

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.23.005

文章编号: 1005-8982(2016)23-0021-06

论著

## EBERs 对鼻咽癌转移的作用及其机制研究

程世越<sup>1</sup>, 李智<sup>1</sup>, 卢建红<sup>2</sup>, 左培莲<sup>2</sup>

(1.中南大学湘雅医院 分子医学研究中心,湖南 长沙 410008;2.中南大学肿瘤研究所,湖南 长沙 410078)

**摘要:目的** 探讨 EBERs 对鼻咽癌转移的作用及其机制。**方法** 在鼻咽癌细胞中转染 EBERs, 荧光定量 PCR(RT-PCR)检测细胞中转移相关指标(如 MMP)的相对表达量,同时 Transwell 检测 EBERs 对鼻咽癌细胞迁移能力的影响。构建敲除 EBERs 的 BAC-EBV(p2089)质粒,转染鼻咽癌细胞,检测细胞的转移能力。转染 EBERs 后 Western blot 检测上皮间质转化(EMT)相关指标,免疫荧光检测 ZO-1 的表达。**结果** 鼻咽癌细胞转染 EBERs 质粒或 p2089 质粒后,RT-PCR 检测发现转移相关指标表达升高,Transwell 检测结果显示细胞迁移能力增强,而在干扰 EBERs 或转染敲除 EBERs 的 p2089 质粒后,转移能力减弱。转染 EBERs 后 E-cadherin 表达降低,Vimentin 升高,同时免疫荧光检测发现 ZO-1 表达降低。**结论** EBERs 可能通过促进 EMT 高表达而促进鼻咽癌的转移。

**关键词:** EBERs;鼻咽癌;转移;上皮间质转化

**中图分类号:** R739.62

**文献标识码:** A

## EBERs promote metastasis of nasopharyngeal carcinoma via epithelial-mesenchymal transition

Shi-yue Cheng<sup>1</sup>, Zhi Li<sup>1</sup>, Jian-hong Lu<sup>2</sup>, Lie-lian Zuo<sup>2</sup>

(1. Center for Molecular Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 2. Cancer Research Institute, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

**Abstract: Objective** To investigate whether EBV encoded RNAs (EBERs) could promote metastasis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) and the possible involvement of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in this process. **Methods** EBERs expression plasmid was transfected into EBV negative NPC cell lines with lipofectamine 2000. 48 h after transfection, matrigel migration assay and cell counting were conducted to explore the impact of EBERs on NPC migration and proliferation, respectively. In addition, siRNA targeting EBERs was applied to EBV positive C666-1 cells, after that the expression changes of metastasis related genes were detected. To consolidate the observation, EBERs-deleted EBV expression plasmid was constructed based on bacterial artificial chromosome (BAC) system. Then expression changes of metastasis related genes were compared between the cells harboring EBV with or without EBERs. Furthermore, the involvement of EMT associated genes in EBERs-mediated metastasis was explored via Western blot, and immunofluorescence was used to detect ZO-1 expression. **Results** Transient transfection of EBERs significantly improved metastasis of NPC cells and expression of metastasis related genes. However, EBERs had no impact on NPC cell proliferation. In support of the observation, siRNA targeting EBERs or EBERs deletion significantly decreased expression of metastasis related genes. Furthermore, EBERs expression decreased ZO-1 and E-cadherin expressions while increased Vimentin expression. **Conclusions** EBERs could promote metastasis of NPC cells, and EMT probably contributes to this process.

**Keywords:** EBERs; nasopharyngeal carcinoma; metastasis; EMT

收稿日期:2016-08-30

[通信作者]李智,E-mail:peries@163.com;Tel:15802654231

EBV 属于人嗜淋巴  $\gamma$  疱疹病毒,在人群中的感染率高达 95%,与鼻咽癌(NPC)、胃癌、Burkitt 淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤等多种肿瘤有较强的相关性。EBV 能够合成 2 种非编码 RNA(EBERs)即 EBER1 和 EBER2,分别由 167 和 172 个核苷酸组成,它们是在 EBV 感染多种细胞(淋巴细胞、鼻咽或胃上皮细胞)后的 3 个潜伏期中表达量最高的转录本,丰度高达  $10^7$ /细胞<sup>[1]</sup>,临床上可以作为检测 EBV 感染的指标<sup>[2]</sup>。EBERs 在 EBV 感染的细胞中普遍存在,但其在体内的生物学功能却较为复杂,已有报道证实,EBERs 能够促进淋巴瘤的发生、发展,但其在其他包括鼻咽癌在内的相关肿瘤中的功能仍不明确。鼻咽癌是一种具有高发病率和致死率的头颈部肿瘤,在流行地区被证实均有 EBV 的感染。有研究证实,鼻咽癌的发生与 EBERs 有一定相关性<sup>[3]</sup>,但并未明确二者之间的因果关系。本研究旨在探讨 EBERs 是否能够促进鼻咽癌细胞的转移及其作用机制,为鼻咽癌临床治疗提供新的潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系

鼻咽癌细胞系 CNE1、HNE1、6-10B、C666-1 培养于含 10%胎牛血清的 RPMI(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),并加入 100 u/ml 青霉素和 100 u/ml 链霉素。

### 1.2 质粒构建

pcDNA3.1-EBERs 10 拷贝质粒由本实验室构建和保存,BAC 质粒、含 EBV B95-8 株全基因组的 BAC 质粒(BAC-EBV)p2089 由德国 GSF 国家环境与卫生研究中心的 Hammerschmidt 教授惠赠,p2089 敲除 EBERs 质粒的构建流程如下<sup>[4-5]</sup>。

**1.2.1 引物设计** EBER1 同源重组正向引物:CCC AAGCTTGACGTAGTCTGTCTTGAGGAAGGCTGGAG CTGCTTCGAA,反向引物:CGGAATTCATCCTAAAA CAAAAGTTTGGTCTAGAGTCGACCTGCAGTTCCG;EBER2 同源重组正向引物:CCCAAGCTTTAGAGTTC GGGTTCGCTACAAGGCTGGAGCTGCTTCGAA,反向引物:CGGAATTCGTGGGTGCAAACTAGCCACTCT AGAGTCGACCTGCAGTTCCG。

**1.2.2 电转化感受态细菌的准备** 首先将表达重组蛋白 red  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  的温敏质粒 pKD46 按化学方法转化至含 p2089 质粒的大肠杆菌中,得到 p2089-pKD46 细菌,30℃培养,具有氯霉素(Cam)和氨苄青霉素(Amp)抗性,将该细菌制备电转化感受态细胞。

**1.2.3 EBERs 重组片段的线性转化** 将纯化的 EBERs 重组 PCR 片段 100 ng 电转化至 BAC-pKD46 感受态细胞中,30℃、180 r/min 培养 2 h,离心后将菌液涂板与含卡那霉素(Kan)的 LB 培养板上,30℃培养过夜后 37℃继续培养 24 h,将具有 Kan 抗性的菌落在含有 Kan 和 Cam 的 LB 培养基中 42℃培养 24 h 以消除 pKD46 质粒。

**1.2.4 切除重组体中的 Kanr 基因** 将重组后线性转化的细菌制成感受态细胞,将表达重组蛋白 FLP 的温敏质粒 pCP20 转化至感受态中,在含有 Amp 的 LB 培养板上 30℃培养 48 h,挑取菌落至含 Cam 的 LB 培养基中,42℃培养以消除 pCP20,将只有 Cam 无 Kan 和 Amp 的菌液在含有 Cam 的 LB 培养板上培养以纯化细菌。

### 1.3 Transwell 迁移实验

实验使用 8  $\mu$ m 孔径的 24 孔板 Transwell 小室(Coring, NY, USA)。提前将 Transwell 小室预冷,在上室中加入 100  $\mu$ l 稀释的 Matrigel(用 RPMI 1640 稀释 10 倍,BD Biosciences, San Diego, CA),4℃静置 10 min 后将 Matrigel 吸走,37℃放置 1 h。细胞消化计数后将  $3 \times 10^4$  个细胞重悬于 200  $\mu$ l 无血清培养基中并加入上室,下室加入 700  $\mu$ l 完全培养基。37℃培养 48 h 后取出小室,4%多聚甲醛固定,结晶紫染色后进行细胞计数。

### 1.4 荧光定量 PCR

鼻咽癌细胞按照 Trizol 法提取 RNA,使用 Prime Scrip RT reagent kit with gDNA Eraser(TaKaRa & Clontech, Japan)进行逆转录,荧光定量 PCR 根据 CFX-96 PCR 系统(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)要求配制反应体系(见附表)。

附表 引物及 siRNA 序列

基因	引物序列
EBER1	正向:5'-AGGACCTACGCTGCCCTAGA-3'
	反向:5'-AAAACATGCGGACCACCAGC-3'
EBER2	正向:5'-AGGACAGCCGTTGCCCTAGTG-3'
	反向:5'-AAAATAGCGGACAAGCCGAATAC-3'
MMP2	正向:5'-TACAGGATCATTGGCTACACACC-3'
	反向:5'-GGTCACATCGCTCCAGACT-3'
MMP3	正向:5'-CCTGGTACCCACGGAACCT-3'
	反向:5'-GGACAAAGCAGGATCACAGTTG-3'
MMP9	正向:5'-TGTACCGCTATGGTTACTACTCG-3'
	反向:5'-GGCAGGGACAGTTGCTTCT-3'

续附表

基因	引物序列
MMP13	正向:5'-AAATTATGGAGGAGATGCCATT-3'
	反向:5'-TCCTTGGAGTGGTCAAGACCTAA-3'
ITGB3	正向:5'-GTGACCTGAAGGAGAATCTGC-3'
	反向:5'-CCGGAGTGCAATCCTCTG-3'
ACTIN	正向:5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'
	反向:5'-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3'
<b>siRNA</b>	
EBER1	正向:5'-CUCUGCUUUCUGCCGUCUUTT-3'
	反向:5'-AAGACGGCAGAAAGCAGAGTT-3'
EBER2	正向:5'-GCAUUUGCAAGUCAGGAUUTT-3'
	反向:5'-GCAUUUGCAAGUCAGGAUUTT-3'

1.5 Western blot

细胞加入适量蛋白裂解液 RIPA,冰上裂解 30 min, 4℃离心 10 629 r/min 离心 15 min,BCA 法测蛋白浓度按照 Thermo Pierce 公司的说明书进行操作。将蛋白变性,上样进行 SDS-PAGE 电泳分离,再将蛋白电转至 PVDF 膜上,5%牛奶室温封闭 1 h, 将一抗 E-cadherin、Vimentin、Tubulin (Cell Signaling Technologies,Danvers, MA, USA)4℃孵育过夜,第 2 天二抗室温孵育 1 h,用Pierce 公司的发光液对膜上蛋白显影,Biorad 成像仪成像分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 和 Graph Pad Prism 5.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )

表示,两组间数据比较用 *t* 检验,*t* 检验为双侧检验,Transwell 的相对细胞数用 Image J 4.2 进行分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌细胞转染 EBERs 后转移能力增加

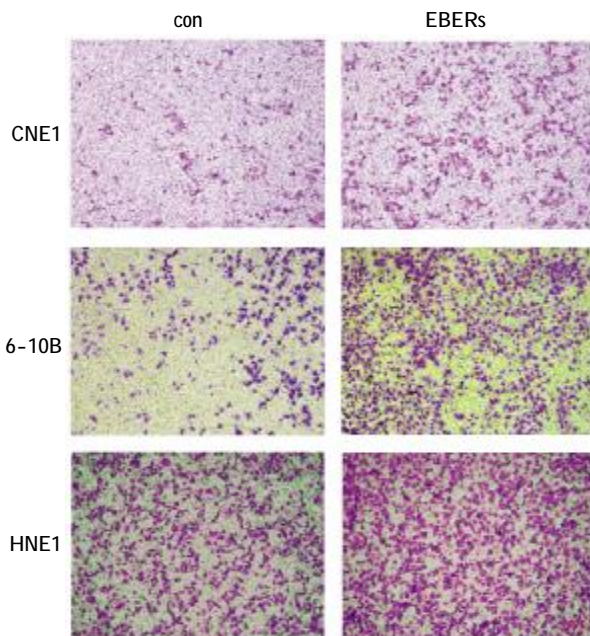
EBERs 表达质粒转染 EBV 阴性的鼻咽癌细胞 CNE1-con、6-10B-con 和 HNE1-con 48 h 后,Transwell 检测细胞的侵袭能力发现,EBERs 能够增强鼻咽癌细胞的侵袭能力(见图 1A)。同时通过比较细胞生长曲线发现,EBERs 对鼻咽癌细胞的增殖能力无明显影响(见图 1B)。

2.2 敲除 EBERs 的 p2089 质粒构建

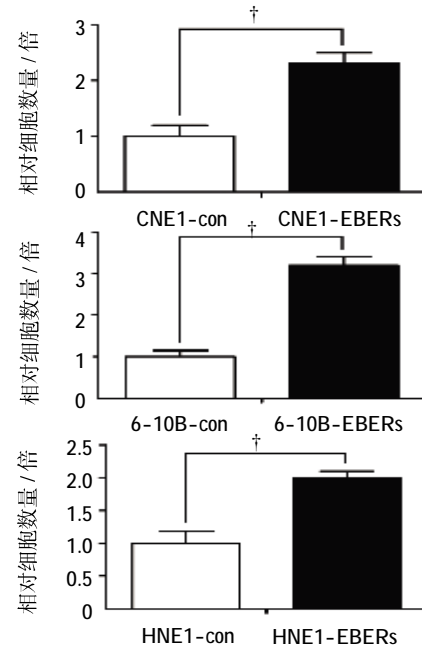
设计并利用 EBER1 和 EBER2 敲除引物从 pKD13 质粒上 PCR 扩增两侧带有 FRP 重组位点的 Kanr 基因,琼脂糖凝胶电泳证实携带有 EBER 两侧同源臂的 Kanr 基因扩增成功(见图 2A)。该片段电转化至携带有 EBV 质粒 p2089 和同源重组酶表达质粒 pKD46 的大肠杆菌 BAC-46,Kan 筛选后经 PCR 检测证实 EBER 被成功敲除(见图 2B)。进一步转化 pCP20 质粒去除 Kanr 基因,Kanr 基因引物进行 PCR 鉴定,证实 Kanr 基因已经从重组质粒上切除(见图 2C)。

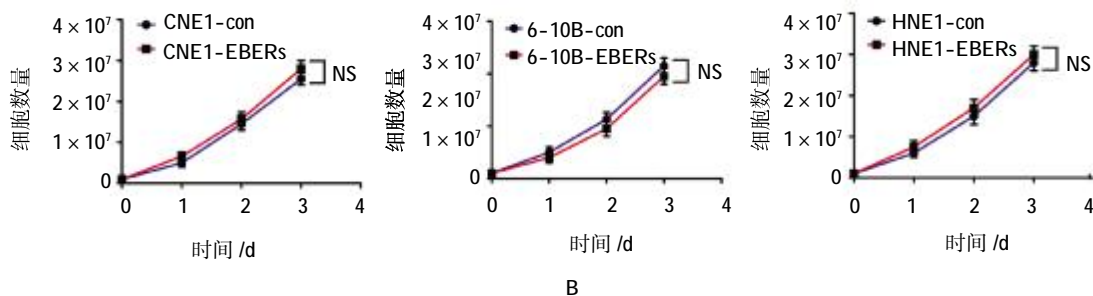
2.3 EBERs 促进鼻咽癌细胞转移相关基因的表达

鼻咽癌细胞转染 EBERs 48 h 后 PCR 检测发现 EBERs 可以促进 ITGB3 在 CNE1 和 HNE1 中的表达,



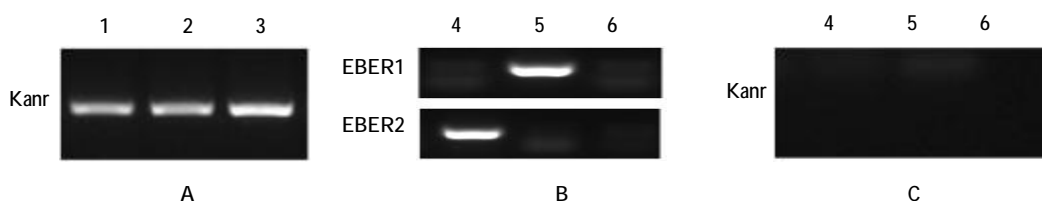
A





A: Transwell 实验检测瞬转 EBERS 表达质粒后鼻咽癌细胞迁移能力的改变, 实验中 EBERS 促进细胞迁移的相对定量 ( $\dagger P < 0.05$ ); B: CNE1, 6-10B 和 HNE1 细胞瞬转 EBERS 表达质粒后细胞的生长曲线

图 1 EBV 阴性鼻咽癌细胞瞬转 EBERS 后细胞的迁移和增殖能力



A: 从 pKD13 质粒上 PCR 扩增的 Kanr 基因; B: PCR 扩增的 EBERS, 鉴定 EBERS 敲除成功; C: PCR 扩增的 Kanr 基因, 鉴定 Kanr 基因已完全切除。1: 携带有 Kanr 基因, 用于重组 EBER1 的 PCR 片段; 2: 携带有 Kanr 基因, 用于重组 EBER2 的 PCR 片段; 3: 携带有 Kanr 基因, 用于重组 EBER1+2 的 PCR 片段; 4: 重组替换掉 EBER1 的 P2089 质粒; 5: 重组替换掉 EBER2 的 P2089 质粒; 6: 重组替换掉 EBER1+2 的 P2089 质粒

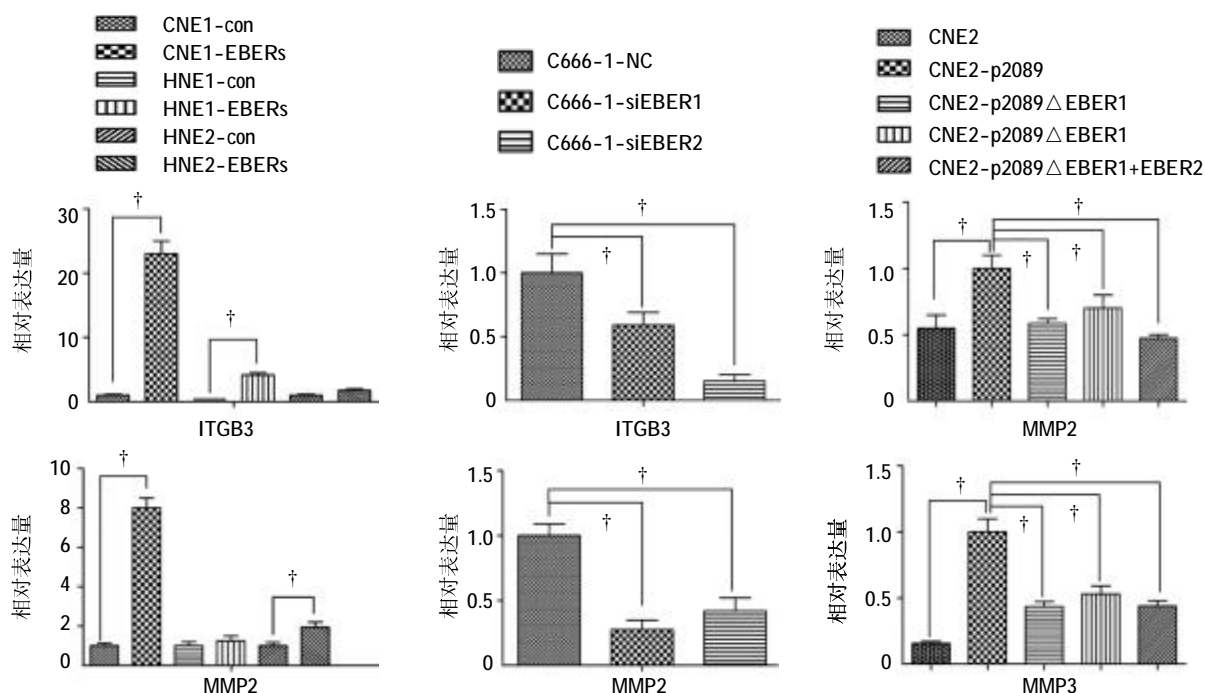
图 2 从 p2089 质粒成功切除 EBERS 基因

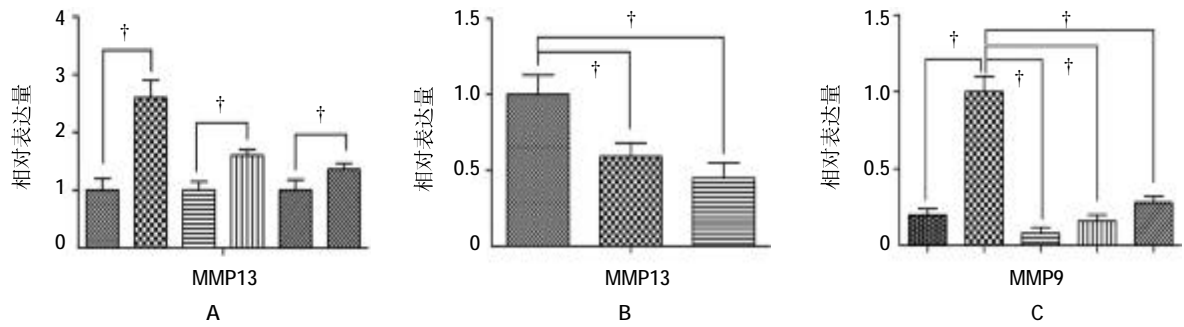
MMP2 在 CNE1 和 HNE2 中的表达, 以及 MMP13 在 CNE1、HNE1 和 HNE2 中的表达 (见图 3A)。在 EBV 阳性的鼻咽癌细胞 C666-1 中用 siRNA 干扰 EBER1 和 EBER2 (siRNA 序列见附表), PCR 检测结果可以看出 ITGB3、MMP2、MMP13 降低 (见图 3B), 从而反向验证 EBERS 具有促进鼻咽癌转移的作用。

及敲除 EBERS 的 p2089 质粒, 48 h 后 PCR 检测转移相关基因的表达, 可以观察到 MMP2、MMP3、MMP9 在转染 p2089 后升高, 而敲除 EBERS 后则抑制 p2089 质粒对 MMP2、MMP3、MMP9 基因表达的上调 (见图 3C)。

在 EBV 阴性的鼻咽癌细胞 CNE2 中转染 p2089

EBV 阴性的 6-10B 细胞中转染 EBERS 后, 细



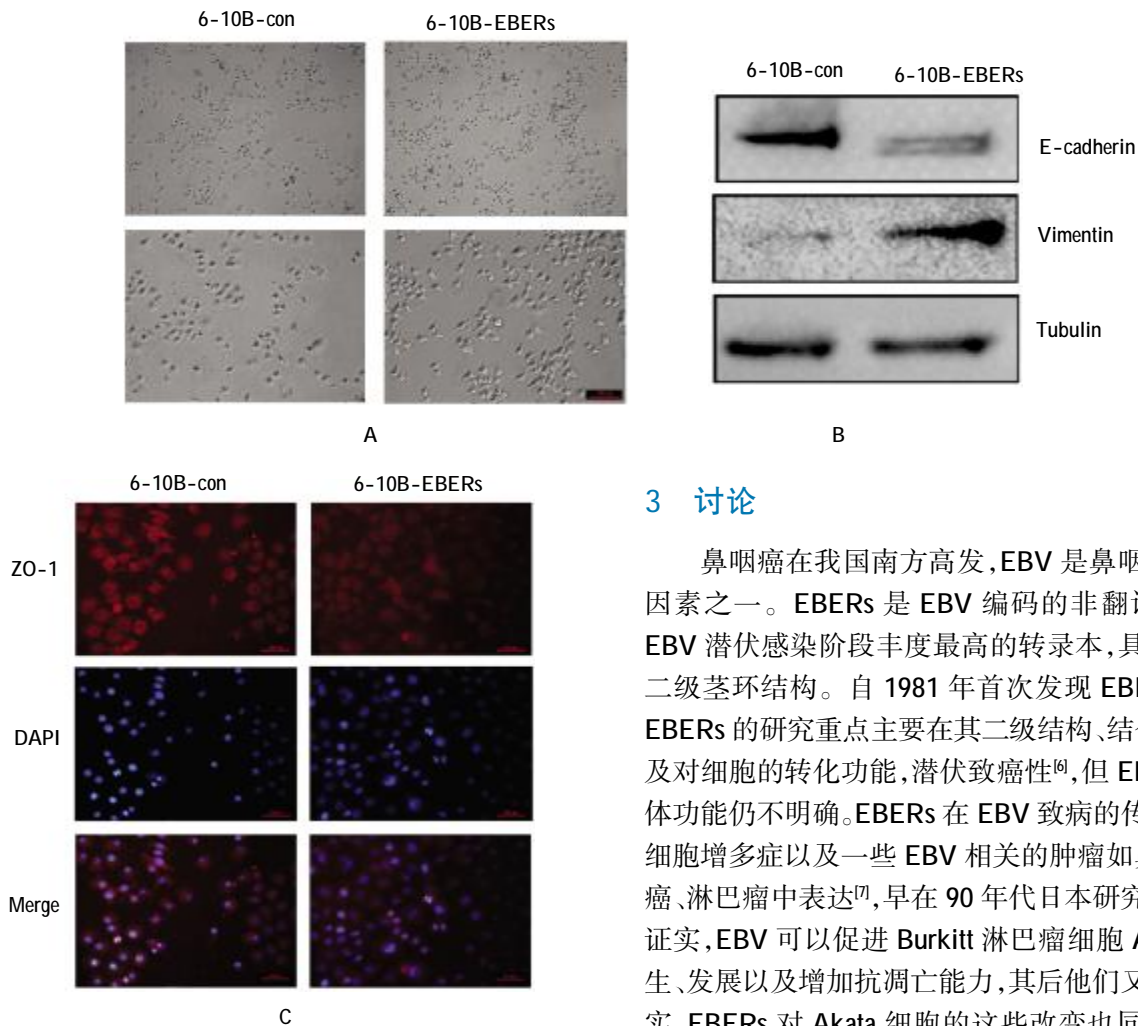


A: EBV 阴性的鼻咽癌细胞瞬转 EBERs 后 PCR 检测转移相关基因的表达; B: EBV 阳性的 C666-1 转染针对 EBER1 或 EBER2 的 siRNA 后 PCR 检测转移相关基因的表达; C: 瞬转 p2089 及敲除 EBERs 的 p2089 质粒后 PCR 检测转移相关基因的表达。†P<0.05

图 3 EBERs 促进鼻咽癌细胞转移相关基因的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

胞形态由短小的椭圆形变成周围有细长角的不规则形,且细胞之间的黏附变得松散(见图 4A),这种形态改变被认为是上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的典型过程。Western blot

验证 EMT 相关分子的变化(见图 4B),发现 EBERs 的表达使得 E-cadherin 降低, Vimentin 升高,同时免疫荧光检测结果显示 ZO-1 的表达低于对照组(见图 4C)。



A: 6-10B 瞬转 EBERs 后的形态变化; B: Western blot 检测 E-cadherin, Vimentin 的表达; C: 免疫荧光检测 ZO-1 的表达

图 4 EBERs 促进鼻咽癌细胞 6-10B 的 EMT 表型和相关基因表达

### 3 讨论

鼻咽癌在我国南方高发, EBV 是鼻咽癌的致病因素之一。EBERs 是 EBV 编码的非翻译 RNA 在 EBV 潜伏感染阶段丰度最高的转录本, 具有独特的二级茎环结构。自 1981 年首次发现 EBERs 以来, EBERs 的研究重点主要在其二级结构、结合蛋白, 以及对细胞的转化功能, 潜伏致癌性<sup>[6]</sup>, 但 EBERs 的具体功能仍不明确。EBERs 在 EBV 致病的传染性单核细胞增多症以及一些 EBV 相关的肿瘤如鼻咽癌、胃癌、淋巴瘤中表达<sup>[7]</sup>, 早在 90 年代日本研究团队已经证实, EBV 可以促进 Burkitt 淋巴瘤细胞 Akata 的发生、发展以及增加抗凋亡能力, 其后他们又进一步证实, EBERs 对 Akata 细胞的这些改变也同样产生作用<sup>[8]</sup>, 在 EBV 阴性的 Akata 细胞中过表达 EBERs, 细胞软琼脂克隆形成能力、抗凋亡能力增强, 癌基因 Bcl-2 升高, 并且认为 EBERs 的这些功能可能与

PKR 相关。此后,EBERs 对肿瘤的相关功能研究也逐渐增多,但主要是针对淋巴瘤进行探讨,对鼻咽癌、胃癌的研究较少。

EBERs 与鼻咽癌的相关性研究较少且不深入,早期有研究表明 EBERs 可以作为鼻咽癌转移的一个分子指标<sup>[9]</sup>,而较近的研究通过鼻咽癌临床样本实验分析<sup>[10]</sup>,提示 EBERs 的高表达可能作为鼻咽癌预后较好的一个指标,与之前的结论相互矛盾。因此,EBERs 在鼻咽癌中发挥何种功能至今没有明确结论。本研究从细胞层面探讨 EBERs 是否能够促进鼻咽癌细胞的转移。笔者在鼻咽癌细胞中瞬时转染 EBERs,观察到鼻咽癌的侵袭转移能力增强,但是对其增殖没有明显影响,PCR 检测表明转移相关基因 MMP2、MMP3 等均显著上升,同时在 C666-1 细胞中通过干扰 EBERs 反向验证以上结论。为了进一步验证 EBV 基因组中的 EBERs 对鼻咽癌的作用,笔者引入 EBERs 敲除的 p2089 质粒,瞬时转染鼻咽癌细胞,同样证实 EBERs 能够促进鼻咽癌细胞的转移能力及转移相关基因的表达。

发生转移的肿瘤细胞需脱离相邻的细胞而进入周围环境中,这需要肿瘤细胞失去细胞-细胞间黏附并获得极性,其中 EMT 在肿瘤转移中起着重要作用。发生 EMT 时上皮细胞向可游离的间质细胞转化,细胞形态由鹅卵石样向梭形转变,细胞分子发生改变。肿瘤细胞发生转移可由 EMT 介导的结论在过去的研究中已经很明确,例如 RU 等<sup>[11]</sup>研究的 miRNA-29b 可以通过抑制 EMT 从而抑制前列腺癌的转移;EMT 在鳞状细胞癌的转移中起着重要的作用<sup>[12]</sup>。通过实验证实鼻咽癌细胞系 6-10B 瞬转 EBERs 后形态发生改变,与 EMT 的经典表型一致,通过 Western blot 及免疫荧光进一步验证 EBERs 能够促进 EMT 相关分子的表达。

综上所述,EBERs 能够促进鼻咽癌的侵袭转移,并且该过程可能是通过 EMT 介导,本结果将为鼻咽癌抗复发和转移的临床治疗提供新的潜在靶点。

#### 参 考 文 献:

- [1] LEE N, MOSS W N, YARIO T A, et al. EBV noncoding RNA binds nascent RNA to drive host PAX5 to viral DNA[J]. *Cell*, 2015, 160(4): 607-618.
- [2] BANERJEE A S, PAL A D, BANERJEE S. Epstein-Barr virus-encoded small non-coding RNAs induce cancer cell chemoresistance and migration[J]. *Virology*, 2013, 443(2): 294-305.
- [3] BURKE A P, YEN T S, SHEKITKA K M, et al. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction[J]. *Mod Pathol*, 1990, 3(3): 377-380.
- [4] 卢建红,唐运莲,周鸣,等.在基于 BAC 的 EB 病毒基因组中引入突变[J]. *微生物学报*, 2008, 48(3): 385-390.
- [5] GREGOROVIC G, BOSSHARD R, KARSTEG C E, et al. Cellular gene expression that correlates with EBER expression in Epstein-Barr virus-infected lymphoblastoid cell lines [J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(7): 3535-3545.
- [6] YOSHIZAKI T, ENDO K, REN Q, et al. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2007, 34(1): 73-78.
- [7] KITAGAWA N, GOTO M, KUROZUMI K, et al. Epstein-Barr virus-encoded poly (A) (-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction[J]. *EMBO J*, 2000, 19(24): 6742-6750.
- [8] KOMANO J, MARUO S, KUROZUMI K, et al. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line akata[J]. *Journal of Virology*, 1999,73(12): 9827-9831.
- [9] CHAO T Y, CHOW K C, CHANG J Y, et al. Expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs as a marker for metastatic undifferentiated nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer*, 1996, 78(1): 24-29.
- [10] KE K J, WANG H Y, FU S, et al. Epstein-Barr virus-encoded RNAs as a survival predictor in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chinese Medical Journal*, 2014, 127(2): 294-299.
- [11] RU P, STEELE R, NEWHALL P, et al. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(5): 1166-1173.
- [12] TSAI J H, DONAHER J L, MURPHY D A, et al. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(6): 725-736.

(申海菊 编辑)