

·基础研究·

siRNAs干扰 EBNA1 下调 EBV 阳性鼻咽癌细胞内 ALOX12 的表达

刘文举, 王凤伟, 买世娟*

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心实验研究部, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】利用 RNA 干扰技术抑制 C666-1 细胞中 EB 病毒核抗原 1(EBNA1)的表达,探索氧化应激与抗氧化相关基因的表达变化。【方法】采用蛋白质印迹证实了能有效抑制 EBNA1 表达的干扰序列,使用甲基噻唑基四唑(MTT)方法检测 C666-1 细胞的存活率,利用实时定量 PCR 芯片技术探索了氧化应激与抗氧化相关基因的转录谱变化,并通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质印迹进行了验证。【结果】EBNA1-1414 和 EBNA1-1437 干扰序列转染 C666-1 细胞 48 h 后,分别可抑制 59%和 56%的 EBNA1 蛋白表达,细胞存活率分别降低了 33%和 24%。PCR 芯片实验发现干扰 EBNA1 表达后 48 h C666-1 细胞中花生四烯酸盐 12-脂氧合酶(ALOX12)蛋白表达有下调,谷胱甘肽还原酶(GSR)和过氧化物酶 3(PRD3)在转录水平表达上调。【结论】EBNA1 或许能够通过上调 ALOX12 的表达间接地发挥促鼻咽癌作用。

关键词: EB 病毒; EB 病毒核抗原 1; RNA 干扰; 鼻咽癌**中图分类号:** R73-3**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-3554(2010)06-0755-06

siRNAs Targeting EBNA1 Down-regulate ALOX12 Expression in EBV Positive NPC Cell Line

LIU Wen-ju, WANG Feng-wei, MAI Shi-juan*

(State Key Laboratory of Oncology in Southern China//Department of Experimental Research Cancer Center,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To suppress Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) expression in C666-1 cells by using the RNA interference strategy, and investigate expression change of genes involved in oxidative stress and antioxidant defence response. 【Methods】Small interfering RNAs targeting EBNA1 were verified by Western blot. The survival of C666-1 cells was measured by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The transcriptional profiling of genes involved in oxidative stress and antioxidant defence response was analyzed by using real-time PCR-microarray method and the PCR-microarray result was verified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. 【Results】EBNA1 protein expression was suppressed by 59% and 56%, respectively, and the survival of C666-1 cells was reduced by 33% and 24% respectively at 48 h after siRNA1414 and siRNA1437 transfection. PCR-microarray analysis revealed that arachidonate 12-lipoxygenase (ALOX12) protein expression was down-regulated and glutathione reductase (GSR) and peroxiredoxin 3 (PRDX3) expression were transcriptionally up-regulated at 48 h after the suppression of EBNA1 expression in C666-1 cells. 【Conclusions】EBNA1 maybe contribute to the oncogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) indirectly by up-regulating ALOX12 expression.

Key words: Epstein-Barr virus; Epstein-Barr virus nuclear antigen 1; RNA interference; nasopharyngeal carcinoma

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6): 755-760]

收稿日期: 2010-06-16

基金项目: 国家重点基础研究计划(973)项目(2006CB910104)

作者简介: 刘文举, 硕士, 研究方向为 EB 病毒与鼻咽癌, E-mail: liuwenjue@yahoo.cn; * 通信作者: 买世娟, 副研究员, 硕士生导师,
E-mail: maishj@sysucc.org.cn

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)与一系列人类恶性肿瘤具有密切的相关性,其中包括鼻咽癌、伯基特淋巴瘤、NK/T 细胞淋巴瘤和胃癌^[1]。EB病毒核抗原 1(EBV encoded nuclear antigen 1, EBNA1)是唯一在 EB 病毒相关肿瘤中均有表达的病毒蛋白,在 EB 病毒的潜伏感染中有重要作用。EBNA1 可以激活 EB 病毒的 DNA 复制,并在细胞分裂过程中介导 EB 病毒游离体在子代细胞的平均分配。我们的研究发现突变型 Qp 启动子有可能通过上调 EBNA1 蛋白的表达来促进病毒在鼻咽上皮细胞中的稳定感染,从而有助于鼻咽癌的发生发展进程^[2]。作为一个转录激活子,EBNA1 不但可以调节其本身、其他 EBNA 蛋白和潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1)的表达^[3],还可以影响一些细胞基因的表达^[4-5]。我们的研究还发现,在广东地区鼻咽癌细胞中特异的变异缬氨酸(variant-valine, V-val)亚型 EBNA1 基因与原型相比,其转录激活能力明显增强^[6]。C666-1 细胞系来源于人未分化鼻咽癌,在长期培养过程中仍持续携带 EB 病毒,并表达了 EBNA1 蛋白,小的非多聚腺苷酸 RNA (small non-polya-denylated RNAs, EBERs)和潜伏膜蛋白转录本。该细胞系携带的 EB 病毒属于 GD1 亚型的病毒基因组,具有羧基末端缺失 30 bp 的 LMP1 基因和 V-val 亚型 EBNA1 基因。C666-1 细胞系尤其类似于中国华南地区的鼻咽癌,作为唯一一株稳定感染 EB 病毒的鼻咽癌细胞系,成为研究鼻咽癌与 EB 病毒的重要工具^[7]。有研究提示 EBNA1 可以促进淋巴细胞的恶变^[8],增强胃癌细胞的成瘤性^[9]。然而目前还未见有报道抑制 C666-1 细胞中 EBNA1 基因表达的研究。因此,我们选择 C666-1 细胞进行 EBNA1 基因的 RNA 干扰,研究 EBNA1 在鼻咽癌中的作用。近年来, RNA 干扰(RNA interference, RNAi)作为一种新的基因沉默技术,以其独特的优势在肿瘤研究领域被广泛应用。其原理是利用双链小片段 RNA 高效、特异地降解细胞内同源 mRNA,阻断体内基因表达,使细胞出现靶基因缺失的表型。有研究提示在恶性淋巴细胞中 EBNA1 参与了氧化应激与抗氧化反应促进了肿瘤进展^[10]。那么鼻咽癌中 EB 病毒编码的 EBNA1 是否能够影响氧化应激与抗氧化相关基因的表达呢?本研究对 C666-1 细胞中的 EBNA1 基因进行特异性的 RNA 干扰,

并检测 EBNA1 基因沉默对 C666-1 细胞中氧化应激与抗氧化相关基因表达的影响,对 EBNA1 在鼻咽癌中的作用进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 C666-1 细胞系来源于人未分化鼻咽癌,由本实验室收藏。

1.1.2 主要试剂 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)购自锐博公司,转染试剂 Lipofectamine2000、TRIzol 试剂和反转录试剂盒均购自 Invitrogen 公司,M-PER 蛋白裂解液购自 Pierce 公司,蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司,EBNA1 抗体(cat#sc-57719)、花生四烯酸盐 12 脂氧合酶(arachidonate 12-lipoxygenase, ALOX12)抗体(cat#sc-32939)和过氧化物酶 3(peroxiredoxin 3, PRDX3)抗体(cat#sc-59661)购自 Santa Cruz 公司,谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GSR)抗体(cat#ab55075)购自 Abcam 公司,GAPDH 抗体(cat#Mab5079)购自联科生物公司, β -actin 抗体(cat#4967)和 ECL 化学发光试剂购自 Cell Signaling 公司,氧化应激与抗氧化 PCR 芯片(cat#PAHS-065A)和 2X SuperArray PCR master mix(cat#PA-112)购自 SuperArray Bioscience 公司,RNeasy MinElute 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司,PCR 试剂盒购自 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 C666-1 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱内饱和湿度培养。

1.2.2 siRNA 的设计和转染 四条靶向 V-val 型 EBNA1 基因编码区的 siRNA 分别被命名为 siRNA1414, siRNA1418, siRNA1437 和 siRNA1538。siRNA1414 靶向 EBNA1 编码区的 1414 - 1434 位点:5'-GGAGGUUCCAACCCGAAAU-3'^[11], siRNA1418 靶向 1418 - 1438 位点:5'-GTTCCAACCCGAATTTGA-3'^[12], siRNA1437 靶向 1437 - 1457 位点:5'-GAACATTGCAGAAGGTTTA-3', siRNA1538 靶向 1538 - 1558 位点:5'-GTAAGACCTCCCTTTA CAA-3', 所有 siRNA 均具有 21 个核苷酸长度,3' 端是对称的 2 个脱氧胸苷。阴性对照序列(命名为

NC)为:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'。C666-1 细胞以 3.0×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板,24 h 内待细胞达 35% ~ 40% 融合时每孔使用 100 nmol/L 的 siRNA 和 5 μ L 的 Lipofectamine 2000 进行转染,只用 5 μ L 的 Lipofectamine 2000 转染作为 MOCK 对照,间隔 72 h 后重复转染 1 次 siRNA。

1.2.3 蛋白提取和蛋白质印迹检测 分别于 2 次转染 siRNA 后 48 h、72 h 和 96 h,参照 M-PER 蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂说明提取 C666-1 细胞总蛋白。SDS-PAGE 分离总蛋白,并转移至硝酸纤维素膜,封闭液室温封闭 2 h,4 $^{\circ}$ C 下孵育一抗过夜,EBNA1 一抗(1:100)、ALOX12 一抗(1:200)、PRDX3 一抗(1:100)、GSR 一抗(1:100)、 β -actin 抗(1:500)和 GAPDH 一抗(1:1000),HRP 标记的特异性二抗(1:5 000)室温下孵育 1 h,采用 ECL 化学发光试剂对 X 光片曝光。应用 Quantity One 4.6.2 软件获得 EBNA1 和 β -actin 的免疫印迹条带灰度值,计算 EBNA1/ β -actin 的灰度比值,并比较处理组 C666-1 细胞与对照细胞 EBNA1 蛋白的表达差异。

1.2.4 细胞存活率检测 使用干扰序列 siRNA1414 和 siRNA1437 连续 2 次转染 C666-1 细胞后 48 h,向 6 孔板每孔加入 5 mg/mL 的甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)250 μ L,继续培养 4 h,吸除上清,每孔加入 1.6 mL 二甲亚砜,立即用分光光度计检测在 570 nm 处的吸光度值。该实验重复 3 次,使用 SPSS16.0 软件计算均数 \pm 标准差,并比较各组存活率差异。

1.2.5 基因表达分析 使用干扰序列 siRNA1437 和 NC 连续 2 次转染 C666-1 细胞后 48 h,参照 TRIzol 试剂说明提取细胞总 RNA。使用 RNeasy MinElute 纯化试剂盒纯化总 RNA。使用紫外吸收测定法测定总 RNA 浓度,并用反转录试剂盒合成 cDNA。在 5 mL 管中配制 1 100 μ L 混合液:2X SuperArray PCR master mix 550 μ L、已稀释的 cDNA 102 μ L 和灭菌蒸馏水 448 μ L。加 10 μ L 混合液到 PCR 芯片对应的每个孔中。将 PCR 芯片置于实时定量 PCR 仪进行 PCR 反应。数据分析采用 $\Delta\Delta$ Ct 方法。

1.2.6 反转录聚合酶链反应分析 反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)分析使用干扰序列 siRNA1437 和 NC 连续 2 次转染 C666-1 细胞后 48 h,参照 TRIzol 试剂说明提取细胞总 RNA。纯化总 RNA 并测浓度后使

用反转录试剂盒合成 cDNA,使用 PCR 试剂盒扩增目的基因及内参 GAPDH。引物为:ALOX12,上游引物:5'-CCTGGTGTCCGGAGATCAC-3',下游引物:5'-GGTAGTGACCCCATCACTGT-3';GSR,上游引物:5'-GTGCCAGCTTAGGAATAACCAG-3',下游引物:5'-GTGAGTCCCCTGTCCCAATAG-3';PRDX3,上游引物:5'-ACTAAGCAGATTTCCCGAGACTAC-3',下游引物:5'-AGCCAGAATTACAAAA CAAAACA-3';表面活性蛋白 D(surfactant protein D, SFTPD),上游引物:5'-AGGAGCAAAGGGAGAAGTGGG-3',下游引物:5'-CAGCTGTGCCTCCGTAAATGG-3';硫氧还蛋白还原酶 1(thioredoxin reductase 1, TXNRD1),上游引物:5'-CTCAGAGTAGTCTCAGTCC-3',下游引物:5'-CATAGTCACTTGACAGTGG-3';蛋氨酸亚砷还原酶 A(methionine sulfoxide reductase A, MSRA),上游引物:5'-TGTACCAGCCAGAACACATG-3',下游引物:5'-CTGCTATCTTCACTCAGACC-3';腺病毒 E1B19KD 相互作用蛋白 3 (adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3, BNIP3),上游引物:5'-GCCCCGGATGCAGGAGGAGA-3'下游引物:5'-GAGCAGCAGATGGAAGGAAAAC-3';A 类清除剂受体 3(scavenger receptor class A, member 3, SCARA3),上游引物:5'-TCTCCGAAGACATCTCCTTGACCC-3',下游引物:5'-GCAGCCTTGACATCGTAGCACTC-3';含硒蛋白质 P,胞浆,1(selenoprotein P, plasma, 1, SEPP1),上游引物:5'-GGCCCGTTGGAAGTGTTGT-3',下游引物:5'-CCTAGGAGCCAACTCTGAAT-3';过氧化物酶 4 (peroxiredoxin 4, PRDX4),上游引物:5'-AACAGCTGTGATCGATGGAG-3',下游引物:5'-TCAAGTCTGTCCCAAAGC-3';GAPDH,上游引物:5'-GGGAACTGTGGCGTGATG-3',下游引物:5'-CTCTTGTGCTCTTGCTGGG-3'。

2 结 果

2.1 C666-1 细胞中 EBNA1 的表达被抑制

我们使用 4 条针对 V-val 亚型 EBNA1 编码区的 siRNA (分别为 siRNA1414、siRNA1418、siRNA1437 和 siRNA1538) 转染 C666-1 细胞;其中 siRNA1414 和 siRNA1437 在蛋白水平有效地抑制了 EBNA1 的表达,2 次转染后 48 h 与 MOCK 对照

相比 EBNA1 蛋白表达分别减少了 59% 和 56%, 并且多次重复实验获得了一致的结果(图 1)。因此, 这 2 条 siRNA 被用于后续的实验。与对照细胞相比, RNA 干扰 48 h 后 C666-1 细胞存活率分别降低了 33% 和 24%(图 2)。

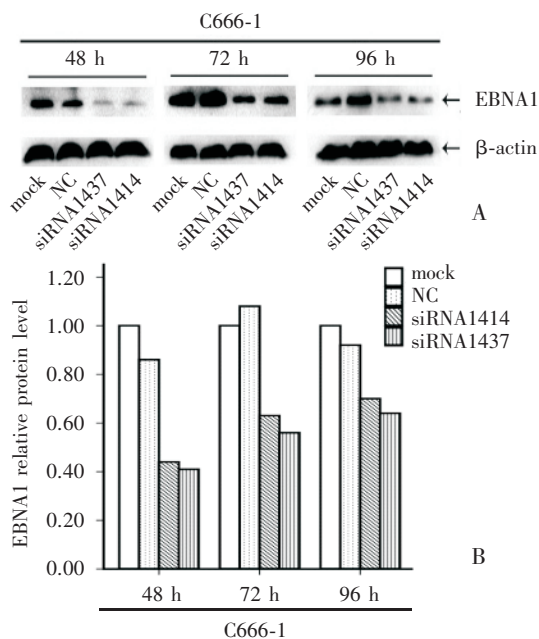


图 1 siRNAs 转染 C666-1 细胞后 EBNA1 蛋白表达下调
Fig.1 Reduced EBNA1 protein expression after siRNA transfection in C666-1 cells

A: C666-1 cells were treated with siRNA1414, siRNA1437, negative control (NC), or not treated (MOCK). The cells were harvested at 48 h, 72 h, and 96 h, respectively, and subjected to western blot analysis. B: The expression levels of EBNA1 were measured and normalized with β -actin by using the Quantity One 4.6.2 software according to the Materials and Method's instructions

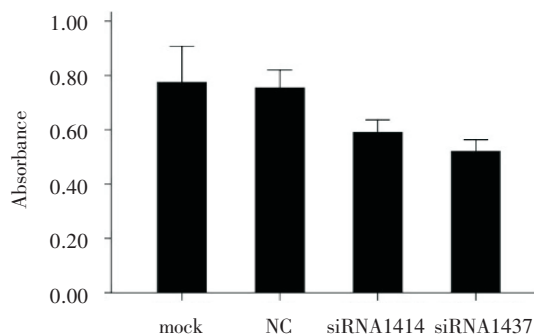


图 2 抑制 EBNA1 蛋白表达降低了 C666-1 细胞存活率
Fig.2 The suppression of EBNA1 protein expression reduced survival of C666-1 cells

Survival of C666-1 cells was measured by performing MTT assay at 48 h after siRNA treatment. The measured values are represented as mean \pm S.D. of the data from 3 experiments.

2.2 在 EBNA1 被抑制的 C666-1 细胞中 ALOX12 基因的表达下调

我们使用氧化应激与抗氧化 PCR 芯片分析了 84 个基因的表达谱。该芯片评价了过氧化物酶类基因, 包括谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX) 家族成员和过氧化物酶 (peroxiredoxin, PRDX) 家族成员。另外, 参与活性氧代谢和过氧化物代谢的基因也被该芯片所涵盖。如表 1 所示, 芯片结果显示 10 个氧化应激与抗氧化相关基因的表达在 EBNA1 被抑制后发生了 2 倍以上的改变。然而, RT-PCR 结果显示这 10 个基因中仅有花生四烯酸盐 12-脂氧合酶 (arachidonate 12-lipoxygenase, ALOX12)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GSR) 和过氧化物酶 3 (peroxiredoxin 3, PRDX3) 的表达发生了相应的变化(图 3A), 而其他 7 个基因的表达没有发生改变(图 4)。进一步, 我们利用蛋白质印迹技术证实了在 EBNA1 被抑制 C666-1 细胞中仅 ALOX12 的表达下调, 而 GSR 和 PRDX3 在蛋白水平并无表达差异(图 3B)。

表 1 10 个氧化应激与抗氧化相关基因表达差异超过 2 倍

Table 1 Expression of 10 oxidative stress and antioxidant defence-related genes showed more than 2-fold difference

	Gene symbol	Fold change (siRNA1437/NC)
Down-regulated genes	ALOX12	-7.35
	SFTPD	-3.15
	PRDX3	29.25
	TXNRD1	14.75
Up-regulated genes	GSR	3.20
	MSRA	2.54
	BNIP3	2.38
	SCARA3	2.18
	SEPP1	2.02
	PRDX4	2.01

3 讨论

3.1 EBNA1 促癌作用的相关研究

基因沉默技术在 EB 病毒相关肿瘤的研究中只有少量报道: Yin 等^[13]把原代鼻咽癌细胞和一种腺组织来源的细胞相融合, 得到一种 EB 病毒

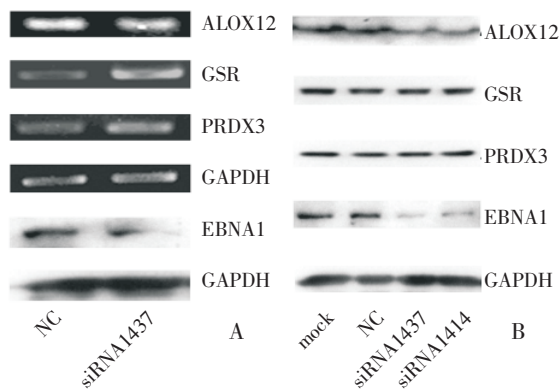


图3 ALOX12 基因在 EBNA1 干扰后的 C666-1 细胞中表达下调

Fig.3 Reduced expression of ALOX12 after inhibition of EBNA1 expression in C666-1 cells.

A: The expression of ALOX12, GSR, and PRDX3 was analyzed by RT-PCR at 48 h after siRNA1437 treatment, and the expression of EBNA1 was also analyzed by western blot at 48 h after siRNA1437 treatment. GAPDH was used as the internal control. B: The protein expression of ALOX12, GSR, PRDX3 and EBNA1 was also analyzed by western blotting at 48 h after siRNA1414 and siRNA1437 treatment. GAPDH was used as the internal control.

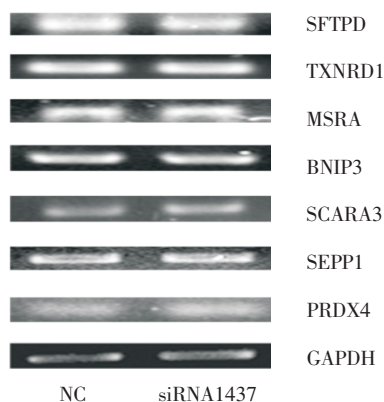


图4 7个氧化应激与抗氧化相关基因在 EBNA1 被抑制后的 C666-1 细胞中的表达无差异

Fig.4 Expression of 7 oxidative stress and antioxidant defence-related genes was no difference after inhibition of EBNA1 expression in C666-1 cells

The expression of SFTPD, TXNRD1, MSRA, BNIP3, SCARA3, SEPP1, and PRDX4 was analyzed by performing RT-PCR at 48 h after siRNA1437 treatment. GAPDH was used as the internal control

阳性的上皮细胞系 NPC-KT, 用 EBNA1 特异的小干扰 RNA 干扰其表达, 结果发现抑制了细胞的生长和克隆形成能力。Hong 等^[12]用小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 干扰 EB 病毒阳性伯基特淋巴瘤细胞系中 EBNA1 的表达后, 检测到增

殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达的降低和细胞周期在 G0/G1 期阻滞。Humme 等^[8]构建了 EBNA1 缺陷型的 EB 病毒重组质粒, 用于感染人外周血 B 淋巴细胞时, 其转化形成淋巴母细胞的效率降低了 1 000 倍, 在严重联合免疫缺陷 (severe combined immuno-deficiency, SCID) 小鼠中的成瘤效率显著降低, 提示 EBNA1 基因可以促进细胞的恶变。本研究利用靶向 EBNA1 基因编码区的 RNA 干扰技术抑制了 C666-1 细胞中 50% 以上的 EBNA1 蛋白表达, 并且干扰 EBNA1 蛋白表达后 C666-1 细胞存活率明显下降, 提示 EBNA1 在鼻咽癌的发生发展中可能有促进作用, 为进一步研究 EBNA1 沉默后对鼻咽癌细胞生物学性状的改变奠定了基础。

3.2 EBNA1 可能通过上调 ALOX12 发挥了间接地促鼻咽癌作用

通过对 C666-1 细胞中 EBNA1 基因被抑制后细胞氧化应激与抗氧化相关基因表达谱变化的研究, 我们发现有多种细胞氧化应激与抗氧化相关基因可能受到 EBNA1 表达的影响。其中 ALOX12, 又被称为血小板型 12-脂氧合酶 (platelet-type 12-lipoxygenase, p12-LOX), 在 EBNA1 被干扰的 C666-1 细胞中转录和蛋白水平表达均有下调。有研究发现在前列腺癌细胞中 ALOX12 通过其产物 12(s) 羟基甘碳四烯酸 (hydroxyeicosatetraenoic acid, HETE) 激活了 NF- κ B (细胞外信号调节激酶, extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通路参与了 12(s) HETE 诱导的胰腺癌细胞的增殖^[14-15]。鼠源性的 p12-LOX 通过增强克隆形成率加速了鼠表皮细胞的肿瘤发生^[16]。EBNA1 可能上调 ALOX12 的表达发挥间接地促鼻咽癌作用, 具体分子机制有待深入探讨。我们的结果显示 GSR 和 PRDX3 在 EBNA1 被干扰的 C666-1 细胞中转录表达有上调, 而蛋白表达并没有发生明显变化, 这可能与 GSR 和 PRDX3 转录后表达的调控相关, 具体机制需深入研究。

综上所述, 我们的研究发现干扰序列 siRNA1414 和 siRNA1437 能够有效地抑制 C666-1 细胞中 EBNA1 蛋白的表达, 干扰 EBNA1 表达后引起了 ALOX12 表达下调, 提示 EBNA1 可能上调 ALOX12 的表达间接地发挥促鼻咽癌作用, 但具体分子机制值得深入探讨。

参考文献:

- [1] 宗永生,钟碧玲,张敏,等. EB病毒在鼻咽癌变过程中作用的研究[J]. 中山医科大学学报;医学科学版,2002,23(3):161-164.
- [2] 黄宇帆,廖奕佶,刘文举,等. 鼻咽癌中EB病毒启动子Qp的突变及其功能学研究[J]. 中山大学学报:医学科学版,2010,31(1):23-27.
- [3] Gahn TA, Sugden B. An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene [J]. *J Virol*, 1995, 69(4): 2633-2636.
- [4] Wood VH, O'Neil JD, Wei W, et al. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways [J]. *Oncogene*, 2007, 26(28): 4135-4147.
- [5] Flavell JR, Baumforth KR, Wood VH, et al. Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells [J]. *Blood*, 2008, 111(1): 292-301.
- [6] Mai SJ, Xie D, Huang YF, et al. The enhanced transcriptional activity of the V-val subtype of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in epithelial cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(5): 1417-1424.
- [7] Cheung ST, Huang DP, Hui AB, et al. Nasopharyngeal carcinoma cell line (C666-1) consistently harbouring Epstein-Barr virus [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83(1): 121-126.
- [8] Humme S, Reisbach G, Feederle R, et al. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(19): 10989-10994.
- [9] Cheng TC, Hsieh SS, Hsu WL, et al. Expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in gastric carcinoma cells is associated with enhanced tumorigenicity and reduced cisplatin sensitivity[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(1): 151-160.
- [10] Gruhne B, Sompallae R, Marescotti D, et al. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(7): 2313-2318.
- [11] Sivachandran N, Sarkari F, Frappier L. Epstein-Barr nuclear antigen 1 contributes to nasopharyngeal carcinoma through disruption of PML nuclear bodies [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(10): e1000170.
- [12] Hong M, Murai Y, Kutsuna T, et al. Suppression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) by RNA interference inhibits proliferation of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132(1): 1-8.
- [13] Yin Q, Flemington EK. siRNAs against the Epstein Barr virus latency replication factor, EBNA1, inhibit its function and growth of EBV-dependent tumor cells [J]. *Virology*, 2006, 346(2): 385-393.
- [14] Kandouz M, Nie D, Pidgeon GP, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase activates NF-kappaB in prostate cancer cells [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2003, 71(3-4): 189-204.
- [15] Ding XZ, Tong WG, Adrian TE. 12-lipoxygenase metabolite 12 (S)-HETE stimulates human pancreatic cancer cell proliferation via protein tyrosine phosphorylation and ERK activation[J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(5): 630-636.
- [16] Piao YS, Du YC, Oshima H, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase accelerates tumor promotion of mouse epidermal cells through enhancement of cloning efficiency [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(2): 440-447.

(编辑 张恩健)