文章编号:1000-5404(2011)19-2025-04

论著

EB病毒BARF1基因对人胃上皮细胞恶性转化的作用

李淑英*[1],李劲涛*[2,3],杜海军[3],王 湛[3],朱丽华[1],周 玲[3],曾 毅[3] (063000 河北 唐山,河北联合大学基础医学院[1];100124 北京,北京工业大学生命科学与生物工程学院[2];100052 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所肿瘤病毒室,传染病预防控制国家重点实验室病毒性肿瘤组[3])

[摘要] **目的** 探讨EB病毒编码BARF1基因在人胃上皮细胞恶性转化中的作用。**方法** 用携带BARF1基因的真核载体PIRES2-EGFP/BARF1,转染人胃上皮细胞系GES-1,通过G418筛选,获得稳定表达BARF1基因的人胃上皮细胞株。GES-1细胞被分为4组,包括1个转染BARF1基因的细胞组,1个转染BARF1基因并有TPA刺激细胞组,1个转染空载体细胞组和未转染的细胞组。观察软琼脂克隆形成能力和SCID鼠体内成瘤能力。SCID鼠被分成不同的组进行皮下接种,每一组接种3只。**结果** 转染BARF1基因的细胞组及其TPA刺激组在软琼脂中能形成克隆,转染组克隆形成率为24.2%(58/240),TPA组克隆形成率为40.0%(96/240);而未转染组和转染空载体组细胞在软琼脂中没有克隆形成。转染BARF1基因的TPA刺激组细胞在SCID鼠体内能形成了肿瘤;未转染组、转染空载体组及转染BARF1基因的细胞组在SCID鼠体内没能形成肿瘤,但转染BARF1基因的细胞组在SCID鼠体内产生了结节。**结论** 作为EBV的一个癌基因BARF1能够使细胞发生恶性转化,获得肿瘤细胞生长的特性,在人胃上皮细胞恶性转化过程中起重要作用。

[关键词] 人胃上皮细胞;转染;BARF1基因
[中图法分类号] R73-362; R730.23; R735.2 [文献标志码] A

Role of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 gene in malignant transformation of human gastric epithelial cells

Li Shuying*[1], Li Jintao*[2,3], Du Haijun[3], Wang Zhan[3], Zhu Lihua[1], Zhou Ling[3], Zeng Yi[3] ([1]College of Basic Medicine, Hebei United University, Tangshan, Hebei Province, 063000; [2]College of Life Science and Bio-engineering, Beijing University of Technology, Beijing, 100124; [3]National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, and State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Beijing, 100052, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus (EBV) in malignant transformation of human gastric epithelial cells. **Methods** BARF1 gene carried by the eukaryotic vector pIRES2-EGFP/BARF1 was transfected into human gastric epithelial cell line GES-1; the transfected cells were screened by G418; and through this process obtained human gastric epithelial cells that stably expressed BARF1 gene. The colony formation in soft agar and tumorigenicity in SCID mice of the stably transfected cells were examined. GES-1 cells were divided into 4 groups including a BARF1 group (cells transfected with BARF1 gene), a TPA group (cells transfected with BARF1 gene and treated with TPA), a vector group (cells transfected with vector plasmid) and a control group (cells with no transfection). The SCID mice were given different groups of cells through subcutaneous inoculation, and each treatment included 3 mice. **Results** The cells of the BARF1 group and the TPA group formed colonies in soft agar, and the clony-forming efficiency were 24.2% (58/240) and 40.0% (96/240), respectively, while cells of the vector group and the control group did not form any colonies in soft agar. Tumors were formed in the SCID mice that were given the cells of the TPA group, while no tumor was formed in the SCID mice that were given the cells of the other groups. However, nodules were formed in the SCID mice that were given the cells of the BARF1 group. **Conclusion** BARF1 gene, as an oncogene of EBV, can induce malignant transformation and gain of tumor cell characteristics in

[基金项目] 河北联合大学博士启动基金;传染病预防控制国家重点实验室自主研究重点课题(2011SKLID103)
*: 同等贡献者
[通信作者] 周 玲,曾 毅, E-mail: lsy5001@sina.com

cells and plays an important role in the malignant transformation of gastric epithelial cells.

[**Key words**] human gastric epithelial cells; transfection; BARF1 gene

Supported by the PHD Start Fund of Hebei United University, and the Key Program of State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control (2011SKLID103). Li Shuying and Li Jintao are the first author who contributed equally to the article. Corresponding author: Zhou Lin, Zeng Yi, E-mail: lsy5001@sina.com

BARF1是EB病毒(Epstein-Barr virus,EBV)编码的早期裂解基因,位于EBV基因的*Bam*HⅠA区域(*Bam*HⅠA Rightward open-reading Frame-1)第165 504至166 169位核苷酸区域,在病毒DNA合成前转录翻译,其编码蛋白含221个氨基酸残基,是一疏水蛋白,其N端有一信号肽序列,没有跨膜区[1]。BARF1定位在细胞膜,细胞质,也可分泌到细胞外,并且其最关键功能区是N端1~49位的氨基酸残基[2]。该基因具有免疫原性,可以作为一种新的免疫治疗靶抗原[3-4];Wynne等[5]的研究表明:BARF1蛋白具有神经保护和促有丝分裂活性,因此有可能将BARF1蛋白与消炎拮抗剂联合使用来治疗神经失调性疾病,以增强神经活性。是近年来确认的EBV新的致癌基因,可促进上皮细胞永生化和转化等功能[6-7]。在鼻咽癌的发生、发展中起重要作用[8-9]。本研究利用携带BARF1基因的真核载体PIRES2-EGFP/BARF1,建立了稳定表达BARF1基因的人胃上皮细胞株;通过软琼脂克隆实验和SCID鼠成瘤实验,探讨BARF1基因在人胃上皮细胞恶性转化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Scid鼠来源于中国医学科学院实验动物研究所,试验用其繁殖后代,7~9周龄,SPF级,体质量22~28 g。B95-8细胞、真核表达载体PIRES2-EGFP/BARF1及GES-1细胞本室保存。RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒、RPMI1640细胞培养液、DMEM培养液、小牛血清及2xPower *Taq* PCR Master Mix均购于北京百泰克生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 B95-8细胞使用RPMI1640,GES-1细胞使用DMEM,并在培养液中添加10%灭活的小牛血清、100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素。培养于37 ℃,5% CO_2的温箱中,每2~3天换1次液。

1.2.2 细胞的转染与克隆 用lipofectamine2000介导,将PIRES2-EGFP空载体及携带目的基因BARF1的真核表达载体PIRES2-EGFP/BARF1转染人胃上皮细胞GES-1(按试剂盒说明书操作)。用有限稀释法进行克隆,转染后第3天将细胞消化分散,按每孔200个细胞接入48孔细胞培养板,用含有300 μg/ml的G418培养液进行筛选,G418为新霉素类似物,可以杀死没有其抗性的细胞,而我们构建的携带BARFl基因的真核表达载体PIRES2-EGFP/BARF1和空载体PIRES2-EGFP均具有neo抗性,所以通过G418可以筛选出阳性克隆细胞。每2~3天换1次液,长出抗性克隆后扩大培养。GES-1细胞被分为4组,包括1个转染BARF1基因的细胞组,1个转染BARF1基因并有TPA刺激细胞组,1个转染空载体细胞组和未转染的细胞组。

1.2.3 转染细胞鉴定BARF1基因的表达 将抗性克隆细胞扩大培养后,提取细胞RNA,逆转录,以逆转录产物为模板PCR扩增BARF1(引物如表1),鉴定BARF1基因的表达。PCR产物在含0.01% Gold View(核酸染料)的1.5%琼脂糖凝胶上电泳检测。同时,将抗性克隆细胞扩大培养后,提取细胞蛋白,用Western blot检测BARF1蛋白的表达。

表1 BARF1扩增引物

引物	序列(5′-3′)	位点	扩增长度(bp)
BARF1#1	CCAGGTTCATCGCTCAGCTC	165508-165527	524
BARF1#2	CATAACACCGCCATTTGCCG	166012-166031	

1.2.4 软琼脂克隆形成试验 将上述1.2.2中的4组细胞及HeLa细胞进行培养,待其生长到80%汇合度时,用0.25%胰酶消化。用含10%胎牛血清的DMEM制成单细胞悬液,做活细胞计数,使细胞浓度为3×10^3个细胞/ml。底层软琼脂制备:用双蒸水配制1.3%琼脂糖10 ml,高压灭菌后,放置55 ℃水浴锅中保温,加入预温37 ℃含20%血清的2×DMEM 10 ml,混合均匀,立即浇入24孔培养板中,每孔加入含0.65%琼脂糖培养基660 μl,置室温使其凝固备用。上层琼脂糖制备:取55 ℃已高压灭菌含0.66%琼脂糖培养基0.3 ml,迅速加入预温37 ℃含20%血清的2×DMEM培养基0.3 ml(含细胞浓度4×10^3个/ml),混合均匀,立即浇入铺有底层琼脂的24孔培养板中,每组细胞接种4个复孔,做好标记,置室温使琼脂凝固。将培养板移入CO_2孵箱,在37 ℃、5% CO_2及饱和湿度环境下培养2周。每天观察软琼脂中细胞克隆的形成,并计数,以细胞分裂3次即增殖8个细胞作为一个克隆,把培养板放置在倒置显微镜上,肉眼直接计数克隆数,计算克隆形成率。并以HeLa细胞作为阳性对照。克隆形成率(%)=克隆数/接种细胞数×100%。

1.2.5 转染细胞在Scid鼠成瘤实验 将1.2.2中的4组细胞分别于Scid鼠皮下接种1 ml细胞悬液(细胞浓度为每毫升含2×10^7个活细胞),每组细胞接种3只Scid鼠,每天观察肿瘤生长状况并记录。

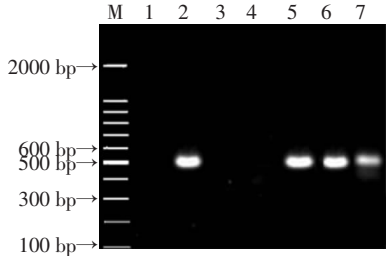
2 结果

2.1 单克隆细胞的获得

约2周后可看到有G418抗性克隆出现,而没有转染成功的细胞均已死亡。每种转染细胞分别挑出3个单克隆扩大培养。

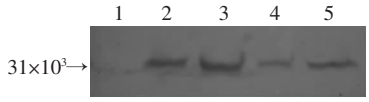
2.2 转染细胞鉴定BARF1基因的表达

从阳性克隆细胞(包括BARFl基因转染的细胞和空载体转染的细胞)提取总RNA,经逆转录,得到大小为524 bp的扩增产物(图1)。提取蛋白,经Western blot,得到约为31×10^3的蛋白产物(图2)。



M：标准(100 bp ladder)；1：无菌双蒸水为模板的阴性对照；2：B95－8 细胞的 cDNA 为模板的阳性对照；3：GES-1 细胞 cDNA 为模板的扩增；4：转染空载体的细胞的 cDNA 模板 PCR 结果；5～6：转染 BARF1 基因的细胞的 cDNA 模板 PCR 结果

图 1　RT-PCR 鉴定转染 BARF1 基因的表达

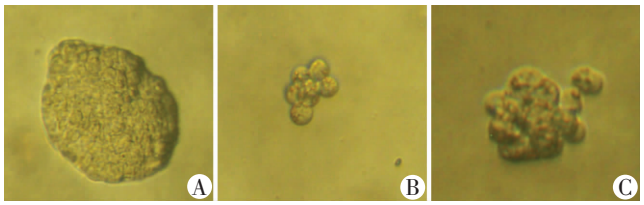


1：转染空载体细胞提取的蛋白作为阴性对照；2：提取 B95－8 细胞蛋白作为阳性对照；3～5：分别代表转染 BARF1 基因的 3 个克隆细胞提取蛋白后 Western blot 的结果

图 2　Western blot 鉴定转染 BARF1 基因的表达

2.3　软琼脂克隆形成实验

以细胞分裂 3 次即增殖 8 个细胞作为一个克隆，以克隆数与接种细胞数之比作为克隆形成率。培养至第 6 天，在倒置显微镜下观察，可以见到阳性对照 HeLa 细胞组、转染 BARF1 细胞组及其 TPA 刺激组有细胞克隆形成，培养至 11 d，HeLa 细胞组克隆明显增多增大，转染 BARF1 细胞组及其 TPA 刺激组细胞克隆增大。细胞呈堆积性生长，其直径大小在 0.5～1.0 μm 之间，并且 TPA 刺激转染 BARF1 细胞组克隆直径大于转染 BARF1 细胞组(图 3)。正常 GES-1 细胞组和空载体质粒转染 GES-1 细胞组未见有克隆形成，并且细胞已死亡。各组细胞克隆形成率分别为：HeLa 为 87.5%(210/240)，TPA 刺激转染 BARF1 细胞组为 40.0%(96/240)；转染 BARF1 细胞组为 24.2%(58/240)。

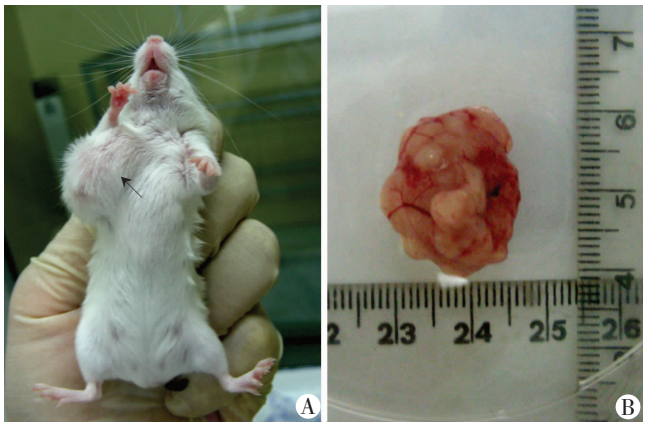


A：阳性对照 HeLa 细胞；B：转染 BARF1 的 GES-1 细胞；C：TPA 刺激转染的 BARF1 的 GES-1 细胞

图 3　转染 BARF1 基因的软琼脂克隆形成实验结果　(倒置显微镜×100)

2.4　成瘤实验

将未转染细胞，转染空载体细胞，转染 BARF1 基因细胞及其 TPA 刺激细胞分别收集，按 2×10^7 个细胞/ml 的量接种至 Scid 鼠右前腿腋皮下，每组接种 3 只鼠每天观察小鼠，观察 1 个月。接种未转染组、转染空载体组细胞的 Scid 鼠没有肿瘤形成。接种转染 BARF1 基因组细胞及其 TPA 刺激组细胞的 Scid 鼠，第 5 天就能摸到明显肿块形成，但接种转染 BARF1 基因细胞的小鼠最终没能形成肿瘤，只产生了结节；而接种转染 BARF1 基因 TPA 刺激组细胞的小鼠最终形成了肿瘤(图 4)，其对应肿瘤大小分别为 2.1 cm×2.2 cm；1.6 cm×2.0 cm；1.8 cm×2.3 cm。



A：Scid 鼠成瘤情况；B：瘤体外观

图 4　TPA 刺激表达 BARF1 基因的 GES-1 细胞接种至 Scid 鼠致瘤情况

3　讨论

胃癌的发生与发展是多因素、多基因相互作用的复杂过程。EB 病毒作为一种外源性的因素，是一种致瘤病毒，并且 BARF1 是近年来确认的 EBV 新的致癌基因，其致癌作用日益受到关注。李友琼等[10]将 BARF1 基因转染胃癌细胞系 SGC7910 后，能够全面增强胃癌细胞的肿瘤原性。

本项研究结果显示：正常的 GES-1 细胞为梭形，转染 BARF1 基因后细胞圆化、增大及母细胞化，用胰蛋白酶消化时，对附着体的黏着力减弱，易于被消化。细胞相互间的走向失去正常规律性，失去接触抑制，细胞重叠生长，可以悬浮生长，软琼脂中有集落形成，表达 BARF1 基因的细胞单独接种至 Scid 鼠不能形成肿瘤，而表达 BARF1 基因的细胞用 TPA 刺激 2 周后，再接种至 Scid 鼠则能形成肿瘤；本实验结果表明，肿瘤的形成是多因素多阶段的发展过程，虽然 BARF1 基因是一种致癌基因，但其本身单独作用不足以导致肿瘤的发生；本项成瘤实验的基础是首先以癌基因 BARF1 作为启动因子，然后以 TPA 作为促癌因子，通过癌基因与促癌物 2 周的相互作用后，而使 Scid 鼠获得了肿瘤生长的特性。提示人体肿瘤的形成不仅需要接触致癌物，而且还需促癌物通过较长时间的诱导，才能使细胞发生恶性转化。

zur-Hausen 等[11]利用 RT-PCR 和 Southern 杂交方法，检测了 132 例胃癌组织，10 例(7.6%)EBERs 阳性胃癌组织中有 9 例表达 BARF1，而 RT-PCR 和 Western 印迹均检测不到 LMP1、EBNA2 的表达。因此认为，EBV 在胃癌中可能存在一种新的感染模式，主要表达 BARF1，而不表达 LMP1，认为 LMP1 在胃癌的发生中可能不起重要作用，而由 BARF1 代替 LMP1 起致癌作用。王云等[12]应用 RT-PCR 和 Southern 杂交技术检测 185 例胃癌组织，13 例 EBV 阳性胃癌组织中检测到

6例早期基因BARF1的表达,提示早期基因BARF1在EBV阳性胃癌发生过程中可能起重要作用。郭秀婵等[13]将猴肾永生化细胞系协同TPA(佛波脂)注射Scid鼠和裸鼠,肿瘤成瘤率为100%。由此可推测在上皮细胞发生恶性转化过程中,或在肿瘤发生过程中BARF1较LMP1可能起更关键的作用。由此推测,BARF1基因不仅与胃癌的发生有关,并且在胃上皮细胞的恶性转化和恶性表性的维持中也起重要作用。

本实验用TPA协同作用于稳定表达BARF1基因的人胃上皮细胞株GES-1,诱导细胞的恶性转化,展示了BARF1基因与胃癌发生关系的一个重要证据,为EB病毒相关胃癌的研究提供了细胞分子生物学研究的模型,为进一步深入探讨EB病毒相关胃癌发生的机制提供了前提支持。

参考文献:

[1] Strockbine L D, Cohen J I, Farrah T, *et al*. The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor[J]. J Virol, 1998, 72(5): 4015-4021.

[2] Sheng W, Decaussin G, Sumner S, *et al*. N-terminal domain of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2[J]. Oncogene, 2001, 20(10): 1176-1185.

[3] Martorelli D, Houali K, Caggiari L, *et al*. Spontaneous T cell responses to Epstein-Barr virus-encoded BARF1 protein and derived peptides in patients with nasopharyngeal carcinoma: bases for improved immunotherapy[J]. Int J Cancer, 2008, 123(5): 1100-1107.

[4] Hoebe E K, Hutajulu S H, van Beek J, *et al*. Purified hexameric Epstein-Barr virus-encoded BARF1 protein for measuring anti-BARF1 antibody responses in nasopharyngeal carcinoma patients[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(2): 298-304.

[5] Wynne A, Kanwar R K, Khanna R, *et al*. Recent Advances on the Possible Neuroprotective Activities of Epstein-Barr Virus Oncogene BARF1 Protein in Chronic Inflammatory Disorders of Central Nervous System[J]. Curr Neuropharmacol, 2010, 8(3): 268-275.

[6] Seto E, Yang L, Middeldorp J, *et al*. Epstein-Barr virus(EBV)-encoded BARF1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression[J]. J Med Virol, 2005, 76(1): 82-88.

[7] Fiorini S, Ooka T. Secretion of Epstein Barr virus encoded BARF1 oncoprotein from latently infected B cells[J]. Virol J, 2008, 5: 70.

[8] Hutajulu S H, Hoebe E K, Verkuijlen S A, *et al*. Conserved mutation of Epstein-Barr virus-encoded BamHI-A Rightward Frame-1 (BARF1) gene in Indonesian nasopharyngeal carcinoma[J]. Infect Agent Cancer, 2010, 5: 16.

[9] Jiang R, Cabras G, Sheng W, *et al*. Synergism of BARF1 with Ras induces malignant transformation in primary primate epithelial cells and human nasopharyngeal epithelial cells[J]. Neoplasia, 2009, 11(9): 964-973.

[10] 李友琼, 张雪怡, 曾健, 等. EB病毒BARF1基因表达对胃癌细胞株SGC7910生物学行为的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2009, 19(3): 214-219.

[11] zur-Hausen A, Brink A A, Craanen M E, *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.

[12] 王云, 罗兵, 王笑峰, 等. 胃癌组织中EB病毒的检测及其增殖期基因的表达[J]. 中国癌症杂志, 2004, 14(3): 217-221.

[13] 郭秀婵, 盛望, 张永利, 等. Epstein-Barr病毒BARF1基因协同TPA诱发猴肾上皮细胞恶性转化的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15(4): 321-323.

(**收稿**:2011-04-11;**修回**:2011-07-06)

(编辑 邓强庭)

(上接2020页)

肺栓塞中,约有12%的患者出现$S_I Q_{III} T_{III}$征[5]。该患者心电图出现$S_I Q_{III} T_{III}$典型改变,故发生急性大块肺栓塞可能,大面积肺栓塞和非大面积肺栓塞死亡率存在统计学差异,一旦患者出现循环稳定的失衡,病情常急转直下,预后往往不佳[6],以至患者未来得及溶栓治疗就出现致死性改变。本例为肾小球轻微病变类型,住院期间虽使用活血化瘀、抗凝药物治疗,但患者仍然出现肺栓塞,考虑与肾病综合征疾病本身的特殊性有关。肾病综合征患者血液处于高凝状态,易形成血栓,其主要原因:①血脂水平高,可增加血小板聚集及血液黏滞度;②血清蛋白低于20 g/L时,抗凝血酶Ⅲ的缺乏非常明显,且低蛋白血症使血浆胶体渗透压下降,引起血容量减少,血液浓缩,促使血栓形成;③大量抗凝因子及纤溶酶从尿中丢失,同时肝脏代偿性合成蛋白增加,使凝血因子Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ及纤维蛋白原增加;④长期服用糖皮质激素,增加凝血因子活性,降低纤维蛋白的溶解;肾病综合征时循环血容量不足、静脉淤积、免疫反应以及治疗用药如利尿剂、糖皮质激素和活动减少均系血栓形成的辅助因素[7]。未接受正确治疗肺栓塞的总死亡率为20%~30%,其中约44%死于症状发生后15 min之内,22%死于2 h以内[8]。

总之,肺栓塞是肾病综合征严重的并发症,未经治疗者死亡率高,可无典型临床表现,若不引起重视,易误诊、漏诊,必须做到早发现、早治疗,才能降低患者死亡率。同时也提示肾病综合征患者,必须加强抗凝治疗,预防血栓形成。

参考文献:

[1] 刘春霞. 急性肺栓塞心电图特点(43例分析)[J]. 航空航天医药, 2010, 21(1): 44.

[2] 李玲. 肺栓塞86例临床分析[J]. 现代医药卫生, 2009, 25(24): 3710-3712.

[3] 曾红. 以肺栓塞为首发症的肾病综合征[J]. 中国临床医生, 2007, 35(10): 78-79.

[4] 赵沁, 陈良光. 56例急性肺栓塞心电图分析[J]. 疾病监测与控制, 2010, 4(5): 302-303.

[5] 王辰. 临床呼吸病学[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2009:238-239.

[6] 叶小群, 况九龙, 齐协飞, 等. 急性肺栓塞30例诊治分析[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2165.

[7] 王海燕. 肾脏病学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 993-994.

[8] 李曦, 张劭夫. 实用呼吸病学[M]. 北京:化学工业出版社, 2010: 266.

(**收稿**:2011-06-30;**修回**:2011-08-04)

(编辑 龙 亮)