克隆位点, 选用 *Xho* I 和 *Sac* II 作为克隆位点, 由此设计上游引物: 5'-CTCGAGCCGAAGGC-GCCACATCGT-3', 5'-CTCGAGCCTGCTGCAGGAGAGGGA-3' 和共同的下游引物 5'-CCG-CGGTGCTCCAATAAATTCCT-3', 经 LA Taq 酶(TaKaRa)扩增获得 PCR 产物, 经 T 克隆确定所获得片段大小后, 经 *Xho* I 和 *Sac* II 酶切后插入 pEGFP-C2 质粒即为 pEGFP-C2-NLS-EGFR, pEGFP-C2-NNLS-EGFR 质粒, 并经测序验证插入位点和 EGFR 突变体序列正确.

1.5 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. 按照说明, 转染前 24 h 将 Tet-on LMP1 HNE2 或 CNE2 细胞(LMP1 阴性)置于事先预置好盖玻片 6 孔细胞培养板培养, 用无血清培养基将 1 μ g 质粒调至 100 μ L, 再加入 5 μ L SuperFect(Qiagen), 混合后室温下放置 10 min, 再加入 350 μ L 完全培养基, 将 DNA-SuperFect 混合物加入 1 个培养孔中, 置 5% CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 5 h 后, 加入完全培养基(含 15% 小牛血清的 RPMI-1640)继续培养 36 h, 其中 CNE2 细胞取出盖玻片前加入 100 ng/mL EGF 处理 15 min, 取出盖玻片后直接置荧光显微镜下观察, 或抽提总蛋白用于 Western blot 分析. 50 μ g 蛋白在 8% 不连续 SDS-PAGE 胶电泳, 电转移至硝酸纤维膜上, 再相应地加入一抗 EGFR 抗体针对 EGFR 羧基端(sc-03-G, Santa Cruz)、二抗. ECL 试剂(Pierce)显示蛋白带.

2 结果

2.1 Western blot 证实 LMP1 诱导 EGFR 可存在于细胞核内

首先利用 Tet-on LMP1 HNE2 细胞, 加入不同浓度的 Dox(0.006-6.0 μ g/mL)诱导 LMP1 表达, Western blot 分析该系统中 LMP1 的可调控性. 从图 1 中可以看出, 该体系 LMP1 能被很好地诱导表达. 在此基础上, 分别抽提不同 Dox 剂量处理细胞后的胞浆蛋白和胞核蛋白, 从图 2 中可以看出, Tet-on LMP1 HNE2 细胞核内部分存在 EGFR 蛋白的表达, 且随 LMP1 蛋白表达增加而增加.

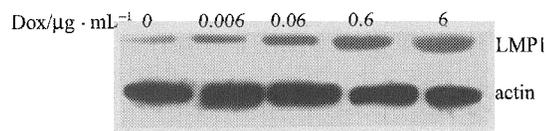


图 1 Western blot 分析 Tet-on LMP1 HNE2 细胞中 LMP1 和 EGFR 蛋白表达变化

Tet-on LMP1 HNE2 细胞加入 0.006~6 μ g/mL Dox 处理 24 h, 抽提总蛋白用于 Western blot, 以 actin 作为内对照, 结果显示随着 Dox 剂量的增加, LMP1 表达也相应地增加, 说明该细胞中 LMP1 可被较好地诱导表达

2.2 免疫荧光分析发现 LMP1 调控 EGFR 核移位

从定量、动态水平上观察到 LMP1 可调控 EGFR 核内表达后, 在激光共聚焦扫描显微镜下, FITC 标记的 EGFR 蛋白发出绿色荧光, PI 衬染细胞核发出红色荧光, 若两者存在共定位, 则不同程度地呈现出相互叠加的黄色荧光. 从图版 I (附本刊后)中可以看出, 在不同浓度 Dox (0.006~6.0 μ g/mL)诱导 Tet-on LMP1 HNE2 细胞 24 h 后, 发现诱导前细胞核内几乎无 EGFR 蛋白

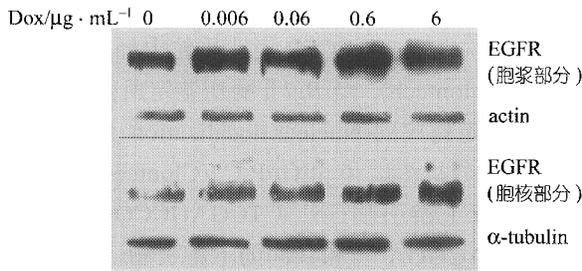


图 2 Western blot 分析 Tet-on LMP1 HNE2 细胞中胞浆和胞核部分 EGFR 蛋白表达变化情况

Tet-on LMP1 HNE2 细胞加入 0.006~6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox 处理 24 h, 抽提胞浆蛋白和胞核蛋白用于 Western blot, 以 actin 作为胞浆蛋白内对照, tubulin 为胞核蛋白内对照, 结果显示胞核不仅存在 EGFR 表达, 而且随着 Dox 剂量的增加, 核内 EGFR 表达也相应地增加

针对 EGFR 羧基端的抗体分析蛋白表达情况, 由于 CNE2 存在内源性 EGFR (170 kD) 且 GFP 分子量较小 (28 kD), 较难区分野生型 EGFR 和 GFP-EGFR, 但可与 NLS-EGFR 和 NNLS-EGFR 区分, 从图 3 结果中说明成功构建了本研究所需的 3 种 GFP 融合表达质粒.

2.4 LMP1 通过 EGFR 的 NLS 调节核移位

将 3 种 GFP 融合表达质粒导入 Tet-on LMP1 HNE2 细胞中, 以 Dox 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导 LMP1 表达, 同时以 GFP 空白载体作对照, 从图 4 中可以发现 pEGFP-C2-Full EGFR 在 LMP1 调控下主要表达于细胞核外, 而 pEGFP-C2-NLS-EGFR 主要表达于细胞核内, pEGFP-C2-NNLS-EGFR 则类似于空白质粒弥漫表达于细胞胞浆和核内. 这说明在 LMP1 调控下, EGFR 中 NLS 对蛋白定位于细胞核内起着一定的作用.

2.5 LMP1 调节 EGFR 核移位为配体非依赖性

在 LMP1 阴性的鼻咽癌细胞系 CNE2 中, 导入不同 GFP 融合表达质粒, 比较 EGFR 特异性配体 100 ng/mL EGF 处理细胞 15 min 前后, 从图 5 中可以发现细胞核内存在绿色信号较未处理组没有明显增加, 说明 EGF 不能引起 EGFR 的核移位增加, 从另一角度初步说明 LMP1 调控 EGFR 核移位为配体非依赖性.

3 讨论

EB 病毒是一种与人 Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌、Hodgkin 病, 甚至胃癌、肺癌等多种肿瘤发病相关的 DNA 致癌病毒^[1]. EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 被认为是重要的致瘤蛋白, 一直以来是 EB 病毒致瘤机制的研究核心. 本研究利用我们所建的 LMP1 可调控表达的鼻咽癌细胞系 Tet-on LMP1 HNE2^[16], 为实时、动态地研究 LMP1 调控 EGFR 提供了一个重要的细胞模型. 利用 Western blot 和 confocal 技术, 从定性、定量的水平发现 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 可使 EGFR 重新移位入核, 并且呈一定的剂量效应. 从一个新的角度提示 LMP1 调控 EGFR 在鼻咽癌发生发展过程中起重要作用.

传统的受体学说认为, 细胞膜受体作为第一信使, 在细胞膜上与其配体结合发挥其生物学效应, 也就是说细胞膜受体不能进入核内, 不能直接影响基因转录. 但近年来, 对 EGFR 家族成员受体核移位对基因表达调控中意义的研究, 大大地拓宽了对细胞膜受体生物学功能的

存在, 诱导后随着 Dox 剂量的增加, 黄色信号也随之增加, 说明 LMP1 可调控 EGFR 蛋白的核移位, 并呈一定的剂量效应.

2.3 构建 EGFR 不同突变体的 GFP 融合表达质粒

分析 EGFR 中核定位序列 (NLS)^[14], 发现其存在于 EGFR 胞内区近跨膜区. 为探讨 LMP1 调控 EGFR 核移位过程中, 其 NLS 究竟扮演着何种角色, 构建了 3 种不同 GFP 融合表达质粒, 在测序确证其插入位点和序列正确后, 将 3 种质粒分别导入 CNE2 鼻咽癌细胞系中, 抽提总蛋白, 采用

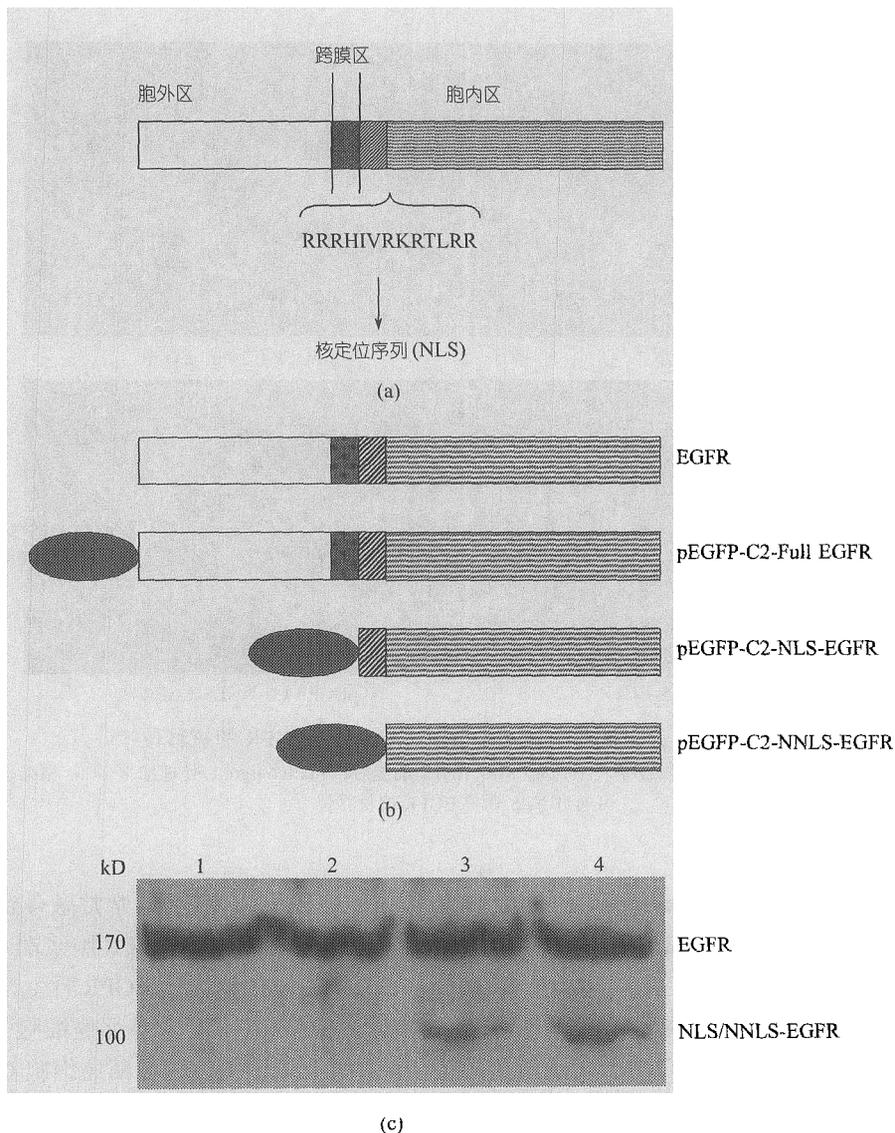


图 3 EGFR 蛋白模式图及构建 EGFR 及突变体 GFP 融合表达质粒

(a) EGFR 蛋白模式图及 NLS 所在部位; (b) GFP 融合表达质粒, 椭圆形示 GFP 蛋白; (c) EGFR 及突变体 GFP 融合表达质粒在 CNE2 表达情况. 1 示 pEGFP-C2; 2 示 pEGFP-C2-Full EGFR; 3 示 pEGFP-C2-NLS-EGFR; 4 示 pEGFP-C2-NNLS-EGFR

认识, 并引起了人们的高度关注^[11]. 转录因子、激酶和复制因子在细胞浆和核内的重新定位对于它们执行其功能是十分重要的, 并且磷酸化是它们重新分布时所必需的^[17-19]. 本研究发现 LMP1 也可诱导 EGFR 核移位, 并呈剂量效应, 但其移位的机制仍有待进一步研究. 我们以往的研究发现 LMP1 可促进 EGF 的分泌, 同时 LMP1 促进 EGFR 蛋白的表达, 从而促进了 EGF 与 EGFR 结合, 形成一个 LMP1 刺激的自分泌环路^[20,21]. 而 Lin 等人^[14]发现 EGF 处理乳腺癌细胞系 30 min 后, 核内存在 EGFR 蛋白, 由此, 我们推测 LMP1 引起 EGFR 的核移位可能与 EGF 的增加有关.

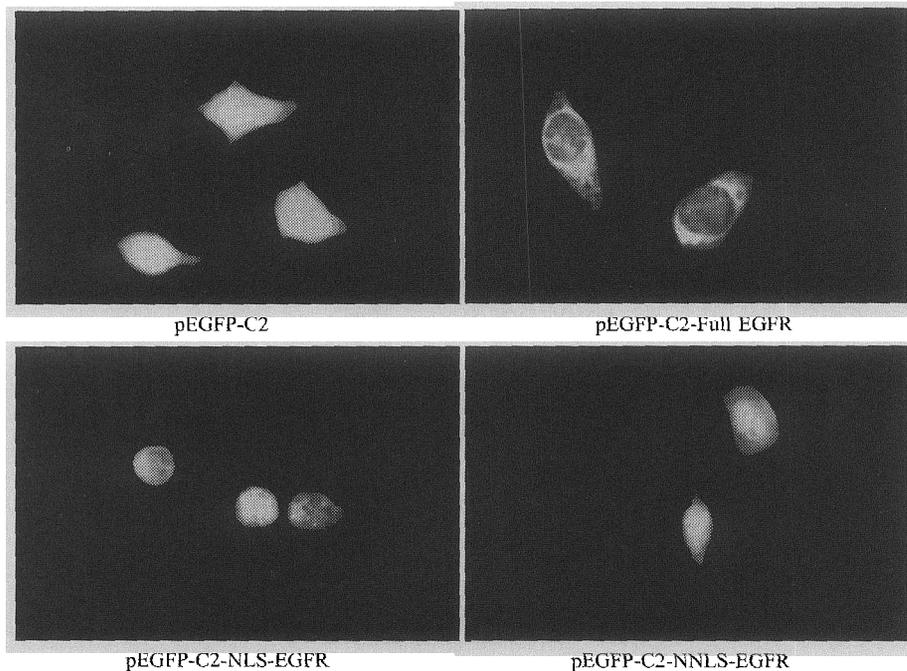


图 4 绿色荧光蛋白示 LMP1 通过 NLS 调控 EGFR 的核移位

将 EGFR 及其突变体的 GFP 融合表达质粒导入 Tet-on LMP1 HNE2 细胞后, Dox 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理细胞 24 h, 结果发现, LMP1 可通过 NLS 调控 EGFR 的核移位

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一种小分子量蛋白质, 常常融合到其他蛋白氨基端或羧基端示踪靶蛋白的定位情况. 我们注意到 Lin 等人^[14]发现 EGFR 胞浆端 645~657 存在核定位信号(NLS)RRRHIVRKRTLRR. 由此, 本研究还将 GFP 融合到 EGFR 野生型及有关 NLS 突变体的氨基端, 从而构建成不同的 GFP 融合表达质粒, 将其导入鼻咽癌细胞中, 发现 LMP1 可促进含 NLS 的 EGFR 融合表达蛋白的核移位. 而 LMP1 阴性的鼻咽癌细胞 CNE2 在 100 ng/mL 的 EGF 刺激下, EGFR 核移位较未经 EGF 刺激前没有明显增加, 这说明在 LMP1 调控下, EGFR 中 NLS 对蛋白定位于细胞核内起着一定的作用, 且 LMP1 调控 EGF 核移位为配体非依赖性, 仅仅是 EGFR 受体胞内区发生了部分核移位. 这一点与 c-erbB4 通过 Presenilin 依赖性 γ -secretase 的作用使其胞浆部分移位入核的结果类似^[13], 而不同于在配体 HRG 刺激下, c-erbB3 通过其羧基端核定位序列可全部移位入核^[12].

尽管外界因素和生长因子均可引起 EGFR 的核移位, 但 EGFR 如何移位至核内, 目前仍不清楚? 移位至核内的 EGFR 是如何具有功能, 如何发挥作用? 研究发现移位至核的 EGFR 可反式激活 cyclinD1 启动子^[14], 而 1,25(OH)₂D₃ 具有抑制细胞生长作用, 也可抑制 EGFR 的 DNA 结合能力和反式激活 cyclinD1 启动子的作用^[22], 这些证据说明移位至核的 EGFR 可作为一种新型的转录因子调节 cyclinD1. 另有报道, FGFR 在其配体刺激下, 全部移位入核并上调 c-Jun 蛋白的表达^[23]. 这些研究结果提示: 直接移位入核的细胞膜受体具有功能, 同时, 也明显提示 LMP1 调控 EGFR 核移位具有类似的功能, 具体作用仍有待进一步研究.

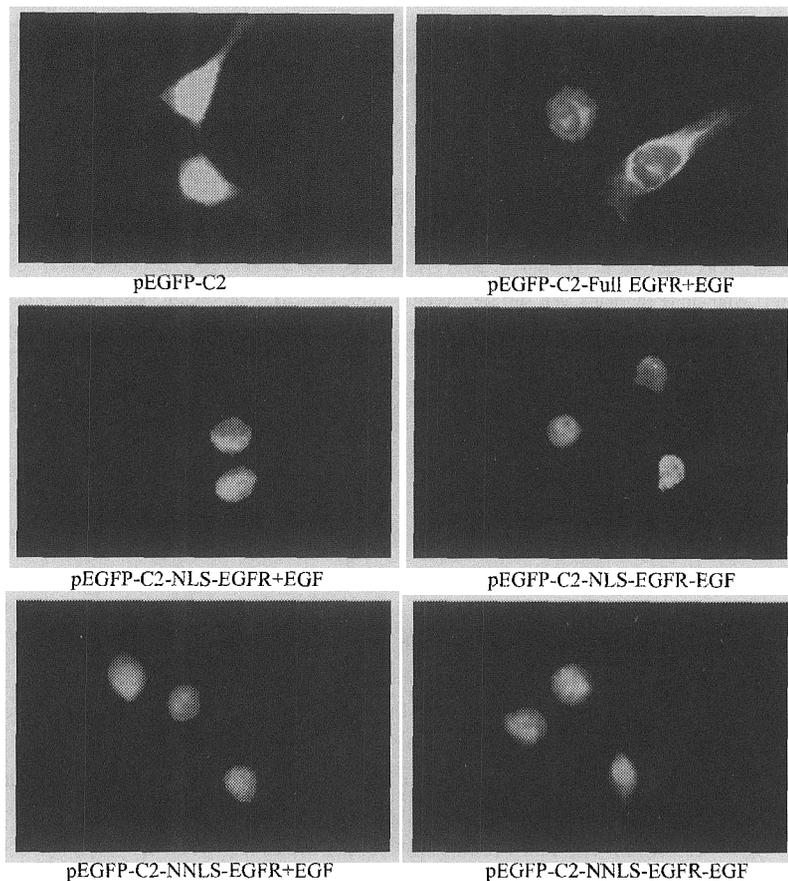


图 5 绿色荧光蛋白示 LMP1 调节 EGFR 核移位为配体非依赖性

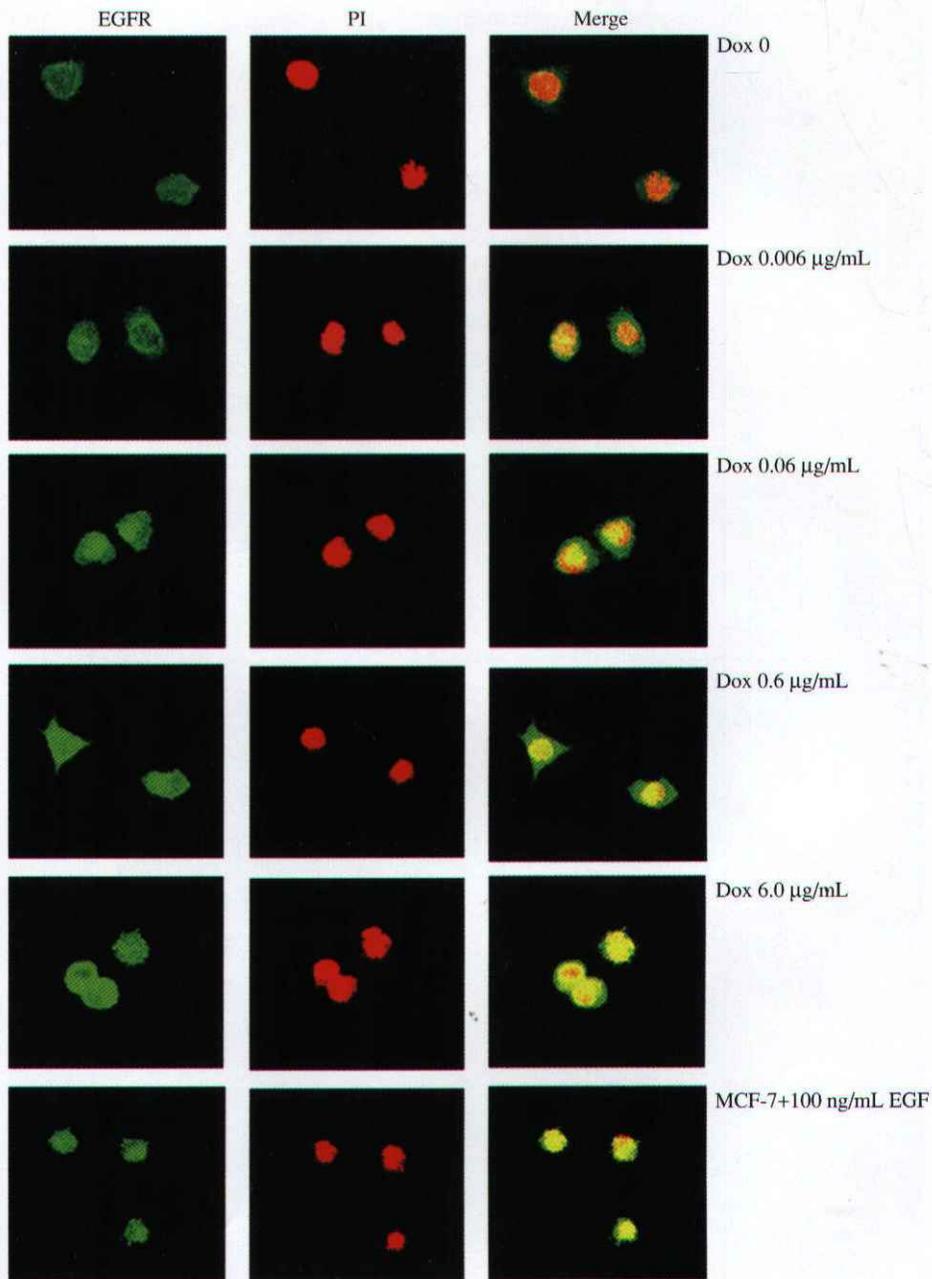
CNE2 鼻咽癌细胞导入不同 EGFR 的 GFP 融合蛋白后, 用 EGF 100 ng/mL 刺激细胞 15 min, 比较 EGF 刺激前后荧光变化情况, 结果提示, LMP1 调节 EGFR 核移位为配体非依赖性

致谢 衷心感谢厦门大学生命科学院为本次实验提供了 Confocal 技术平台, 同时也感谢叶晓峰、张斌、刘苏提供的帮助。

参 考 文 献

- 1 胡利富. EB 病毒编码的潜伏膜蛋白. 癌症, 2002, 21(5): 559~566
- 2 陶永光, 胡 智, 曹 亚, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 在鼻咽癌细胞中调节表皮生长因子受体磷酸化. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(3): 226~228
- 3 王承兴, 邓锡云, 曹 亚, 等. EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞系中通过 NF- κ B, AP-1 促进 MMP9 表达. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(1): 9~13
- 4 Zhao X R, Deng L, Cao Y, et al. Induction of cyclin D1 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 through activation of nuclear factor κ B. The 92st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2001, 42: 125
- 5 Mehl A M, Floettmann J E, Jones M, et al. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 regulation by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies pathways that cooperate with nuclear factor kappa B to activate transcription. J Biol Chem, 2001, 276(4): 984~992

- 6 Eiopoulos A G, Young L S. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol*, 2001, 11: 435~444
- 7 Duchek P, Rorth P. Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila oogenesis*. *Science*, 2001, 291: 131~133
- 8 许 新, 丛笑博, 张高权, 等. 胞内区功能缺失的 EGFR 基因对胚胎生殖细胞系 EG4 分化的影响. *科学通报*, 2001, 46(10): 816~817
- 9 Arteaga C L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist*, 2002, 7 (Suppl) 4: 31~39
- 10 陶永光. 以表皮生长因子受体为靶向的肿瘤信号转导干预治疗. *国外医学肿瘤学分册*, 2001, 28(2): 120~123
- 11 Wells A, Marti U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 697~702
- 12 Offtender M, Schofer C, Weipoltshammer K, et al. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, 2002, 157(6): 929~939
- 13 Lee H J, Jung K M, Huang Y Z, et al. Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J Biol Chem*, 2002, 277(8): 6318~6323
- 14 Lin S Y, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(9): 802~808
- 15 廖 伟, 易 红, 曹 亚, 等. 一株四环素及衍生物诱导表达的 Tet-on 鼻咽癌细胞系. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(1): 132~136
- 16 Liao W, Yi H, Cao Y, et al. Doxycycline dependent expression of EBV latent membrane protein 1 with Tet regulating system in NPC cell line. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, 1999, 31(3): 309~312
- 17 Nigg E A. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 1997, 386, 779~787
- 18 Kaffman, A, Rank N M, O'Neill E M, et al. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature*, 1998, 396, 482~486
- 19 Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, et al. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*, 1998, 8: 1049~1057
- 20 王承兴, 李晓艳, 曹 亚, 等. EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞系中上调 EGFR 表达. *中华肿瘤学杂志*, 2001, 23(4): 269~272
- 21 段朝军, 陈主初, 赵明伦, 等. EB 病毒 LMP1 与 EGF 自分泌在鼻咽癌生长中的作用及其相互关系. *湖南医科大学学报*, 1997, 22: 483~486
- 22 Cordero J B, Cozzolino M, Lu Y, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 2002, 277(41): 38965~38971
- 23 Reilly J F, Maher P A. Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J Cell Biol*, 2001, 152(6): 1307~1312



间接免疫荧光法和激光共聚焦显微镜示 LMP1 调控 EGFR 核移位变化情况

Tet-on LMP1 HNE2 细胞加入 0.006~6 $\mu\text{g/mL}$ Dox 处理 24 h, 以激光共聚焦显微镜观察 EGFR 蛋白的定位。绿色荧光为 FITC 示 EGFR 蛋白, 红色荧光为 PI 特异细胞核染色, 两者若存在核定位, 则出现黄色的叠加信号。MCF-7 乳腺癌细胞加入 EGF 刺激 15 min 作为阳性对照。结果发现 LMP1 可调控 EGFR 核定位, 并随 Dox 所诱导 LMP1 的增加而黄色信号即 EGFR 也随之增加