# EB病毒潜伏膜蛋白 1 介导c-Jun/Jun B异源二聚体对cyclin D1 的调节*

宋 鑫[①] 陶永光[①] 曾 亮[①] 杨 静[①] 唐发清[①] 黎民敬[②] 龚建平[③] 吴 乔[④] 曹 亚[①**]

(① 中南大学湘雅医学院 肿瘤研究所, 长沙 410078; ② Laboratory of Molecular Technology SAIC-Frederick, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702, USA; ③ 华中科技大学同济医学院分子医学中心, 武汉 430030; ④ 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 研究发现 LMP1 可介导 c-Jun/JunB 活性异源二聚体的形成, 在此基础上, 利用建立的 Tet-on 系统调控 LMP1 表达的细胞系, 采用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、荧光素酶活性检测、Super-EMSA 方法和流式细胞术, 探讨 LMP1 介导 c-Jun/Jun B 异源二聚体对 cyclin D1 的调节功能. 结果表明, LMP1 介导的 c-Jun/Jun B 异源二聚体可上调 cyclin D1 启动子活性及其表达, 并影响细胞周期的行进.

关键词 潜伏膜蛋白 **1** **c-Jun** **Jun B** 异源二聚体 **cyclin D1** 细胞周期

我们最新的研究工作已经证实[1]: 在鼻咽癌细胞中, EB病毒潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein, LMP1)激活JNK, 动态调控JunB和c-Jun表达及翻译后修饰, 介导c-Jun/JunB新的活性异源二聚体形成.

c-Jun/JunB 异源二聚体作为 AP1 重要的转录因子, 其功能性活化的重要证据是通过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、凋亡分化等生物学效应. 因此, 为了进一步探索 c-Jun/JunB 活性异源二聚体的作用, 寻找其调控的靶基因至关重要.

令人感兴趣的是, 新近的文献研究, 在c-Jun/JunB介导的信号传导通路和细胞周期G1/S期相关重要靶基因cyclin D1 之间建立起新的直接的联系. 利用人HeLa细胞系研究证实, c-Jun在靶基因cyclin D1 启动子上有两个AP1 样结合位点用以激活cyclin D1 启动子[2]; 新近的研究表明, JunB和c-Jun为相互拮抗转录调节因子, JunB/c-Jun这一比例决定cyclin D1 在早G1 期的转录与细胞周期的平衡; 在细胞周期过程

2004-03-12 收稿, 2004-09-02 收修改稿
* 国家重点基础研究发展规划(973 计划)(批准号: G1998051201)、国家自然科学基金(批准号: 30300403, 30100005, 30000087)和国家杰出青年科学基金(批准号: 39525022)资助项目
** 联系人, E-mail: Ycao98@public.cs.hn.cn

中, JunB和 c-Jun的磷酸化增强其转录活性, 并调节JunB/ c-Jun的动态平衡, 最终调控cyclin D1 启动子活性, 影响其表达[3].

我们前期的研究工作已经证实, 在mRNA水平上, 用Atlas™ Human cDNA expression array I (Clontech公司) 检测人体正常鼻咽组织与鼻咽癌组织基因表达, 发现鼻咽癌组织cyclin D1 表达上调[4,5]; 在蛋白质水平上, 我们已初步证实cyclin D1 在人体鼻咽癌组织异常过表达, 表明可能与鼻咽癌的发病有关[6]; 在由鼻咽柱状上皮单纯性增生/化生、异型增生/化生和鼻咽癌癌变多阶段过程cyclin D1 表达呈增高趋势, 其中在异型增生/化生中呈"一过性增高", 提示cyclin D1 蛋白过表达可能为鼻咽癌发生过程中的早期事件, 异型增生/化生可能是鼻咽癌癌变多阶段的重要"关卡"[7]. 进一步的研究工作表明, EB病毒LMP1 通过其介导的NF-κB, AP-1 信号传导途径及其之间的cross-talk[8,9], 可能整合信号于细胞周期重要调节因子cyclin D1[10,11], 从而参与鼻咽细胞增殖紊乱及凋亡失控[12]. 上述大量的工作基础提示: cyclin D1 很可能受EB病毒LMP1 诱发形成的c-Jun/JunB异源二聚体的异常调控.

我们在前期研究工作基础上[1], 进一步研究c-Jun/JunB异源二聚体对细胞周期相关重要靶基因cyclin D1 的调控作用. 该分子机制的阐明, 有助于从一个新的角度重新审视EB病毒LMP1 功能性活化c-Jun/JunB异源二聚体的意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和培养条件

Tet-on-LMP1 HNE2 鼻咽癌细胞系[13]为本所构建的、LMP1 表达受四环素衍生物强力霉素(doxycycline,Dox, Sigma公司)调控的鼻咽癌细胞系, LMP1 被Dox诱导表达呈时间依赖性和剂量依赖性增强. 该细胞培养条件: 含 15%小牛血清的RPMI 1640 (Sigma公司), 37℃, 5% $CO_2$, 并维持 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.

### 1.2 细胞总蛋白和核蛋白的抽提

根据文献抽取细胞总蛋白[14]和核蛋白[15], –70℃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, 电转移至硝酸纤维膜(Schleicher & Schuell)上, 再相应地加入一抗、二抗, ECL 试剂(Pierce)显示蛋白带. 抗体使用如下: LMP1 抗体购自 DAKO 公司(CS1-4); c-Jun/AP1(D)-G(sc-44-G), c-Jun 抗体(sc-1694), JunB (sc-8051), cyclin D1(H-295)和 α-tubulin 抗体(sc-5286) 购自 Santa Cruz 公司.

### 1.4 质粒抽提和瞬间转染

按照质粒抽提试剂盒说明(QIAGEN, Cat.No. 12163)抽提质粒; 按照SuperFect®转染试剂说明(QIAGEN)在 6 孔培养板(Costar)中进行质粒瞬间转染; 通过荧光酶试剂盒(Promega, Cat:E4531)分析LMP1 对cyclin D1 启动子的调节活性; 采用统计软件SPSS 11.0 one-way ANOVA对荧光素酶活性检测结果进行单因素方差统计分析; 采用β-galactosidase活性检测试剂盒(Promega, Cat:E2000)校正转染效率. 有关质粒的使用: cyclin D1 荧光酶报道质粒由M. Strauss博士惠赠[16]; β-galactosidase 表达质粒(pRSVβ-gal)由N. D. Perkins博士惠赠[17].

### 1.5 激光共聚焦荧光显微镜(laser confocal fluorescence microscope, LCFM)检测

用 0.6 μg/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(PBS 配制)4℃固定、漂洗; 取出盖玻片置于载玻片上加 cyclin D1 一抗孵育(H-295, Santa Cruz)过夜; 加针对 cyclin D1 FITC 标记的二抗(F1202, Sigma), 4℃湿盒过夜, 漂洗, 封闭剂(含防淬灭剂)封片; 激光共聚焦荧光显微镜下(Bio-Rad, MRC 1024ES)观察, Lasersharp 软件对结果进行分析处理.

### 1.6 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. 为了分析

c-Jun/JunB异源二聚体与人cyclin D1 启动子区结合能力, 根据文献设计针对人cyclin D1 启动子区两个AP1 双链探针(探针 1: 5′-AAAAAATGAGTCAGAA-TGGAG-3′和探针 2: 5′-CAACAGTAACGTCACACG-GAC-3′)[2], 同时, 根据文献设计AP1 双链探针(5′-TTCCGGCTGACTCATCAAGCG–3′)序列[18,19]和SP1 双链探针(5′-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3′)序列[19,20], 上述探针由美国国立癌症研究院SAIC-Frederick分子技术实验室合成探针并用生物素进行DNA 3′末端标记. 以不加相应抗体的体系作为阴性对照, 用SP1 探针(5′-ATTCGATCGGGGCGGG-GCGAGC-3′)作为校正实验(结果未显示). C-Jun (sc-1694), JunB(sc-8051)和C-Jun/AP1(D)-G(sc-44-G)抗体购自Santa Cruz公司.

### 1.7　流式细胞术 DNA 含量分析法

$1\times10^6$细胞于 70%的乙醇中固定、漂洗, 离心收集细胞, 0.2 mol/L柠檬酸/柠檬酸钠高渗处理 30 min, PBS漂洗, 0.1% Triton(PBS配制)漂洗, DNA染液(内含 500 μg/mL PI和 0.1% Rnase A)室温避光染色 30 min, 流式细胞仪(机器型号: ELITE, 激光波长: 488 nm; 功率: 15 mW, Beckman-Coulter公司, 美国)检测, MULTYCYCLE软件(PHEONIX公司, 美国)进行DNA 周期分析, 计算细胞各期的百分数.

### 1.8　流式细胞术双参数分析法

$2\times10^6$细胞于–20℃纯甲醇中固定, 离心收集细胞; 0.25% Triton X-100(PBS配制)冰上处理 5 min, PBS洗涤; 加入 1% BSA稀释的cyclin D1 抗体(稀释浓度为 1∶100) (DCS-6, DAKO)4℃孵育过夜; 加入FITC标记的二抗(1∶40 稀释) (F2266, Sigma), 室温下避光孵育 30 min; 洗涤后用 500 μg/mL PI和 0.1% RNase A室温避光染色 30 min; 同型对照采用IgG同型非特异性抗体以排除实验中的非特异性结合. 经上述处理的细胞悬液, 荧光标记成功后, 应用FACSort流式细胞仪(Becton Dickson, 美国)检测, 经 488 nm 激光激发, 被标记细胞发射的红色(PI)和绿色(FITC)荧光分别被FACSort流式细胞仪的标准透镜接收. 应用Cellquest软件(Becton Dickson, 美国)对上述所测细胞进行分析.

## 2　结果

### 2.1　EB 病毒 LMP1 介导下 c-Jun/JunB 异源二聚体具有与 cyclin D1 启动子结合的活性

利用 Tet-on LMP1 HNE2 细胞, 加入不同浓度的 Dox (0.006~6.0 μg/mL)诱导 LMP1 表达, Western blot 结果表明 LMP1 表达在 0.6 μg/mL 剂量诱导下达到高峰, 6 μg/mL 剂量诱导下 LMP1 表达维持在几乎同样水平(图 1(a)), 因此, 我们采用 0.6 μg/mL 的 Dox 诱导剂量, 检测不同时间的 LMP1 表达水平. 结果表明, 随着 Dox 诱导时间的延长, EB 病毒 LMP1 蛋白表达呈时间依赖性增强(图 1(b)).

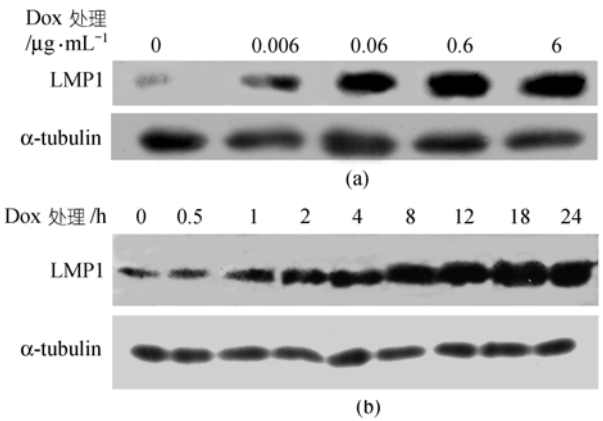


图 1

(a) Western blot 分析不同浓度 Dox 诱导下 Tet-on LMP1 HNE2 细胞 LMP1 蛋白表达的改变. 不同剂量 Dox 处理细胞, 100 μg 蛋白在 8% SDS-PAGE 电泳, 转膜, LMP1 一抗孵育, 二抗孵育, ECL 发光, X 线胶片显带. α-tubulin 为内对照校正实验. (b) Western blot 分析 0.6 μg/mL Dox 诱导下 Tet-on LMP1 HNE2 细胞 LMP1 蛋白表达在不同时间点的改变. 0.6 μg/mL Dox 在不同时间段处理细胞, 100 μg 蛋白在 8% SDS-PAGE 电泳, 转膜, LMP1 一抗孵育, 二抗孵育, ECL 发光, X 线胶片显带. α-tubulin 为内对照校正实验

我们新近的研究证明, 0.6 μg/mL Dox 诱导 LMP1 表达后 12 h 能够有效地促进 c-Jun/JunB 二聚体形成, 同时与 AP1 DNA 结合活性显著增强. 因此, 用同样的条件处理细胞并提取细胞核蛋白, 结果发现, c-Jun/JunB 异源二聚体组分 c-Jun 和 JunB 均具有与 cyclin D1 启动子区探针 1 结合的活性(图 2), 这为进一

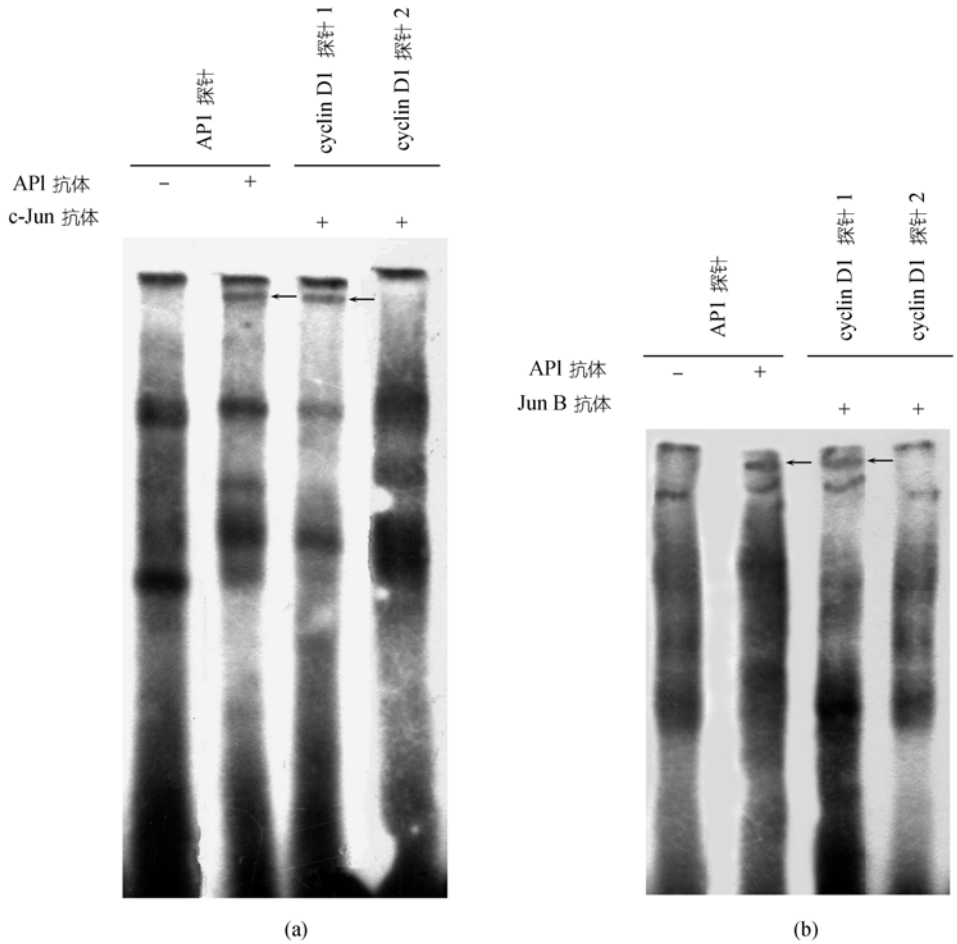


图 2 Super-EMSA 方法分析 0.6 μg/mL Dox 诱导 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞 12 h 时 c-Jun/JunB 异源二聚体与 cyclin D1 启动子探针结合的活性

(a) 检测 c-Jun 亚基与 cyclin D1 启动子探针的结合; (b) 检测 Jun B 亚基与 cyclin D1 启动子探针的结合. 0.6 μg/mL Dox 处理 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞 12 h, 提取核蛋白, 5 μg 核蛋白和 20 fmol 3′末段生物素标记双链探针孵育, c-Jun 或 Jun B 抗体加入 20 μL 反应体系. sp1 双链探针作为校正实验

步研究 c-Jun/JunB 异源二聚体对 cyclin D1 的调节作用提供了实验依据.

### 2.2 EB 病毒 LMP1 介导 c-Jun/JunB 异源二聚体激活 cyclin D1 启动子, 上调其表达

将 cyclin D1 荧光酶报道质粒和β-gal 校正质粒共转染 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞, 结果显示, 不同剂量 Dox 诱导 24 h 后, 与未诱导相比, cyclin D1 荧光素酶活性逐渐增加, 在 6 μg/mL Dox 诱导浓度, cyclin D1 荧光素酶活性增加到 6 倍以上($P < 0.05$) (图 3).

在确定 EB 病毒 LMP1 介导下 c-Jun/JunB 异源二聚体具有与 cyclin D1 启动子结合活性和调节启动子转录活性的实验基础上, 进一步研究其对 cyclin D1 蛋白表达水平的调节. 结果显示: cyclin D1 蛋白表达呈剂量依赖性增加(图 4), 表明 LMP1 调节 cyclin D1 上调呈剂量依赖效应.

利用荧光标记联合激光共聚焦荧光显微技术, 以不加 Dox 诱导为对照, 分别检测不同的时间点 0.6 μg/mL 诱导 LMP1 表达的情况下, 定性分析 cyclin D1 在细胞核分布变化. 结果显示, 在激光共聚焦荧光显微镜下, FITC 标记的 cyclin D1 蛋白发出绿色荧光; PI 衬染细胞核发出红色荧光. 在 Dox 诱导 Tet-on-LMP1

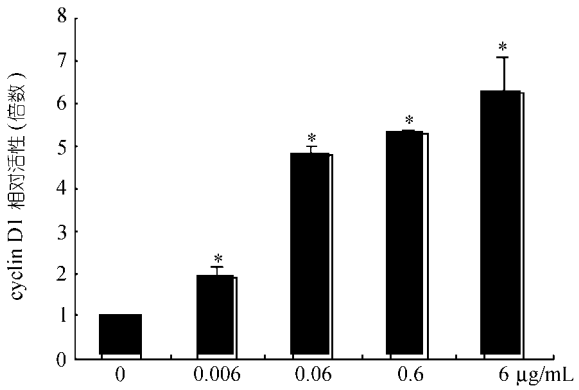


图 3　不同剂量 Dox 诱导下 cyclin D1 启动子相对活性改变

不同浓度Dox处理细胞, 裂解液裂解细胞, 单光子检测仪检测荧光酶活性. 结果为 3 次实验的平均值(* 示$P < 0.05$, 与 0 μg/mL Dox处理组比较) β-gal 表达质粒作为内对照校正实验

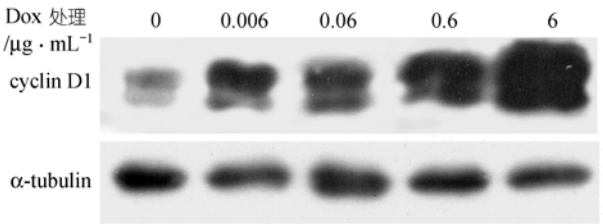


图 4　Western blot 方法分析不同剂量 Dox 诱导对 cyclin D1 蛋白表达的影响

不同剂量的 Dox 处理细胞, 100 μg 蛋白在 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜, cyclin D1 一抗孵育, 二抗孵育, ECL 发光, X 线胶片显带. α-tubulin 为内对照校正实验

HNE2 细胞后 2, 4 和 8 h 时间点, 有广泛的相互叠加的黄色荧光分布, 但是 12 h 时间点黄色荧光在细胞核分布明显减少, 24 h 时间点几乎消失(图 5).

进一步采用 Western blot 方法定量分析 0.6 μg/mL Dox 诱导下, LMP1 介导 cyclin D1 表达的时间效应, 结果表明, cyclin D1 表达 0.5 h 开始增强, 并维持较高水平直至 8 h, 从 12 h 开始下降, 24 h 表达十分微弱(图 6).

### 2.3　EB 病毒 LMP1 介导 c-Jun/JunB 异源二聚体通过调控 cyclin D1 表达影响细胞周期的行进

在发现 LMP1 介导下形成的 c-Jun/JunB 异源二聚体, 增强 cyclin D1 启动子活性, 上调 cyclin D1 表达的实验基础上, 我们进一步利用流式细胞术 DNA 含量分析方法, 以不加 Dox 诱导为对照, 在 0.6 μg/mL Dox 诱导下, 检测 Tet-on LMP1 HNE2 细胞在高水平持续表达的 cyclin D1 作用下不同时间点细胞周期变化. 结果发现, Dox 诱导后几乎各个时间点 G1 期细胞百分数不同程度地升高; S 期和 G2 期细胞百分数不同程度地下降(表 1, 图 7).

为了更进一步阐明上述细胞周期的细胞百分比改变与 cyclin D1 表达时相的相关性, 我们利用 DNA 含量和平均荧光强度双参数方法检测 cyclin D1. 结果表明, 在 Dox 诱导仅仅 0.5 h 内, cyclin D1 平均荧光强度明显升高; 在 0.5 至 8 h 内, 维持在较高水平的平台期内; 8 至 24 h 则明显减弱(图 8).

## 3　讨论

我们前期的研究工作已经证实, 鼻咽癌细胞中 EB病毒LMP1 通过TRADD 和TRAF激活JNK[21],上调 AP1 转录活性[22,23], 增强AP1 DNA结合能力[9]. 同时发现, 鼻咽癌细胞中LMP1 活化cyclin D1 的表达[11], 导致细胞增殖紊乱[10,12]. 我们最新的研究工作证实: 在鼻咽癌细胞中, LMP1 介导c-Jun/JunB活性异源二聚体形成[1].

在上述研究工作基础上, 本文的研究发现, LMP1 介导 c-Jun/JunB 异源二聚体调控 cyclin D1 启动子活性及其蛋白表达(图 3~5), 这为进一步阐明

表 1　0.6 μg/mL Dox 诱导下 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞在不同时间点的细胞周期时相分布/%

| 时相 | 时间点/h | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 18 | 24 |
| Dox(−)/G1 | 55.8 | 53.9 | 53.1 | 49.2 | 41.7 | 48 | 57.8 | 65.7 | 66.3 |
| Dox(+)/G1 | 55.8 | 57.7 | 55.1 | 52.5 | 42.4 | 52.2 | 58 | 70.2 | 74.1 |
| Dox(−)/S | 40.8 | 43.2 | 43.7 | 48.9 | 52.1 | 40.6 | 29.5 | 24.1 | 26.4 |
| Dox(+)/S | 40.8 | 40.2 | 42.6 | 46 | 51.8 | 36.5 | 28.6 | 20.9 | 21.7 |
| Dox(−)/G2 | 3.4 | 2.9 | 3.2 | 1.9 | 8.7 | 11.4 | 14.5 | 10.2 | 7.3 |
| Dox(+)/G2 | 3.4 | 2.1 | 2.3 | 1.5 | 5.8 | 11.3 | 13.4 | 8.9 | 4.2 |

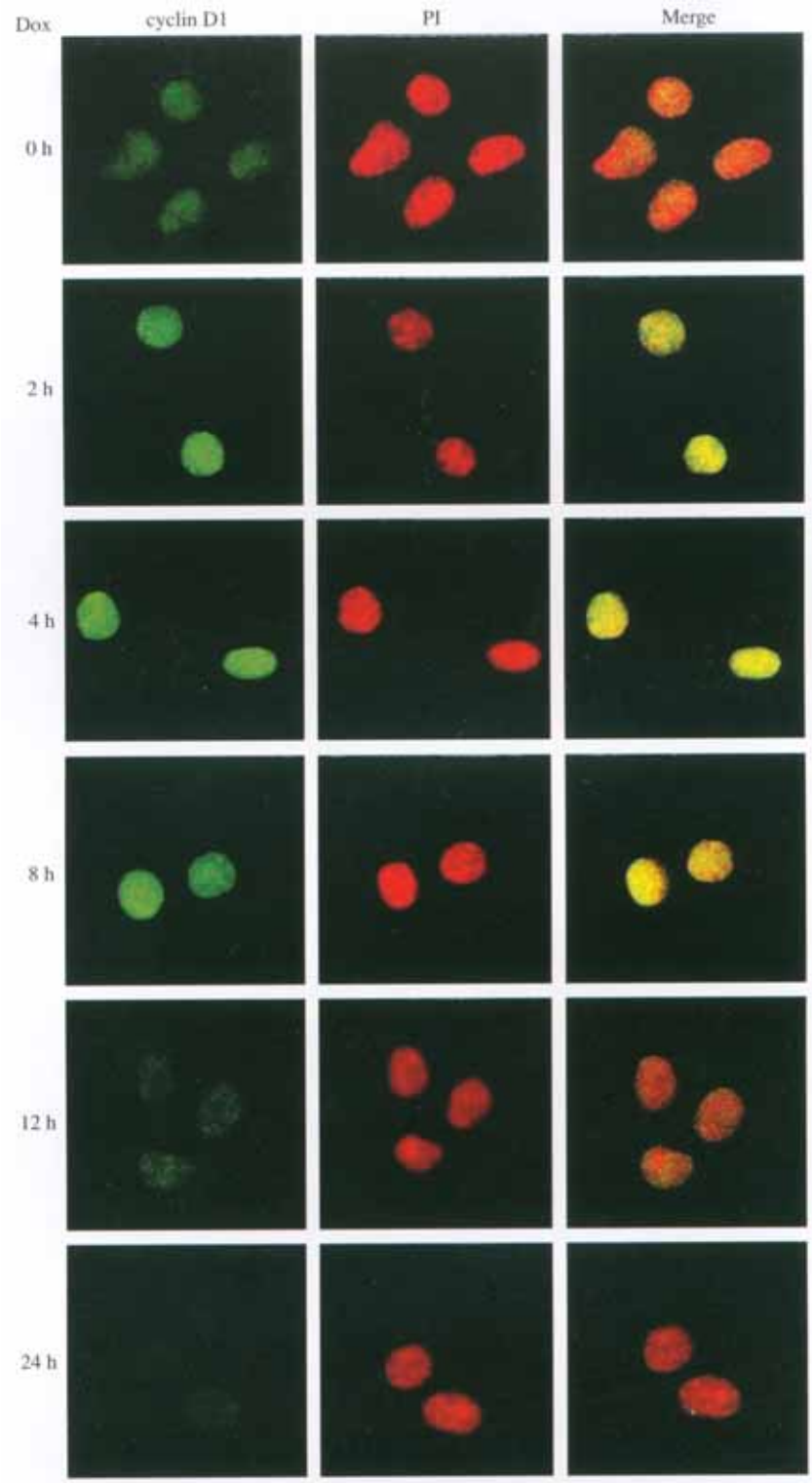


图 5 间接免疫荧光法和激光共聚焦显微镜示 LMP1 调控 cyclin D1 在核内的分布

Tet-on LMP1 HNE2 细胞加入 0.6 μg/mL Dox 处理不同时间，以激光共聚焦显微镜观察 cyclin D1 蛋白的核内分布. 绿色荧光为 FITC 示 cyclin D1 蛋白，红色荧光为 PI 特异细胞核染色, cyclin D1 若存在核定位，则出现黄色的叠加信号

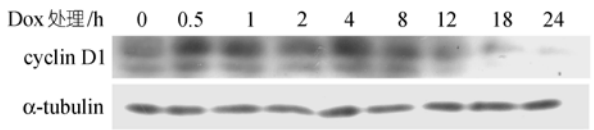


图 6　Western blot 方法分析不同时间 Dox 诱导下 LMP1 调控 cyclin D1 蛋白表达变化

0.6 μg/mL Dox 在不同时间段处理细胞, 100 μg 蛋白在 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜, cyclin D1 一抗孵育, 二抗孵育, ECL 发光, X 线胶片显带. α-tubulin 为内对照校正实验

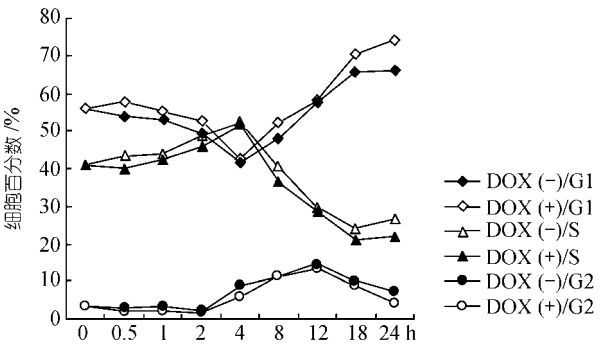


图 7　0.6 μg/mL Dox 诱导下 LMP1 调控 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞在不同时间点的细胞周期时相分布

0.6 μg/mL Dox 在不同的时间段处理细胞, 70%乙醇中固定, PI 染核, 用 Beckman-Coulter 公司流式细胞仪检测, MULTYCYCLE 软件分析

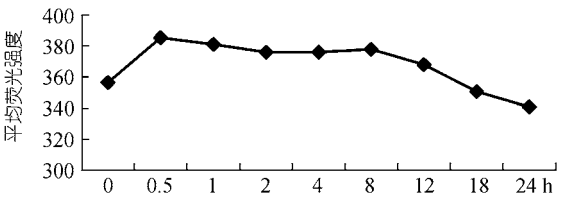


图 8　0.6 μg/mL Dox 诱导下 LMP1 调控不同时间点的 Tet-on-LMP1 HNE2 细胞在细胞周期中 cyclin D1 平均荧光强度变化

0.6 μg/mL Dox 在不同时间段处理细胞, −20℃纯甲醇固定, FITC 显示 cyclin D1 蛋白, PI 显示 DNA 含量, 采用 FACSort 仪双参数分析 cyclin D1 荧光强度

LMP1 通过 AP1 信号传导途径对细胞周期直接调控所产生的生物学效应提供了重要的实验依据.

细胞周期不同时相间存在着G1/S, G2/M等一系列类似“开关”式的关键检测点, 具有监视和调控细胞周期时相的作用, 使其正常转换, 以保证各个细胞周期事件的启动、完成, 忠实地按序进行, 其中G1/S检测点至关重要[24].

肿瘤是一类细胞周期性疾病[25]. 细胞周期受一系列因子的共同调控, 其中最主要的是一组cyclin蛋白, 而与肿瘤关系最密切的首推cyclin D[26], 当细胞受刺激进入周期后最早表达的是cyclin D1, cyclin D1 成为连接外界生长因子、信号转导与细胞周期的纽带[27]. cyclin D1 作为调节细胞周期行进的G1/S检测点相关重要正性调节蛋白, 与CDK4 结合并激活其活性, 进一步调节pRb的磷酸化状态, 最终决定转录因子E2F的释放, 促进DNA合成, 使细胞进入S期, 用以准确协调地驱动细胞周期进行[28]; 相反, 用cyclin D1/CDK4 选择性抑制剂indolocarbazoles则可使肿瘤细胞停止生长, 阻滞于G1 期[29~31].

研究表明, 正常情况下, 处于对数生长期的细胞, 在有丝分裂原的刺激下, cyclin D1 在G0 期细胞表达达到高峰; cyclin D1 的出现仅限于G0 期和G1 早期, 被认为是细胞G0 到G1 期转换的细胞周期重要标志蛋白, 进入S期前降解, 多数情况下S, G2/M期表达阴性[32,33]. 新近的研究表明, cyclin D1 瞬时表达足以促进细胞的正常复制和生长[34], 过表达则引发细胞周期驱动机制不断加强, G1/S检测点失调[35]; 细胞一旦越过G1/S期检测点, 细胞周期的行进就处于不可逆的状态[25,36], 可能引发细胞异常增殖[24], 启动受损而未经修复细胞进入细胞周期的下一个时相, 导致基因组不稳定性增加[37], 加速肿瘤的恶性演进[38].

我们前期的研究工作表明, LMP1 通过AP1 信号传导通路加速鼻咽癌细胞增殖[39~41]. 本文进一步的研究结果显示: 随着LMP1 介导c-Jun/JunB异源二聚体形成增多[1], cyclin D1 启动子荧光酶活性逐渐增强(图 4), cyclin D1 蛋白表达 (图 4~6)以及与细胞周期相应的平均荧光强度逐渐增强(图 8)并维持在较高水平. 在此情况下, 流式细胞术的实验结果提示: 过多的G0 期(静止期)细胞重返细胞周期进入G1 期, 进入细胞周期(S期和G2 期)的细胞更快速地跨越细胞周期, 进入下一次细胞分裂(表 1, 图 7), 从而可能引发G1/S检测点失调, 细胞异常增殖, 并进一步加剧肿瘤细胞的恶性演进. 该研究在外界致病因子EB病毒LMP1, AP1 信号传导通路和细胞周期之间建立了新的直接

联系，为肿瘤发病机制研究提供并补充了新的思路和实验模式.

## 参 考 文 献


1 宋 鑫, 陶永光, 曹 亚, 等. EB病毒潜伏膜蛋白 1 介导活性 c-Jun/Jun B异源二聚体形成. 中国科学, C辑, 2004, 34(4): 325~334[摘要] [PDF]

2 Herber B, Truss M, Beato M, et al. Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. Oncogene, 1994, 9: 2105~2107

3 Bakiri L, Lallemand D, Ella B W, et al. Cell cycle-dependent variations in c-Junand JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. EMBO J, 2000, 19: 2056~2068[DOI]

4 黎众魁, 谢 鹭, 何志巍, 等. 用cDNA表达阵列谱比较鼻咽癌与正常鼻咽组织的基因表达谱差异. 科学通报, 1998, 16: 2462~2463

5 谢 鹭, 许亮国, 何志巍, 等. 用肿瘤cDNA阵列分析鼻咽癌组织的基因表达. 自然科学进展, 2000, 10: 378~382

6 肖 绘, 邓锡云, 曹 亚, 等. 鼻咽癌中 D 型周期素的差异性表达及 cyclinD1 基因扩增的研究. 中华耳鼻喉科杂志, 2000, 35: 2

7 宋 鑫, 赵晓荣, 曹 亚, 等. 用组织微阵列技术分析鼻咽癌变多阶段组织 cyclinD1 过表达. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29: 385~389

8 廖 伟, 邓锡云, 曹 亚, 等. EBV LMP1 在 NPC 细胞中调控 NF-κB 的研究. 病毒学报, 2000, 16: 198~202

9 罗非君, 胡 智, 曹 亚, 等. EB 病毒的潜伏膜蛋白 1 参与鼻咽癌恶性演进的转录调控实验研究. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29: 567~571

10 赵晓荣, 王承兴, 曹 亚, 等. 周期蛋白 D1 在鼻咽癌细胞系中功能及意义的深入研究. 中华肿瘤学杂志, 2001, 23: 373~375

11 赵晓荣, 王承兴, 曹 亚, 等. 鼻咽癌细胞中 EB 病毒病毒潜伏膜蛋白 1 活化 CyclinD1 的表达. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28: 704~710

12 赵晓荣, 顾焕华, 曹 亚, 等. CyclinD1 在鼻咽癌细胞中的表达及功能的初步分析. 生物化学与生物物理学报, 2000, 2: 194~196

13 Liao W, Yi H, Li X Y, et al. Doxycycline dependent expression of EBV latent membrane protein 1 with Tet regulating system in nasopharygeal carcinoma cell Line. Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai), 1999, 31: 309~312

14 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual. 2nd. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

15 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

16 Hinz M, Krappmann D, Eichten A, et al. NF-κB function in growth control: regulation of cyclinD 1 expression and G0/G1 –to -S -phase transition. MCB, 1999, 19: 2690~2698

17 Chapman N R, Perkins N D. Inhibition of the RelA(p65) NF-kappaB subunit by Egr-1.J Biol Chem, 2000, 275: 4719~4725[DOI]

18 Lee W, Mitchell P, Tjian R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. Cell, 1987, 49: 741~752[DOI]

19 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

20 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[DOI]

21 胡 智, 曾 亮, 曹 亚, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 通过 TRAF/TRADD 激活 JNK 信号途径. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29: 562～566

22 罗非君, 彭小宁, 曹 亚, 等. EB 病毒 LMP1 上调鼻咽癌细胞系 AP-1 活性. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16: 551~555

23 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 AP-1 活化. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 18: 114~119

24 Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. Cell Prolif, 2000, 33: 261~274[DOI]

25 Sherr J. Cancer cell cycle. Science, 1996, 274: 1672~1677[DOI]

26 Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. Ⅱ: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell, 1994, 79: 573~582[DOI]

27 Arber N, Hibshoosh H, Moss S F, et al. Increased expression of Cyclin D1 is an early event in multistagecolorectal carcinogenesis. Gastroenterology, 1996, 110: 669~674

28 Donjerkovic D, Scott D W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. Cell Res, 2000, 10(1): 1~16

29 Petty W J, Dragnev K H, Dmitrovsky E. Cyclin D1 as a target for chemoprevention. Lung Cancer, 2003, (Suppl) 1: S155~161[DOI]

30 Zhu G, Conner S E, Zhou X, et al. Synthesis, structure-activity relationship, and biological studies of indolocarbazoles as potent cyclin D1-CDK4 inhibitors. J Med Chem, 2003, 46: 2027~2030[DOI]

31 Engler T A, Furness K, Malhotra S, et al. Novel, potent and selective cyclinD1/CDK4inhibitors: indolo[6,7-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles. Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13: 2261~2267[DOI]

32 Sharpless T, Traganos F, Darzynkiewicz Z, et al. Flow cytofluorimetry: discrimination between single cells and cell aggregates by direct size measurements. Acta Cytol, 1975, 19: 577~581

33 Tam S W, Theodoras A M, Shay J W, et al. Differential expression and regulation of cyclin D1 protein in normal and tumor human cells:association with Cdk4 is required for cyclin D1 function in G1 progression. Oncogene, 1994, 9: 2663~2674

34 Nelsen C J, Rickheim D G, Timchenko N A, et al. Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth *in vivo*. Cancer Res, 2001, 61: 8564~8568

35 宋　鑫, 曹　亚. G1/S 检测点调控与癌变多阶段的关系. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24(2): 73~76

36 Bartek J, Lukas J, Bartkova J.Perspective: defects in cell cycle control and cancer. J Pathol, 1999, 187: 95~99[DOI]

37 Robles A I, Larcher F, Whalin R B, et al. Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 7634~7638[DOI]

38 Zhou B B, Elledge S J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature, 2000, 408: 433~439[DOI]

39 胡　智, 陶永光, 曹　亚, 等. JIP 影响鼻咽癌细胞增殖和凋亡的生物学效应研究. 癌症, 2002, 21: 1182~1186

40 胡　智, 陶永光, 曹　亚, 等. JNK 相互作用蛋白通过 JNK 途径影响鼻咽癌的增殖和凋亡. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30: 579~585

41 Deng Lin, Yang Jing, Cao Ya, et al. Cells in G2/M phase increased in human nasopharyngeal carcinama cell line by EBV-LMP1 through activation of NF-κB and AP-1. Cell Research, 2003, 13: 187~194