

# 复制状态下 EB 病毒对宿主细胞中 *ZEB1* 基因表达的影响<sup>\*</sup>

李明阳<sup>1\*\*</sup>, 马春霞<sup>1</sup>, 陈香岭<sup>1</sup>, 吴翰欣<sup>2</sup>, 吴小海<sup>1</sup>, 俞建昆<sup>1\*\*\*</sup>

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南 昆明 650118; 2. 昆明医科大学第二附属医院, 云南 昆明 650118)

**[摘要]** 目的: 探究 EB 病毒(EBV)在潜伏感染和裂解复制状态下对 *ZEB1*、*ZEB2*、*ZEB1-AS1* 基因表达的影响。方法: 将 EBV 相关癌细胞系 Raji、SNU-719、AGS 分为实验组(TPA 及 NaB 诱导 EBV)和对照组(加入等体积 DMSO), 将稳定表达 pLVshRNA-EGFP-EBVsponge 的 SNU-719 细胞系设为 sponge 组, 未经转染 RNA sponge 的 SNU-719 细胞系设为 control 组(2 组细胞均使用 TPA 及 NaB 进行诱导), TPA 及 NaB 处理 48 h 后提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR, 从 mRNA 水平检测 *ZEB1*、*ZEB2* 及 *ZEB1-AS1* 基因的表达。结果: 与对照组相比, EBV 复制期间, 在 Raji、SNU-719、AGS 细胞中 *ZEB1* mRNA 表达量显著升高( $P < 0.05$ ), *ZEB1-AS1* mRNA 的表达量仅在 AGS 细胞中显著降低( $P < 0.05$ ), 在 SNU-719 和 AGS 细胞中未检测到 *ZEB2* 的表达; 稳定表达 pLVshRNA-EGFP-EBVsponge 的 SNU-719 细胞比未转染 RNA sponge 的 SNU-719 细胞, *ZEB1* 表达量明显降低( $P < 0.05$ )。结论: EBV 依靠自身编码的 miRNA 在复制期间促进 *ZEB1* 的表达, 同时也对 *ZEB1-AS1* 有抑制作用。

**[关键词]** EB 病毒; 潜伏感染; 裂解复制; E 盒结合锌指蛋白 1; miRNA; miRNA 抑制剂

**[中图分类号]** R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)03-0269-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.03.005

## Epstein-Barr Virus on *ZEB1* Gene Expression in Host Cells under Replication

LI Mingyang<sup>1</sup>, MA Chunxia<sup>1</sup>, CHEN Xiangling<sup>1</sup>, WU Hanxin<sup>2</sup>, WU Xiaohai<sup>1</sup>, YU Jiankun<sup>1</sup>

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China; 2. Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, Yunnan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of EBV on the expression of *ZEB1*, *ZEB2* and *ZEB1-AS1* genes under latent infection and lytic replication. **Method:** The EBV associated cancer cell line Raji, SNU-719 and AGS was divided into two groups: the experimental group (TPA and NaB induced EBV) and the control group (Added equal volume DMSO). SNU-719 cell lines stably expressing pLVshRNA-EGFP-EBVsponge were divided into sponge group, and SNU-719 cells without transfection of RNA sponge were set to control group (both groups were induced by TPA and NaB). After 48 h of TPA and NaB treatment, total RNA was extracted for RT-PCR. and the expression of *ZEB1*, *ZEB2* and *ZEB1-AS1* genes was detected at mRNA levels. **Result:** The expression of *ZEB1* mRNA in Raji, SNU-719 and AGS cells was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The expression of *ZEB1-AS1* mRNA in AGS cells only decreased significantly ( $P < 0.05$ ), but no *ZEB2* expression was detected in SNU-719 and AGS cells. The expression of *ZEB1* in SNU-719 cells with stable expression of pLVshRNA-EGFP-EBVsponge was significantly lower than that in SNU-719 cells

\* [基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20111106120056); 中国医学科学院重大协同创新项目(2016-12M-001)

\*\* 中国医学科学院医学生物学研究所 2016 级硕士研究生

\*\*\* 通信作者 E-mail: yjk@imbcams.com.cn

网络出版时间: 2018-03-20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180320.1721.010.html>

without RNA sponge( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** EBV relies on self-encoded miRNA to promote the expression of ZEB1 during replication, and also inhibits the expression of ZEB1-AS1.

[ **Key words** ] EB virus; latent infection; cleavage replication; zinc finger E-box bindingprotein; miRNA; RNA sponge

癌症的发生与体内某些基因的异常表达有关, E 盒结合锌指蛋白 1 (zinc finger E-box bindingprotein, ZEB1) 是一种转录因子, 可调节靶基因的转录<sup>[1-2]</sup>; 在上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 和其他癌症发生相关途径中起到促癌作用, 在不同组织来源的癌细胞内都能检测到 ZEB1 基因的异常表达<sup>[3-5]</sup>。Epstein-Barr 病毒(EBV) 是第 1 个被发现编码 miRNA 的病毒, 可分为 BART 簇和 BHRF1 簇, EBV 可通过调控宿主和其病毒基因的表达从而发挥致癌作用<sup>[6]</sup>。研究表明, EBV 与淋巴瘤、胃癌、鼻咽癌等多种肿瘤的发生密切相关, 但 EBV 在肿瘤发生发展中的机制尚无定论<sup>[8]</sup>。有文献报道, ZEB1 和 ZEB2 可调节 EBV 的潜伏感染和裂解复制<sup>[7]</sup>, 而已有研究证明, 化学物质 12-O-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯(TPA) 与丁酸钠(NaB) 可作为外源性刺激因子, 诱导细胞中处于潜伏期的 EBV 再激活, 可增强鼻咽癌细胞的基因组不稳定性 and 肿瘤发生率<sup>[8-9]</sup>。因此, 本研究利用 TPA 及 NaB 联合诱导 EBV 再激活, 观察 EBV 在潜伏感染和裂解复制时的宿主细胞中 ZEB1 和 ZEB1-AS1 基因的表达, 再利用高效 miRNA 抑制剂——miRNA sponge 处理宿主细胞, 探究 EBV 自身编码的 miRNA 是否会对 ZEB1 基因的表达产生影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与相关试剂

EBV 相关癌细胞系 Raji 和 AGS 细胞购自中国

科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 稳定表达 pLVshRNA-EGFP-EBVsponge 的 SNU-719 细胞系由陈香岭惠赠<sup>[9]</sup>, 细胞 Hyclone RPMI-1640 培养基含 10% FBS、青霉素-链霉素浓度为 100 000 U/L 和 100 000  $\mu\text{g/L}$ , RT-PCR 试剂盒 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Vazyme, rTaq 酶购自 Takara 公司, PCR 引物由擎科生物公司昆明实验室合成, 佛波酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) 购自 A lexis 公司(溶于 DMSO, 分装后放置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存), 丁酸钠(NaB) 由中国医学科学院医学生物学研究所中心实验室提供(溶于 Hyclone RPMI-1640 培养基, 分装后放置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组与 EBV 激活诱导** 将 EBV 相关肿瘤细胞 Raji、SNU-719 和 AGS 分别分为实验组和对照组, 实验组细胞用 TPA (终浓度为 50  $\mu\text{g/L}$ ) 及 NaB (终浓度 1 mmol/L) 联合处理, 对照组细胞加入相同体积的 DMSO, 实验重复 3 次。将稳定表达 pLVshRNA-EGFP-EBVsponge 的 SNU-719 细胞系设为 sponge 组, 未经转染 RNA sponge 的 SNU-719 细胞系设为 control 组, 均用 TPA (终浓度 50  $\mu\text{g/L}$ ) 及 NaB (终浓度 1 mmol/L) 联合处理, 实验重复 3 次。

**1.2.2 总 RNA 的提取及 RT-PCR** TPA 及 NaB 联合处理细胞 48 h 后, 采用 Trizol 法提取细胞的总 RNA<sup>[10]</sup>。使用 Random hexamers 引物进行逆转录, 得到 cDNA 第 1 链, 再用 PCR ZEB1、ZEB1-AS1、ZEB2 及 BZLF1 引物进行 PCR 扩增检测, 引物序列见表 1。

表 1 ZEB1、ZEB1-AS1、ZEB2 及 BZLF1PCR 扩增引物序列

Tab. 1 ZEB1, ZEB1-AS1, ZEB2 and BZLF1PCR amplified primer sequence

基因	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')
ZEB1	TAGTTGCTCCCTGTGCAATTAC	GCAATTCATATGGCTTCTCTCCACTG
ZEB1-AS1	GGGCTGTGCGAGTTGGAAG	GCTCTGAGTCCTGCCACCTAG
ZEB2	CCTGGCACAACAACGAGATTCTAC	CTGAAGGTACTCCTCGATGCTG
BZLF1	GGAAGCCACCCGATTCTTGATC	CAGTCTCCGACATAACCCAGAATC

### 1.3 统计学分析

采用 Bio-RAD 凝胶成像自带分析软件将目的条带灰度值转化为数值, 以 GAPDH 作为内参照,

获得相对定量值, 每组实验平行重复 3 次, 最终结果使用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *ZEB1* mRNA 表达

如图 1 所示,用 TPA 及 NaB 联合处理细胞 48 h 后,EBV 复制的标志性基因 *BZLF1* 显著增强,Raji、SNU-719、AGS 实验组细胞中 *ZEB1* mRNA 表达量较对照组均显著升高 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ),提示 EBV 在复制活跃阶段更易促进 *ZEB1* 的表达。

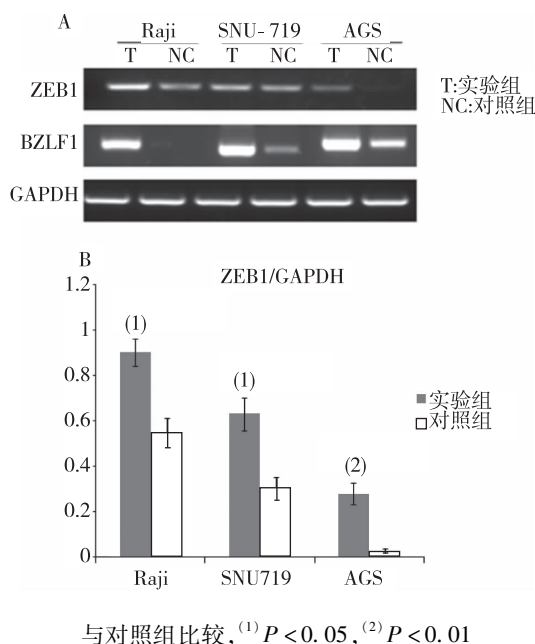


图 1 EBV 复制期间 Raji、SNU-719、AGS 细胞中 *ZEB1* mRNA 的相对表达

Fig. 1 Relative expression of *ZEB1* mRNA in Raji, SNU-719 and AGS cells during EBV replication

### 2.2 *ZEB1-AS1* mRNA 的表达

如图 2 所示,用 TPA 及 NaB 联合处理细胞 48 h 后,Raji、SNU-719、AGS 实验组细胞中 *ZEB1-AS1* mRNA 的相对表达量较对照组均有不同程度降低,在 AGS 实细胞中差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 *ZEB2* mRNA 的相对表达

如图 3 所示,TPA 及 NaB 联合处理细胞 48 h 后,SNU-719 和 AGS 细胞中未检测到 *ZEB2* mRNA 的表达;而在 Raji 细胞中,虽然检测到 *ZEB2* mRNA 的表达,但实验组与对照组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 EBV 复制期间 sponge 对 SNU-719 细胞中 *ZEB*、*ZEB1-AS1*、*ZEB2* mRNA 表达的影响

如图 4 所示,经 TPA 及 NaB 联合诱导 48 h

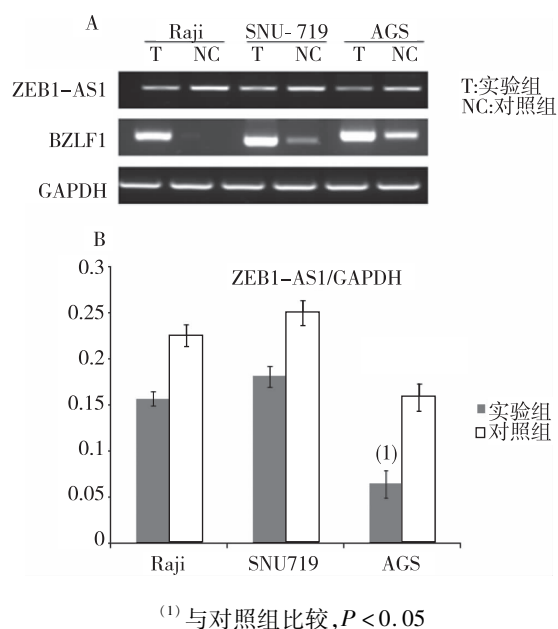


图 2 EBV 复制期间 Raji、SNU-719、AGS 细胞中 *ZEB1-AS1* mRNA 的相对表达

Fig. 2 Relative expression of *ZEB1-AS1* mRNA in Raji, SNU-719 and AGS cells during EBV replication

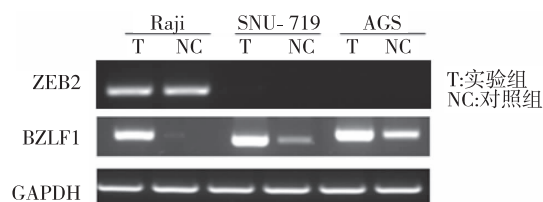


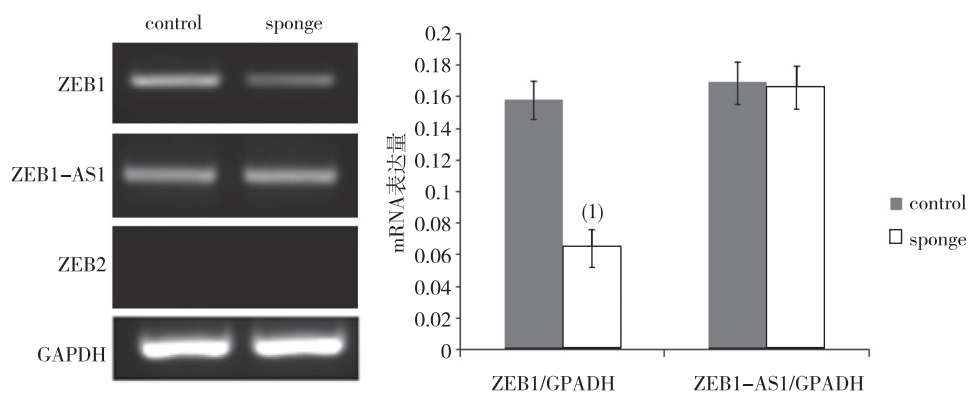
图 3 EBV 复制期间 Raji、SNU-719、AGS 细胞中 *ZEB2* mRNA 的相对表达

Fig. 3 Relative expression of *ZEB2* mRNA in Raji, SNU-719 and AGS cells during EBV replication

后,与 control 组比较,稳定表达 pLVshRNA-EGFP-EBV sponge 的 sponge 组 SNU-719 细胞中 *ZEB1* mRNA 水平下降,*ZEB1-AS1* mRNA 表达量无明显差异;而 *ZEB2* mRNA 未检测到。

## 3 讨论

本次研究发现,经 TPA 及 NaB 联合诱导后,在胃来源的 EBV 相关癌细胞系 SNU-719 和 AGS 中 *ZEB1* 的表达量显著上升,有报道指出 *ZEB1* 可调节 EBV 的潜伏感染和裂解复制<sup>[11]</sup>。*ZEB1* 是上皮源性肿瘤 EMT 的转录诱导因子之一,在多种癌组织细胞中均有表达,而在正常上皮组织以及分化好的癌组织细胞中不表达,是上皮-间质转化过程的



(1) 与 control 比较,  $P < 0.01$

图4 EBV复制期间 sponge 对 SNU-719 细胞中 ZEB、ZEB1-AS1 及 ZEB2 mRNA 表达的影响

Fig.4 EBV in SNU-719 cells under replication promoting the expression of ZEB1 by self-encoded miRNA

主要调节因子<sup>[12-17]</sup>。EMT 是肿瘤侵袭和转移的首要步骤,在肿瘤 EMT 中的作用越来越突出。近年来对 ZEB1 的研究取得了一些进展,特别是在肺癌组织中的 EMT 过程,肺癌组织 ZEB1 的表达量明显高于邻近的非肿瘤组织,并且肺腺癌细胞的胞质和胞核中都有 ZEB1 蛋白表达。有趣的是,本研究在 Raji 细胞中也获得了相同的结果,Raji 细胞系是从一位黑人男孩的 Burkitt 淋巴瘤中分离建立的,是第一个人类造血系统的连续传代细胞,为 EBV 阳性 B 细胞起源,由此可以判断 EBV 在不同组织来源的细胞内均可调节 ZEB1 的高表达,而在非上皮来源的细胞中,ZEB1 可能通过其他的分子途径导致细胞癌化。

miRNAs 是一类广泛存在于各类真核生物中的大小约 19 ~ 25 个碱基的单链非编码小分子 RNA,进化上相对保守,具有时序特异性和组织特异性。如 miR-200 结合在 ZEB1 mRNA 的 3' UTR,抑制 ZEB1 翻译;而 ZEB1 可占据 miR-200 启动子的 E 盒,抑制 miR-200 家族转录,从而形成相互抑制双重负反馈环回路<sup>[18-19]</sup>。而 EBV 是第 1 个被发现编码 miRNA 的病毒,EBV 编码的 miR-BARTs 在 EBV 感染的上皮细胞中下调促凋亡基因和肿瘤抑制基因产物表达,增强上皮细胞转化的特质<sup>[20-23]</sup>。有研究发现 EBV-miR-BART4-5p 通过调控 Bid 蛋白抑制凋亡<sup>[24]</sup>;EBV-miR-BART5 通过调控 PUMA 促进细胞生存;EBV-miR-BART16 和 EBV-miR-BART 分别靶标促凋亡蛋白 SH2B3、TOM22 和 PAK2、TP53INP1 来调控<sup>[25-27]</sup>。本次研究利用稳定表达 pLVshRNA-EGFP-EBVsponge 的

SNU-719 细胞和未转染 RNA sponge 的 SNU-719 细胞作对比,发现含有 sponge 的 SNU-719 细胞中,ZEB1 的表达量显著下降,提示 EBV 自身编码的 4 种或其中的几种 miRNA 对 EBV 促进 ZEB1 的高表达有帮助作用,解除了宿主细胞本身对 ZEB1 的抑制,但具体的作用机制还需进一步探究。

综上,本研究利用化学物质 TPA 联合 NaB 作为外源性刺激因子,诱导 EB 病毒相关癌细胞系中处于潜伏期的 EBV 再激活,发现 ZEB1 和 ZEB1-AS1 可能存在协同作用;并利用 RNA sponge 技术探讨了 EBV 自身编码的 miRNA 对 ZEB1 和 ZEB1-AS1 表达量的影响,而 ZEB1 是 EMT 过程重要的调节因子,因此 EBV 自身编码的 miRNA 对 EMT 的影响还需要进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] BROWNE G, SAYAN A E, TULCHINSKY E. ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer[J]. Cell Cycle, 2010, 9(5):886-891.
- [2] VANDEWALLE C, VAN R F, BERX G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2009, 66(5):773.
- [3] YAO J, YAO X, TIAN T, et al. ABCB5-ZEB1 Axis Promotes Invasion and Metastasis in Breast Cancer Cells. [J]. Oncology Research, 2017, 25(3):305.
- [4] PRECA B T, BAJDAK K, MOCK K, et al. A novel ZEB1/HAS2 positive feedback loop promotes EMT in breast cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(7):11530-

- 11543.
- [5] SELTH L A, DAS R, TOWNLEY S L, et al. A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(1):24–34.
- [6] CHEN S J, CHEN G H, CHEN Y H, et al. Characterization of Epstein-Barr Virus miRNAome in Nasopharyngeal Carcinoma by Deep Sequencing[J]. *Plos One*, 2010, 5(9):e12745.
- [7] ELLIS A L, WANG Z, YU X, et al. Either ZEB1 or ZEB2/SIP1 can play a central role in regulating the Epstein-Barr virus latent-lytic switch in a cell-type-specific manner[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(12):6139.
- [8] 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]. *International Journal of Cancer*, 2009, 124(9):2016–2025.
- [9] 陈香岭, 杨梦莉, 马春霞, 等. 构建稳定表达 pLVshRNA-EGFP-EBVsponge 的 SNU719 细胞系[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(4):435–439.
- [10] 孙达权, 石松, 徐莹莹, 等. 核不均一核糖核蛋白 C2 基因克隆及其对肝癌细胞生长的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2017(6):626–630.
- [11] SU W, MIAO X, CHEN X, et al. Long noncoding RNA ZEB1-AS1 epigenetically regulates the expressions of ZEB1 and downstream molecules in prostate cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16(1):142.
- [12] YU X, WANG Z, MERTZ J E. ZEB1 regulates the latent-lytic switch in infection by Epstein-Barr virus[J]. *Plos Pathogens*, 2007, 3(12):e194.
- [13] SANCHEZ-TILLÓ E, SILES L, DE B O, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2011, 1(7):897–912.
- [14] YOKOBORI T, SUZUKI S, TANAKA N, et al. MiR-150 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma via targeting the EMT inducer ZEB1[J]. *Cancer Science*, 2013, 104(1):48–54.
- [15] ROCHE J, NASARRE P, GEMMILL R, et al. Global decrease of histone H3K27 acetylation in ZEB1-induced epithelial to mesenchymal transition in lung cancer cells [J]. *Cancers*, 2013, 5(2):334–356.
- [16] ZHILAN C, SHUANG L, KECHENG H, et al. The nuclear protein expression levels of SNAI1 and ZEB1 are involved in the progression and lymph node metastasis of cervical cancer via the epithelial-mesenchymal transition pathway. [J]. *Human Pathology*, 2013, 44(10):2097–2105.
- [17] YANG Y, AHN Y H, CHEN Y, et al. ZEB1 sensitizes lung adenocarcinoma to metastasis suppression by PI3K antagonism[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(6):2696.
- [18] LOBERT S, GRAICHEN M E, MORRIS K. Coordinated regulation of  $\beta$ -tubulin isotypes and epithelial-to-mesenchymal transition protein ZEB1 in breast cancer cells[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(32):5482–5490.
- [19] HURTEAU G J, CARLSON J A, ROOS E, et al. Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(13):2064.
- [20] MIZUGUCHI Y, SPECHT S, III J G L, et al. Cooperation of p300 and PCAF in the Control of MicroRNA 200c/141 Transcription and Epithelial Characteristics[J]. *Plos One*, 2012, 7(2):e32449.
- [21] MARQUITZ A R, RAAB-TRAUB N. The role of miRNAs and EBV BARTs in NPC. [C]. *Seminars in Cancer Biology*, 2012:166–172.
- [22] HSU C Y, YI Y H, CHANG K P, et al. The Epstein-Barr virus-encoded microRNA MiR-BART9 promotes tumor metastasis by targeting E-cadherin in nasopharyngeal carcinoma. [J]. *PLOS Pathogens*, 2014, 10(2):e1003974.
- [23] SKALSKY R L, CORCORAN D L, GOTTWEIN E, et al. The viral and cellular MicroRNA targetome in lymphoblastoid cell lines[J]. *Plos Pathogens*, 2012, 8(1):e1002484.
- [24] CAI L, YE Y, JIANG Q, et al. Epstein – Barr virus-encoded microRNA BART1 induces tumour metastasis by regulating PTEN-dependent pathways in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Nature Communications*, 2015, 6:7353.
- [25] SHINOZAKIUSHIKU A, KUNITA A, ISOGAI M, et al. Profiling of virus-encoded MicroRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and their roles in gastric carcinogenesis[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(10):5581.
- [26] KANG D, SKALSKY R L, CULLEN B R. EBV bart MicroRNAs target multiple pro-apoptotic cellular genes to promote epithelial cell survival [J]. *Plos Pathogens*, 2015, 11(6):e1004979.
- [27] HYOJI K, HOYUN C, SUK KYEONG L. EBV-Epstein Barr virus miR-BART20-5p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting BAD [J]. *Cancer Letters*, 2015, 356(2):733–742.

(2018-01-20 收稿, 2018-03-05 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 乐 萍