

论著·基础研究

NMHC-Ⅱ A 蛋白的重组表达、多克隆抗体制备及其功能的初步探讨*

熊 丹^{1,2}, 杜 勇³, 张 华³, 武 薇¹, 莫红梅¹, 张秀明^{1△}

(1. 深圳大学第三附属医院医学检验科, 广东深圳 518001; 2. 上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心医学检验科, 上海 200433; 3. 中山大学附属肿瘤医院实验研究部, 广东广州 510060)

摘 要:目的 对人源非肌肉肌球蛋白重链Ⅱ A(NMHC-Ⅱ A)蛋白进行重组表达、纯化并制备其多克隆抗体,初步探讨其生物学功能。方法 将 MYH9 编码基因克隆于原核表达载体 pGEX-4T-1, IPTG 诱导重组表达。以谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠纯化产物为免疫原制备兔抗 NMHC-Ⅱ A 多克隆抗体,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析和免疫印迹(Western-blot)检测抗体特异性;采用酶联免疫吸附法(ELISA)对纯化抗体的活性进行评价;采用抗体阻断试验进一步证实 NMHC-Ⅱ A 在 EB 病毒(EBV)感染鼻咽上皮细胞中的作用。结果 本研究生产和纯化两株多克隆 NMHC-Ⅱ A 抗体的浓度分别是 600 μg/mL 和 1.35 mg/mL。制备的 NMHC-Ⅱ A 多克隆抗体以剂量依赖性的方式抑制 EB 病毒感染上皮细胞。结论 本研究成功实现 NMHC-Ⅱ A 的重组表达、抗体制备,实现了对其功能的初步研究,为其在鼻咽癌的发生发展过程中进一步深入研究奠定了基础。

关键词: EB 病毒; 非肌肉肌球蛋白重链Ⅱ A; 多克隆抗体; 免疫特异性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.001 **中图法分类号:** R392.11

文章编号: 1673-4130(2019)11-1281-06 **文献标识码:** A

Recombinant expression, polyclonal antibody preparation and primary functional study of NMHC-Ⅱ A*

XIONG Dan^{1,2}, DU Yong³, ZHANG Hua³, WU Wei¹, MO Hongmei¹, ZHANG Xiuming^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Public Health Clinical Center Affiliate to Fudan University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Experimental Research, Sun Yat-Sen University Cancer Center, Guangzhou, Guangdong 510060, China;)

Abstract: Objective To recombinantly express, purify and prepare polyclonal antibodies against human non-muscle myosin heavy chain Ⅱ A (NMHC-Ⅱ A) protein, and to explore its biological function. **Methods** MYH9 coding gene was cloned into prokaryotic expression vector pGEX-4T-1, and recombinant expression was induced by IPTG. The rabbit anti NMHC-Ⅱ A polyclonal antibody was prepared from the purified product of glutathione agarose gel beads. The specificity of the antibody was detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting. The activity of purified antibody was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The role of NMHC-Ⅱ A in nasopharyngeal epithelial cells infected by EB virus (EBV) was further confirmed by antibody blocking test. **Results** In this study, the concentrations at which two polyclonal NMHC-Ⅱ A antibodies were produced and purified were 600 g/mL and 1.35 mg/mL, respectively. The prepared NMHC-Ⅱ A polyclonal antibody inhibited EBV infection of epithelial cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** In this study, the recombinant expression and antibody preparation of NMHC-Ⅱ A were successfully realized, and the preliminary study of its function was realized, which laid a foundation for further research in the development of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: Epstein-Barr virus; NMHC-Ⅱ A; polyclonal antibody; immune specificity

鼻咽癌是来源于人类鼻咽上皮细胞恶性程度较高的头颈部肿瘤,北美和其他西方国家的白种人每年的发病率低于 1/100 000;然而,在中国南方其年发病率可高达 25/100 000~30/100 000,其中又以广东最

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772921);国家自然科学基金青年科学基金项目(81502344);上海市科委医学引导类科技项目(15411969200);深圳市卫生计生委学科能力建设提升项目(SZXJ2017018);深圳市引进高层次医学团队项目(SZSM201601062)。

作者简介:熊丹,女,主管技师,主要从事肿瘤标志物的筛查和肿瘤发病机制的研究。△ 通信作者, E-mail: zxm0760@163.com。

本文引用格式:熊丹,杜勇,张华,等. NMHC-Ⅱ A 蛋白的重组表达、多克隆抗体制备及其功能的初步探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(11): 1281-1285.

为常见^[1]。由于具有显著的地方性,鼻咽癌又被称为“广东癌”^[2]。在中国的华南等高发区,鼻咽癌的组织类型 97% 以上为未分化癌(WHO Ⅲ型)^[3]。EB 病毒感染、环境致癌因素以及抑癌基因和原癌基因的突变等多因素、多步骤共同参与了鼻咽癌的发生、发展过程^[1]。EB 病毒属人类 γ -疱疹病毒亚科淋巴潜隐病毒属,1997 年世界卫生组织国际癌症研究机构(LARC)的报告中已将 EB 病毒列为 I 类致癌原^[4]。EB 病毒在体内主要感染 B 淋巴细胞和上皮细胞,与伯基特淋巴瘤、霍奇金病、胃癌和鼻咽癌等肿瘤密切相关^[5]。

非肌肉肌浆球蛋白重链 II A(NMHC-II A)由位于 22q11.2 染色体上的全长 1 960 个氨基酸的 MYH9 基因编码^[6],这是一种广泛表达在细胞质的肌球蛋白,参与多种过程,包括细胞内化学机械力的产生和肌动蛋白细胞骨架的移位^[7]。笔者前期研究发现 NMHC-II A 与病毒糖蛋白 gH/gL 相互作用介导 EB 病毒感染鼻咽上皮细胞^[8],NMHC-II A 是 EB 病毒进入鼻咽上皮细胞的重要细胞分子。因此制备针对 NMHC-II A 为靶点的抗 EB 病毒感染的中和抗体,对于鼻咽癌的靶向治疗具有重要意义。本文应用兔多克隆抗体制备技术,制备抗 NMHC-II A 的特异性抗体,为进一步进行鼻咽癌的分子靶向治疗和研究 NMHC-II A 在鼻咽癌中扮演的角色奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 3 例鼻咽炎增生组织(NPN-1、NPN-2、NPN-3,病理诊断为炎症增生组织)和 4 例鼻咽癌组织(NPC-1、NPC-1、NPC-3、NPC-4,病理诊断为肿瘤组织)。4 株原代鼻咽上皮细胞(N01、N02、N03、N04)、永生化的 NP69 细胞和 BMI1/NPECs 在无血清的培养基(KSFM)中培养(InvitroGen, 17005~075);鼻咽癌细胞株(C666-1、HK1、SUNE1、SUNE2、CNE1、CNE2)、CNE2-EBV、HNE1-EBV、HK1-EBV 和 Akata(EBV-eGFP)培养在 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,培养条件为 37℃、5% CO₂。EBV-eGFP 的制备如文献^[9]报道,用 0.8% 羊抗人 IgG 交联 Akata(EBV-eGFP)细胞表面 IgG 蛋白,促使 EB 病毒从潜伏期进入裂解期,从而使病毒颗粒释放。重组质粒 pGEX-4T-1/GST-NMHC-II A-C(amino acids 1665-1960;UniProt entry P35579)由本室构建并保存。实验动物日本大耳白兔,购买于具有“实验动物生产许可证”资质的武汉市万千佳兴生物科技有限公司。

1.2 仪器与试剂 7900HT Fast Real-time PCR 系统(Applied Biosystems,USA),电泳仪,水平电泳槽,凝胶成像系统(SynGene),台式冷冻离心机(Centrifuge 5810, Centrifuge 5417R, Eppendorf),超纯水系统(Millipore),磁力搅拌器,分析天平和 pH 计(Mettler Toledo),漩涡振荡仪(Scientific Industries),超净工作台(苏净),培养箱(Thermo Forma),普通光学显

微镜(COIC, XSZ-H),倒置相差显微镜(COIC XDS-1B),流式细胞仪(FACS Diva Option, Becton Dickinson, Mountain View, CA)。Trizol 试剂(Invitrogen, Grand Island, NY),逆转录酶 cDNA 合成试剂盒(Fermentas, St Leon-Rot, 德国),卡那霉素,谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠(Glutathione-Sepharose beads, GE 公司),兔 IgG(R&D Systems 公司),anti-NMHC-II A 兔多克隆抗体(英国 Abcam 公司),GAPDH 抗体和 β -actin 抗体(中国上海康成公司)。

1.3 方法

1.3.1 重组蛋白的表达、鉴定和纯化 将重组质粒 pGEX-4T-1/GST-NMHC-II A-C(amino acids 1665-1960;UniProt entry P35579)进行 Bam HI 和 EcoRI 双酶切鉴定,得到的小片段,进行测序和比对。将重组质粒 pGEX-4T-1/GST-NMHC-II A-C 和对照质粒 pGEX-4T-1/GST 转化入 E. coli BL21 感受态细胞中,涂布于含有卡那霉素(50 μ g/mL)抗性的 LB 平板,37℃ 过夜培养,得到重组蛋白表达菌株,然后加入 500 μ M IPTG 诱导表达 5 h 后,离心收集沉淀。在沉淀中加入细菌裂解液,超声破碎后,离心,收集上清,用 SDS-PAGE 的方法检测目的蛋白。用谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠(Glutathione-Sepharose beads, GE 公司)纯化 NMHC-II A 重组蛋白,参照产品说明书操作。

1.3.2 多克隆抗体的制备、纯化和效价测定 以日本大耳白兔为免疫动物,免疫前取 1 mL 兔血清为对照组。将浓缩后的 NMHC-II A 蛋白作为免疫原以 1.0 毫克/只的剂量通过背部及皮下多点注射到 2 只日本大耳白兔。首次免疫与加强免疫总共 4 次,末次免疫 7 d 后对日本大耳白兔进行颈动脉取血,分别收集 2 只日本大耳白兔免疫后的血清各 30 mL 和 12 mL,然后进行纯化。期间,采用间接 ELISA 的方法检测从日本大耳白兔耳缘静脉取血中该抗体的效价。采用 SDS-PAGE 检测纯化后的兔抗 NMHC-II A 抗体浓度。

1.3.3 Real-time PCR 和 Western-Blot 检测 用 Trizol 试剂(Invitrogen, Grand Island, NY)从 4 株原代鼻咽上皮细胞、3 株永生化的鼻咽上皮细胞株、6 株鼻咽癌细胞株、3 例鼻咽炎增生组织和 4 例鼻咽癌组织中提取总 RNA,然后用逆转录酶 cDNA 合成试剂盒(Fermentas, St Leon-Rot, 德国)进行逆转录成 cDNA,用 Real-time PCR 方法检测鼻咽细胞株和组织中 NMHC-II A 的 mRNA 水平的表达情况。NMHC-II A、GAPDH 的引物序列及 Real-time PCR 反应条件同文献报道一致^[10]。Western-Blot 检测方法参照文献^[11]采用的抗体包括 anti-NMHC-II A 兔多克隆抗体(英国 Abcam 公司)、制备的 anti-NMHC-II A 兔多克隆抗体、GAPDH 抗体和 β -actin 抗体(中国上海康成公司),以 GAPDH 和 β -actin 抗体为内参照。

1.3.4 抗体阻断试验 用制备的不同浓度的多克隆

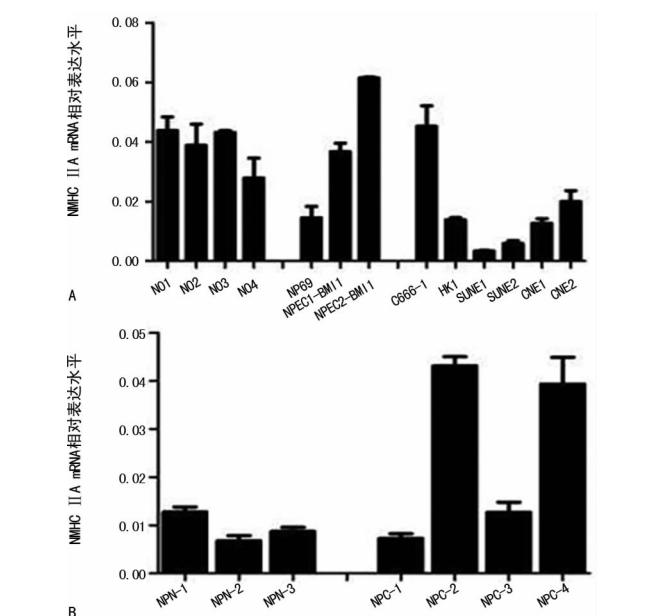
NMHC-Ⅱ A 抗体(100、50 和 25 $\mu\text{g/mL}$)和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的对照 IgG(购买于 R&D Systems 公司)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 预处理细胞 1 h,不除去抗体,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件,EB 病毒感染细胞 3 h,接着用 1 $\times$ SA 洗 2 次,加 1 mL 的 KSFM 培养基培养 24 h,用流式细胞仪检测 24 h 内 EB 病毒感染细胞的平均荧光强度。

1.3.5 流式细胞仪分析 为检测 EB 病毒感染细胞的百分率和平均荧光强度,细胞在感染后 24 h 内被胰蛋白酶消化成单个细胞悬液,然后采用流式细胞仪(FACS Diva Option;Becton Dickinson)进行检测。

1.3.6 统计学处理 使用统计软件包 SPSS16.0 进行统计分析。符合正态分布的计量资料,两组间均数比较,采用 Student's *t* 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 NMHC-Ⅱ A mRNA 在鼻咽细胞和组织中广泛表达 实时荧光定量 PCR 结果显示,原代培养的鼻咽上皮细胞、永生化鼻咽上皮细胞株、鼻咽癌细胞株、鼻咽炎增生组织和鼻咽癌组织在转录水平上都表达 NMHC-Ⅱ A。4 株原代培养的鼻咽上皮细胞 NMHC-Ⅱ A 的 mRNA 表达比鼻咽癌细胞株中的表达都高,除了 C666-1 外。永生化鼻咽上皮细胞株中,NP69 的表达较低,另外 2 株永生化细胞株比较高。在鼻咽癌细胞株中,C666-1 的 NMHC-Ⅱ A 的 mRNA 表达最高,其次是 CNE2。与 3 例鼻咽炎增生组织相比,4 例鼻咽癌组织中,2 例鼻咽癌组织中 NMHC-Ⅱ A 的 mRNA 表达水平较高,另外 2 例相差不大(图 1)。

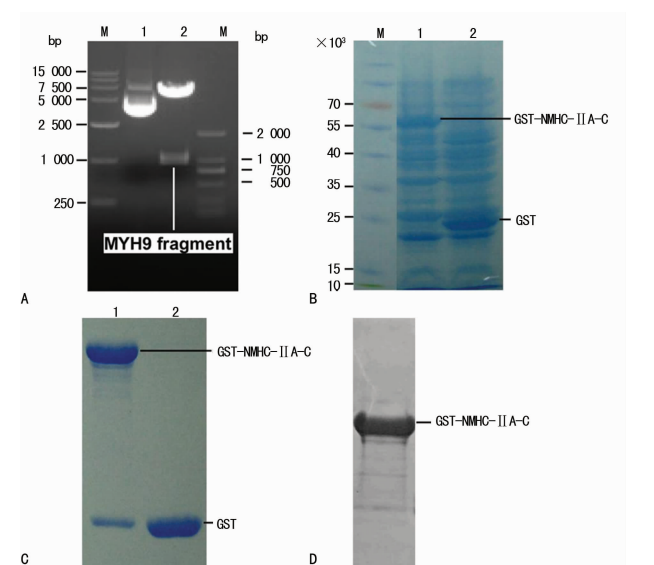


注:A 表示 NMHC-Ⅱ A mRNA 在原代培养鼻咽上皮细胞、永生化鼻咽上皮细胞和鼻咽癌细胞中广泛表达;B 表示 NMHC-Ⅱ A mRNA 在鼻咽炎增生组织和鼻咽癌组织中广泛表达

图 1 NMHC-Ⅱ A mRNA 在鼻咽细胞和组织中广泛表达

2.2 NMHC-Ⅱ A-pGEX-4T-1 原核表达载体的鉴定及 NMHC-Ⅱ A 重组蛋白的诱导表达、纯化 重组质粒 pGEX-4T-1/GST-NMHC-Ⅱ A-C 进行双酶切后得

到小片段的大小为 1 000 bp 左右,经过测序和比对,确定其序列与 NCBI 数据库中 MYH9 基因序列一致(图 2A)。含有 pGEX-4T-1/GST-NMHC-Ⅱ A-C 和 pGEX-4T-1/GST 重组质粒的 E. coli BL21 经 IPTG 诱导表达后,经 SDS-PAGE 电泳,结果显示在相对分子质量为 60×10^3 左右处有明显的蛋白诱导条带,为 GST-NMHC-Ⅱ A 的重组蛋白;相对分子质量为 25×10^3 左右处有明显的蛋白诱导条带,为 GST 蛋白(图 2B)。将原核表达产物裂解后用谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠进行 NMHC-Ⅱ A 重组蛋白纯化,通过 SDS-PAGE 实验进行鉴定,初步纯化了 GST-NMHC-Ⅱ A 的融合蛋白(图 2C),进一步大批量的培养细菌并纯化蛋白,得到了大于 2 mg,浓度为 1.0 mg/mL 的纯化蛋白,经免疫印迹鉴定,为 GST-NMHC-Ⅱ A 的融合蛋白(图 2D)。



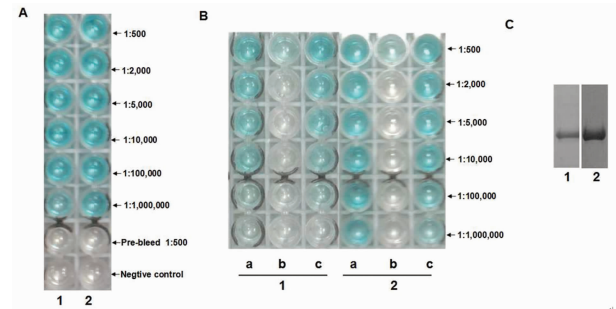
注:图 A 为用 Bam HI 和 EcoRI 对重组质粒 pGEX-4T-1/GST-NMHC-Ⅱ A-C 进行双酶切的鉴定,M 为 DNA DL15000 marker 和 DNA DL2000 marker,1 为重组质粒 pGEX-4T-1/GST-NMHC-Ⅱ A-C,2 为用 Bam HI 和 EcoRI 对重组质粒 pGEX-4T-1/GST-NMHC-Ⅱ A-C 进行酶切的结果;图 B 为 GST-NMHC-Ⅱ A 和 GST 蛋白的表达,M 为 Marker,1 为 GST-NMHC-Ⅱ A 的重组蛋白,2 为 GST 蛋白;图 C 为 GST-NMHC-Ⅱ A 和 GST 蛋白的纯化,M 为 Marker,1 为 GST-NMHC-Ⅱ A 的重组蛋白,2 为 GST 蛋白;图 D 为大批量制备 GST-NMHC-Ⅱ A 重组蛋白的鉴定

图 2 NMHC-Ⅱ A-pGEX-4T-1 原核表达载体的鉴定及 NMHC-Ⅱ A 重组蛋白的诱导表达、纯化

2.3 兔抗 NMHC-Ⅱ A 多克隆抗体的制备及效价测定 将 NMHC-Ⅱ A 蛋白作为免疫原免疫日本大耳白兔,将免疫后的血清通过间接 ELISA 方法测得抗 NMHC-Ⅱ A 血清的效价均为 1 000 000(图 3A)。采用间接 ELISA 方法检测来源于 1 号日本大耳白兔的血清、洗脱液和纯化抗体的效价分别是 1 : 100 000、1 : 500 和 1 : 100 000。来源于 2 号日本大耳白兔的血清、洗脱液和纯化抗体的效价分别是 1 : 1 000 000、1 : 500 和 1 : 1 000 000(图 3B)。SDS-PAGE 检测纯化后的兔抗 NMHC-Ⅱ A 抗体浓度分别是 600 $\mu\text{g/mL}$

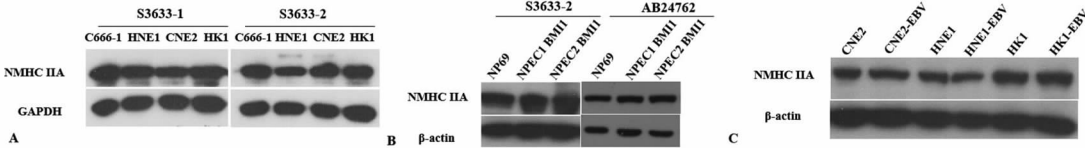
和 1.35 mg/mL(图 3C)。

2.4 采用制备的兔抗 NMHC-Ⅱ A 抗体检测鼻咽癌细胞株和永生化鼻咽上皮细胞株中 NMHC-Ⅱ A 蛋白的表达 采用制备得到的 1 号抗体(编号为 S3633-1)和 2 号抗体(编号为 S3633-2)检测鼻咽癌细胞株中 NMHC-Ⅱ A 的蛋白表达情况,发现 2 株抗体能检测到鼻咽癌细胞株中 NMHC-Ⅱ A 的表达(图 4A)。与商业化 NMHC-Ⅱ A 抗体相比,制备的抗体也能检测到永生化鼻咽上皮细胞株中 NMHC-Ⅱ A 蛋白的表达;商业化的抗体和制备的抗体的使用浓度均为 1:1 000,表明制备的抗体有良好的特异度和灵敏度(图 4B)。采用 Western-blot 方法检测鼻咽癌细胞株和稳定表达 EB 病毒的鼻咽癌细胞株中 NMHC-Ⅱ A 的表达情况,发现 EB 病毒的感染并不影响 NMHC-Ⅱ A 蛋白的表达(图 4C)。



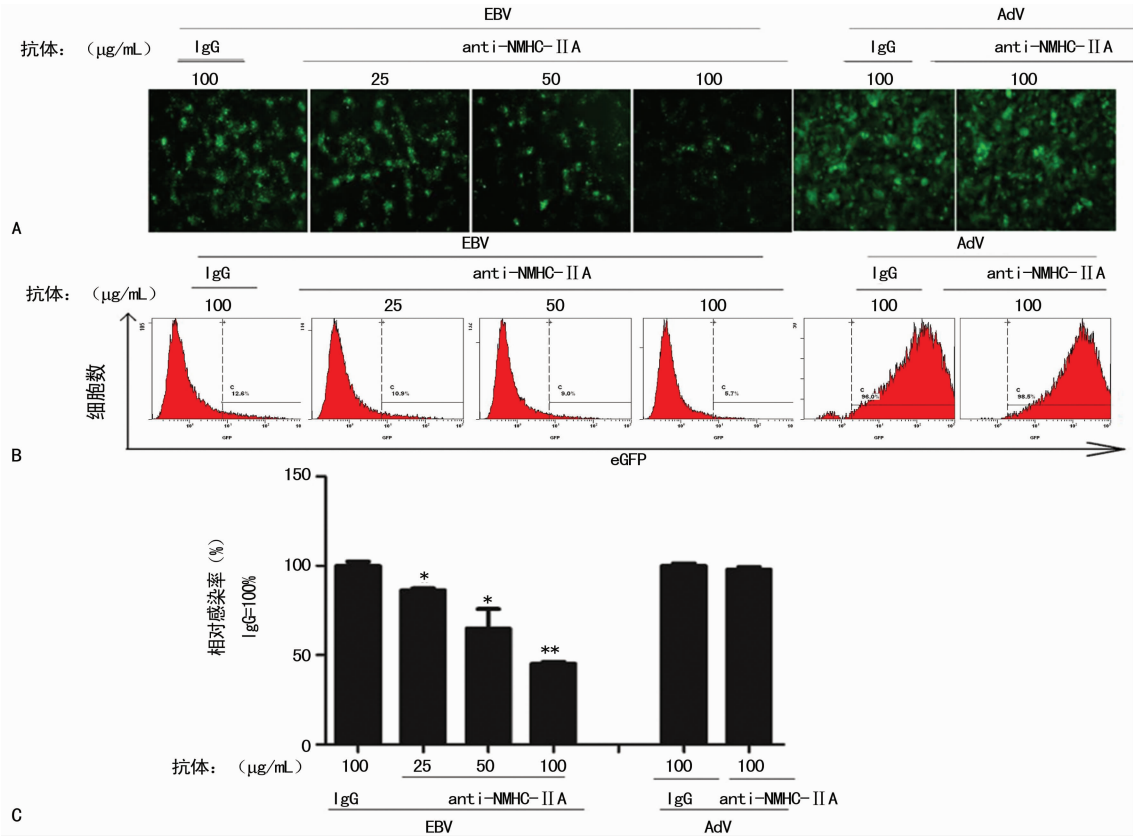
注:图 A 为采用 ELISA 方法检测来源于 2 只日本大耳白兔的抗血清抗体的效价,1 为 1 号日本大耳白兔,2 为 2 号日本大耳白兔;图 B 为采用 ELISA 方法检测 2 株纯化抗体的效价,1 为 1 号日本大耳白兔,2 为 2 号日本大耳白兔,a 为血清;b 为洗脱液;c 为纯化抗体;图 C 为 SDS-PAGE 检测纯化后的 NMHC-Ⅱ A 抗体浓度,1 为来源于 1 号日本大耳白兔的纯化抗体,2 为来源于 2 号日本大耳白兔的纯化抗体

图 3 兔抗 NMHC-Ⅱ A 多克隆抗体的效价及特异性检测



注:图 A 为采用 1 号抗体(编号为 S3633-1)和 2 号抗体(编号为 S3633-2)检测鼻咽癌细胞株中 NMHC-Ⅱ A 的蛋白表达情况;图 B 为采用 2 号抗体(编号为 S3633-2)和商业化的抗体(编号为 AB24762)检测永生化鼻咽上皮细胞中 NMHC-Ⅱ A 的蛋白表达情况;图 C 为采用 2 号抗体(编号为 S3633-2)检测鼻咽癌细胞株和用 EB 病毒感染鼻咽癌细胞株建立的稳定表达 EB 病毒的鼻咽癌细胞株中 NMHC-Ⅱ A 的蛋白表达情况

图 4 制备的兔抗 NMHC-Ⅱ A 抗体检测鼻咽癌细胞株和永生化鼻咽上皮细胞株中 NMHC-Ⅱ A 蛋白的表达



注:A 为荧光显微镜观察 EB 病毒或者腺病毒感染预先与不同浓度的中和抗体 NMHC-Ⅱ A 孵育后永生化鼻咽上皮细胞的代表性图片;B、C 为 EB 病毒或者腺病毒感染预先与不同浓度的中和抗体 NMHC-Ⅱ A 孵育后永生化鼻咽上皮细胞的感染效率及柱状图;数据显示平均值±标准差(n=2),以对照组 IgG 感染效率为 100%,其余的与其比较所得到的值;* P<0.05,** P<0.01

图 5 NMHC-Ⅱ A 中和抗体抑制 EB 病毒感染的效率图

2.5 NMHC-II A 抗体可以有效地抑制 EB 病毒的感染 研究 NMHC-II A 在 EB 病毒感染鼻咽癌上皮细胞中是否发挥作用。分别将 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 制备的多克隆抗体 NMHC-II A 预先与永生化鼻咽细胞株 NPEC2-BMI1 孵育后,然后通过荧光显微镜观察和流式细胞仪检测,发现兔抗 NMHC-II A 多克隆抗体可以降低 EB 病毒的感染效率,并呈剂量依赖性。100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量的多克隆抗体减少 EB 病毒的感染效率达 54.84%。相反,该抗体对腺病毒的感染并没有影响。无论是显微镜观察 GFP 的表达分布和流式检测 EB 病毒的感染效率,结果均一致(图 5)。

3 讨 论

NMHC-II A 在卡波氏肉瘤病毒(KSHV)^[11]和人类单纯疱疹病毒(HSV-1)^[12]进入宿主细胞发挥着非常重要的作用。NMHC-II A 是 HSV-1 感染上皮细胞的受体,并且发现 NMHC-II A 有利于 HSV-1 与上皮细胞的融合^[12]。文献报道 NMHC-II A 是猪繁殖和呼吸综合征(PRRS)病毒感染的重要细胞因子,重组 NMHC-II A 蛋白 C 末端结构域(命名为 PRA)通过与病毒糖蛋白 5 直接相互作用阻断猪繁殖和呼吸综合征病毒(PRRSV)的内化,进一步发现 PRRSV 与可溶性 PRA 蛋白的预孵育对病毒有抑制作用,并呈剂量依赖性。PRA 还具有抑制 PRRSV 基因型 1 和 2 的不同菌株感染的广谱能力^[13]。笔者前期研究表明 EB 病毒 gH/gL 与 NMHC-II A 相互作用促进 EB 病毒有效进入上皮细胞,并且抑制内源性 NMHC-II A 的表达可减少 EB 病毒的结合^[8],说明内源性 NMHC-II A 在 EB 病毒感染永生化鼻咽上皮细胞中发挥着重要的作用。笔者前期通过抗体阻断实验发现制备的多克隆抗体 NMHC-II A 可以降低 EB 病毒的感染效率,并呈剂量依赖性,但对腺病毒的感染没有影响^[8]。本研究采用不同的剂量也得到了相同的结果,同样采用的是重组蛋白 C 末端区域,进一步表明内源性 NMHC-II A 在 EB 病毒感染永生化的鼻咽上皮细胞中发挥着重要的作用。能阻断 NMHC-II A 与 EB 病毒 gH/gL 相互作用的抑制剂可能阻止 EB 病毒进入或阻止永生化的鼻咽上皮细胞向鼻咽癌转化。因此制备针对 NMHC-II A 为靶点的抗 EB 病毒感染的中和抗体,对于鼻咽癌的靶向及其抗病毒治疗具有重要意义。

采用 Akata EBV(+)细胞制备的 EB 病毒携带绿色荧光蛋白,从而为检测病毒感染细胞提供方便。笔者前期研究发现 EB 病毒感染永生化鼻咽上皮细胞形成球形细胞后,与没感染前,NMHC-II A 表达无明显变化^[8]。笔者采用高滴度的 EB 病毒感染鼻咽癌细胞株,然后用 G418 筛选,获得了稳定表达 EB 病毒的鼻咽癌细胞株。采用 Western-blot 方法检测稳定表达 EB 病毒的鼻咽癌细胞株中 NMHC-II A 蛋白的表达情况,发现与对照组相比,NMHC-II A 蛋白的表达

没有增加,表明 EB 病毒的感染并不能影响 NMHC-II A 蛋白的表达,与笔者前期研究一致。

最近,NMHC-II A 在肿瘤细胞中的作用越来越受关注。研究发现 MicroRNA-647 通过靶向调控 SRF-MYH9 轴,从而抑制胃癌细胞的侵袭和转移^[14]。一项研究表明长链非编码 RNA PTCSC2 与 MYH9 蛋白结合,更易发生甲状腺癌^[15]。另一项研究发现 S100A4-Myh9 轴通过诱导转化生长因子 β 介导的上皮间充质转移促进胃癌细胞的迁移和侵袭^[16]。笔者研究发现高表达的 NMHC-II A 可以作为预示膀胱癌病人不良预后的分子标志物,沉默内源性 NMHC-II A 的表达后能降低膀胱癌细胞侵袭及转移能力^[10]。然而,在头颈部鳞癌中,NMHC-II A 被确认为肿瘤抑制因子^[17]。文献报道 NMHC-II A S1943 位点的磷酸化有助于调节细胞外基质降解从而促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[18]。

本研究发现 NMHC-II A mRNA 在原代培养、永生化鼻咽上皮细胞株、鼻咽癌细胞株及鼻咽组织、鼻咽癌组织中都有表达,并且 NMHC-II A 蛋白在原代培养、永生化鼻咽上皮细胞株和鼻咽癌细胞株中都有表达,表明这种蛋白广泛存在于鼻咽上皮细胞,该蛋白及其磷酸化水平在鼻咽癌中发挥的作用又是如何,值得进一步研究。

4 结 论

笔者成功实现了人源 NMHC-II A 蛋白的重组表达、纯化及高效价多克隆抗体的制备。该多克隆抗体能识别细胞中内源表达的 NMHC-II A 蛋白。同时,发现 NMHC-II A 多克隆抗体可以有效地抑制 EB 病毒在永生化鼻咽上皮细胞中的感染,为进一步研究 NMHC-II A 相关功能奠定了重要基础。

参考文献

- [1] LO K W, TO K F, HUANG D P. Focus on nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer cell, 2004, 5(5): 423-428.
- [2] JIA H. A controversial bid to thwart the 'Cantonese cancer'[J]. Science, 2008, 321(5893): 1154-1155.
- [3] KHAN G, HASHIM M J. Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010 [J]. Infect agent cancer, 2014, 9(1): 38.
- [4] LIEBERMAN P M. Epstein-Barr virus turns 50 [J]. Science, 2014, 343(6177): 1323-1325.
- [5] ROWE M, FITZSIMMONS L, BELL A I. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma [J]. Chin J Cancer, 2014, 33(12): 609.
- [6] CONTI M A, ADELSTEIN R S. Nonmuscle myosin II moves in new directions[J]. J Cell Sci, 2008, 121(1): 11-18.
- [7] PECCI A, MA X, SAVOIA A, et al. MYH9: structure, functions and role of non-muscle myosin II A in human disease [J]. Gene, 2018, 664(48): 152-167.
- [8] XIONG D, DU Y, WANG H B, et al. (下转第 1292 页)

- [4] FARH K K, GRIMSON A, JAN C, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*[J]. *Science*, 2005, 310(5755): 1817-1821.
- [5] BESSE A, SANA J, LAKOMY R, et al. MiR-338-5p sensitizes glioblastoma cells to radiation through regulation of genes involved in DNA damage response[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(6): 7719-7727.
- [6] HATANO K, KUMAR B, ZHANG Y, et al. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(8): 4075-4086.
- [7] YAN L, WANG Y, LIANG J, et al. MiR-301b promotes the proliferation, mobility, and epithelial-to-mesenchymal transition of bladder cancer cells by targeting EGR1[J]. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95(5): 571-577.
- [8] WU D G, CHEN B S, CUI F, et al. Hypoxia-induced microRNA-301b regulates apoptosis by targeting Bim in lung cancer[J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(4): 476-483.
- [9] XIANG S J, CHEN H J, LUO X J, et al. Isoliquiritigenin suppresses human melanoma growth by targeting miR-301b/LRIG1 signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 184.
- [10] MAKHARASHVILI N, TUBBS A T, YANG S H, et al. Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in Double-Strand break end resection[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(6): 1022-1033.
- [11] SARTORI A A, LUKAS C, COATES J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection[J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 506-509.
- [12] REAL N E, CASTRO G N, DARIO C F, et al. Molecular markers of DNA damage and repair in cervical cancer patients treated with cisplatin neoadjuvant chemotherapy: an exploratory study[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2017, 22(6): 811-822.
- [13] BEMELMANS M H, BUURMAN W A. Tumor necrosis factor: function, release and clearance[J]. *Crit Rev Immunol*, 1996, 16(1): 1-11.
- [14] WHEELHOUSE N M, CHAN Y S, GILLIES S E, et al. TNF- α induced DNA damage in primary murine hepatocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 12(6): 889-894.
- [15] SHOJI Y, UEDONO Y, ISHIKURA H, et al. DNA damage induced by tumour necrosis factor- α in L929 cells is mediated by mitochondrial Oxygen radical formation [J]. *Immunology*, 1995, 84(4): 543-548.
- [16] WESTBROOK A M, WEI BO, HACKE K, et al. The role of tumour necrosis factor- α and tumour necrosis factor receptor signalling in inflammation-associated systemic genotoxicity[J]. *Mutagenesis*, 2012, 27(1): 77-86.
- [17] YUN M H, HIOM K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle[J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 460-U184.

(收稿日期: 2018-11-02 修回日期: 2019-01-10)

(上接第 1285 页)

- Nonmuscle myosin heavy chain II A mediates Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal epithelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, 112(35): 11036-11041.
- [9] LAN K, VERMA S C, MURAKAMI M, et al. Epstein - Barr Virus (EBV): infection, propagation, quantitation, and storage[J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2017, 6(1): 14E. 2. 1-14E. 2. 21.
- [10] 熊丹, 许晓清, 阚丽娟, 等. 膜蛋白 NMHC II A 的表达对膀胱癌细胞侵袭和转移的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(11): 1281-1285.
- [11] VEETIL M V, SADAGOPAN S, KERUR N, et al. Interaction of c-Cbl with myosin II A regulates Bleb associated macropinocytosis of Kaposi' s sarcoma-associated herpesvirus [J]. *PLoS pathogens*, 2010, 6(12): e1001238.
- [12] ARII J, GOTO H, SUENAGA T, et al. Non-muscle myosin II A is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1 [J]. *Nature*, 2010, 467(7317): 859-862.
- [13] LIA L L, XUE B Y, SUN W Y, et al. Recombinant MYH9 protein C-terminal domain blocks porcine reproductive and respiratory syndrome virus internalization by direct interaction with viral glycoprotein 5 [J]. *Antiviral Res*, 2018, 156: 10-20.
- [14] YE G, HUANG K, YU J, et al. MicroRNA-647 targets SRF-MYH9 axis to suppress invasion and metastasis of gastric cancer [J]. *Theranostics*, 2017, 7(13): 3338-3353.
- [15] WANG Y, HE H, LI W, et al. MYH9 binds to lncRNA gene PTCSC2 and regulates FOXE1 in the 9q22 thyroid cancer risk locus [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, 114(3): 474-479.
- [16] LI F, SHI J, XU Z, et al. S100A4-MYH9 axis promote migration and invasion of gastric cancer cells by inducing TGF- β -Mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cancer*, 2018, 9(21): 3839.
- [17] SCHRAMEK D, SENDOEL A, SEGAL J P, et al. Direct in vivo RNAi screen unveils myosin II a as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas[J]. *Science*, 2014, 343(6168): 309-313.
- [18] LAURA E N, YA R W, JOHN S C, et al. Myosin-II A heavy chain phosphorylation on S1943 regulates tumor metastasis[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 370(2): 273-282.

(收稿日期: 2018-11-04 修回日期: 2019-01-12)