DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2015.09.014

EB 病毒 miR-BART4* 和 miR-BART18-3p 在鼻咽癌中的表达及意义

李 璐[1],王建红[1],黄 辉[2],范才文[1],肖胜军[1],熊伟明[2],雷 迅[2]

摘要 **目的** 分析 EB 病毒(EBV) miRNAs 在鼻咽癌组织中的表达,探索 EBV 诱发鼻咽癌的分子机制,寻找鼻咽癌防治和诊断的生物分子标志物。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 分析 EBV miRNAs ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18-3p 在 36 例鼻咽低分化鳞癌组织和 32 例慢性鼻咽黏膜炎症组织中的表达水平。**结果** ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18-3p 的表达水平(Ct 值)在鼻咽癌组织中分别为(26.97±2.67)和(27.02±2.32),在鼻咽黏膜炎症组织中的表达水平分别为(38.49±3.05)和(39.39±2.16),两种 EBV miRNAs 在鼻咽癌组织中的表达明显高于鼻咽黏膜炎症组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** EBV 可能通过 ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18-3p 高表达诱发鼻咽癌,它们是鼻咽癌诊断和防治的潜在生物分子标志物。

2015-04-29 接收

基金项目:广西自然科学基金项目(编号:2011GXNSFD018034);广西教育厅科研项目(编号:2013YB168);广西医学科学实验中心开放基金专项项目(编号:KFJJ2010-51);广西科学研究与技术开发计划项目(编号:桂科攻0592007-1J)

作者单位:[1]桂林医学院生物化学与分子生物学教研室,桂林 541004

[2]桂林医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科,桂林 541001

作者简介:李 璐,女,硕士研究生;

雷 迅,男,教授,责任作者,E-mail: yypeng_7@hotmail.com

关键词 鼻咽癌;生物分子标志物;EB 病毒微小 RNA

中图分类号 R 739.63

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1267-04

鼻咽癌是遗传和环境因素共同作用的典型疾病。世界各地鼻咽癌患者的癌组织中均可检出 EB 病毒(EBV) DNA 和病毒核抗原。EBV 伴随鼻咽癌的整个发生过程,尤其是在低分化和未分化的鼻咽癌上皮肿瘤组织中,几乎所有的肿瘤细胞都含有 EBV 基因组[1]。EBV 整合可以提高染色体的不稳定性,引起基因表达水平变化,诱导细胞增殖和肿瘤形成的关键基因表达异常,促进细胞恶性转化[2]。近来发现的 miRNA 是细胞内的一类非编码 RNA,对基因表达有调节作用,是真核细胞生命活动的调控分子。miRNA 有调控 10%~30% 人类基因的潜能,已经成为研究肿瘤发生与调控机制的一个新领域,研究[3]表明 miRNAs 可以控制细胞的生物学进程,如细胞增殖、分化和转移。miRNA 的异常表达可以导致肿瘤的发生,这些异常表达的 miRNAs 是潜在的癌基因或抑癌基因,通过调控下游靶基因参与肿瘤的形成[4]。EBV 编码的 miRNAs 参与调控鼻咽癌细胞的生长和分化[5]。因此,EBV miRNA 相关研究成果将为鼻咽癌的诊断、预后和治疗提供新的

in vitro. ***Results*** Two libraries could meet the requirement for the in vitro molecular evolution. SPA single domain structure A in 29, 30 amino acids site-directed mutation was library (A1), structure C in 36, 37 site-directed mutation was library (C1), SPA single domain structure A insert 3 amino acids after 37 random peptide was library (A_{I37}), SPA single domain structure C after 20 insert 3 random peptide was library (C_{I20}). The phage display library which was made up of a random combination of A1 and C1 named "A1C1". And the phage display library which was made up of a random combination of A_{I37} and C_{I20} named "A_{I37} C_{I20}". The capacity of these two libraries were respectively: 3.0×10^6 and 2.0×10^6. The titers were respectively: 2.3×10^{12} and 2.1×10^{12} (TU/ml). These two libraries had evolved completely through four or five times of affinity screening. Besides, Phage-Elisa monoclonal obtained a monoclonal with high OD, and the testing analytical result was $A_{(Q29K30)}$ $A_{(I29I30)}$ and $A_{I37\text{-}TQS}$A. ***Conclusion*** A fixed point mutation molecules $A_{(Q29K30)}$ $A_{(I29I30)}$ and insertion mutation molecular $A_{I37\text{-}TQS}$A are obtained with the high combining ability. The study shows the relationship of the structure and function of Ig-binding molecules and lays a foundation for directed improvement of Ig-binding molecules and acquirement of new Ig-binding molecules with new Ig-binding characteristics.

Key words AC mutants; phage-displayed library; selection; human IgG

分子基础。该研究观察 EBV miRNA(ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18-3p)在鼻咽癌组织中的表达,探索其在 EBV 致鼻咽癌中的作用,寻找鼻咽癌防治和诊断的生物分子标志物。

1 材料与方法

1.1 病例资料 鼻咽癌和鼻咽炎症组织标本来自桂林医学院附属医院,经临床组织病理学确诊为鼻咽低分化鳞癌和慢性鼻咽黏膜炎症组织。鼻咽低分化鳞癌组织 36 例,男 20 例,女 16 例,年龄 36 ~ 60(47.92 ± 6.80)岁;鼻咽炎症组织标本 32 例,男 16 例,女 16 例,年龄 21 ~ 62(43.66 ± 12.40)岁。标本采集前经桂林医学院附属医院伦理委员会同意,患者知情同意后进行采集分析。

1.2 实验仪器与试剂 荧光定量 PCR 仪 7500(美国 ABI 公司);生物分光光度计(德国 Eppendorf 公司);RNA 提取试剂 TRIzol(美国 Invitrogen 公司);通用 cDNA 合成试剂盒、SYBR® Green master mix,Universal RT、U6 snRNA(hsa,mmu,rno) PCR primer set、UniRT(丹麦 Exiqon 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 引物合成 通过 miRNA 数据库查找拟研究 EBV-miRNA 序列:① ebv-miR-BART4*:CACAUCACGUAGGCACCAGGUGU;② ebv-miR-BART18-3p:UAUCGGAAGUUUGGGCUUCGUC,由丹麦 Exiqon 公司合成 LUN™ PCR 引物。

1.3.2 组织总 RNA 的提取 采用 RNA 试剂盒 TRIzol 提取组织总 RNA,生物分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度,吸光度(absorbance,A)比值 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.1,置 -80 ℃保存备用。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 分析 采用 cDNA 合成试剂盒进行逆转录,按照说明配制反应体系 5 × reaction buffer 2 μl,template total RNA 4 μl,enzyme mix 1 μl,nuclease-free water 3 μl,反转录条件:42 ℃ 1 h,95 ℃ 5 min。利用 SYBR® Green master mix,universal RT 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 检测,反应在 7500 PCR 仪上进行,扩增条件:95 ℃ 10 min,94 ℃ 10 s,60 ℃ 1 min(采集荧光)45 个循环,同时以 miR-U6 作为内参。实验结果采用实时定量 PCR 的 Ct 值进行统计分析,Ct 值大于 35 个循环表示低表达或无表达。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,完全随机设计两组 t 检验。

2 结果

2.1 EBV-miRNA 的扩增曲线 本实验采用 SYBR Green 法进行相对表达量分析,实时荧光定量 PCR 扩增对照 miR-U6、ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18-3p。扩增曲线效果好,熔解曲线无引物二聚体和非特异性扩增(图 1)。鼻咽癌组织中,ebv-miRNAs 扩增曲线的 Ct 值少,起峰早;而鼻咽黏膜炎症组织中,Ct 值大,起峰晚(图 2)。

2.2 鼻咽炎症与鼻咽癌组织中 EBV-miRNAs 表达水平 ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18-3p 在鼻咽炎症组织中的 Ct 值明显高于鼻咽癌组织,表明鼻咽低分化鳞癌组织中两种 ebv-miRNAs 表达水平高于鼻咽炎症组织(Ct 值越高,表示起峰所需循环次越多,表达量越低),差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

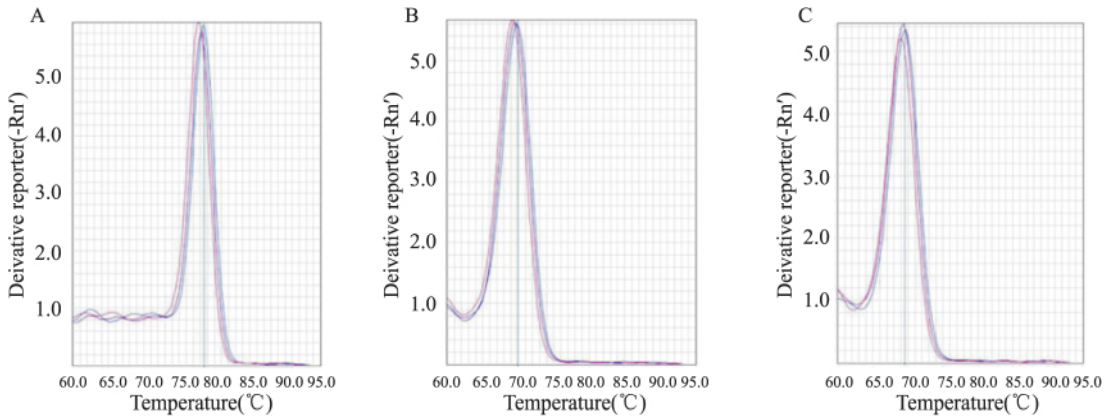

图 1 荧光定量 PCR 产物熔解曲线

A: miR-U6; B: ebv-miR-BART4*; C: ebv-miR-BART18-3p

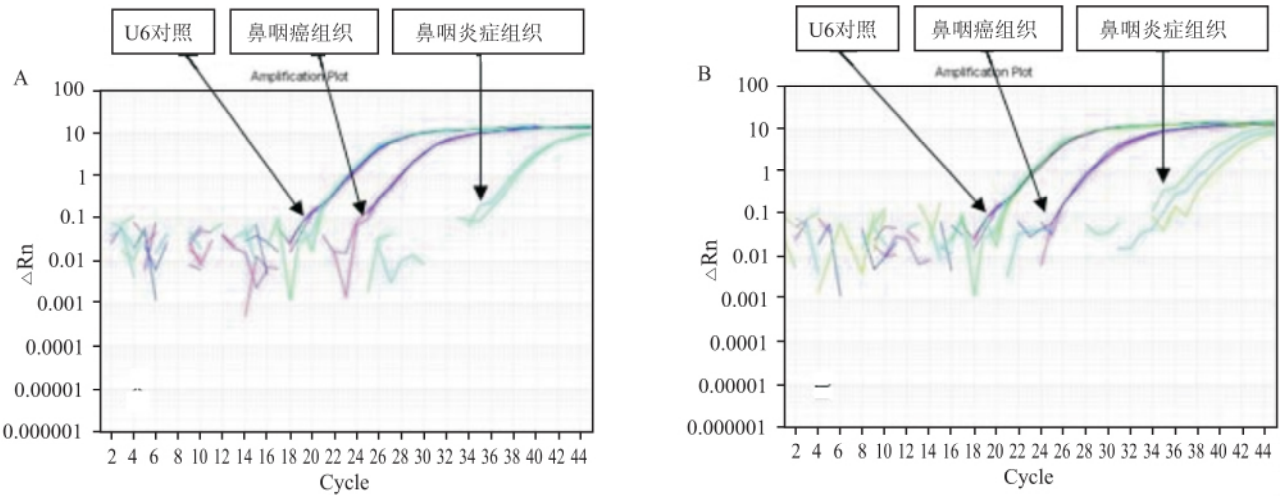

图2 荧光定量 PCR 分析 miRNA 表达

A: ebv-miR-BART4* ; B: ebv-miR-BART18-3p

表1 ebv-miRNAs 在鼻咽炎症与鼻咽癌组织中的表达(Ct 值)分析

组别	鼻咽炎症组织 ($n=32$)	鼻咽癌组织 ($n=36$)	t 值
miR-U6	23.13 ± 1.43	22.92 ± 1.41	0.60
ebv-miR-BART4*	38.49 ± 3.05	26.97 ± 2.67*	16.62
ebv-miR-BART18-3p	39.39 ± 2.16	27.02 ± 2.32*	22.65

与鼻咽炎症组织比较: * $P<0.01$

3 讨论

恶性肿瘤是我国城乡居民的主要死因之一，2010 年肿瘤登记数据评估表明全国恶性肿瘤发病率为 235.23/10 万，死亡率为 148.81/10 万[6]。近年来，我国恶性肿瘤的发病率有明显增高趋势。广西是我国鼻咽癌的高发区，最近统计表明，广西鼻咽癌的粗死亡率达 6.61/10 万，占全部恶性肿瘤死亡总数的 5.60%，在恶性肿瘤死亡分类构成中排列第 4 位[7]。miRNA 是近年发现的一类内源性非编码 RNA，大小 21 ~ 25 个核苷酸，研究[8-9]表明，miRNA 通过抑制靶基因的表达或翻译，参与细胞的增殖、分化和凋亡调控。新近发现 miRNA 也在人类肿瘤的发生和发展中扮演着重要角色，发挥癌基因或抑癌基因的作用。依据 miRNA 在肿瘤发生、发展过程中的作用，可分为原癌 miRNA(OncomiR) 和抑癌 miRNA(TsmiR)。OncomiR 的靶基因是抑癌基因，OncomiR 过表达将导致肿瘤发生。目前，普遍认为组织或个体发育的某些阶段，由于 miRNA 基因的启动子持续激活，miRNA 加工的效率增高，或其稳定性提高等原因，导致某些 OncomiR 的表达增加，进而抑制其靶基因(抑癌基因)的表达，最终引起肿瘤形成。TsmiR 表达下降或者缺失，癌基因激活或活性增强，也将导致肿瘤发生[10-11]。本实验结果表明，ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18-3p 在鼻咽炎症组织中低表达或无表达，在鼻咽癌组织中高表达，提示 ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18 可能在鼻咽癌的发生中起 OncomiR 作用。

miRNA 的调节网络中，一个 miRNA 可调控多个靶基因的表达，某个靶基因的表达也可通过多个 miRNA 的组合来调控。Tazawa et al[12] 发现，miR-34a 在结直肠癌患者中高表达，通过负调控 E2F1 信号通路而抑制结直肠癌细胞增殖。Wu et al[13] 发现，miR-135 在结肠癌患者中的高表达与结肠癌的局部淋巴结转移、远处转移、及疗效有关。胃癌组织中 miR-192 和 miR-215 的表达水平显著高于非癌胃组织，有促进肿瘤生长和迁徙，与肿瘤的侵袭、转移密切相关[14]。鼻咽癌是来源于鼻咽黏膜上皮的恶性肿瘤，早期就发生侵袭和转移，提示 ebv-miR-BART4* 和 ebv-miR-BART18-3p 的高表达可能在鼻咽癌的侵袭和转移中起重要作用。尚未清楚 EBV 是否通过 ebv-miR-BART4* 、ebv-miR-BART18-3p 途径作用于靶分子，参与转录因子的活化，促进鼻咽癌的早期侵袭、转移。

miRNA 有很强的细胞、组织或疾病特异性，这些特异表达的 miRNA 既是其功能的基础，又是相应疾病的特异性标志物[15]。miRNA 不仅与肿瘤的发生和发展有关，而且能游离于细胞之外，稳定存在于外周循环，具备疾病分子生物标志物的特点，在多种

肿瘤和非肿瘤疾病的诊断和预后中显示了潜在的价值[16]。ebv-miR-BART4*、ebv-miR-BART18-3p 有可能是鼻咽癌的特异性生物分子标志物，在鼻咽癌的诊断和靶向治疗中有重要意义。

参考文献

[1] Song C, Yang S. A meta-analysis on the EBV DNA and VCA-IgA in diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma [J]. Pak J Med Sci, 2013, 29(3): 885 - 90.

[2] Fang C Y, Lee C H, Wu C C, et al. Recurrent chemical reactivations of EBV promotes genome instability and enhances tumor progression of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Int J Cancer, 2009, 124(9): 2016 - 25.

[3] 单保恩，刘丽华. MicroRNA：癌症诊治新靶点 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2014，21(6)：603 - 9.

[4] Berger F, Reiser M F. Micro-RNAs as potential new molecular biomarkers in oncology: have they reached relevance for the clinical imaging sciences? [J]. Theranostics, 2013, 3(12): 943 - 52.

[5] Lung R W, Tong J H, To K F. Emerging roles of small Epstein-Barr virus derived non-coding RNAs in epithelial malignancy [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9): 17378 - 409.

[6] 陈万青，张思维，曾红梅，等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡 [J]. 中国肿瘤，2014，23(1)：1 - 10.

[7] 邓 伟，利基林，叶司原，等. 广西鼻咽癌死亡的流行趋势分析 [J]. 广西医科大学学报，2011，17(2)：73 - 6.

[8] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281 - 97.

[9] Wahid F, Shehzad A, Khan T, et al. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1803(11): 1231 - 43.

[10] Chua J H, Armugam A, Jeyaseelan K. MicroRNAs: biogenesis, function and applications [J]. Curr Opin Mol Ther, 2009, 11(2): 189 - 99.

[11] Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T, et al. MicroRNAs function as tumor suppressors or oncogenes: aberrant expression of microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Auris Nasus Larynx, 2013, 40(2): 143 - 9.

[12] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(39): 15472 - 7.

[13] Wu W, Wang Z, Yang P, et al. MicroRNA-135b regulates metastasis suppressor 1 expression and promotes migration and invasion in colorectal cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 388(1 - 2): 249 - 59.

[14] Jin Z, Selaru F M, Cheng Y, et al. MicroRNA-192 and-215 are upregulated in human gastric cancer *in vivo* and suppress ALCAM expression *in vitro* [J]. Oncogene, 2011, 30(13): 1577 - 85.

[15] Bonfrate L, Altomare D F, Di Lena M, et al. MicroRNA in colorectal cancer: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment [J]. J Gastrointestin Liver Dis, 2013, 22(3): 311 - 20.

[16] De Guire V, Robitaille R, Tétreault N, et al. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges [J]. Clin Biochem, 2013, 46(10 - 11): 846 - 60.

Expression of EB virus miR-BART4* and miR-BART18-3p in nasopharyngeal carcinoma and its significance

Li Lu[1], Wang Jianhong[1], Huang Hui[2], et al

([1] *Biochemistry and Molecular Biology Teaching and Research Section of Guilin Medical College, Guilin* 541004; [2] *Dept of Otorhinolaryngology, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin* 541001)

Abstract ***Objective*** To analyze expression of EB virus (EBV) miRNAs in nasopharyngeal carcinoma(NPC) tissue, explore molecular mechanism of EBV induced NPC and biomarker for prevention and diagnosis of NPC. ***Methods*** 36 cases of nasopharyngeal poorly differentiated squamous cell carcinoma tissues and 32 cases of chronic nasopharyngeal mucositis tissues were collected. Expressions of EBV miRNAs ebv-miR-BART4* and ebv-miR-BART18-3p were tested in these tissues by quantitative real-time PCR; the expression level of EBV miRNAs was analyzed in both tissue groups. Results The expressions(Ct) of ebv-miR-BART4* and ebv-miR-BART18-3p were (26.97 ± 2.67) and (27.02 ± 2.32) in NPC tissue, (38.49 ± 3.05) and (39.39 ± 2.16) in nasopharyngeal mucosa inflammation tissue, the expressions of two ebv-miRNAs were significantly higher in NPC tissue than that in nasopharyngeal mucosa inflammation tissue($P < 0.01$). ***Conclusion*** NPC may be induced by EBV through the high expression of ebv-miR-BART4* and ebv-miR-BART18-3p. They are potential biological molecular markers for the diagnosis and treatment of NPC.

Key words nasopharyngeal carcinoma; biological marker; ebv-miRNAs