

## EXPRESSION OF P53 PROTEIN AND CYTOBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MALIGNANT TROPHOBLASTIC CELLS IN VITRO

ZHENG Wei SHI Yi-fu XIE Xing et al.

(Women's Hospital, Zhejiang University Medical School, Hangzhou 310006)

### ABSTRACT

Primary cell culture was made from 23 malignant trophoblastic tumors and 19 normal early pregnant villi. Immunohistochemical staining, RT-PCR, RIA and ELISA for P53 protein,  $\beta$ -hCGmRNA,  $\beta$ -hCG, hPL and IL-6 were employed. In the cell culture of malignant trophoblastic tumors, the cytotrophoblastic cells with abnormal proliferation and low differentiation were main type of cells in vitro. The P53 protein expression in 20 primary cultured malignant trophoblastic cells were significantly higher than that in normal early pregnant villi ( $P < 0.01$ ). The amounts of  $\beta$ -hCG and IL-6 were significantly higher than that in normal early pregnant villi ( $P < 0.05$ ). Expression of p53 protein and secretion of IL-6 may be involved in the abnormal proliferation and low differentiation of malignant trophoblastic cells.

**Key words:** Trophoblast tumor In vitro P53 protein

## Epstein-Barr 病毒感染对 CNE-2Z 不同细胞组分中 PKC 和 TPK 活性的影响\*

李岩松 陈小毅\* 孙宁\* 沈淑静\*

(广东医学院附属医院病理科 湛江 524001 \*广东医学院病理教研室 湛江 524023)

鼻咽癌在中国大陆南方各省、台湾和香港等地发病率较高。许多研究证实 Epstein-Barr Virus (EBV) 与鼻咽癌的发生密切相关。但 EBV 是通过什么机制来影响细胞生长, 目前仍不清楚。我们以低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 为模型, 探讨 EBV 感染后不同细胞组分中 PKC(蛋白激酶 C) 和 TPK(酪氨酸蛋白激酶) 活性变化与细胞生长的关系, 从细胞生物学变化的角度研究鼻咽癌的发生发展。

### 材料和方法

#### 1. 试剂及来源

CNE-2Z 和 B95-8(EBV 转化的绒猴淋巴细胞系) 细胞株由广东医学院病理教研室提供。RPMI-1640 培养基(Gibco 公司), 小牛血清(杭州四季青生物材料工程公司), MTT、TPA 及谷氨酰胺(Sigma 公司), 聚 Glu. Tyr(4:1), leupeptin、磷脂酰氨基酸(PS)和二酯酰

甘油类似物(Diolein)为 Sigma 产品。PIPES[piperazine-N, N-bis(2-ethanesulfonic acid)]、MOPS[3-(N-Morpholino)propane-Sulfonic acid]和 TritonX-100 为 Farco 产品。DTT 为 Serva 产品。其他试剂购自东风试剂厂或市售产品。EBV DNA-W 片段特异引物(北京医科大学病理教研室合成), 小鼠抗 EB 病毒早期抗原和 SP 免疫组织化学试剂盒购自迈新公司。

#### 2. EBV 的制备

按 Nemerow 等<sup>[1]</sup>报道的方法, 用 RPMI-1640 培养液将 B95-8 细胞浓度调至  $10^6$  个/ml, 置 33℃ 下不换液培养 12 天, 细胞悬液以  $1500 \times G$ , 20℃ 离心 15 分钟, 经  $0.8 \mu$  Millipore 膜过滤的上清液超速离心 ( $15000 \times G$ , 4℃ 离心 120min) 浓缩 100 倍, 置 -80℃ 保存备用。以 CBL 转化实验检测 EBV 的存在。

#### 3. EBV 感染 CNE-2Z 细胞实验

参照 Hedrick 等<sup>[2]</sup>相关的方法。实验分三组。EBV

本文 1999 年 1 月 1 日收到, 6 月 28 日接受。

\* 卫生部科学研究基金课题(批准号: 94-2-293)。

处理组(E组),将CNE-2Z细胞调整为 $2 \times 10^5$ 个/ml,分别于培养的第2、4天加入含EBV上清液2ml,37℃培养1小时后弃液,再加新鲜培养液常规培养5天(传代2次);EBV+TPA组(ET组),于培养的第2、4天加入含EBV上清液2ml,在第2次EBV感染的当天加入TPA(终浓度为 $10^{-6}$ /mol/L),培养1天,弃液换新鲜培养液继续培养4天传代两次;对照组(C组),不加任何处理,最后收集细胞备用。

#### 4. EBV基因检测

收集各组细胞(总数约 $10^6$ 细胞),用0.9% NaCl液洗涤细胞1次,加Lysis buffer液1ml和蛋白酶K30 $\mu$ l,混匀,37℃水浴24h后加入饱和酚1ml,5000rpm离心5min $\times$ 2,上清加1ml氯仿,混匀,5000rpm离心5min,取5 $\mu$ l上清作PCR。以EBV-W片段特异引物检测。用B95-8 DNA作阳性对照, $\lambda$ DNA作阴性对照,双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)作空白对照。

#### 5. 免疫组化染色

EBV早期抗原染色严格按SP法操作步骤进行,用B95-8细胞涂片为阳性对照,以PBS取代第一抗体作阴性对照。EBV早期抗原以胞浆出现棕黄色颗粒,阳性细胞百分率 $>5\%$ 阳性, $\leq 5\%$ 为阴性。

#### 6. 细胞体外增殖实验

参考文献<sup>[3]</sup>。培养的E,ET和C组细胞经胰酶消化、台盼蓝染色计活细胞数后,然后以含15%小牛血清的RPMI1640培养液调细胞浓度至 $2.5 \times 10^4$ /ml。于96孔培养板中,每孔加入0.2ml细胞悬液,每组5孔,同时设空白对照(加15%小牛血清生长液),置5%CO<sub>2</sub>培养箱温育。分别于第1、2、4和6天取出培养板,弃去培养液后,每孔加入10 $\mu$ l MTT(5mg MTT溶于PBS液1ml),4小时后每孔加入10%SDS 100 $\mu$ l,过夜,使MTT还原产物完全溶解后,以空白对照孔调零,酶标仪(DG-3022,上海,波长595nm)检测OD值。

#### 7. 胞液及膜性TPK酶液的制备

按Wong等法<sup>[4]</sup>改良。将备用细胞先经0.9% NaCl洗涤一次后,悬浮于缓冲液A[20mmol/L Tris-HCl(pH7.6),0.25mmol/L蔗糖,20mmol/L DTT,2mmol/L EDTA,0.5mmol/L PMSF和5 $\mu$ g/ml Leupoptin],于冰浴中超声粉碎细胞,700g离心10min去核,上清经100000g离心1h,上清液即胞液组分。沉淀溶于含0.5% TritonX-100缓冲液A,冰浴粉碎后0℃抽提1h,100000g离心2h,上清为TPK膜性组分。

#### 8. 胞液和膜性PKC酶液的制备

参考文献<sup>[5]</sup>。将备用细胞先经0.9% NaCl洗涤一

次,再悬浮于缓冲液B[20mmol/L Tris-HCl(pH7.5),10mmol EGTA,0.25mol/L蔗糖,0.5mmol/L PMST],冰浴中超声粉碎细胞,操作同TPK酶液制备。但100000g离心后的沉淀溶解于含有0.5% Triton X-100的缓冲液B,冰浴中超声粉碎抽提1h,100000g离心1h,上清液为PKC膜性组分。

#### 细胞核分离及胞核PKC、TPK酶液的制备

按Wray等法<sup>[6]</sup>改良。将备用细胞先经0.9% NaCl洗涤一次,再悬浮于缓冲液C[50mmol/L PIPES,pH6.5,含1mmol/L CaCl<sub>2</sub>,0.32mmol/L蔗糖,10mg/L Leupetin],冰浴中超声粉碎细胞,用四层纱布过滤。700g离心15min,沉淀为粗制细胞核。加入0.5ml核悬液[50mol/L Tris-HCl(pH7.5),0.3mol/L蔗糖,4mmol/L MgCl<sub>2</sub>,25mmol/L KCl,0.1mmol/L EDTA,1mmol/L DTT,10mg/L Leupeptin],混匀,再加含2mmol/L蔗糖的核悬液(核纯化液)。30000g 4℃离心35min,再以核悬液洗两次。在5mmol/L MOPS[pH7.0,含1mmol/L KCl,10mg/L Leupeptin,PKC酶液另含2mmol/L EDTA及EGTA]中含超声匀浆30s,共3次,冰浴1.5h,再100000g离心45min,上清液测TPK和PKC活力。

#### 9. TPK活性的测定

按Kong等法<sup>[7]</sup>改良。反应混合物总体积50 $\mu$ l,含终浓度50mmol/L Tris-HCl(pH7.5)50 $\mu$ mol/L NaVO<sub>3</sub>,7mg/ml pNPP,0.84mg/ml聚Glu. Tyr(4:1)(对照用H<sub>2</sub>O代替);适量酶液(50 $\mu$ mol/L V-<sup>32</sup>P-ATP(含1 $\mu$ Ci)和TPK样品13 $\mu$ l。于反应10min后,立即取全部50 $\mu$ l反应液点在一新华三号滤纸上,阴干,滤纸片用10%三氯醋酸(含1mmol/L ATP)清洗七次,现用无水乙醇洗涤一次,吹干后于LS600C Beckman液闪仪测cpm。以上条件测得的激酶活性减去不加聚Glu. Tyr(4:1)时所测得的活性即为TPK活性。样品均为三复管。

#### 10. PKC活性的测定

参考文献<sup>[6]</sup>。反应混合物总体积100 $\mu$ l,内含20mmol/L Tris-HCl(pH7.5),10mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.5mmol/L CaCl<sub>2</sub>,4 $\mu$ g/ml PS,0.8 $\mu$ g/ml diolein,0.2mg/ml组蛋白ⅡS,50 $\mu$ mol/L V-<sup>32</sup>P-ATP(含1 $\mu$ Ci)和PKC酶样品液20 $\mu$ l(约75 $\mu$ g酶蛋白)。以上条件测得的激酶活性减去用2mmol/L EGAT代替Ca<sup>2+</sup>、PS和diolein所测得的活性,即为PKC活性。于25℃反应10min后,立即吸取90 $\mu$ l反应液点于三张新华三号滤纸上。以下操作同TPK测定。

## 结 果

### 1. EBV 基因检测

用 PCR 法以 EBV DNA-W 片段特异性引物检测上述各组细胞,其中阴性对照组、ddH<sub>2</sub>O 组的基因阴性,而 B95-8、C、E、ET 组 EBV 基因为阳性(见图 1)。

### 2. 各实验组细胞 EBV 早期抗原产物表达

C、E、ET 组细胞均有 EBV 感染,但 E 和 ET 组 EBV 早期抗原表达明显高于 C 组,与对照组比较,差异有显著性( $P < 0.01$ )。而 ET 组与 E 组比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。结果见表 1。

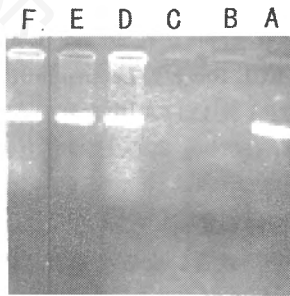


图 1 EBV 感染 CNE-2Z 细胞的 PCR 结果  
A. B9-58; B.  $\lambda$ DNA; C. ddH<sub>2</sub>O; D. C 组;  
E. E 组; F. ET 组。

Table 1 EBV early antigen detection of CNE-2Z cell lines infected by EBV and EBV plus TPA

Groupes	Positive cells (%)
	EBV early antigen
C	36.5
E	68.5**
ET	73.0**

\*\* compared with control,  $P < 0.01$ .

### 3. EBV 感染对 CNE-2Z 细胞体外增殖能力的影响

我们检测 EBV 和 EBV+TPA 感染 CNE-2Z 后第 1、2、4、6 天的 OD 值,发现从第 2 天开始 EBV 在体外可明显抑制 CNE-2Z 细胞增殖 ( $P < 0.01$ )。TPA 与 EBV 共同作用于 CNE-2Z 细胞后的第 1、2、6 天,也明显抑制细胞生长(与 C 相比  $P < 0.01-0.05$ )。TPA 在 EBV 感染 CNE-2Z 后第 1、2 天表现为协同 EBV 的抑制细胞生长作用(ET 与 E 组比较,  $P < 0.01-0.05$  结果见表 2)。

### 4. EBV 感染对 CNE-2Z 细胞三种亚细胞组分中 PKC 活性的影响

在对照组中,PKC 活性为膜性 > 胞核 > 胞液。EBV 和 EBV+TPA 再感染 CNE-2Z 细胞后,胞液 PKC 活性明显升高,膜性 PKC 显著降低。TPA 拮抗 EBV 升高胞液 PKC 活性。但

Table 2 Proliferation changes of CNE-2Z infected by EBV and EBV plus TPA in vitro

Groups	Day1	OD value(595nm)		
		Day2	Day4	Day6
C	0.22±0.02	0.53±0.05	1.80±0.18	2.15±0.13
E	0.23±0.02	0.45±0.02**	1.26±0.09**	1.52±0.29**
ET	#0.12±0.01**	#0.39±0.03**	#1.60±0.10	#1.96±0.01

\* compared with control,  $P < 0.05$ , #ET compared with E,  $P < 0.05$

\*\* compared with control,  $P < 0.01$ , ##ET compared with E,  $P < 0.01$

Table 3 Effects of EBV and EBV plus TPA on PKC activity in different cellular fractions from CNE-2Z cells

Groups	Cytosol	Activities(kcpm/min. mg <sup>-1</sup> protein)	
		Membrane	Nucleus
C	6.38±0.67	255.73±34.56	71.61±17.34
E	29.61±6.27**	104.40±37.77*	42.60±12.43
ET	#8.24±0.39*	122.34±25.21*	63.66±19.12

\*\* compared with control,  $P < 0.01$ ; \* compared with control,  $P < 0.05$ ; ##ET compared with,  $P < 0.01$ .

The experiments for PKC and PTK WERE REPEATED 3 and 4 times, respectively.

EBV 和 EBV+TPA 对胞核 PKC 活性没有影响(结果见表 3)。

5. EBV 感染对 CNE-2Z 细胞不同细胞组分 TPK 活性的影响:未处理 CNE-2Z 细胞中,TPK 活性为胞核>膜性>胞液。EBV 再感

染 CNE-2Z 细胞后,降低胞核 TPK 活性,但对胞液和膜性 TPK 活性无影响。而 EBV+TPA 再感染 CNE-2Z 后,降低膜性和胞核 TPK 活性,升高胞液 TPK 活性。TPK 有拮抗 EBV 升高膜性 TPA 作用(见表 4)。

Table 4 Effects of EBV and EBV plus TPA on TPK activity in different cellular fractions from CNE-2Z cells

Groups	Activities(kicpm/min. mg <sup>-1</sup> . protein)		
	Cytosol	Membrane	Nucleus
C	51.15±22.33	95.43±11.06	389.20±38.71
E	64.89±0.63	102.08±1.81	202.73±48.20**
ET	66.69±21.48**	##47.03±8.50**	193.22±15.33**

\*\* compared with control,  $P < 0.01$ , ## compared with E,  $P < 0.01$ .

The experiments for PKC and TPK were repeated 3 and 4 times, respectively.

## 讨 论

近来发现 CNE-2Z 存在 EB 病毒受体<sup>[8]</sup>。本研究证实 EBV 在体外可再感染 CNE-2Z 细胞。长期以来对 EBV 的研究都是基于其促增殖和抑制分化而设计的,所得出的大量结果也证明其与细胞增殖和去分化有关。但也有研究发现,EBV 和 TPA 在体外转染两株表达 EB 病毒受体的永生鳞状上皮细胞系(SVC-CR2、SCC12F-CR2)后,出现细胞内 EBV 复制增加,同时细胞出现分化<sup>[9]</sup>。这与我们的实验结果一致。

大量的研究已确定了 PKC 在细胞信号传递网络中的重要地位。EBV 再感染 CNE-2Z 受 PKC 调控<sup>[8]</sup>。但 EBV 再感染 CNE-2Z 后抑制细胞生长的机制,仍不清楚。研究发现 EBV 和 EBV+TPA 再感染 CNE-2Z 后,通过降低膜性 PKC 活性,升高胞液 PKC 活性来抑制细胞生长。这些结果提示不同亚细胞组分中 PKC 受不同的因素调控,在 EBV 感染 CNE-2Z 细胞时的表达变化不同,可能由不同的基因编码。加之 PKC 有多种亚型<sup>[10]</sup>,由不同的基因编码,不同亚型可能对 EBV 有不同的敏感性。当然也可能与感染的 CNE-2Z 细胞中 PKC 发生细胞内转位,即从膜性向胞液转位导致膜性 PKC 降低而胞液 PKC 升高。这些都有待进一步研究。

TPK 是另一种重要的蛋白激酶,已证明 TPK 包括 TPK 受体(如许多生长因子受体,主要位于细胞膜)和非受体 TPK(一些癌基因编码产物,位于胞浆和胞核)。本实验观察了 EBV 感染 CNE-2Z 细胞不同亚细胞组分中 TPK 活性变化,发现 EBV 通过降低膜性和胞核 TPK 活性,升高胞液 TPK 活性来抑制细胞增殖。近来有人发现<sup>[11]</sup>,TPK(pp60<sup>c-src</sup>)在有刺激因子作用时,存在转位现象。从本实验结果来看,不排除膜性和胞核 TPK 向胞液转位的可能性。但不能仅凭转位来解释不同亚细胞组分中 TPK 活性的变化,我们推测还可能与 EBV 抑制 CNE-2Z 细胞胞核中非受体 TPK 有关。这些值得今后深入研究。

## 摘 要

研究 EBV 体外再感染 CNE-2Z 细胞后,不同组分中 PKC(蛋白激酶 C)和 TPK(酪氨酸蛋白激酶)活性的影响,并探讨 PKC 和 TPK 活性与细胞增殖的关系。实验分三组即对照组、EBV 组和 EBV+TPA 组,用免疫细胞化学(以小鼠抗 EB 病毒早期抗原)检测 EBV 在体外能否再感染 CNE-2Z 细胞,用特异底物法和特异激活剂法分别测定其 PKC 和 TPK 活性,MTT 法检测 CNE-2Z 细胞体外增殖能力。结果显示未处理 CNE-2Z 细胞中 PKC 活性为膜性>胞

核>胞液,TPK为胞核>膜性>胞液。EBV和EBV+TPA再感染CNE-2Z细胞后,抑制细胞增殖,同时胞液PKC和TPK活性升高,膜性和胞核TPK和膜性PKC活性降低。本研究结果提示,EBV可能通过影响不同细胞组分中PKC和TPK活性来调节CNE-2Z鼻咽癌细胞的增殖。

关键词:鼻咽癌细胞株 Epstein-Barr病毒  
蛋白激酶 增殖

### 参 考 文 献

- [1] Nemrow, GR. et al., 1981, *J. Immunol.*, 127:272.
- [2] Hedric, JA. et al., 1992, *Eur J Immunol.*, 22:1123.
- [3] 黄谨, 1992, 白求恩医科大学学报, 18(4): 395.
- [4] Wong, WT. et al., 1983, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:2529.
- [5] Krug, E. et al., 1987, *Cancer Res*, 47:22436.
- [6] Wray, W. et al., 1970, *Exp Cell Res*, 59: 469.
- [7] Kong, SK. et al., 1987, *Bio Chem*, 262: 2597.
- [8] 吴锋, 赵明伦, 1995, 中华肿瘤杂志, 17(增刊):22.
- [9] Li QX, et al., 1992, *Nature*, 356:347.
- [10] 陈南岳, 1991, 生物化学与生物物理学进展, 10(4):269.
- [11] Murphy, CT. et al., 1995, *Biochemical Society Transactions*, 23:194.

## THE EFFECT OF EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION ON THE ACTIVITIES OF PROTEIN KINASE C AND TYROSINE PROTEIN KINASE IN DIFFERENT SUBCELLULAR FRACTIONS OF CNE-2Z CELL LINE IN VITRO

LI Yan Song\* CHEN Xiao Yi\*\* SUN Ning\*\* SHEN Shu Jing\*\*

(\* Department of Pathology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524001.

\*\* Department of Pathology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524023)

### ABSTRACT

In order to explore the effect of EBV infection on the activities of protein kinase C(PKC) and tyrosine protein kinases (TPK) in different subcellular fractions of CNE-2Z cell line in vitro. Polymerase chain reaction (PCR), immunocytochemical staining, MTT assay and kinase assay were employed in our experiment. The results showed that in vitro EBV can reinfect CNE-2Z cell line (positive rates of early antigen from group E and ET were markedly higher than of early antigen from group C.). After reinfection by EBV and EBV combined with TPA, OD value of MTT of group E and group ET were distinctly lower than that of control group ( $P < 0.01$ ). It was found that in group C the activity of PKC was membranous > nuclear > cytosolic; the activity of TPK was nuclear > membranous > cytosolic. After treatment with EBV and EBV combined with TPA, the membranous and nuclear TPK and membranous PKC were obviously decreased. The cytosolic PKC and TPK were significantly elevated. Our study suggested that the proliferation of CNE-2Z cells infected by EBV and EBV combined with TPA is related to the changes of PKC and TPK activities in three different subcellular fractions in vitro.

Key words: Epstein-Barr virus Nasopharyngeal carcinoma Protein kinase Proliferation

## 微血管内皮细胞的分离、纯化、鉴定及基因转移的研究

苏 宁 严 航 李 懿 萍

(南京铁道医学院病理教研室 南京 210009)

血管内皮细胞位于血液和组织之间,除了构成完整的血管内膜、维持血管内、外液体平衡外,随着生物学研究的进展,尚发现它能分泌多

种生物活性物质,在凝血、炎症、修复等病理过

本文1999年3月5日收到,11月2日接受。