



EBV编码miRNAs在病毒感染和肿瘤发生中的 功能和意义*

彭 秋¹⁾ 刘良专²⁾ 甘润良^{1)**}

(¹⁾ 南华大学病理学教研室/肿瘤研究所, 衡阳 421001; (²⁾ 南华大学医学研究实验中心, 衡阳 421001)

摘要 EB病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 是一种 172 kb 大小的线性双链 DNA 病毒, 与鼻咽癌、淋巴瘤、胃癌等恶性肿瘤的发生密切相关. EBV 编码的微小 RNAs (miRNAs) 可以调节病毒和宿主细胞基因的表达, 并且在癌症发生发展中起着多种作用. 本文综述了 EBV 编码的 miRNAs (EBV-encoded miRNA, EBV miRNAs) 在病毒感染和肿瘤发生、侵袭转移、抗凋亡、信号通路等方面的生物学功能, 以及对于 EBV 相关肿瘤诊断标志物的潜在意义. EB 病毒编码的 miRNAs 也可能成为进一步研究 EBV 相关肿瘤治疗的一个候选靶点.

关键词 EB病毒 (EBV), 肿瘤, 微小RNA (miRNAs)

中图分类号 R36

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0090

EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 属 γ -疱疹病毒亚科成员. 在正常人群中 EBV 感染非常普遍, 95% 以上的成年人检测血清 EBV 抗体阳性^[1]. EBV 原发感染多发生于幼年时期, 可长期潜伏感染于 B 淋巴细胞中. 在病毒潜伏感染阶段, 病毒蛋白抗原表达很少, 致使宿主免疫细胞无法识别感染细胞. 但在某些诱导因子的作用下, 潜伏感染的 EBV 可被再次激活, 致使宿主细胞异常增殖或转化, 在某些个体可能导致与 EBV 相关肿瘤的发生, 如鼻咽癌、淋巴瘤、胃癌等.

EBV 感染宿主细胞后存在以下 4 种可能的结局. a. 潜伏感染. EBV 感染 B 细胞后, 多数细胞中的病毒基因组处于潜伏状态, EBV 基因组以共价闭合环状附加体 (episome) 形式存在于细胞核内, 随细胞分裂而复制并分配到子代细胞中, 此时病毒只有潜伏期的基因表达. b. 裂解性感染. EBV 在口咽上皮细胞和 B 淋巴细胞中, 可表现为裂解性感染. 此时, 病毒基因组 DNA 由环形变为线性, 在细胞内自主复制, 产生新的病毒颗粒, 最终裂解宿主细胞, 病毒颗粒释放, 再次感染其他细胞. c. 缺陷型感染. 指病毒 DNA 部分缺失的 EBV 株所致的感染. 如 Raji 病毒株缺失 EBNA3C 基因和 BALF2 基

因, 使 Raji 株在裂解感染时不表达晚期基因, 不能形成病毒颗粒, 病毒依赖细胞间相互接触而传染. P3HR-1 病毒株缺失 IR2 区、U2 区、部分 IR1 区和 U3 区 (EBNA-LP、EBNA2 和 BHLF1 基因位于其中). P3HR-1 株能进入裂解性感染并释放病毒颗粒但不能转化正常淋巴细胞. P3HR-1 病毒株在传代中可以产生更大范围的 DNA 缺失, 此时病毒依赖细胞间相互接触而传染. d. 恶性转化. EBV 表达多种与转化有关的基因产物 (LMP-1、EBNA-2、非编码 RNA 等), 诱导人类 B 淋巴细胞、上皮细胞转化和发生肿瘤.

EBV 是第一个被发现可以编码微小 RNA (miRNAs) 的病毒. Pfeiffer 等^[2] 在感染 EBV 的 Burkitt's 淋巴瘤细胞系中发现, 病毒编码的 5 个 miRNAs 分别位于 BamH I 片段右可读框 1 (BHRF1) 区域和 BamH I A 片段右向转录产物 (BART) 区域, BHRF1 包括 miR-BHRF1-1、miR-BHRF1-2、miR-BHRF1-3, BART 包括 miR-BART1

* 国家自然科学基金面上项目 (81372134, 81641012) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 15200561081, E-mail: ganrunliang@163.com

收稿日期: 2019-04-23, 接受日期: 2019-07-02

簇和 miR-BART2 簇. 现在根据 miRNAs 数据库 (<http://www.mirbase.org/>), EBV 编码 25 个前体 miRNAs, 切割产生 44 个成熟的 miRNAs. BHRF1 转录 3 个前体 miRNAs, 经切割产生 4 个成熟 miRNAs (miR-BHRF1-1、miR-BHRF1-2-3p、miR-BHRF1-2-5p、miR-BHRF1-3) [3]. ebv-miR-BHRF1-1 位于启动子区域、ebv-miR-BHRF1-2 和 ebv-miR-BHRF1-3 位于 BHRF1 的 3' 末端非翻译区 (3'-untranslational region, 3'UTR) [4]. BART 转录 22 个前体 miRNAs, 加工产生 40 个成熟的 miRNAs

(图 1) [3]. 其中 8 个前体 miRNAs (ebv-mir-BART1、-BART3-6 和 -BART15-17) 位于 BART1 簇, 其他 13 个前体 miRNAs (ebv-mir-BART7-14、-BART18-22) 位于 BART2 簇 [5]. BHRF1 基因簇在 EBV 潜伏感染 III 期的 B 细胞中高表达, 在 EBV 潜伏感染 I、II 期中几乎检测不到 [2], BART miRNAs 在所有 EBV 阳性细胞系中均有表达, 包括 Burkitt's 淋巴瘤 (BL)、EBV 转化淋巴细胞 (LCL) 和鼻咽癌 [6].

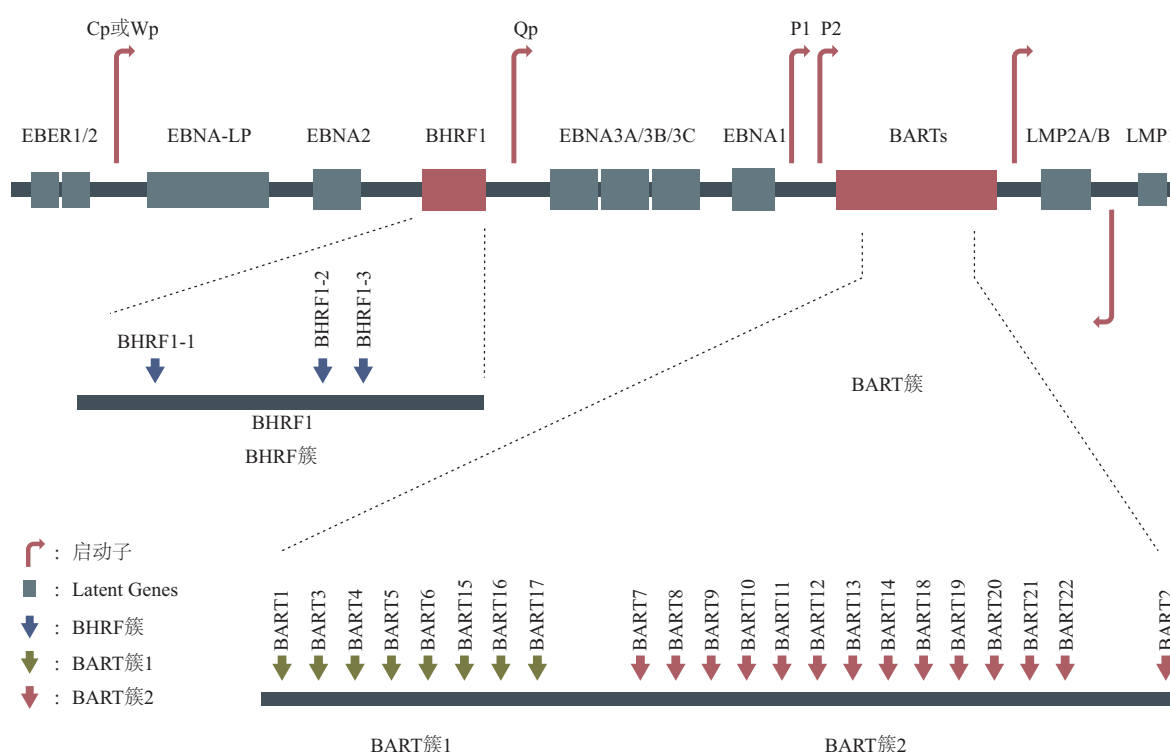


Fig. 1 Genomic location of miRNAs encoded by EBV

图1 EBV编码miRNAs的基因组定位

BHRF簇和BART簇1、簇2区域在图的底部展开. Cp: C启动子; P1: 启动子1; P2: 启动子2; Qp: Q启动子; Wp: W启动子.

EBV 转录产生的 miRNAs 通过完全或不完全的碱基配对, 与病毒基因或宿主细胞内靶基因 mRNA 3'-UTR 的保守区相互作用, 诱导靶基因 mRNA 的降解或翻译抑制. 近些年研究发现, EBV miRNAs 参与病毒的潜伏感染, 而且还可以通过调节多种信号分子 (细胞因子、转录因子、促凋亡或抗凋亡基因等) 的表达参与肿瘤发生发展过程的各个生物学方面, 包括肿瘤细胞的生长增殖、凋亡、免疫应答、侵袭转移、信号转导通路等.

1 EBV miRNAs在病毒感染中的作用

EBV 在体外可以使 B 淋巴细胞转化为永生化的淋巴母细胞, 然而在人体内 EBV 通常在淋巴细胞中维持潜伏感染, 在口咽上皮细胞内发生裂解性感染. 在病毒潜伏感染细胞及 EBV 相关肿瘤组织中, EBV 编码的蛋白质具有免疫抗原性, 其表达水平很受限制. 而不具有免疫抗原性的 EBV miRNAs 却更容易大量表达. EBV miRNAs 可通过

靶向病毒自身基因和细胞内基因, 为EBV逃避宿主免疫监视、形成EBV持续感染创造有利条件。

1.1 EBV miRNAs对病毒自身基因表达的调节

EBV miRNAs可以通过靶向病毒裂解复制相关的基因, 抑制病毒裂解感染。EBV裂解基因调控因子BZLF1和BRLF1的表达可启动EBV复制, 形成新的EBV颗粒集落, 然后在细胞裂解后释放, 使EBV从潜伏感染期进入裂解期。有研究发现EBV miRNAs靶向病毒裂解基因和与复制相关的早期基因, 抑制病毒裂解复制, 致使病毒可长期潜伏感染于宿主细胞。例如在EBV相关胃癌研究中, miR-BART20-5p可下调BZLF1和BRLF1基因来抑制病毒裂解周期的发生, 并维持EBV潜伏感染^[7]。MAP3K2是MAPK通路中的关键分子, 其下游信号通路中的转录因子(CREB、ATF1-2和c-JUN)可与BZLF1的启动子区域结合并促进BZLF1表达。Qiu等^[8]研究证实, miR-BART18-5p可以靶向B淋巴细胞中MAP3K2的3'-UTR, 抑制MAP3K2的表达, 从而下调BZLF1, 致使病毒在早期的裂解复制受到抑制。Iizasa等^[9]在鼻咽癌C666-1细胞系中利用反义寡核苷酸抑制miR-BART6-5p的表达, 发现Dicer的表达增强, 并且Zta(BZLF1编码的蛋白质)、Rta(BRLF1编码的蛋白质)、EBNA 2和LMP1的mRNA水平也升高。由于Dicer介导pre-miRNA到成熟miRNA的剪切过程, 因此miR-BART6-5p通过靶向结合Dicer的方式, 调节与病毒潜伏相关基因的表达, 介导病毒I/II型潜伏感染向III型潜伏感染转化^[9]。EBV miRNAs还可以直接靶向与病毒复制有关的早期基因, 如miR-BART2-5p靶向病毒DNA聚合酶BALF5, 抑制病毒子代的产生, 影响病毒的裂解感染^[10]。

EBV miRNAs还可以靶向病毒抗原相关基因, 维持病毒潜伏感染。EBV长期潜伏感染于宿主细胞中, 除了抑制自身裂解感染, 还可以通过降低病毒蛋白质的抗原性而逃逸宿主的免疫应答。EBV编码的包膜蛋白有LMP1、LMP2A等, 它们可作为抗原触发宿主细胞免疫应答。EBV miRNAs可通过对病毒膜蛋白的调控进行免疫逃逸。一些EBV miRNAs(miR-BART3、miR-BART5、miR-BART5-5p、miR-BART19-5p、miR-BART20)靶向LMP1基因的3'-UTR减少LMP1蛋白的表达^[11-12]。LMP2A蛋白是EBV编码的另一种较强免疫原性的病毒抗原, Lung等^[13]在鼻咽癌中发现miR-BART22-3p可以直接靶向LMP2A基因的3'-

UTR, 减少LMP2A蛋白的表达, 因此病毒感染的细胞可逃避宿主的免疫监视, 继而维持病毒的潜伏感染。

1.2 EBV miRNAs对宿主基因表达的调节

在机体通过免疫系统设法清除病毒的同时, 病毒也会通过多种方式逃避机体免疫防护机制的作用并在体内长期存在。例如RIG-I样受体家族(包括RIG-I、MDA5和LGP2)是模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)中的重要成员, 能够识别细胞质中的病毒RNA或复制转录本。有研究表明, ebv-miR-BART6-3p可以靶向RIG-I mRNA的3'UTR, 从而干扰RIG-I样受体信号介导的IFN- β 产生, 抑制EBV触发的宿主免疫应答, 维持EBV长期的潜伏感染^[14]。NK细胞的活化性受体NKG2D通过与病毒感染细胞或肿瘤细胞诱导产生的配体MICB(major histocompatibility complex class I chain-related gene B)结合激活肿瘤的免疫监视。Nachmani等^[15]发现, miR-BART2-5p靶向MICB, 下调MICB的表达, 从而降低NK细胞的激活和对病毒感染细胞的免疫识别。趋化因子CXCL11与淋巴细胞表面趋化因子受体CXCR3结合, 使免疫细胞迁移到受感染的位点, 发挥免疫功能。Xia等^[16]对非霍奇金淋巴瘤研究中发现, miR-BHRF1-3靶向趋化因子CXCL11, 通过减少CXCL11的表达而降低宿主细胞的免疫趋化功能, 抑制炎症反应, 从而有利于EBV感染细胞的存活。

2 EBV miRNAs在肿瘤发生中的作用

2.1 EBV miRNAs在细胞凋亡方面的作用

EBV miRNAs通过靶向促凋亡相关基因如PUMA、Bim、Caspase3、Bad等或凋亡相关基因受体TOMM22的表达来抑制细胞凋亡的发生。PUMA(p53 up-regulated modulator of apoptosis, P53上调凋亡调控因子)可促进线粒体释放细胞色素C, 从而发挥促凋亡作用。Choy等^[17]发现在EBV阳性的鼻咽癌细胞中PUMA的表达水平明显低于EBV阴性的鼻咽癌细胞, 随后发现ebv-miR-BART5-5p和miR-BART19-5p可靶向PUMA, 抑制PUMA蛋白的产生, 从而抑制细胞发生凋亡。另一个促凋亡基因Bim(bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim) mRNA的3'-UTR中有多个BARTs miRNAs的结合位点, 其中包括miR-BART1、miR-BART3、miR-BART9、miR-BART11和miR-BART12^[18]。Caspase是细胞凋亡过

程中的核心蛋白酶, 它的激活代表细胞进入不可逆转的凋亡期. Vereide 等^[19]发现 miR-BART1-3p 和 miR-BART16 可抑制促凋亡蛋白 caspase3 的表达, 从而抑制细胞凋亡. 除此之外 caspase3 还是多个 EBV miR-BARTs 的靶点, 如 miR-BART3-3p、miR-BART8-5p、miR-BART13-3p 等^[20]. Bad 通过信号转导通路以及与天冬氨酸特异的 caspase 家族成员相互作用而促进细胞凋亡. 研究发现, miR-BART20-5p 通过抑制 Bad 的表达, 从而抑制细胞发生凋亡^[21]. TOMM22 是促凋亡蛋白 Bax 的受体复合物的一部分, Bax 和 TOMM22 结合后, 导致线粒体膜通透性增加而促进凋亡. Marquitz 等^[18]发现 miR-BART16 靶向并抑制 TOMM22 的表达从而发挥抗凋亡的作用.

EBV 在感染细胞的早、中期, 为保护病毒自身滞留在细胞中, 可编码上述抗凋亡作用的 EBV miRNAs. 但在感染的后期, EBV 为感染邻近细胞, 可转录诱导凋亡的 EBV miRNAs, 致使细胞裂解和子代病毒的释放. 例如 Choi 等^[22]制备了 44 种 BART miRNAs 模拟物, 并将其转染到 AGS 胃腺癌细胞株 (EBV 阴性细胞株) 中. 实验发现与大多数 BART miRNAs 不同, 少数 BART miRNAs 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 其中 miR-BART15-3p 靶向抗凋亡蛋白 BRUCE 的 3'-UTR, 表现出最强的凋亡活性. 在凋亡过程中, 凋亡小体包裹病毒后减少了宿主抗体对病毒的杀伤作用, 所以 miR-BART15-3 可以通过调控抗凋亡蛋白的表达来逃避宿主免疫清除、从而促进子代病毒传播.

2.2 EBV miRNAs 在促进肿瘤发生和侵袭转移中的作用

EBV miRNAs 可以使某些具有抑瘤功能的靶基因表达下调或失活, 从而增强 EBV 感染细胞的生长转化特性和侵袭、转移能力. PRDM1/Blimp1 是 B 细胞向浆细胞分化过程中一个含有 5 个锌指状结构的转录抑制因子, 在小鼠中又名 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1 (B lymphocyte induced maturation protein 1, Blimp1). PRDM1/Blimp1 在侵袭性淋巴瘤包括弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 中是抑瘤基因^[23]. Ma 等^[24]发现 miR-BHRF1-2 与 PRDM1 之间的相互作用与 EBV 相关淋巴瘤的发病机制可能相关, 因为在淋巴母细胞系 (lymphoblastoid cell lines, LCL) 中 miR-BHRF1-2 靶向 PRDM1/Blimp1 mRNA 的 3'-UTR, 致使细胞凋亡受到抑制. Zheng 等^[25]在鼻咽癌和胃癌中发现 miR-BART5-3p

靶向 TP53, 导致细胞周期素依赖性激酶抑制因子 1A (CDKN1A)、BAX 和 FAS 下调, 从而促进肿瘤细胞的生长. N-myc 下游调控基因 1 (N-myc downstream regulated 1, NDRG1) 是维持上皮细胞分化和肿瘤转移抑制的重要因子, 在上皮细胞中高表达. Kanda 等^[26]采用免疫组化方法检测 EBV 阳性鼻咽癌组织中 NDRG1 蛋白表达水平明显低于 EBV 阴性鼻咽癌组织, 随后研究发现不仅 ebv-miR-BART22, 甚至整个 BART miRNA 簇 2 都可协同下调 NDRG1 的表达, Kanda 等认为 BART miRNAs 与体内 EBV 介导的鼻咽上皮癌转移密切相关.

在 EBV 相关肿瘤细胞中, EBV miRNAs 可以通过调节与上皮-间质转化 (EMT) 相关的分子和信号通路, 影响肿瘤细胞的侵袭和转移能力. Hsu 等^[27]发现 ebv-miR-BART9 能直接靶向并抑制上皮型钙黏附素 (E-cadherin) 的表达, 增强鼻咽癌细胞的侵袭转移. MAP3K5 是 p38MAPK 和 JNK 通路上重要的 1 个早期应答基因, 是促进多种肿瘤细胞凋亡的抑癌基因. Chen 等^[28]研究发现 miR-BART22 直接靶向 MAP3K5 的 3'-UTR, 抑制 MAP3K5 的表达, 使相应磷酸化 MAP3K5 蛋白减少, 导致 p38MAPK 通路下游靶基因 MAP2K4 蛋白磷酸化的下调, 并且稳定转染 miR-BART22 后可以提高鼻咽癌细胞株 5-8F 的增殖和侵袭能力. 不过也有报道 EBV miRNAs 的表达与肿瘤转移呈负相关. HE 等^[29]研究发现 miR-BART6-3p 通过靶向长链非编码 RNA (lncRNA) LOC553103, 调节与 EMT 相关分子的表达, 如上调 E-cadherin, 下调 N-cadherin (神经型钙黏附素)、 β -catenin (β -链蛋白)、snail (核转录因子) 和基质金属蛋白酶 MMP2 和 MMP9 表达, 从而抑制鼻咽癌和胃癌细胞的侵袭和迁移.

2.3 EBV miRNAs 通过调控细胞信号转导通路促进肿瘤发生

信号转导通路如 Wnt、NF- κ B、PI3K/Akt 等在肿瘤发生发展中发挥重要作用, EBV miRNAs 作为一类转录后调控因子, 通过对参与信号通路靶基因的调控, 在信号转导通路中发挥影响和作用.

Wnt 蛋白属于分泌型糖蛋白, 可分泌生长因子. Wnt/ β -catenin 通路是经典的 Wnt 信号通路, 该信号通路可传递生长刺激信号, 在生长、发育、代谢以及干细胞维持等方面发挥重要作用. 在很多肿瘤中, Wnt 信号通路处于异常激活状态. 研究发现,

EBV miRNAs可靶向多个Wnt/ β -catenin信号通路中关键拮抗基因, 激活Wnt/ β -catenin信号通路从而促进EBV相关肿瘤的发生. Wong等^[30]采用miRNA微阵列分析检测5例鼻咽癌, 发现12种表达上调的EBV miRNAs (BART1-3p、2-5p、5、6-5p、6-3p、7、8、9、14、17-5p、18-5p、19-3p), 通过实时荧光定量PCR技术对15例鼻咽癌患者以及EBV阳性细胞株C666-1和NP460hTERT验证了这些miRNAs的表达情况. 随后他们采用生物信息学方法对这些miRNAs的靶基因进行分析, 发现靶基因不仅与细胞凋亡 (BCLAF1)、细胞周期 (p21)、DNA损伤应答 (ATM)、无作用蛋白的水解 (UBE3A) 相关, 还与信号转导通路 (Wnt、p53、MAPK、PI3K) 相关. 进一步将EBV miRNAs靶基因与Wnt通路进行关联分析, 发现多个EBV miRNAs的靶基因是抑制Wnt通路的关键因子, 如miR-BART19-3p靶向Wnt抑制因子1 (Wnt inhibitory factor 1, WIF1)、miR-BART19-3、miR-BART7和miR-BART17-5p靶向结肠腺瘤息肉易感基因 (adenomatous polyposis coli, APC)、miR-BART19-3、miR-BART14和miR-BART18-5p靶向Nemo样激酶 (Nemo-like kinase, NLK). NLK可以通过磷酸化TCF/LEF蛋白, 进而抑制 β -catenin/TCF/LEF复合物与转录元件的结合, 在Wnt通路中起负性调节作用.

核转录因子 (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 家族共有5个成员: p65/RelA、RelB、c-Rel、p50/(NF- κ B1) 和p52/(NF- κ B2). 其中p50被称为NF- κ B1, 是p105蛋白经蛋白酶体途径水解产生的. Verhoeven等^[31]发现, NF- κ Bp50在体内、体外都可与BART的启动子结合, 在鼻咽癌细胞系C666-1中可以抑制NF- κ B活性并下调BART的表达水平. LMP1功能类似于激活的TNF受体家族成员CD40, 能够激活多种信号通路, 包括NF- κ B. 由于LMP1蛋白能够强烈刺激宿主的免疫应答, 在EBV感染的鼻咽癌细胞中, EBV转录的miRNAs通过作用于LMP1基因的3'-UTR下调LMP1表达水平来逃避宿主的免疫监视, 比如ebv-miR-BART3、miR-BART5、miR-BART5-5p、miR-BART19-5p、miR-BART20都可以下调LMP1的表达^[11-12]. Verhoeven等^[31]认为在鼻咽癌中EBV编码的潜伏膜蛋白LMP1可以通过激活NF- κ B信号通路上调BART miRNAs的表达水平, 而BART miRNAs也能下调LMP1蛋白的表达, 因此在鼻咽癌细胞中BART

miRNA与LMP1介导的NF- κ B激活之间存在一个负反馈循环.

在大多数恶性肿瘤中, PI3K/Akt信号通路处于激活状态, 造成细胞的大量增殖. 磷酸酶与张力蛋白同源物基因 (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome Ten, PTEN) 可以抑制PI3K/Akt信号通路, 对细胞生长起负性调节的作用. 因此PTEN的突变或缺失与细胞的恶性转化和肿瘤的进展密切相关. Cai等^[32]研究发现, miR-BART1、miR-BART7-3p直接靶向抑癌基因PTEN, 导致PI3K/Akt信号通路持续激活, 促进鼻咽癌细胞的生长和侵袭、转移.

除以上信号通路外, I型IFN信号通路通过诱导直接抗病毒活性和形成适应性免疫反应, 在协调抗病毒防御中发挥着关键作用. CREBBP (CREB-binding protein) 是IFN信号转导中的关键转录共激活因子, miR-BART16可直接靶向CREBBP从而干扰I型IFN信号通路^[33], 影响宿主抗病毒的活性及功能.

2.4 受EBV感染的细胞通过外泌体转运病毒编码的miRNAs

在正常及病理状态下人体内多种细胞均可产生外泌体, 其主要来源于细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体, 经多囊泡体的外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中. EB病毒感染的细胞可以产生外泌体, 而外泌体通过携带宿主细胞特定的细胞活性成分 (信使RNA、细胞miRNAs、蛋白质、DNA等) 和病毒组分物质 (如EB病毒蛋白、miRNAs、mRNA等) 转运到相邻或者更远处的细胞, 参与细胞增殖、免疫应答、肿瘤转移等生物活动^[34].

EBV感染的B细胞分泌的外泌体, 可以被单核细胞来源树突状细胞 (monocyte-derived dendritic cells, MoDC) 内化并传递至未感染的B细胞内, 参与EBV感染、免疫应答和肿瘤的发生发展^[35]. Pegtel等^[35]发现, EBV感染的B细胞分泌的含有ebv-miR-BHRF1-3的外泌体, 可以转运到未感染的B细胞中, 下调干扰素诱导T细胞趋化因子CXCL11/ITAC, 抑制EBV感染后宿主干扰素应答的活化来逃避宿主的免疫反应. Haneklaus等^[36]发现, ebv-miR-BART15可以通过外泌体从感染的B细胞分泌, 从而抑制非感染细胞中的NLRP3炎症小体的活性, 导致炎症细胞因子IL-1 β 、IL-18生成减少. EBV阳性的淋巴瘤细胞分泌的包含EBV miRNAs的外泌体, 可以诱导单核/

巨噬细胞表达CD69、IL-10和TNF,并使其活化成肿瘤相关巨噬细胞,以支持淋巴瘤的生长和发展^[37].上述研究表明,EBV感染细胞通过外泌体传递病毒编码的miRNAs,可以调节细胞的生长增殖、迁移、免疫应答和细胞间通讯,从而有助于炎性肿瘤微环境的形成和肿瘤的发生发展^[34-35, 37].

3 EBV miRNAs在肿瘤诊断和治疗中的潜在作用

EBV相关肿瘤常伴有多种EBV miRNAs的表达变化,分析EBV miRNAs表达谱和检测其表达水平可对肿瘤进行诊断和预后判断.有一些研究者系统检测EBV miRNAs在鼻咽癌、淋巴瘤和胃癌等肿瘤组织与正常组织中的差异表达,筛选出一些具有临床诊断价值的分子靶标.Zhu等^[38]发现在鼻咽癌组织中所有来自BART区的EBV miRNAs都有表达,而来自BHRF1区的EBV miRNAs则没有表达.Cai等^[39]通过qRT-PCR测定了82例鼻咽癌标本,发现ebv-miR-BART1在鼻咽癌中高表达,并与鼻咽癌的病理临床特征相关,因为ebv-miR-BART1-5p和BART1-3p在N2-3期的表达水平明显高于N0-1期,同样在临床Ⅲ-Ⅳ期miR-BART1-5p和BART1-3p的表达水平明显高于临床Ⅰ-Ⅱ早期.进一步研究发现ebv-miR-BART1是通过靶向PTEN,激活PI3K/Akt信号通路,促进鼻咽癌细胞侵袭和转移.Zhang等^[40]通过实时定量PCR技术对89例鼻咽癌患者、28例正常人和18例非鼻咽癌患者的血浆标本检测发现,miR-BART7和miR-BART13在鼻咽癌患者中高表达,并且在鼻咽癌晚期患者中升高更为明显.随后他们对41例鼻咽癌患者放疗前后血清中EBV miRNAs进行检测分析,发现放疗治疗后miR-BART7和miR-BART13均明显降低,提示miR-BART7和miR-BART13可作为鼻咽癌疗效监测的生物标志物.GFPT1是氨基己糖信号通路的关键限速酶,控制着转化生长因子 β 1(TGF β 1)的产生,TGF β 1是一个能在体细胞中触发自我更新和损伤修复机制的细胞因子,有实验发现TGF β 1能保护斑马鱼胚胎免受辐射的致死作用.Gwo等^[41]报道miR-BART7可以通过靶向GFPT1,控制TGF β 1的产生,从而提高NPC对辐射治疗的反应性.

EB病毒miR-BART7、miR-BART22和miR-BART10在弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)中高表达^[42].Kang等^[43]采用实时定量PCR(qPCR)技术检测59例胃癌组

织和39例正常胃黏膜组织中EBV miRNAs的表达水平,发现miR-BART1-5p、miR-BART4-5p和miR-BART20-5p在肿瘤组织中的表达水平高于正常组织.以EBV miRNAs表达水平的中位数作为临界点,通过对临床病理参数分析发现,BART20-5p高表达与患者无复发生存期差相关,提示miR-BART20-5p高表达可预测EBV相关性胃癌患者的无复发生存情况.miR-BART15-3p不仅靶向BRUCE,还可以靶向其他与抗凋亡相关基因TAX1结合蛋白1(Tax1-binding protein 1, TAX1BP1).Choi等^[44]在EBV阴性胃癌AGS细胞株中发现转染ebv-miR-BART15-3p可下调TAX1BP1的mRNA和蛋白质,miR-BART15-3p抑制剂则可以上调AGS细胞TAX1BP1的mRNA和蛋白质表达.将miR-BART15-3p转染到经过5-Fu(抗癌药物,5-fluorouracil)处理过后的AGS细胞,发现AGS凋亡的细胞数增加,结果表明miR-BART15-3p通过下调TAX1BP1可以增加胃癌细胞对5-Fu的化疗敏感性.

综上所述,EBV miRNAs在病毒感染、细胞凋亡、信号转导通路和肿瘤发生发展过程中具有重要作用.有些EBV miRNAs将成为疾病诊断的生物学标记物,也可作为癌症基因治疗的分子靶点.由于靶基因对应的miRNAs和miRNAs对应的靶点可能都不是唯一的,因此目前工作仍是不断发现新的EBV miRNAs及其对应的靶点,从而揭示EBV编码miRNAs的功能和作用机制.利用生物信息学方法绘制出EBV miRNAs与靶基因之间的调控网络图,进一步筛选鉴定对于EBV相关疾病具有诊断意义和干预治疗的miRNA分子,可以为EBV相关肿瘤的治疗提供新的方法和靶点.

参 考 文 献

- [1] Wiwanitkit V. Epstein-Barr virus infection and opisthorchiasis: a story of cholangiocarcinoma in the highly endemic area. Iran J Cancer Prev, 2016, 9(2):e3647
- [2] Pfeffer S, Zavolan M, Grasser F A, *et al.* Identification of virus-encoded microRNAs. Science, 2004, 304(5671):734-736
- [3] Barth S, Meister G, Grasser F A. EBV-encoded miRNAs. Biochim Biophys Acta, 2011, 1809(11-12):631-640
- [4] Qiu J, Cosmopoulos K, Pegtel M, *et al.* A novel persistence associated EBV miRNA expression profile is disrupted in neoplasia. Plos Pathog, 2011, 7(8):e1002193
- [5] Klinke O, Feederle R, Delecluse H J. Genetics of Epstein-Barr virus microRNAs. Semin Cancer Biol, 2014, 26:52-59
- [6] Pratt Z L, Kuzembayeva M, Sengupta S, *et al.* The microRNAs of

- Epstein-Barr virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines. *Virology*, 2009, **386**(2):387-397
- [7] Jung Y J, Choi H, Kim H, *et al.* MicroRNA miR-BART20-5p stabilizes Epstein-Barr virus latency by directly targeting BZLF1 and BRLF1. *J Virol*, 2014, **88**(16):9027-9037
- [8] Qiu J, Thorley-Lawson D A. EBV microRNA BART 18-5p targets MAP3K2 to facilitate persistence *in vivo* by inhibiting viral replication in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(30):11157-11162
- [9] Iizasa H, Wulff B E, Alla N R, *et al.* Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. *J Biol Chem*, 2010, **285**(43):33358-33370
- [10] Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, *et al.* Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(2):666-675
- [11] Lo A K, To K F, Lo K W, *et al.* Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(41):16164-16169
- [12] Skalsky R L, Kang D, Linnstaedt S D, *et al.* Evolutionary conservation of primate lymphocryptovirus microRNA targets. *J Virol*, 2014, **88**(3):1617-1635
- [13] Lung R W, Tong J H, Sung Y M, *et al.* Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia*, 2009, **11**(11):1174-1184
- [14] Lu Y, Qin Z, Wang J, *et al.* Epstein-Barr virus miR-BART6-3p inhibits the RIG-I pathway. *J Innate Immun*, 2017, **9**(6):574-586
- [15] Nachmani D, Stern-Ginossar N, Sarid R, *et al.* Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell Host Microbe*, 2009, **5**(4):376-385
- [16] Xia T, O'Hara A, Araujo I, *et al.* EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3. *Cancer Res*, 2008, **68**(5):1436-1442
- [17] Choy E Y, Siu K L, Kok K H, *et al.* An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med*, 2008, **205**(11):2551-2560
- [18] Marquitz A R, Mathur A, Nam C S, *et al.* The Epstein-Barr virus BART microRNAs target the pro-apoptotic protein Bim. *Virology*, 2011, **412**(2):392-400
- [19] Vereide D T, Seto E, Chiu Y F, *et al.* Epstein-Barr virus maintains lymphomas *via* its miRNAs. *Oncogene*, 2014, **33**(10):1258-1264
- [20] Harold C, Cox D, Riley K J. Epstein-Barr viral microRNAs target caspase 3. *Virology*, 2016, **13**:145
- [21] Kim H, Choi H, Lee S K. Epstein-Barr virus miR-BART20-5p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting BAD. *Cancer Lett*, 2015, **356**(2 Pt B):733-742
- [22] Choi H, Lee H, Kim S R, *et al.* Epstein-Barr virus-encoded microRNA BART15-3p promotes cell apoptosis partially by targeting BRUCE. *J Virol*, 2013, **87**(14):8135-8144
- [23] Tam W, Gomez M, Chadburn A, *et al.* Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 2006, **107**(10):4090-4100
- [24] Ma J, Nie K, Redmond D, *et al.* EBV-miR-BHRF1-2 targets PRDM1/Blimp1: potential role in EBV lymphomagenesis. *Leukemia*, 2016, **30**(3):594-604
- [25] Zheng X, Wang J, Wei L, *et al.* Epstein-Barr virus miR-BART5-3p inhibits p53 expression. *J Virol*, 2018, **92**(23):pii e01022-18
- [26] Kanda T, Miyata M, Kano M, *et al.* Clustered microRNAs of the Epstein-Barr virus cooperatively downregulate an epithelial cell-specific metastasis suppressor. *J Virol*, 2015, **89**(5):2684-2697
- [27] 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. *Plos Pathog*, 2014, **10**(2):e1003974
- [28] Chen R, Zhang M, Li Q, *et al.* Retraction: the Epstein-Barr virus-encoded miR-BART22 targets MAP3K5 to promote host cell proliferative and invasive abilities in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer*, 2017, **8**(16):3130
- [29] He B, Li W, Wu Y, *et al.* Epstein-Barr virus-encoded miR-BART6-3p inhibits cancer cell metastasis and invasion by targeting long non-coding RNA LOC553103. *Cell Death Dis*, 2016, **7**(9):e2353
- [30] Wong A M, Kong K L, Tsang J W, *et al.* Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs. *Cancer*, 2012, **118**(3):698-710
- [31] Verhoeven R J, Tong S, Zhang G, *et al.* NF-kappaB signaling regulates expression of Epstein-Barr virus BART microRNAs and long noncoding RNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol*, 2016, **90**(14):6475-6488
- [32] Cai L M, Lyu X M, Luo W R, *et al.* EBV-miR-BART7-3p promotes the EMT and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing the tumor suppressor PTEN. *Oncogene*, 2015, **34**(17):2156-2166
- [33] Hooykaas M, van Gent M, Soppe J A, *et al.* EBV microRNA BART16 suppresses type I IFN signaling. *J Immunol*, 2017, **198**(10):4062-4073
- [34] Meckes D J, Shair K H, Marquitz A R, *et al.* Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(47):20370-20375
- [35] Pegtel D M, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson D A, *et al.* Functional delivery of viral miRNAs *via* exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(14):6328-6333
- [36] Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, *et al.* Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1beta production. *J Immunol*, 2012, **189**(8):3795-3799
- [37] Kotani A. Role of tumor-derived secretory small RNAs in EBV related lymphoma. *Uirusu*, 2014, **64**(1):43-48
- [38] Zhu J Y, Pfuhl T, Motsch N, *et al.* Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J Virol*, 2009, **83**(7):3333-3341
- [39] 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. *Nat Commun*,

- 2015, **6**:7353
- [40] Zhang G, Zong J, Lin S, *et al.* Circulating Epstein-Barr virus microRNAs miR-BART7 and miR-BART13 as biomarkers for nasopharyngeal carcinoma diagnosis and treatment. *Int J Cancer*, 2015, **136**(5):E301-E312
- [41] Gao W, Li Z H, Chen S, *et al.* Epstein-Barr virus encoded microRNA BART7 regulates radiation sensitivity of nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, 2017, **8**(12):20297-20308
- [42] Imig J, Motsch N, Zhu J Y, *et al.* microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(5):1880-1893
- [43] Kang B W, Choi Y, Kwon O K, *et al.* High level of viral microRNA-BART20-5p expression is associated with worse survival of patients with Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *Oncotarget*, 2017, **8**(9):14988-14994
- [44] Choi H, Lee S K. TAX1BP1 downregulation by EBV-miR-BART15-3p enhances chemosensitivity of gastric cancer cells to 5-FU. *Arch Virol*, 2017, **162**(2):369-377

Function and Significance of EBV-encoded miRNAs in Viral Infection and Oncogenesis*

PENG Qiu¹⁾, LIU Liang-Zhuan²⁾, GAN Run-Liang^{1)**}

¹⁾*Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang 421001, China;*

²⁾*Experimental Center for Medical Research, University of South China, Hengyang 421001, China)*

Abstract Epstein-Barr virus (EBV) has a relatively large double-stranded DNA genome. The EBV genome is approximately 172 kb in length. EBV has been associated with several cancer types, such as nasopharyngeal carcinoma, lymphoma and gastric cancer. EBV miRNAs can regulate gene expressions of virus and host cell, and play a variety of roles in the development of EBV-associated cancers. This article reviews the biological functions of EBV miRNAs in viral infection, oncogenesis, tumor invasion and metastasis, anti-apoptosis, signaling pathway, and potential significance as biomarkers for diagnosis of EBV-associated cancers. EBV miRNAs may be candidate targets of the therapy for EBV-associated cancers.

Key words Epstein-Barr virus (EBV), neoplasm, microRNAs (miRNAs)

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0090

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(81372134, 81641012).

** Corresponding author.

Tel:15200561081, E-mail: ganrunliang@163.com

Received: April 23, 2019 Accepted: July 2, 2019