维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)05-0464-03

重庆地区鼻咽癌患者血浆 EB 病毒 LMP1 基因检测及 N 端 XhoI 酶切位点变异分析

杨玉成,王祎琴,钱 迪,何 芸,洪苏玲

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究重庆地区鼻咽癌和非鼻咽癌患者血浆 Epstein-Barr 病毒(EBV)潜伏膜蛋白 1 (LMP1)基因存在情况及 N 端 XhoI 酶切位点变异状况,探讨其在鼻咽癌发生中所起的作用。方法:收集重庆籍鼻咽癌患者外周血 48 例,非鼻咽癌患者外周血 40 例,提取 DNA 后,用聚合酶链反应技术(PCR) 特异性地扩增 LMP1 基因的 N 端区,PCR 产物经 XhoI 酶切后用 8%聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳分离分析,用双脱氧终止法对部分 PCR 产物进行测序,用 DNAssist 软件对序列进行碱基缺失变异分析。结果:48 例鼻咽癌外周血中,全部扩增出 267bp 的特异性 LMP1 基因条带,阳性率为 100%。40 例非鼻咽癌者外周血中,38 例扩增出特异性条带,阳性率为 95%。与 B95-8 原型 LMP1 比较,全部 PCR 产物酶切电泳分析、测序及软件序列分析未发现一例存在 XhoI 酶切位点缺失变异。结论:我国重庆地区鼻咽癌和非鼻咽癌患者血浆携带的 EB 病毒 LMP1 基因 XhoI 酶切位点无缺失变异;LMPl 基因 N 端 XhoI 酶切位点缺失变异与鼻咽癌发病的确切关系还需进一步研究。

【关键词】Epstein-Barr 病毒;潜伏膜蛋白 1;鼻咽癌;基因突变

【中国图书分类法分类号】R373.9;R739.63 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-03

Analysis of Epstein-Barr virus LMP1 gene XhoI-site mutation in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma in Chongqing of China

YANG Yucheng, et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect and analyze the Epstein-Barr virus LMP1 gene XhoI-site mutation in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma(NPC) in Chongqing of China. *Methods*: DNA extraction and PCR amplification was used in plasma of 48 NPC patients and 40 control non-NPC cases from Chongqing of China. All the PCR production was digested by enzyme XhoI, then segregated in 8% PAGE. XhoI-site mutation was analyzed by sequencing and comparing with B95-8 cell. *Results*: The LMP1 was amplified and digested successfully from 48 of 48 NPC cases (100%) and from 38 of 40 non-NPC cases (95%), but none of LMP1 XhoI-site mutation was found. Sequencing was performed on 4 LMP1 genes from NPC cases and 5 LMP1 genes from non-NPC cases, they showed the presence of the XhoI-site. *Conclusions*: XhoI-site in EBV LMP1 gene N terminus has no mutation in plasma of NPC or non-NPC cases in Chongqing of China. The precise relationship of XhoI-site mutation and NPC pathogenesis need further investigation.

【Key words】Epstein-Barr virus; Latent membrane protein 1; Nasopharyngeal carcinoma; Gene mutation

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma,NPC)是我国常见的十大恶性肿瘤之一,其发病除与遗传因素、环境因素有关外,国内外一系列研究表明 EBV (Epstein-Barr Virus,EBV) 在鼻咽癌的发生发展中起重要作用[1]。EBV 遍布全世界,而鼻咽癌的发病率有很强的地域及人种倾向,提示 EBV 地域相关多态性及病毒变异可能与鼻咽癌的发病有关[2]。目前 EBV 缺失变异研究较多的是 LMP1 基因、EBNA1 基因等。

LMP1 基因是众多 EBV 编码基因中被明确证明唯一能够将体外培养的人和啮齿类动物细胞转化成肿瘤细胞系的致瘤基因,而被列为癌基因[3]。LMP1 蛋白的 N-末端区与 C-末端区是 LMP1 的主要功能区域,具有转化和信号转导功能。研究表明,LMP1

作者介绍:杨玉成(1974-),男,博士,主要研究方向:耳鼻咽喉头颈肿瘤基础与临床。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672311);重庆市卫生局重点资助项目(2003);重庆市卫生局资助项目(07-2-47)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因在不同地区存在序列差异，大多集中在 N 端 XhoI 酶切位点的变异及 C 端 30bp 的缺失。LMP1 N 端 XhoI 酶切位点的丢失可能是导致华南地区鼻咽癌高发的原因之一[4]。然而，对于重庆这一鼻咽癌较高发区的人群 EBV-LMP1 基因携带及变异情况尚未见报道。本文旨在研究重庆地区鼻咽癌和非鼻咽癌病人血液携带的 EBV-LMP1 基因流行状况及 N 端 XhoI 酶切位点的变异情况，为进一步探讨 LMP1 N 端 XhoI 酶切位点的变异与鼻咽癌发病的相关性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 病例及标本 绒猴淋巴细胞系 B95-8 细胞由中山大学肿瘤研究所惠赠；48 例鼻咽癌和 40 例非鼻咽癌患者来自重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科门诊及住院病例，全为首诊重庆籍患者。其中男性 53 例，女性 35 例，年龄 18~68 岁，平均年龄(46±14)岁。非鼻咽癌患者为来本科就诊的鼻息肉、鼻窦炎、突聋、咽喉炎等患者及健康体检者，免疫酶法检测均为 EB 病毒携带者。每例取外周抗凝全血 2~3ml，离心 1000r/min×3min,取血浆 0.5~1.0ml，1.5m1EP 管，-40℃冻存。

1.1.2 主要试剂 Ex Taq 酶、限制性内切酶 XhoI、DL2,000 DNA Marker、DNA 胶回收试剂盒均购自 TAKARA（大连）公司。质粒提取试剂盒、Cycle-pure kit 购自 OMEGA 公司。DNA 抽提试剂盒购自北京天为时代公司，酚/氯仿购自北方同正生物有限公司，引物合成由上海英骏生物工程公司完成，DNA 测序由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室测序部完成。

1.1.3 主要仪器 聚合酶连反应(PCR)扩增仪(PE-Cetus 公司，美国)，Gel Doc100 凝胶成像仪(BIO-RAD 公司，美国)，全波长分光光度计(BIO-RAD 公司，美国)，基因测序仪 3100 型(ABI 公司，美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及 DNA 抽提 B95-8 细胞用含 10%小牛血清的 RMPI 1640 培养基培养，置于 37℃、5%CO_2 的饱和水汽二氧化碳培养箱。72h 后收集细胞，参照 DNA 抽提试剂盒说明提取基因组 DNA。鼻咽癌和非鼻咽癌病人外周血每例取血浆 0.5ml，参照《分子克隆》第二、三版用酚/氯仿提取 DNA。

1.2.2 引物设计及 PCR 扩增 依据 EB 病毒 B95-8 基因组序列(GenBank 登陆号为 NC001345 或 V01555)，用 Primer5 软件设计上下游引物如下：

P1:5'-CATCAGTAGGAGTATACAAAG-3'(169208nt~169228nt)；

P2:5'-ATGGAACACGACCTTG-3'(169474nt~169459nt)。特异性地扩增 LMP1 基因 N 端外显子 A 包含 XhoI 酶切位点的区域，扩增片段为 267bp。PCR 反应体系中含模板 DNA 0.5~5μl，10×PCR 缓冲液 2.5μl，$MgCl_2$(25mmol/L)2μl，d NTP(各 2.5mmol/L)2μl，10μmol 的上下游引物各 1.0μl，Ex Taq 酶(5U/μl)0.15μl，加灭菌纯水至 25μl。反应条件为：94℃预变性 5min，94℃变性 50s，55℃退火 30s，72℃延伸 30s，反应 35 个循环，72℃再延伸 8min。对于初次未扩增出特异条带的样本，可增加模板量重复 PCR 扩增 2~3 次。PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。阳性对照为 B95-8 细胞 DNA，阴性对照用无菌去离子水代替模板。

1.2.3 PCR 扩增片段 XhoI 酶切分析 将鼻咽癌和非鼻咽癌的 LMPl 基因 PCR 扩增产物及 B95-8 细胞扩增产物各 5~10μl 用 XhoI 酶切，酶切反应体系为：10×buffer H 2μl，XhoI 1μl，加灭菌纯水至 20μl，37℃水浴酶切 2h，加入核酸上样 buffer 终止。酶切产物用 8%的 PAGE 胶电泳分离鉴定。

1.2.4 序列测定及分析 分别取鼻咽癌患者和非鼻咽癌对照者(有无 XhoI 酶切位点变异各占 2~3 例)PCR 纯化产物进行 LMPl 双脱氧终止法测序，测序引物为 P1。测序结果与 B95-8 细胞来源的原型 LMP1 序列用 DNAMAN5.2 软件和 DNAssist1.02 软件进行对比分析，了解 LMPl N 端有无 XhoI 酶切位点变异。阳性对照为 B95-8 细胞的 PCR 扩增片段。

1.2.5 统计学分析 鼻咽癌和非鼻咽癌两组病人 LMPl 基因的缺失变异情况用 χ^2 进行检验分析。

2 结 果

2.1 LMP1 基因的 PCR 扩增结果

以 B95-8 细胞为阳性对照，经 PCR 扩增得到 267pb 大小的 DNA 条带。48 例鼻咽癌标本中全部扩增出阳性条带，阳性率为 100%。40 例非鼻咽癌标本中，38 例扩增出阳性条带，阳性率为 95%。琼脂糖凝胶电泳结果如图 1。

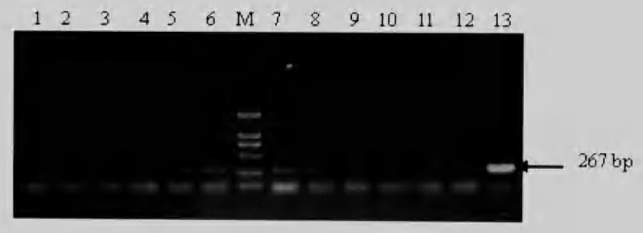
2.2 LMP1 基因 N 端 XhoI 酶切结果

48 例鼻咽癌患者和 38 例非鼻咽癌对照者 LMPl N 端 PCR 产物进行 XhoI 酶切后经 8%PAGE 胶电泳分离电泳如图 2。结果用 Gene Tool 软件初步分析，与 B95-8 细胞阳性条带比较，发现全部 267bp 的条带，均能被 XhoI 酶切，产生大小约 220bp 和 47bp 的条带，表明全部存在 XhoI 酶切位点，未见 XhoI 酶切位点缺失变异。

2.3 测序及序列分析结果

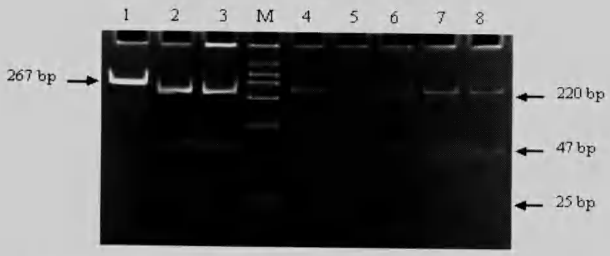
双脱氧终止法测序结果与 B95-8 细胞来源的原型 LMP1 序列用 DNAMAN5.2 软件和 DNAssist1.02 软件进行对比分析比较，4 例鼻咽癌和 5 例非鼻咽癌的 PCR 扩增产物测序结果如图 3，显示 LMPl 基因 N 端均无 XhoI 酶切位点丢失变异。

维普资讯 http://www.cqvip.com

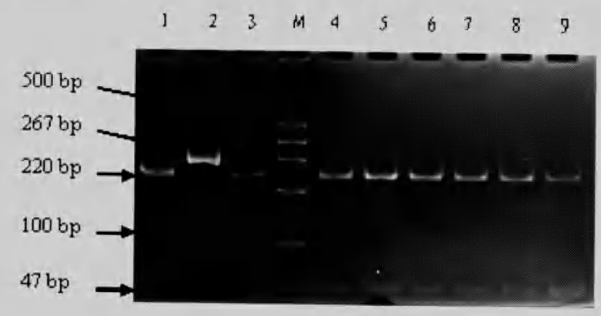


M:DL2 000 marker;1~6:鼻咽癌 PCR 产物;7~12:非鼻咽癌 PCR 产物;13:B95-8 PCR 产物

图 1 鼻咽癌病人和非鼻咽癌对照者 LMP1 基因 N 端 PCR 扩增结果



M:DNA marker B;1:鼻咽癌 PCR 产物未酶切;2,4~8:鼻咽癌 PCR 产物 Xho I 酶切;3: B95-8 PCR 产物 XhoI 酶切



M:DNA marker B;1:B95-8 PCR 产物酶切;2:非鼻咽癌 PCR 产物未酶切;3~9:非鼻咽癌 PCR 产物 XhoI 未酶切

图 2 鼻咽癌病人和非鼻咽癌对照者 LMP1 基因 N 端 PCR 产物 XhoI 酶切结果

3 讨 论

EBV 全球分布广泛,人群感染率高,感染无明显的地区差异,而鼻咽癌却集中发生于华南地区,尤其是广东、广西、香港等地发病率高,提示 EBV 亚株在鼻咽癌发病过程中可能发挥重要作用。在 20 世纪 90 年代初,美国 Abdel-Hamid 教授和我国陈剑经教授就提出 EBV 亚株与其致病性相关[5]。近年来,寻找鼻咽癌相关的病毒变异及地域相关的多态性成为鼻咽癌病因研究的热点,研究较多的是 LMP1 基因、EBNA1 基因等。



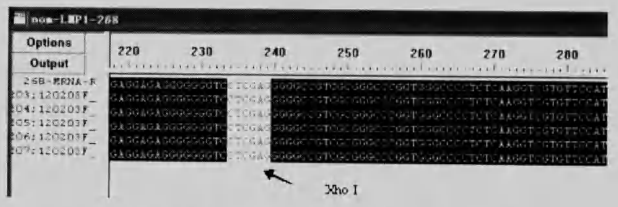


图 3 鼻咽癌患者和非鼻咽癌对照者 LMPl N 端测序对比分析结果

在中国南方来源的鼻咽癌组织中,EBV-LMP1 基因 N 端区域有明显的位点多态性,该多态性可能影响 LMPl 蛋白质降解和 LMPl 锚定于细胞膜。中国台湾的鼻咽癌与中国大陆鼻咽癌患者的 LMPl 有类似的基因顺序。与 B95-8 的 LMPl 顺序相比较,广州地区人群漱口液脱落细胞中 LMP1 序列 N 端保守性差,共有 5 个氨基酸发生转变,169425nt T 替换 G,致使 XhoI 酶切位点丢失,与 B98-5 的同源性为 79%,介于上海与台湾、香港的缺失型 LMPl 之间[4,6,7]。林等[8,9] 检测发现广东地区 EB 病毒健康携带者外周血单个核细胞所携带的 EB 病毒 LMP1 基因为非缺失型(wt-XhoI),而在鼻咽癌组织中主要为缺失型(XhoI-loss),但未进行鼻咽癌患者外周血携带的 EB 病毒 LMP1 基因 Xho I 缺失突变情况研究。我们通过原型 LMPl 特异的 PCR 首次调查研究了我国西部重庆地区鼻咽癌患者及非鼻咽癌人群中 LMP1 基因在血浆中携带情况,48 例鼻咽癌患者血浆中,LMP1 N 端检出率为 100%;40 例非鼻咽癌对照者中 LMP1 N 端检出率为 95%,两组人群携带情况无差异性。通过电泳分离、酶切分析及测序分析,鼻咽癌患者及非鼻咽癌人群中均未发现 LMP1 N 端 XhoI 酶切位点缺失变异,表明我国重庆地区鼻咽癌患者及非鼻咽癌人群血浆中携带的 EB 病毒 LMP1 基因为 wt-XhoI。

目前,EB 病毒缺失变异与鼻咽癌发病的确切关系还不明确。在鼻咽癌高发区广州地区,张等[4]调查发现在鼻咽癌病人和非鼻咽癌两组人群漱口液中均以 XhoI-loss LMP1 为主,其构成比无差异,不

(下转第 473 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

因此克隆入 MCS 的基因和 EGFP 能分别同时表达，而产生非融合蛋白，而彼此不影响各自的蛋白功能的表达[8]。根据荧光显微镜下绿色荧光的存在可确定目的基因得到表达。另外，在 EGFP 基因的下游存在 SV 多聚腺苷酸加尾信号指导双顺反子 mRNA3' 端的加工，能有效提高目的基因的表达。

本实验利用基因克隆技术构建了含增强型绿色荧光蛋白与 HGF 的真核表达质粒 pIRES2-EGFP/HGF，然后利用脂质体法导入真核细胞后蛋白水平获得高效表达，证明 HGF 真核表达载体构建成功，可为肝纤维化等疾病的基因治疗的相关研究奠定了很好的实验基础。

（致谢：感谢军事医学科学院吴祖泽院士提供 pcDNA3.0-HGF 质粒，才使本实验得以顺利完成。）

（通讯作者：王志刚，重庆医科大学超声影像学研究所，教授，博士生导师。E-mail:wzg62942443@163.com）

参 考 文 献

[1] Dixon IM.Help from within:cardioprotective properties of hepatocyte growth factor[J].Cardiovasc Res,2001;51(1):4-6.

[2] Chirgadze DY,Hepple J,Byrd RA,et al.Insights into the structure of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF)and implications for receptor activation[J]. FEBS Lett,1998;430(1-2):126-129.

[3] Hirano S,Bless DM,Rousseau B, et al. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model[J].Laryngoscope,2004;114(3):548-556.

[4] Iimuro Y,Fujimoto J.Strategy of gene therapy for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J].J Hepatobiliary Pancreat Surg,2003;10(1):45-47.

[5] 谢 娜，王晓燕，张 琼，等. 乙型肝炎病毒启动子调控的增强型绿色荧光蛋白真核表达载体的构建与表达 [J]. 中华肝脏病杂志，2006;14(4):268-271.

[6] Heim R,Tsien RY.Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer[J].Curr Biol,1996;6(2):178-182.

[7] Ryu KJ,Lee SW.Identification of the most accessible sites to ribozymes on the hepatitis C virus internal ribosome entry site[J].J Biochem Mol Biol,2003;36(6):538-544.

[8] 邹海波，安 洪，蒋电明，等.携带 IRES 的 BMP2 绿色荧光蛋白表达载体的构建和表达[J].重庆医科大学学报，2004;29(4):455-458.

（上接第 466 页）

支持 XhoI-loss LMP1 的 EBV 选择性地感染鼻咽癌病人。本研究发现，我国重庆地区鼻咽癌患者及非鼻咽癌人群外周血携带的 EB 病毒为 wt-XhoI LMP1，与我国广东地区健康携带者外周血携带的 EB 病毒 LMP1 基因相似[8]。因此，我们初步推测 XhoI-loss LMP1 的 EB 病毒并没有选择性地感染鼻咽癌病人，LMP1 基因 N 端区 Xho I 酶切位点的缺失突变，可能是在鼻咽癌的发生发展过程中产生的，而不是先有缺失突变，再选择性地感染鼻咽癌病人。至于重庆地区人群 EBV-LMPl 基因的缺失变异情况有待于扩大样本进一步研究，同时鼻咽癌组织中 LMP1-LMPl 基因 N 端 XhoI 酶切位点缺失变异情况及其与鼻咽癌发病的确切关系还需进一步研究。

（致谢：本研究在重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室完成，感谢各位老师无私的指导和帮助！）

参 考 文 献

[1] 陈鸿雁，陈佩君.聚合酶链反应检测 EB 病毒 DNA 在鼻咽癌诊断中的应用[J].重庆医科大学学报，2000;25(1):23-25.

[2] Chang ET,Adami HO.The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma [J].Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2006;15(10):1765-1777.

[3] 章晓鹏，贺智教，陈主初.EB 病毒及其癌基因 LMP1 对上皮细胞的转化作用[J].生命的化学，2003;23(2):143-145.

[4] 张晓实，宋坤华，麦海强，等.EB 病毒潜伏膜蛋白 1 多态性与鼻咽癌的关系[J].病毒学报，2001;17(2):103-107.

[5] Abdel-Hamid M,Chen JJ,Constantine N,et al.EBV strain variation:geographical distribution and relation to disease state[J].Virology,1992;190(1):168-175.

[6] Shu CH,Tu TY.Prevalence of the Taiwan variant of the Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma patients and normal individuals[J].Zhonghua Yi Xue Za Zhi(Taipei),2000;63(4):288-293.

[7] 杨玉成，洪苏玲.EB 病毒潜伏膜蛋白 1 与鼻咽癌[J].国际耳鼻咽喉头颈外科杂志，2007;31(1):19-22.

[8] 林素暇，宗永生，吴秋良，等.鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1 基因 N 端 Xho I 酶切位点的丢失[J].癌症，2003;22(11):1147-1151.

[9] 林素暇，宗永生，张 敏，等.鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1 基因的序列变异[J].中华病理学杂志，2005;34(12):791-795.