

EB 病毒编码的 BARF1 对 GES-1 细胞的影响

杨佳宁,李 娜,董鸿铭,徐 媛,李淑英

摘要:目的 探讨爱泼斯坦—巴尔病毒(Epstein-Barr virus, EBV)编码的 BARF1 基因对人胃上皮细胞(GES-1)增殖、迁移及细胞周期分布的影响。**方法** 将 pIRES-EGFP/BARF1 重组质粒、pIRES-EGFP 空载体转染 GES-1 细胞,通过 G418 筛选,获得稳定表达 pIRES-EGFP/BARF1 及 pIRES-EGFP 的 GES-1 细胞。在荧光显微镜下观察转染与未转染组细胞生长状况;通过逆转录 PCR(Reverse Transcription-PCR, RT-PCR)检测转染细胞中 BARF1 基因表达情况;通过细胞计数及 CCK8 法评估转染与未转染三组细胞的增殖能力;通过免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)染色法评价不同组别细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达情况;应用划痕实验分别对稳定转染 BARF1 组和空载体组 GES-1 细胞的迁移效率进行分析评价;应用流式细胞仪检测与分析细胞周期的分布情况。**结果** 获得稳定表达 pIRES-EGFP/BARF1、pIRES-EGFP 的 GES-1 细胞模型;稳定转染 BARF1 组的细胞增殖能力高于未转染组及转染空载体组,并且稳定转染 BARF1 组 S 期显著延长;稳定转染 BARF1 组 GES-1 细胞的迁移能力比转染 pIRES-EGFP 空载体组得到明显提升;细胞周期蛋白 Cyclin D1 集中表达在稳定转染 BARF1 组的 GES-1 细胞核内。**结论** 作为 EBV 编码的癌基因 BARF1 能够促进人胃上皮细胞 GES-1 增殖、迁移及分裂,抑制细胞凋亡,促进胃上皮细胞的恶性转化。

关键词:胃癌;GES-1;BARF1 基因;胃上皮细胞

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2021)12-1071-07

The effect of BARF1 encoded by Epstein-Barr virus on GES-1 cells

YANG Jia-ning, LI Na, DONG Hong-ming, XU Yuan, LI Shu-ying

(North China University of Science and Technology / Hebei Key
Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063210, China)

Abstract: The effects of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus on proliferation, migration and cell cycle distribution of human gastric epithelial cells (GES-1) were investigated. GES-1 cells were transfected with recombinant plasmid of pIRES-EGFP/BARF1 and empty vector of pIRES-EGFP. GES-1 cells with stable expression of pIRES-EGFP/BARF1 and empty vector of pIRES-EGFP were obtained by G418 screened. The GES-1 cell growth of transfected with pIRES-EGFP/BARF1 and pIRES-EGFP, and untransfected were observed under fluorescence microscope. The expression of BARF1 gene in the transfected cells was detected by reverse transcription-PCR (RT-PCR). The proliferation of transfected and untransfected cells was evaluated by cell count and CCK8 method. The expression of CyclinD1 in different groups was evaluated by immunohistochemical staining. The migration efficiency of GES-1 cells stably transfected with BARF1 and empty vector was analyzed and evaluated by wound-healing assay. The cell cycle distribution was detected and analyzed by flow cytometry. The GES-1 cell model stably expressing pIRES-EGFP/BARF1 and pIRES-EGFP was obtained; the proliferation ability of cells in the stable transfected BARF1 group was higher than that of the untransfected group and the transfected empty vector group, and the S phase of the stable transfected BARF1 group was significantly prolonged. The migration ability of GES-1 cells stably transfected with BARF1 was significantly higher than that of pIRES-EGFP emptyvector group. CyclinD1 was concentrated in the nucleus of GES-1 stably transfected BARF1 group. BARF1, an oncogene encoded by EBV, can promote the proliferation, migration and division of human gastric epithelial cells GES-1, inhibit apoptosis and promote the malignant transformation of gastric epithelial cells.

河北省留学人员科技活动资助项目(No. CY201620)

通讯作者:李淑英,Email: lsy5001@sina.com;

ORCID: 0000-0001-9781-2336

作者单位:华北理工大学(河北省慢性疾病重点实验室),唐山
063210

Keywords:gastric cancer; GES-1; BARF1 gene; gastric epithelial cells

Supported by the Project of Science and Technology for Scholars in Hebei Province(No.CY201620)

Corresponding author: Li Shu-ying, Email: lsy5001@sina.com

胃癌(Gastric cancer, GC),是严重危害人类健康的恶性肿瘤^[1]。据有关报道表明,每年大致出现100万左右的GC新发病例,GC通常表现出全球发病率高、存活率低的特点^[2],其发生发展过程较为复杂,受到多重因素的影响,可涉及表观遗传学改变、EBV感染、幽门螺旋杆菌感染、年龄、生活方式不健康、食用腌制品、烤鱼、烤肉、水果食用量低以及吸烟等众多方面^[2-5]。EBV被认为是人类世界最早被发现的致癌病毒^[6],存在归属于疱疹病毒家族的γ病毒亚群,全世界约超过95%的人表现为潜伏感染^[7],并且该病毒以双链DNA形式存在^[8],一旦发生感染,就会存在于人类整个生命过程中,是与人类多种恶性肿瘤发生密切相关的一种病原体^[8]。据相关研究所述,EBV目前被认为是诱发人类癌症的一级危险物^[6],在全世界有10%左右的GC患者会同时检测到感染了EBV^[6,9]。EBV相关胃癌(Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma, EB-VaGC)^[10]如今已被归属为EBV相关恶性肿瘤中最常见的一种疾病类型^[7,11]。胃环境呈现明显酸性,包膜病毒表现为不耐酸的特征,迄今为止EBV如何感染并引起胃癌还没有明确的解释^[12]。已报道的EBV感染胃上皮细胞的可能诱因包括以下两个方面:首先可能由于胃炎发生过程中存在潜伏感染EBV的B淋巴细胞^[13],并通过上皮细胞分泌的囊泡得以激活^[14];其次可能由于持续摄入带有EBV的唾液,使EBV可以在恶劣的酸性环境下复制并使胃上皮细胞癌变^[15]。研究表明,在EBV基因组中有多种与癌症发生存在关联的基因,除了公认的EB病毒核抗原1(EBNA1)、潜伏膜蛋白1(LMP1)和潜伏膜蛋白2(LMP2)之外,还包括BARF1基因^[16]。BARF1(BamHI-A rightward frame 1)基因存在于EBV基因组BamH I A最右侧开放读码框^[17],主要表达在EBV裂解早期,它如今被认为是可诱导多种不同的上皮细胞发生恶性损伤的基因之一,推动上皮细胞持续性增殖及异常转化的进程,促使恶性肿瘤生长,起到阻断细胞凋亡的作用,并以潜在的方式促进EBV相关肿瘤的发生发展^[16,18-19]。即使已经进行了多项研究,但对于EBVaGC的发病机制依旧很不明朗^[4,7-8,20]。本文在体外构建了可稳定表达外源pIRES-EGFP/BARF1基因的人胃上皮细胞模型,探讨外源基因BARF1的表达在人胃上皮细胞增殖、迁移及细胞周期分布。

1 材料与方法

1.1 材料 pIRES-EGFP/BARF1重组质粒、GES-1(人胃上皮细胞)、PBS缓冲液、PI工作液、RNA提取、逆转录PCR及IHC染色相关试剂由本室保存;Lipofectamine 2000为美国Invitrogen公司产品;双抗、胎牛血清、胰酶(0.25%,含EDTA)为美国HyClone公司产品;新霉素类似物(G418)为中国北京Solarbio公司产品;培养板(6、24、48、96孔)为美国康宁公司产品;CCK8试剂盒为中国上海Beyotime公司产品;DMEM高糖及RPMI 1640基础培养基分别为中国北京Biosharp和美国Gibco产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 GES-1细胞(人胃上皮细胞)从冰箱(-80℃)取出后迅速放入恒温水浴箱(37℃)中融化,离心并吸除冻存液,加入一定体积的完全培养基(10%FBS,1%双抗的RPMI 1640培养基)制成均匀分布的细胞悬液,将细胞悬液加入培养瓶轻轻摇匀,放到无菌、加湿、恒温培养箱(37℃,5%CO₂)中进行常规培养,平均每1~3d更换1次培养基;当细胞密度适宜(90%以上),用胰酶(0.25%,含EDTA)消化细胞,若镜下细胞变圆,吸除消化液,加一定体积的完全培养基,使细胞分布均匀并无细胞聚集成团,转种至24孔板,过夜培养。

1.2.2 细胞转染 上述细胞生长至转染所需密度(约50%~70%),去除废培养液,用PBS缓慢清洗细胞至背景洁净,弃PBS,加入一定体积(0.25mL)不含FBS和抗生素的高糖DMEM;按照脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000)说明书并结合自身细胞情况调整各物质加入量后实施细胞转染,将3组细胞(即转染pIRES-EGFP/BARF1组、pIRES-EGFP空载体组及未转染组)做上标记,轻轻摇晃24孔板,使质粒/脂质体混合液于各孔中均匀分布,常规培养;6h后补充高糖DMEM(含20%血清)培养基0.25mL,相同环境下继续培养;转染24h后,再补充0.35mL普通完全培养基(10%FBS,1%双抗的高糖DMEM培养基),继续培养;转染48h后将培养板密封放到荧光倒置显微镜(Nikon ECLIPSE Ti-U)下进行细胞转染情况的观察。

1.2.3 确定G418筛选浓度 在24孔板中选10个孔加入等量的GES-1细胞,常规培养细胞至70%~80%汇合度时,将细胞培养液更换为含不同浓度梯度G418的RPMI 1640培养基(G418浓度分别为0.1,0.3,0.5,0.8,1.0 μg/μL),将对应孔做好标记,

观察 2 周内细胞生长及死亡情况,筛选出最适宜的 G418 筛选浓度。

1.2.4 G418 抗性单细胞克隆筛选 当转染后的细胞密度适宜(约 70%~80%)时,将细胞培养基更换为上述筛选培养基,进行细胞筛选,每 3~5 d 更换 1 次培养液,直至筛选出抗性单克隆,挑出单克隆根据细胞汇合度陆续转至 96 孔板、48 孔板扩大培养。

1.2.5 RT PCR 鉴定

1.2.5.1 提取细胞 RNA 收集 3 组细胞(生长状态优良、数量适宜)并用 PBS 洗涤、重悬,低速离心(1 000 r/m,3~5 min),弃上清;用无菌镊子夹取 1.5 mL 无酶 EP 管(需经 0.1% DEPC 水处理并湿热灭菌),加入 1 mL Trizol Rengen,来回吹打细胞,使得细胞得到充分裂解从而释放出 RNA;用镊子小心盖好 EP 管盖,倒置、翻转混匀,静置(室温,5 min);加入氯仿(0.2 mL),用力颠倒混匀,静置(室温,5 min);4 ℃,12 000 r/m 离心 10 min;将水相单独吸出(体积小于 750 μL),与异丙醇按比例(1:1)混合均匀而后静置;再次相同条件离心 15 min,弃上清;加 1 mL 冰乙醇(用无菌 DEPC 水将无水乙醇稀释至浓度为 75%)洗涤沉淀及管壁,再次相同条件离心 10 min,吸出上清,室温干燥,未完全干燥时在含有 RNA 产物的 EP 管中加入一定体积(60 μL)的无菌 DEPC 水,将 RNA 产物进行电泳检测,放到冰箱(-80 ℃)保存备用。

1.2.5.2 逆转录 PCR(RT-PCR) 待上述提取的 RNA 验证无误后,进行逆转录反应。该反应为 20 μL 反应体系:先加入 9 μL RNase free H₂O(无核酸酶水),再取 3 μL RNA 提取产物作为模板,1 μL dNTP Mix,1 μL Oligo(dT)₁₈ primer,在 PCR 反应仪上 70 ℃ 育 5 min,取出后放到冰上。在上述反应管中加入 4 μL 5×first-strand buffer 缓冲液,1 μL M-MuLV TUREscript H-RTase(逆转录酶),1 μL RNase inhibitor,42 ℃ 反应 50 min,65 ℃ 反应 15 min,以获取 cDNA。

1.2.5.3 BARF1 的 PCR 检测 该反应为 20 μL 反应体系(需冰上操作):10 μL 2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR Mix,上下游检测引物各 0.5 μL (10 μM),加入不足 1 μg 的 cDNA 模板,补足 ddH₂O 至反应体系达到 20 μL。反应条件为:1 个循环:95 ℃ 5 min(预变性);35 个循环:94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;1 个循环:72 ℃ 5 min;4 ℃ 保持;PCR 产物在不含 Gold View(核酸染料)的 1% 琼脂糖凝胶电泳,并用成像仪观察和分析电泳图。

1.3 BARF1 基因表达效果分析

1.3.1 细胞增殖活力分析

1.3.1.1 细胞计数法 在各组细胞几乎覆盖到整个培养板时,收集 3 组细胞,取几乎相同数量的细胞接种到 24 孔板(本实验每孔加入 300 μL 细胞悬液,约 900 个细胞),每组接种 6 个平行孔;每次分别收集 3 组细胞,并将细胞均匀、无聚集地分布于培养基中,吸取细胞悬液(10 μL),采用改良的牛鲍式(Neubauer)计数板计数培养 0~6 d 各组细胞数量,计算出 3 次计数结果的平均值以及标准差。应用 Microsoft Excel 工作表来绘制各组细胞的生长曲线,横坐标选用培养时间(Time,以“d”为单位),纵坐标选用细胞数量($\times 10^3$ 个/mL)。

1.3.1.2 CCK8 法 将 3 组细胞(处于对数生长期)接种到 96 孔板(100 μL 细胞悬液,约 300 个细胞),分别设立 6 个平行复孔,按不同分组标记清晰;设置只加 CCK8 溶液和 RPMI 1640 培养基的空白对照组;常规培养,根据细胞自身状态和培养基情况适当调整更换培养基的频率(约 1~3 d);分别将各个分组中的细胞培养 0~6 d 后,每天在相同时间点将细胞培养板取出并滴加少量 CCK-8 溶液(10 μL),培养 1 h,用酶标仪测定并记录 450 nm 处的吸光度值(A450)。利用 Microsoft Excel 工作表来制作细胞的生长曲线,其中,横坐标选用培养时间(Time,以“d”为单位),纵坐标选用吸光度(OD 值)。

1.3.2 细胞迁移能力分析 细胞划痕实验:将一定量的细胞悬液(约 5×10^5 个细胞)加入到培养板(24 孔),培养 24 h,次日选取适当的观察点,做好标记,用 0.2 mL 无菌枪头比着直尺划线,缓慢加 PBS 将细胞背景洗净,加入低血清培养基(含 1% FBS)常规培养,分别于划线后 0、24、48 h 取相同位置拍照。使用图像处理软件(Image Pro Plus 6.0)进行灰度、对比度等指数的调整,获得迁移面积与高度的值,计算 3 次实验所得细胞迁移距离的平均值和标准差。根据所得数据用 Microsoft Excel 工作表制作柱形图,以培养时间作为横坐标(Times,以“h”为单位),纵坐标为迁移率(用小数表示)。

1.3.3 细胞周期检测 流式细胞术:收集 3 组细胞,用预冷的 PBS 溶液洗涤并调整细胞悬液至所需浓度(1×10^6 个/mL);缓慢加入乙醇溶液(调整终浓度至 70%),4 ℃ 过夜处理;第 2 d,离心(2 000 g/min)并将上清液吸出,加入预冷 PBS 并离心以洗除固定液,按照一定比例(9:1)配制 PI 工作液与 RNaseA 的混合液(二者混合后总体积为 500 μL),黑暗、无光环境中处理(4 ℃,30 min),将细胞充分混合均匀并进行过滤(300 目尼龙),采用流式细胞

仪对细胞周期的分布情况进行上机检测。

1.3.4 细胞周期蛋白 Cyclin D1 表达情况的评估

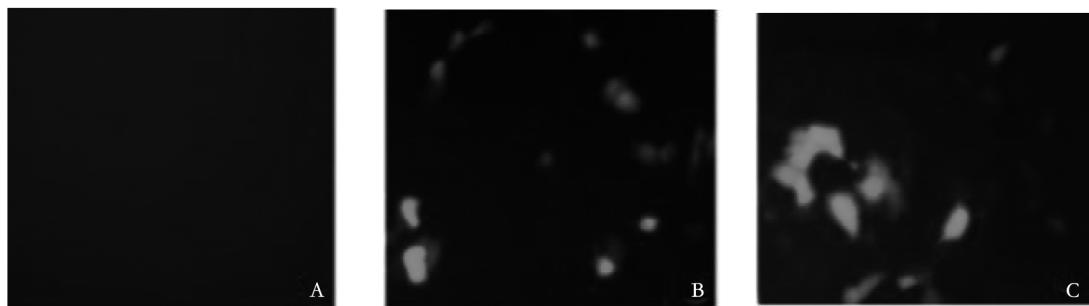
IHC 染色法: 收集 3 组细胞(生长状态良好、数量适宜), 加入一定体积的完全培养基使细胞沉淀呈现均匀分布的单个悬浮状态, 并按照实验需要对细胞浓度进行调整(约 1×10^4 个细胞/mL)。将无菌盖玻片固定 6 孔板底, 将 3 组细胞分别接种于各孔, 使细胞覆盖盖玻片, 终止培养; 用 PBS 清洗(2~3 次); 4 °C 环境下, 用 4% 多聚甲醛(Paraformaldehyde Fix Solution, PFA) 处理 20 min; 用过氧化氢(H_2O_2 , 3%) 处理 5 min; 加入一定体积的 TritonX-100(0.2%, 或者吐温 20) 通透剂处理 20 min; 加入 BSA(牛血清白蛋白, 5%) 封闭 20 min; 分别加入鼠源性一抗和阴性对照(PBS), 在 4 °C 环境下, 于湿盒中过夜孵育; 次日, 将盖玻片从 4 °C 拿到室温环境下平衡 20 min; 加入试剂 1(山羊抗鼠 IgG 抗体—HRP 多聚体 1), 孵育(25 °C, 2 h); 再加入试剂 2(山羊抗鼠 IgG 抗体—HRP 多聚体 2), 室温孵育 20 min; 滴

加 DAB 显色液, 室温暗处理 10 min(以上各步骤之间需用 PBS 或 PBST 洗涤并根据实际情况调整洗涤时间和次数); 自来水缓水流冲洗, 苏木素复染细胞核, 用体积分数 70%、80%、80%、90%、95%、100% 的乙醇脱水; 二甲苯处理 2×1 min, 封片, 镜下观察。

1.4 统计分析 应用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 GES-1 细胞质粒转染效果分析 转染后第 3 d, 应用 Nikon ECLIPSE Ti-U 荧光倒置显微镜观察稳定转染 BARF1 组及稳定转染空载体组 GES-1 的转染效果, 并以未转染组作为空白对照, 结果显示稳定转染 BARF1 组和空载体组 GES-1 细胞都存在绿色荧光, 如图 1 所示。



A:未转染组;B:稳定转染空载体组;C:稳定转染 BARF1 组

图 1 荧光显微镜观察转染后第 3 d 各组细胞绿色荧光蛋白表达情况(200×)

Fig.1 Fluorescence microscope to observe the expression of green fluorescent protein in each group on the third day after transfection (200×)

2.2 G418 耐药性单克隆细胞的获得 通过建立不同浓度梯度的 G418 选择性培养基确定合适的筛选浓度。用筛选培养基(300 μ g/mL G418, 10% 血清的 RPMI 1640 培养基) 大约筛选 2 周后, 转染 BARF1 组及转染空载体组中可稳定表达外源基因的细胞得以存活, 从而获得可耐受 G418 的阳性单细胞克隆, 每种转染细胞分别挑出 3 个单克隆陆续转移至 96 孔板和 48 孔板扩大培养, 获得大量可稳定表达外源基因(空载体和重组质粒)的 GES-1 细胞。

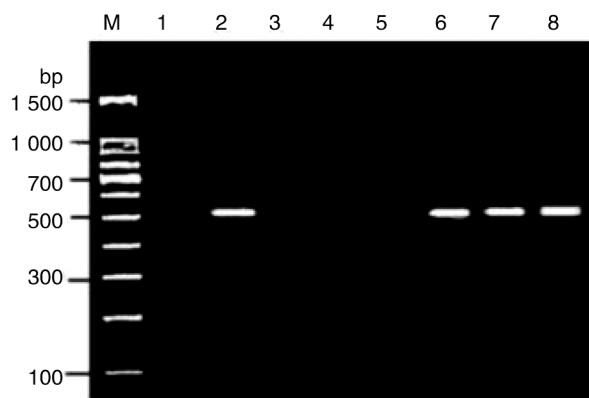
2.3 BARF1 基因表达情况的鉴定 从上述获得的耐 G418 单克隆细胞(包括稳定转染 BARF1 组及稳

定转染空载体组 GES-1 细胞) 中提取 RNA, 经逆转录, 并将其产物作为模板进行 PCR 扩增, 获得的产物大小为 524 bp。分别以 B95-8 cDNA 和 GES-1 的 cDNA PCR 产物作为阳性和阴性对照, 结果如图 2 所示。

2.4 细胞增殖能力测定

2.4.1 细胞计数法 通过细胞计数评估对 GES-1 细胞增殖能力的影响, 结果显示外源基因 BARF1 与空载体组和未转染组相对比, 稳定转染 BARF1 组 GES-1 细胞增殖能力显著提高, 结果如图 3 所示。

2.4.2 CCK8 法 为进一步验证 BARF1 基因是否



M:100 bp Ladder;1 为阴性对照,2 为阳性对照,3—5 为稳定转染空载体组 cDNA 模板 PCR 产物,6—8 为稳定转染 BARF1 组 GES-1 cDNA 模板 PCR 产物

图 2 RT-PCR 鉴定转染各组细胞中 BARF1 的表达

Fig.2 Expression of BARF1 in transfected cells was identified by RT-PCR

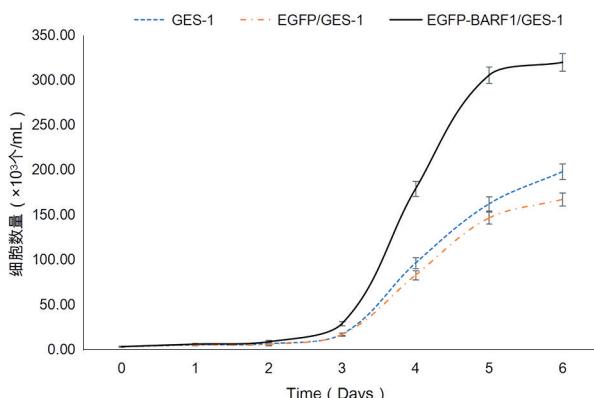


图 3 细胞计数法测定各组细胞增殖能力

Fig.3 Cell proliferation ability of each group was determined by cell counting method

对细胞增殖能力产生正向促进作用,采用 CCK8 法对各组细胞进行处理并用酶标仪进行检测分析;根据各组细胞经处理后所得到的 450 nm 处的吸光度值,作出如下图所示的生长曲线(图 4),经过分析可知,CCK8 法与细胞计数法所得到的结果相呼应,即稳定转染 BARF1 组的 GES-1 细胞增殖能力要明显高于空载体组和未转染组。

2.5 IHC 法检测细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达状况 显微镜下观察 3 组细胞 IHC 法染色结果发现:未转染组、稳定转染空载体组染色结果均为阴性,经苏木素复染后呈现蓝色,未检测到 Cyclin D1 的表达;而稳定转染 BARF1 组细胞核中呈现明显的棕褐色,结果显示为阳性,表明转染 BARF1 后人胃上皮细胞 GES-1 中 Cyclin D1 表达,结果如图 5 所示。

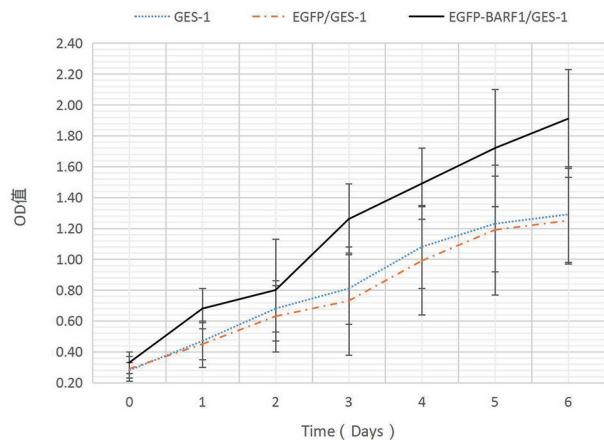
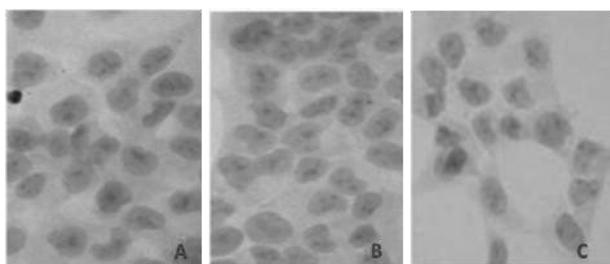


图 4 CCK8 法检测细胞增殖能力

Fig.4 Ability of cell proliferation was detected by CCK8 method



A:未转染 GES-1 组;B:稳定转染空载体组;C:稳定转染 BARF1 组

图 5 IHC 法细胞周期蛋白 Cyclin D1 的检测(400×)

Fig.5 Cyclin D1 was detected by IHC method (400×)

2.6 划痕实验评估各组细胞划痕愈合能力 评估及观测各组细胞迁移能力的差异,结果显示,稳定转染 BARF1 组 GES-1 细胞、稳定转染空载体组 GES-1 细胞的 24 h 划痕愈合率分别为(0.38 ± 0.04)和(0.26 ± 0.02),48 h 迁移效率分别为(0.70 ± 0.02)和(0.58 ± 0.02),经统计学分析可知,稳定转染 BARF1 组 GES-1 细胞迁移效率高于空载体组,结果如图 6 所示。

2.7 流式细胞术检测细胞周期分布情况 为探讨 BARF1 表达与细胞周期分布情况是否存在明显相关性,采用流式细胞仪对各组细胞周期分布情况进行检测。结果显示,未转染组 GES-1 细胞各分期所占比例分别为 G1 期 61.98%、G2 期 13.87% 及 S 期 24.15%;稳定转染空载体组 GES-1 细胞 G1 期、G2 期及 S 期所占比例分别为 68.59%、6.89%、24.52%;而可稳定表达外源基因 BARF1 组的 GES-1 细胞周期分布为: G1 期 55.68%、G2 期 6.22%,S 期 38.10%;以上研究结果表明,与空载体组和未转染组相比,稳定转染 BARF1 组细胞 S 期

明显延长。结果如图 7 所示。

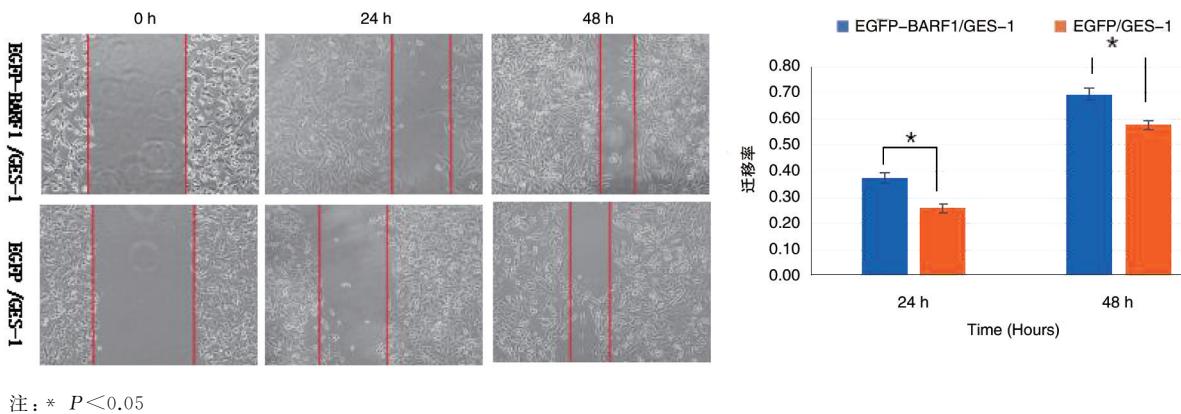


图 6 各组细胞迁移能力检测($100\times$)

Fig.6 Detection of cell migration ability in each group ($100\times$)

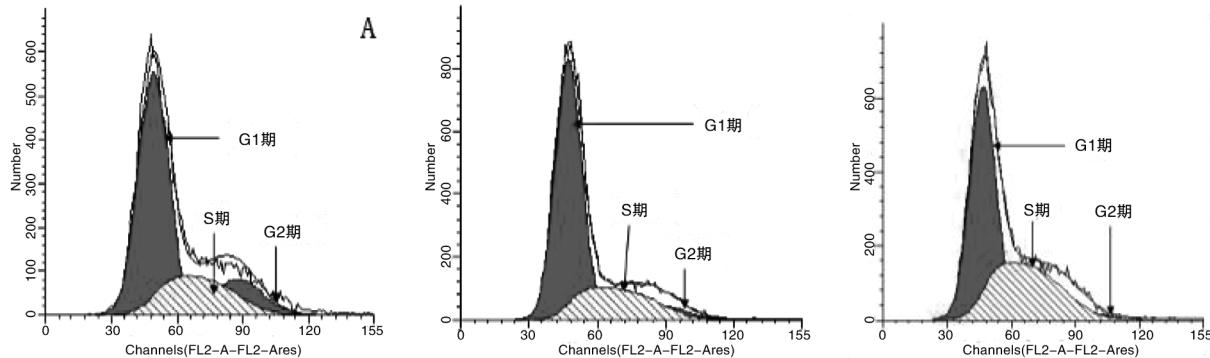


图 7 流式细胞术检测细胞周期分布

Fig.7 Cell cycle distribution was detected by flow cytometry

3 讨 论

胃癌是多种因素共同作用引发的消化系统恶性肿瘤, 众所周知, 在我国常见的几种恶性肿瘤中 GC 表现出发病率高、预后差、存活率低等特点, 被认为是对人体造成严重威胁的恶性肿瘤之一^[21]; EBV 也称人疱疹病毒 4 型 (Human Herpesvirus 4, HHV4), 在人群中多数是以潜伏感染的方式威胁着人们的健康^[6]。据有关报道指出, 这种“致癌病毒”正在以一种不为人知的方式推动着胃癌的发生和发展^[18]; BARF1 存在于右侧 EBV 基因组的 BamHI-A 转录框架中, 所编码的蛋白大小约是 31-33 kDa, 通过自分泌/旁分泌的方式刺激细胞周期的启动, 并促进不同上皮细胞发生恶性改变^[22], 可能对 EB-VaGC 的出现和发展有关键的促进作用。即使人们已经把关注的焦点逐渐投向了 BARF1 刺激 GC 发生上, 但其究竟如何诱导 GC 发生发展仍然需要更详细的解释, 其中所涉及的诱导机制仍然需要大量

的实验加以考证^[23]。GES-1 细胞系是胎儿胃粘膜细胞永生化后获得的细胞系, 拥有可以在体外进行稳定转化和传代的良好特性, 本文通过体外构建稳定表达 BARF1 基因的 GES-1 细胞模型, 探讨了 BARF1 基因对胃上皮细胞 GES-1 的影响。

本文通过细胞计数和 CCK8 法验证 BARF1 对 GES-1 细胞增殖能力的影响, 结果显示, 稳定表达外源基因 BARF1 基因的 GES-1 细胞的增殖速度快, 与空载组和未转染组有着显著差异, 则 BARF1 基因会对胃上皮细胞 GES-1 的增殖产生促进作用; 为评估 BARF1 基因是否会对 Cyclin D1 蛋白的表达产生影响, 通过 IHC 染色法对三组细胞的细胞周期蛋白 Cyclin D1 进行检测, 发现只有稳定表达 BARF1 组 Cyclin D1 表达阳性, 而其余两组未见该蛋白的表达, 这可能与 BARF1 上调 NF- κ B 和 Cyclin-D1 对细胞增殖发挥促进作用的机制相关^[24]; 之所以人体会出现各种癌变信号, 一个十分重要的条

件就是相关细胞表现出异常强大的迁移和侵袭能力^[25],本文通过划痕实验比较、分析稳定转染 BARF1 组和空载体组 GES-1 的迁移能力,两组间细胞迁移能力存在明显的差别,即稳定转染 BARF1 组细胞的迁移效率更高,该结果进一步验证了 BARF1 基因的致癌特性;细胞周期分析结果显示,稳定转染外源基因 BARF1 组的人胃上皮细胞 S 期明显延长,表明 BARF1 基因具有促细胞有丝分裂的生物学特性,这与 Sall A、Sakka E 等^[22,26]的研究结果相一致。

综上所述,BARF1 基因的表达可促进 GES-1 细胞增殖、迁移及分裂,最终诱导正常胃上皮细胞发生恶性改变,因此,BARF1 基因可能在 EBVaGC 的发生发展中发挥重要作用。

利益冲突:无

引用本文格式: 杨佳宁,李娜,董鸿铭,等. EB 病毒编码的 BARF1 对 GES-1 细胞的影响[J]. 中国人兽共患病学报,2021,37(12):1071-1077,1083. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.162

参考文献:

- [1] Polakovicova I, Jerez S, Wichmann IA, et al. Role of microRNAs and exosomes in *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus associated gastric cancers[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 636. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00636
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660
- [3] Verma R, Sharma PC. Next generation sequencing-based emerging trends in molecular biology of gastric cancer[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(2): 207-225.
- [4] Cheng XJ, Lin JC, Tu SP. Etiology and prevention of gastric cancer[J]. Gastrointest Tumor, 2016, 3(1): 25-36. DOI: 10.1159/000443995
- [5] Camargo MC, Koriyama C, Matsuo K, et al. Case-case comparison of smoking and alcohol risk associations with Epstein-Barr virus-positive gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2014, 134 (4): 948-953. DOI: 10.1002/ijc.28402
- [6] Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, et al. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2018, 66: 15-22. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.03.006
- [7] Li J, Liu W, Che K, et al. The methylation status and expression of Epstein-Barr virus early genes BARF1 and BHRF1 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas[J]. Gastroenterol Res Pract, 2017, 2017: 3804146. DOI: 10.1155/2017/3804146
- [8] Yin H, Qu J, Peng Q, et al. Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis[J]. Med Microbiol Immunol, 2019, 208(5): 573-583. DOI: 10.1007/s00430-018-0570-1
- [9] Stanland L J, Luftig M A. The Role of EBV-Induced hypermethylation in gastric cancer tumorigenesis[J]. Viruses, 2020, 12 (11). DOI: 10.3390/v12111222
- [10] 张文杰,唐世孝,王健. EB 病毒、幽门螺杆菌 *cagA* 和 *vacA* 基因型感染与胃癌的关系研究[J]. 西南军医, 2009, 11(02): 188-192.
- [11] Nishikawa J, Iizasa H, Yoshiyama H, et al. Clinical importance of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(6). DOI: 10.3390/cancers10060167
- [12] Palrasu M, Zaika E, El-Rifai W, et al. Role of bacterial and viral pathogens in gastric carcinogenesis[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(8). DOI: 10.3390/cancers13081878
- [13] Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer [J]. J Clin Invest, 2007, 117 (1): 60-69. DOI: 10.1172/JCI30111
- [14] Lin Z, Swan K, Zhang X, et al. Secreted oral epithelial cell membrane vesicles induce Epstein-Barr virus reactivation in latently infected B cells[J]. J Virol, 2016, 90 (7): 3469-79. DOI: 10.1128/JVI.02830-15
- [15] Farrell PJ. Epstein-Barr virus and cancer[J]. Annual review of pathology: mechanisms of disease, 2019, 14 (1): 29-53. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023
- [16] Hoebe E, Wille C, Hagemeier S, et al. Epstein-Barr virus gene BARF1 expression is regulated by the epithelial differentiation factor deltaNp63alpha in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(3). DOI: 10.3390/cancers10030076
- [17] 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. DOI: 10.1002/jmv.20327
- [18] Lo AK, Dawson CW, Lung HL, et al. The therapeutic potential of targeting BARF1 in EBV-associated malignancies[J]. Cancers (Basel), 2020, 12 (7). DOI: 10.3390/cancers12071940
- [19] 杜海军,周玲,曾毅. EB 病毒中早期表达的癌基因——中早期表达的癌基因[J]. 病毒学分册, 2003, (6): 172-174.
- [20] Wang Y, Luo B, Yan LP, et al. Relationship between Epstein-Barr virus-encoded proteins with cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins in gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(21): 3234-3239. DOI: 10.3748/wjg.v11.i21.3234
- [21] Polakovicova I, Jerez S, Wichmann IA, et al. Role of microRNAs and exosomes in *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus associated gastric cancers[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 636. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00636
- [22] Sall A, Caserta S, Jolicoeur P, et al. Mitogenic activity of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 protein[J]. Oncogene, 2004, 23(28): 4938-4944. DOI: 10.1038/sj.onc.1207607