

EBV LMP2A 对胃癌细胞生物学特性的影响

蒋 叶¹, 冯国开², 陈健宁¹, 张娜娜¹, 曾木圣², 邵春奎^{1*}

(1. 中山大学附属第三医院病理科, 广东 广州 510630; 2. 中山大学肿瘤防治中心肿瘤研究所, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】探讨 EBV LMP2A 基因对人胃癌细胞生物学特性的影响。【方法】用包含 LMP2A 基因的逆转录病毒载体转染人胃癌细胞株(SGC7901), QRT-PCR 检测 LMP2A 基因的表达, CCK8 检测细胞增殖情况; 流式细胞术检测细胞凋亡; 划痕试验和 transwell 检测细胞迁移能力; 克隆形成试验检测细胞成瘤能力。【结果】LMP2A 基因转染的胃癌细胞生长速度增快、凋亡减少、迁移能力增强, 在平板和软琼脂中集落形成能力增强。【结论】LMP2A 基因能明显增强胃癌细胞的恶性生物学行为。

关键词: EBV; LMP2A; 转染; 胃癌; SGC7901; 凋亡; 生物学特性

中图分类号: R735 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)01-0028-08

Effects of EBV LMP2A on Biological Characters of Gastric Cancer Cells

JIANG Ye¹, FENG Guo-kai², CHEN Jian-ning¹, ZHANG Na-na¹, ZENG Mu-sheng², SHAO Chun-kui^{1*}

(1. Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Experimental Research, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of EBV LMP2A on biological characters of gastric cancer cells. 【Methods】 Human gastric cancer cell line SGC7901 was transfected with a retroviral vector containing the LMP2A gene. The expression of LMP2A gene mRNA was detected by QRT-PCR. The cell proliferation was detected by CCK8 assay. Cell apoptosis were analyzed by flow cytometry. The migration of cell was measured with wound healing assay and Transwell test. Cell tumorigenicity was measured with colony formation assay. 【Results】 The LMP2A gene-transfected gastric cancer cells grew vigorously and rapidly, had less apoptotic cells, formed more colonies and up-regulated the ability of migration. 【Conclusion】 The LMP2A gene can significantly enhance the malignancy of gastric cancer cells.

Key words: EBV; LMP2A; transfection; gastric carcinoma; SGC7901; apoptosis; biological characters

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1):28-35]

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)属于人类 γ 疱疹病毒, 为自然界广泛存在的疱疹病毒科 DNA 致癌病毒, 人群感染率高达 90% 以上, 与人类多种淋巴瘤, 如伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HL)以及免疫缺陷病人淋巴瘤等的发生密切相关。此外, EBV 还与某些上皮性肿瘤如鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)和部分胃癌相关。近 30 年来研究表明, 世界范围内约 1.3% ~ 18% 的胃癌与 EBV 感

染密切相关, 这部分胃癌称为 EB 病毒相关胃癌(Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma, EBVaGC)^[1]。在 EBV 相关恶性肿瘤中, EBV 以潜伏感染的形式存在; 根据其表达蛋白种类分为 3 种潜伏类型: I 型潜伏表达 EBNA1、LMP2A、EBERs 和 BARFs, 如 EBVaGC 和伯基特淋巴瘤(EBVaGC 约半数表达 LMP2A); II 型潜伏, 除表达 EBNA1、LMP2A、EBERs 和 BARFs 外, 还表达 LMP1, 如鼻咽癌和霍奇金淋巴瘤; III 型潜伏, 表达 I 型和 II 型

收稿日期: 2012-08-03

基金项目: 国家自然科学基金(81071893, 3067240, 81272553); 广东省自然科学基金(S2012020010898); 广州市科技计划项目(2011J4100106)

作者简介: 蒋叶, 硕士研究生, 研究方向: 胃癌分子病理, E-mail: 477921702@qq.com; * 通信作者: 邵春奎, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 分子病理学, E-mail: chunkuishao2011@163.com

的各种潜伏蛋白,同时还表达 EBNA2, 3A 和 3C^[2-3],如 AIDS 相关淋巴瘤。EBV 潜伏性膜蛋白 1(latent membrane protein-1, LMP1)是 EBV 中唯一能够在体外转化细胞的 EBV 编码的基因产物,其在 EBV 介导的 B 淋巴细胞增殖和永生化中起非常重要作用,因而被公认为病毒基因组编码的具有促细胞癌变和转移作用的癌蛋白^[4]。EBVaGC 为 I 型潜伏不表达 LMP1,是否存在类似 LMP1 的癌蛋白至今仍未十分清楚。目前研究表明,约半数的 EBVaGC 表达 EBV 另一个重要潜伏膜蛋白—LMP2A。LMP2A 一方面参与上皮细胞的转化、维持病毒的潜伏状态,促进肿瘤的发生,另一方面,它包含了细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 作用的抗原表位,可以作为免疫治疗的靶点^[5]。在 EBVaGC 中, LMP2A 是否起着癌基因的作用? LMP2A 对胃癌会有哪些方面的影响? 这些问题均未见系统的研究与报道。因此,本研究拟通过逆转录病毒介导 LMP2A 基因在胃癌细胞中稳定表达,观察 LMP2A 对胃癌细胞生物学行为的影响,这对于揭示其对胃癌的致病机制以及开展 EBVaGC 的特异性治疗均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 EBV LMP2A 真核表达载体质粒 pBabe-LMP2A 及空白载体质粒 pBabe 及病毒包装质粒 PIK 由中山大学肿瘤医院曾木圣教授馈赠。pBabe-LMP2A 质粒携带 LMP2A 基因及嘌呤霉素抗性基因, pBabe 质粒携带嘌呤霉素抗性基因。

1.1.2 细胞株 人胃癌细胞株 SGC7901 和人胚肾细胞株 293FT 由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清、RPMI1640 培养基和 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司, 2.5 g/L 胰酶和 1×PBS 购自吉诺生物公司; 嘌呤霉素购自 sigma 公司; RNA 提取试剂盒 (Total RNA kit I, Cat No: R6834) 购自 OMEGA 公司; 逆转录试剂盒 (Prime Script RT reagent Kit Perfect Real Time, code: DRR037S), SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq, code: DRR420S) 购自 Takara 公司; CCK-8 试剂购自晶欣公司; Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购自凯基生物公司; Hoechst 33342 购自 MP 公司; 结晶紫、低熔点琼脂糖、CaCl₂、

HBS、氯喹等购自广州威佳科技有限公司。

1.2 细胞培养及转染

1.2.1 培养条件 SGC7901 细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 293FT 细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基。细胞培养在 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行。细胞生长接近 75% 融合时, 用 2.5 g/L 胰酶消化, 以 1:3 或 1:4 比例传代。

1.2.2 磷酸钙转染法包装逆转录病毒 293FT 细胞密度达 70% 左右时, 进行磷酸钙转染法包装逆转录病毒。将 20 μL 目的质粒 (1 g/L)、20 μL 病毒包装质粒 PIK (1 g/L)、100 μL 去离子水、50 μL 1 mol/L 的 CaCl₂、200 μL HBS (pH = 6.75) 混匀后室温下静置 15~30 min, 然后均匀滴入 293FT 细胞内, 并加入终浓度 25 μmol/L 的氯喹, 轻轻混匀, 显微镜下观察, 细胞表面可见细密沉淀。培养 6 h 后, 弃去培养基, PBS 洗两次, 轻摇至沉淀全部溶解后加入新鲜培养基继续培养 18 h, 然后每 4 h 收集一次病毒, 用注射器吸取培养皿上清, 0.45 μm 过滤器进行过滤。

1.2.3 逆转录病毒转染胃癌细胞株 SGC7901 培养 SGC7901 细胞至细胞密度为 70% 左右, 弃去培养基, 加入新鲜病毒液, 每 4 h 换一次新鲜病毒液, 重复 3 至 4 次, 再培养 24 h 至 48 h 后弃去病毒液传代, 加入嘌呤霉素筛选 10 d 后出现抗性细胞克隆, 表明转染成功。

1.3 实时荧光定量 RT-PCR 鉴定 LMP2A 的表达

1.3.1 总 RNA 的提取 重组细胞株 SGC7901-pBabe 和 SGC7901-pBabe-LMP2A 总 RNA 提取按 RNA 提取试剂盒说明书操作步骤进行。

1.3.2 逆转录 SGC7901-pBabe 和 SGC7901-pBabe-LMP2A 的总 RNA 逆转录为 cDNA 按逆转录试剂盒说明书所列步骤操作。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 以重组细胞株 SGC7901-pBabe 和 SGC7901-pBabe-LMP2A 的 cDNA 为模板扩增 LMP2A 片段进行 LMP2A 重组细胞株的鉴定, 步骤参照 SYBR Green I 试剂盒说明书, 使用仪器为 ABI PRISM 7000。LMP2A 引物序列: Forward: 5'-ACGATGGCGGAAACAACCTC-3', Reverse: 5'-GGGTCCTC ATAAGGCGGTG-3', 产物 121bp; GAPDH 引物序列: Forward: 5'-ACCCAGAAG ACTGTGGATGG-3' Reverse: 5'-

TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-3',产物 200 bp。所用引物均由上海英骏公司合成,PAGE 纯化。每次试验每种细胞设置 3 个复孔,取平均值为 Ct 值,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量^[6]。相同条件下重复试验 3 次。

1.4 CCK-8 测细胞生长曲线

将 2×10^3 个对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,每株细胞设 6 个复孔,以只加培养基不加细胞的空白对照孔调零。检测时,每孔加 10 μ L CCK-8,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后直接用酶联免疫检测仪测定在 450 nm 处的吸光度,以时间为横坐标,以吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。相同条件下试验重复 3 次。

1.5 流式细胞术(Annexin V-FITC/PI 双染法)细胞凋亡分析

用不含血清的培养基悬浮细胞后计数, 5×10^5 个细胞/每孔接种于 6 孔板,分别于培养 24 h 和 48 h 后收集细胞,胰酶(不含 EDTA)消化,1000 r/min (离心机半径 $r = 6$ cm)、离心 5 min,冰冷 PBS 洗涤 2 次,加入 500 μ L Binding Buffer 悬浮细胞,加入 Annexin V-FITC 和 PI,混匀室温避光孵育 15 min,1 h 内采用 BD FACSCalibur 流式细胞仪进行分析。凋亡率为 Annexin V 单阳细胞(右下象限:早期凋亡)与 Annexin V、PI 双阳细胞(右上象限:晚期凋亡)合计。每次试验每种细胞设置 3 个复孔,相同条件下重复试验 3 次。

1.6 划痕试验

接种细胞于 12 孔板中,待细胞密度长至 75% 时用 100 μ L 枪头沿孔底直径均匀笔直划痕,吹走划落细胞,为尽量避免细胞增殖影响迁移结果,改为含 3% 胎牛血清培养基培养,并于 0 h、24 h、48 h 倒置显微镜下观察、拍照、测量划痕闭合宽度。每次试验每种细胞设置 6 个复孔,相同条件下试验重复 3 次。

1.7 Transwell 迁移实验

无血清培养基重悬细胞并调整其浓度为 4×10^5 个/mL,取 200 μ L (8×10^4 个)加入 transwell 上室,下室加入 600 μ L 含 150 mL/L 胎牛血清的培养基,transwell 培养体系在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后棉签擦去上室非迁移细胞,750 mL/L 乙醇固定上室膜 1 h,PBS 洗去固定液,5 mg/L Hoechst33342 染色 10 min 后倒置荧光显微镜观察,沿直径选取 6 个视野,计数并拍照分析。

每次试验每种细胞设置 3 个复孔,相同条件下试验重复 3 次。

1.8 平板克隆形成试验

调整细胞浓度为 100 个/mL,混匀后以 2 mL/孔加入 6 孔板中,培养 14 d 后弃去培养基,PBS 洗 2 次,750 mL/L 乙醇固定 30 min,PBS 洗去固定液,1 g/L 结晶紫染色 30 min,流水缓慢冲洗,晾干,拍照,分析结果。含有 50 个以上细胞的集落计为 1 个克隆,克隆形成率=(克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%。每次试验每种细胞设置 3 个复孔,相同条件下试验重复 3 次。

1.9 软琼脂克隆形成实验

在 6 孔板中先制备 6 g/L 下层琼脂,待凝固后,制备 3 g/L 上层琼脂,上层琼脂中分别含有 300 个活细胞/每孔;将制好的 6 孔琼脂板放入细胞培养箱中培养 14 d,相差显微镜下计数克隆形成数、拍照、分析结果。每次试验每种细胞设置 3 个复孔,相同条件下试验重复 3 次。

1.10 统计学分析

实验数据采用 SPSS 13.0 软件进行 t 检验和方差分析。各指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 RT-PCR 鉴定 LMP2A 的表达

重组质粒 pBabe-LMP2A 和空载体质粒 pBabe 分别导入 SGC7901 细胞,经嘌呤霉素筛选,7~10 d 后出现抗性细胞克隆,表明转染成功。实时荧光定量 RT-PCR 可在被转染的细胞中检测到 LMP2A mRNA 的相对表达量为 (316 ± 33) (图 1A),图 1B 为扩增曲线。

2.2 LMP2A 载体稳定转染后细胞增殖情况的变化

SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞和 SGC7901-pBabe 细胞在贴壁后第 1、2 天细胞增殖缓慢,第 3 天进入指数生长期,SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞的增殖能力明显较 SGC7901-pBabe 细胞强(图 2),结果表明,转染 LMP2A 的胃癌细胞增殖能力增强。其吸光值从第 3 天开始同对照组细胞差异有统计学意义。

2.3 LMP2A 载体稳定转染后细胞凋亡情况的变化

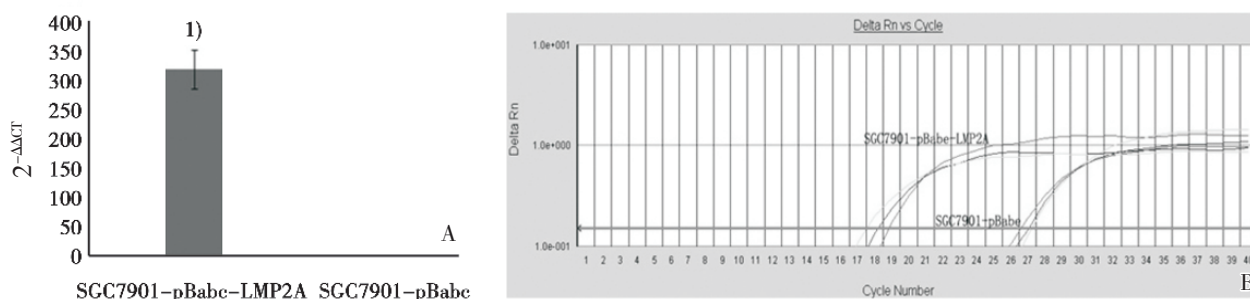


图 1 SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞和 SGC7901-pBabe 细胞中 LMP2A mRNA 的相对表达量

Fig.1 Relative expression of LMP2A mRNA in SGC7901-pBabe-LMP2A cells and SGC7901-pBabe cells

Quantitative real-time RT-PCR showed that the relative expression of LMP2A mRNA in SGC7901-pBabe-LMP2A cells was 316 ± 33 folds of that in SGC7901-pBabe cells. 1) $P < 0.05$

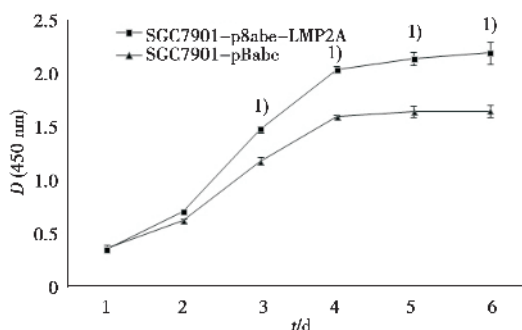


图 2 SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞和 SGC7901-pBabe 细胞生长曲线

Fig.2 Growth curve of SGC7901-pBabe-LMP2A cells and SGC7901-pBabe cells

The proliferation ability of SGC7901-pBabe-LMP2A cells increased apparently. There were statistical differences from the third day to the sixth day. 1) $P < 0.05$.

流式细胞术 (AnnexinV/PI 双染法) 检测 SGC7901-pBabe-LMP2A、SGC7901-pBabe 和 SGC7901 三株细胞无血清培养 24 h 和 48 h 后的细胞凋亡比例。图 3 显示, 无血清培养 24 h 后, SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞的凋亡率为 $(15.0 \pm 1.6)\%$, 明显比 SGC7901-pBabe 细胞 $(26.1 \pm 2.0)\%$ 和 SGC7901 细胞 $(26.6 \pm 1.5)\%$ 少。无血清培养 48 h 后, SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞的凋亡率为 $(26.9 \pm 2.0)\%$, 仍然比 SGC7901-pBabe 细胞 $(51.1 \pm 2.7)\%$ 和 SGC7901 细胞 $(54.8 \pm 2.3)\%$ 少, 差异有统计学意义。

2.4 LMP2A 载体稳定转染后细胞迁移能力的变化

细胞划痕后 24 h 观察到 SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞划痕宽度恢复 40% ~ 50%, 而 SGC7901-pBabe 细胞恢复 20% ~ 30%; 细胞划痕后 48 h, LMP2A 组细胞划痕宽度恢复 70% ~ 90%, 而对照组只恢复到 40% ~ 50% (图 4A)。Transwell 迁移试验细胞迁移 24 h 后 LMP2A 组高倍镜每视野平均穿膜细胞数 (189 ± 15) 明显多于对照组平均穿膜细胞数 (103 ± 10) ; 图 4BC), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上试验表明, LMP2A 高表达时, 细胞迁移能力增强。

2.5 LMP2A 载体稳定转染后细胞克隆形成能力的变化

SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞和 SGC7901-pBabe 细胞的平板克隆形成率分别为 $(51 \pm 6)\%$ 和 $(23 \pm 4)\%$, 与空白质粒转染组比较, LMP2A 组的克隆形成能力明显增强 ($P < 0.05$, 图 5A)。含细胞的软琼脂按常规条件培养 14 d 后, 在相差显微镜下观察, 低倍镜计数每孔克隆数, 取复孔平均值, 发现 SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞克隆形成数 (46 ± 8) 显著高于 SGC7901-pBabe 细胞 (26 ± 3) ; 图 5B), 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

EBV 相关上皮肿瘤由 EBV 感染的上皮细胞单克隆增殖形成, 是病毒与宿主相互作用致癌的典型模式^[7]。在 EBV 表达的各种潜伏蛋白中, 研究最多的是 LMP1, 它可以促进细胞增殖^[8], 抑制细胞分化和凋亡^[9-10], 促进肿瘤转移^[11]及逃避宿主免

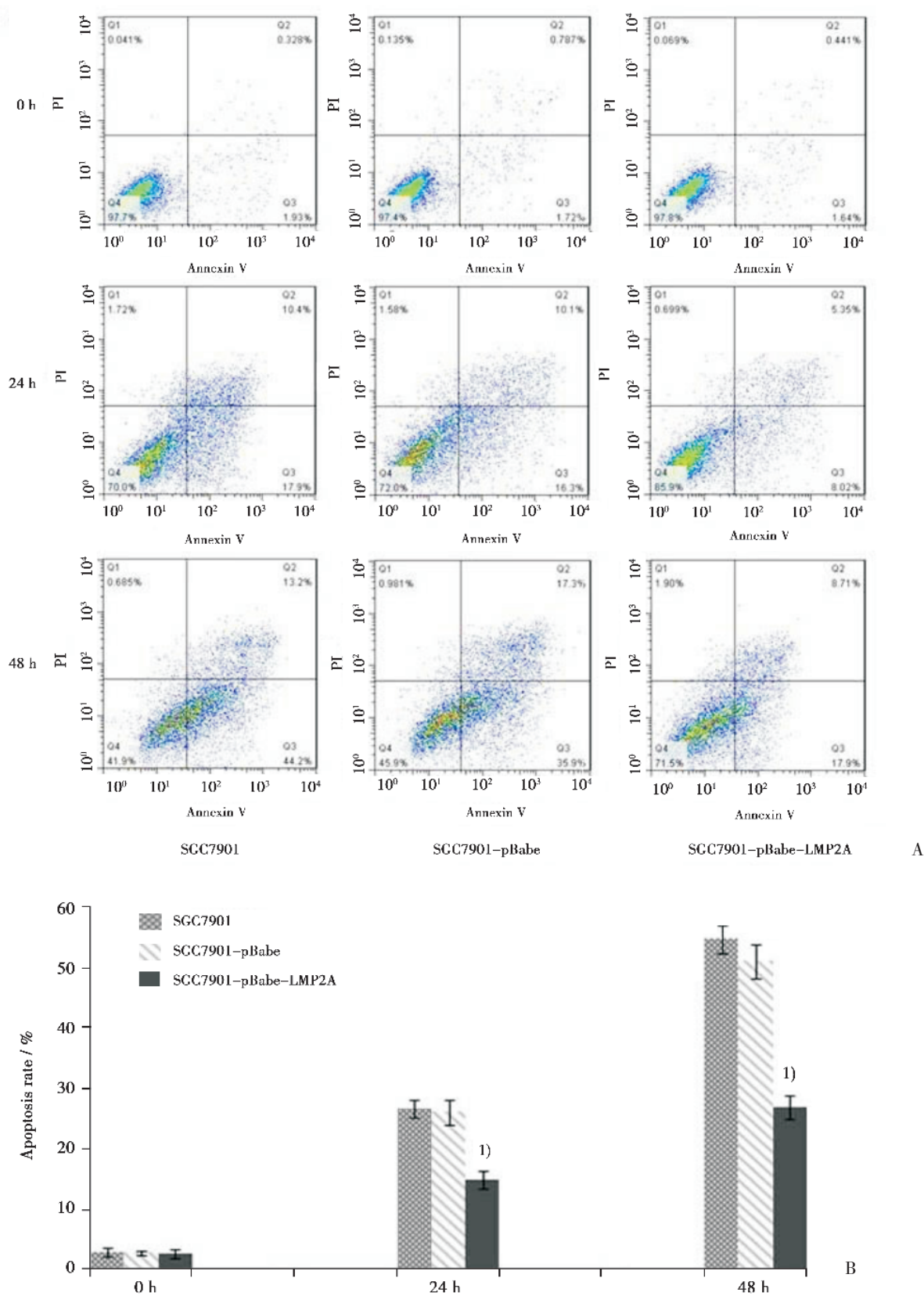


图 3 转染 LMP2A 后 SGC7901 细胞抗凋亡能力增强

Fig.3 SGC7901 cells transfected with LMP2A are prone to undergo apoptosis

SGC7901-pBabe-LMP2A cells, SGC7901-pBabe cells and SGC7901 cells were cultured in serum-free medium after 24 h and 48 h. Annexin V-FITC /PI staining. The apoptosis rate of SGC7901 -pBabe-LMP2A cells is less than the other two cells. $1P < 0.05$

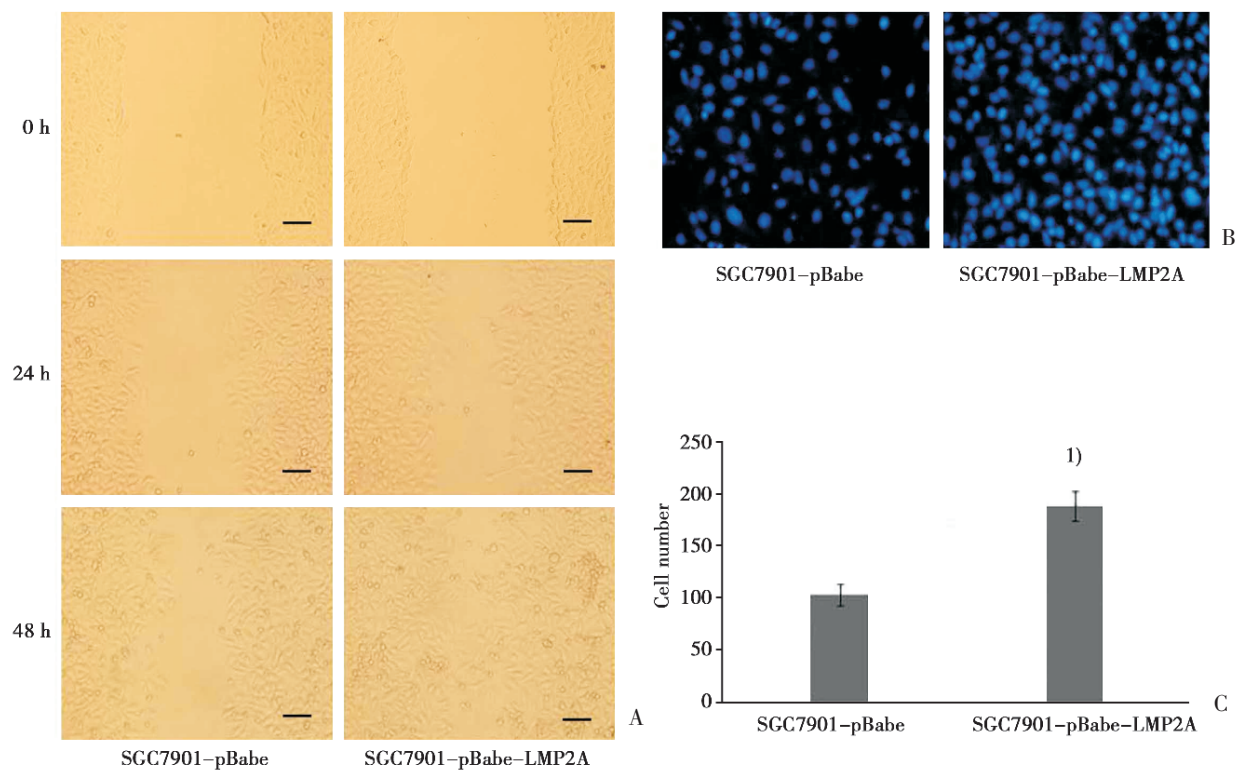


图 4 LMP2A 增强 SGC7901 细胞的迁移能力

Fig.4 LMP2A enhances the migration ability of SGC7901 cells

A: Scrape-wound migration assay shows that migration of LMP2A-transformed cells is significantly more fast. Bar = 200 μ m; B: Transwell migration assay shows the LMP2A-transformed group has more vertical migration cells; C: The average numbers of vertical migration cells per high-power field (HPF). 1) $P < 0.05$.

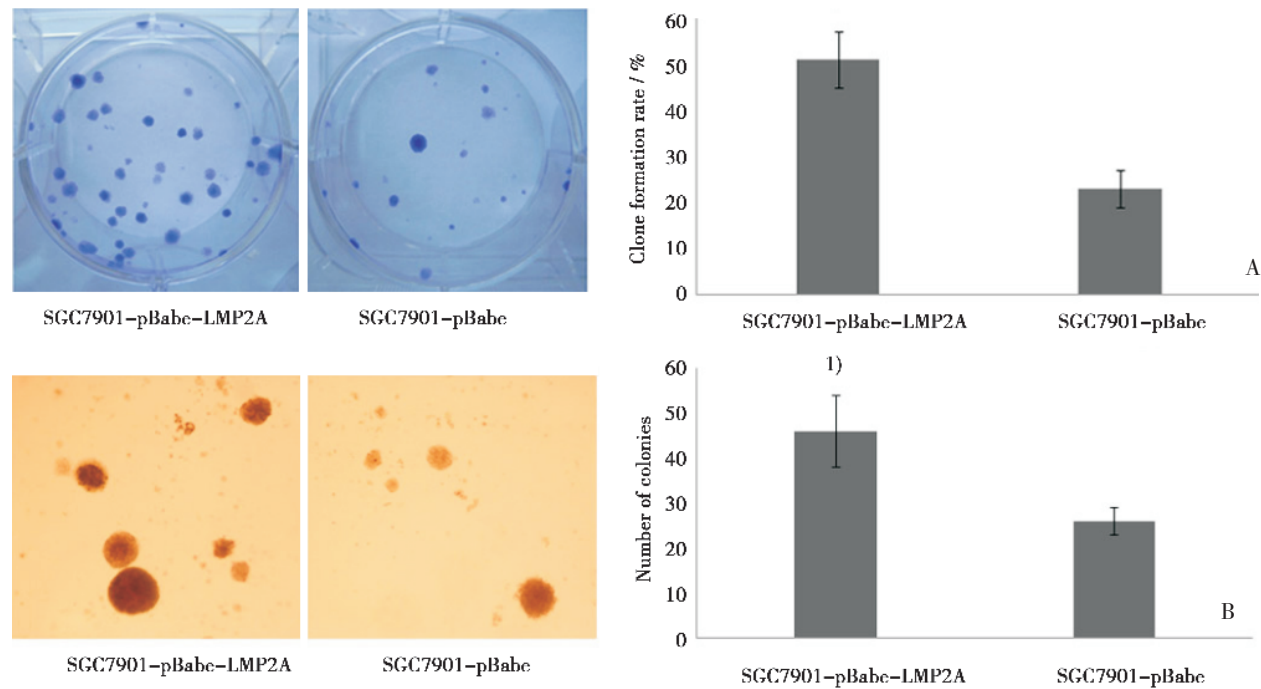


图 5 LMP2A 增强 SGC7901 细胞的克隆形成能力

Fig.5 LMP2A enhances the colony forming ability of SGC7901 cells

A: Colony formation assay of the SGC7901 cell lines. Upon the stable expression of LMP2A, these cells form bigger and more colonies compared with the vector control cells; B: The anchorage-independent growth in soft agar of SGC7901 cells with or without exogenous LMP2A expression. 1) $P < 0.05$.

疫反应^[12],是 EBV 重要的致癌蛋白。而 EBVaGC 中 EBV 为 I 型潜伏,不表达 LMP1,但是约半数的 EBVaGC 表达 EBV 的另一种重要潜伏蛋白 LMP2A。LMP2A 对胃癌是否也起着致癌蛋白的作用?国内外有关研究仍为之甚少。本研究利用逆转录病毒载体系统,成功地构建了稳定表达 LMP2A 的胃癌细胞 SGC7901-pBabe-LMP2A 及不表达 LMP2A 的空载体转染的 SGC7901-pBabe 细胞,以此探讨 LMP2A 对胃癌生物学特性的影响。

实验结果显示,SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞增殖旺盛,从绘制的细胞生长曲线可见,SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞的增殖能力明显增强。无血清条件下培养 24 h 和 48 h 后可见 SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞的凋亡率明显下降。划痕试验和 transwell 试验结果证实 SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞的平行迁移能力和垂直迁移能力均较强。体外试验中,SGC7901-pBabe-LMP2A 细胞无论是锚定依赖性还是锚定非依赖性的生长都强于 SGC7901-pBabe 细胞。以上结果说明,LMP2A 基因的存在,改变了 SGC7901 的生长特性,使其增殖增强、对抗凋亡、迁移增强并更具成瘤能力。

恶性肿瘤以细胞过度而异常的增生为基本特征。在我们的实验中,LMP2A 转入胃癌细胞 SGC7901 并稳定表达后其增殖能力和抗去营养性凋亡能力明显增强了。国内曾有研究表明,LMP2A 瞬时转染胃癌细胞后其增殖能力增强,并上调了细胞周期蛋白 Cyclin E^[13]。瞬时转染目的片段能获得较高的表达量,但作用时间短,而我们利用逆转录病毒载体系统使 LMP2A 在胃癌细胞中稳定表达,更能模拟病毒在细胞内表达潜伏蛋白的模式。国外也有研究表明,在人永生表皮细胞株 HaCaT 中,LMP2A 能促使细胞过度增殖并抑制细胞分化^[14]。在胃癌细胞株 HSC-39 中,LMP2A 还可以阻止 TGF- β 1 诱导的凋亡^[15]。这与我们的研究结果是相符的。LMP2A 增强胃癌细胞的增殖和抗凋亡能力的机制又如何呢?目前研究仍为之甚少。LMP2A 促进 HaCaT 细胞增殖经证实部分是通过 PI3K/AKT 通路发挥作用的。PI3K/AKT 信号通路在人类绝大多数恶性肿瘤中被异常激活,其在肿瘤的增殖、存活、细胞运动、抵抗凋亡等各方面都

发挥了重要作用。而在表达 LMP2A 的胃癌细胞中,PI3K/AKT 信号通路是否也发挥了作用仍有待进一步研究。

恶性肿瘤的另一个特征是易于转移。在细胞迁移试验中,划痕的平行迁移和 Transwell 的垂直迁移都表明 LMP2A 增强了 SGC7901 细胞的迁移能力。肿瘤细胞的迁移能力与肿瘤的浸润转移是密切相关的。LMP2A 对细胞迁移能力的影响在胃癌中研究甚少,而在鼻咽癌中,近年有研究表明 LMP2A 能促进鼻咽癌的上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程^[16]。癌细胞经历 EMT 意味着其细胞间粘附下降、细胞骨架改建、细胞极性消失,从而更易于转移。

我们在体外试验中证实 LMP2A 可以同时促进胃癌细胞 SGC7901 的锚定依赖性和锚定非依赖性生长。国外相关研究表明 LMP2A 可以通过激活 PI3K/AKT 通路使 HaCaT 细胞在裸鼠体内形成肿瘤^[13];最新的研究也证实 EBV 可以促进另一株胃癌细胞株—AGS 的锚定非依赖性生长^[17]。细胞克隆形成尤其是锚定非依赖性生长的机制异常复杂,涉及到细胞内一系列的信号转导通路的激活。而目前的研究只证实 PI3K/AKT 通路在 LMP2A 促进 HaCaT 细胞的成瘤中发挥了作用。

综上所述,EBV 潜伏膜蛋白基因 LMP2A 能明显地增强胃癌细胞 SGC7901 的恶性程度,促使细胞增殖增强、抵抗凋亡、转移并成瘤,进一步证实 LMP2A 蛋白在胃癌细胞中可能起着致癌蛋白的作用,但 LMP2A 作用于胃癌细胞的分子机制尚需进一步研究,而我们建立的这个系统为进一步的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(10): 757-768.
- [2] Sugiura M, Imai S, Tokunaga M, et al. Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells[J]. Br J Cancer, 1996, 74(4): 625-631.
- [3] Zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, et al. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF1 gene[J]. Cancer Res, 2000,

- 60(10): 2745–2748.
- [4] Dawson CW, Port RJ, Young LS. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2012, 22(2): 144–153.
- [5] Lee SP, Tierney RJ, Thomas WA, et al. Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2: a potential target for CTL-based tumor therapy [J]. *J Immunol*, 1997, 158(7): 3325–3334.
- [6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [7] Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(9): 1726–1733.
- [8] Graham JP, Arcipowski KM, Bishop GA. Differential B-lymphocyte regulation by CD40 and its viral mimic, latent membrane protein 1 [J]. *Immunol Rel*, 2010, 237(1): 226–248.
- [9] Lee KH, Goan YG, Hsiao M, et al. MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(15): 2529–2538.
- [10] Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. A polymorphism of microRNA 27a genome region is associated with the development of gastric mucosal atrophy in Japanese male subjects [J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(7): 1691–1697.
- [11] Morris MA, Dawson CW, Wei W, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 induces a hyperproliferative and inflammatory gene expression programme in cultured keratinocytes [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(11): 2806–2820.
- [12] Zhang XN, Huang PC. Cell survival and death program modulated by LMP1: implication in antitumor immunity [J]. *Ai Zheng*, 2009, 28(8): 831–8377.
- [13] 高玉, 纪静, 朱伟, 等. EB病毒潜伏期膜蛋白 LMP2A 对胃癌细胞增殖的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(2): 108–113.
- Gao Y, Ji J, Zhu W, et al. Influence of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on the proliferation of human gastric cancer cells [J]. *World Chin J Digestol*, 2007, 15(2): 108–113.
- [14] Scholle F, Bendt KM, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation and activates Akt [J]. *J Virol*, 2000, 74(22): 10681–10689.
- [15] Fukuda M, Longnecker R. Latent membrane protein 2A inhibits transforming growth factor- β 1-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *J Virol*, 2004, 78(4): 1697–1705.
- [16] Kong QL, Hu LJ, Cao JY, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces an epithelial-mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like cancer cells in nasopharyngeal carcinoma [J]. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(6): e1000940.
- [17] Marquitz AR, Mathur A, Shair KH, et al. Infection of Epstein-Barr virus in a gastric carcinoma cell line induces anchorage independence and global changes in gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(24): 9593–9598.

(编辑 孙慧兰)