

microRNA 在 EB 病毒相关淋巴瘤中的研究进展

吴婷¹ 陈波斌^{1△}

[关键词] microRNA;EB 病毒;淋巴瘤
[中图分类号] R733.4 [文献标志码] A [文章编号] 1004-2806(2013)07-0505-04

Research advantages of microRNA in Epstein-Barr virus-associated lymphoma

Summary As the first human tumor virus,Epstein-Barr virus (EBV) has been implicated in the development of a wide range of lymphoproliferative disorders including Burkitt's and Hodgkin's lymphoma,diffuse large B-cell lymphoma and nasal NK/T-cell lymphoma. MicroRNA (miRNA) is a small non-coding RNA which widely exists in eukaryotic cells and encoded by EBV,and it plays an important role in the formation of lymphoma. We will re-view research advantages of miRNA in EBV-associated lymphoma.
Key words microRNA;Epstein-Barr virus;lymphoma

淋巴瘤是人类常见的恶性肿瘤之一,其病因比较复杂,可能与病毒感染、免疫缺陷、电离辐射、化学毒物和基因突变等有关。EB 病毒(EBV)已被证实是引起人类传染性单核细胞增多症的病因,并与多种恶性肿瘤如鼻咽癌、胃癌、淋巴瘤、霍奇金病的关系非常密切。microRNA(miRNA)是一种小分子非编码 RNA,在细胞的增殖、分化、凋亡和肿瘤形成中起重要作用。目前研究显示,EBV 可通过编码病毒 miRNA 或改变细胞内 miRNA 表达维持病毒的持续感染,可能是淋巴瘤形成的重要原因。本文对 miRNA 在 EBV 相关淋巴瘤中的研究进展做一综述。

1 EBV 的生物学特点

EBV 是一种双链 γ -DNA 疱疹病毒,在正常人群中感染非常普遍,约 90% 以上的成人血清 EBV 抗体阳性。EBV 主要感染人体的淋巴细胞和上皮细胞,其感染靶细胞的方式主要有潜伏感染、裂解性感染和缺损性感染等 3 种方式,其中潜伏感染最常见。在潜伏感染过程中 EBV 可表达 2 种基因(EBER1、EBER2),6 种核抗原(EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B、EBNA3C 和 LP),3 种潜伏膜蛋白(LMP1、LMP2A、LMP2B)和 BamHI-A 片段转录产物(BARTs)。EBV 潜伏感染被认为是病毒致肿瘤作用的主要机制,根据被感染细胞表面表达的抗原不同,潜伏感染分为 4 型^[1]: I 型潜伏感染主要见于 Burkitt's 淋巴瘤(BL),病毒表达 EBNA1、EBERs 和 BARTs; II 型潜伏感染主要见于鼻咽癌、胃癌、霍奇金淋巴瘤(HL)及 NK/T 细胞淋巴瘤,病毒表达 EBNA1、LMPs、EBERs 和

BARTs; III 型潜伏感染主要见于弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)及免疫抑制患者的淋巴组织增生性疾病,病毒表达所有的 EBNAs、LMPs、EBERs 和 BARTs; IV 型潜伏感染仅发生在健康病毒携带者的 B 淋巴细胞中,病毒表达 LMP-2A、EBERs 和 BARTs。

2 miRNA 的生物学特征及其与 EBV 的关系

miRNA 是一类由 19~25 个核苷酸构成的非编码单链 RNA,广泛存在于动植物体内,可与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(UTR)以完全或不完全碱基互补配对方式结合,在转录后水平抑制 mRNA 的翻译或促使靶 mRNA 降解。miRNA 已被证实存在不同基因表达调控途径中具有重要的作用,包括胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡、造血作用及肿瘤发生等^[2]。研究发现,疱疹病毒科、多瘤病毒科和逆转录病毒科等 15 种病毒体内存在病毒基因组编码的 miRNA(vmiRNA)。EBV 是首个被发现存在 vmiRNA 表达的病毒,至今已发现其至少表达 44 种成熟 miRNA,其中 4 种 miRNA 由 BHRF1(BamHI fragment H rightward open reading frame 1)转录而来即 miR-BHRF1,其余 miRNA 由 BART(BamHI-A region rightward transcript)转录而来即 miR-BARTs。vmiRNA 在不同的细胞类型和实验体系中的表达水平不同,实验证明 miR-BHRF1 主要在 III 型潜伏感染的 B 淋巴细胞中表达,在 I 型潜伏感染的细胞中表达水平较低,而在鼻咽癌中无表达^[3]。vmiRNA 能够对病毒蛋白编码区基因和受感染细胞内某些基因产生调控作用以维持病毒持续感染,从而影响细胞的正常功能,与肿瘤的形成有关。此外,EBV 还可影响受感染细胞内 miRNA 的表达,从而在肿瘤的发生中起作用。

¹复旦大学附属华山医院血液科(上海,200040)
[△]审校者
通信作者:陈波斌,E-mail:bobin_chen@yahoo.com

3 EBV 编码的 miRNA 在淋巴瘤发病机制中的作用

Pfeffer 等(2004)从 EBV 感染的 B 淋巴细胞中发现了首个 vmiRNA。vmiRNA 的生物学加工过程与细胞 miRNA 的加工过程相同,其成熟 miRNA 也是通过诱导沉默复合物(miRISC)的形成而发挥调节功能^[4]。但在长期进化中,vmiRNA 序列与真核细胞编码的 miRNA 相比缺乏保守性,使其具有较高的突变频率和较快的进化过程,这种进化优势使病毒能快速地适应不同的细胞环境变化,有利于 vmiRNA 广泛发挥调控作用。由于序列的保守性差,缺乏高度的同源性,难以通过计算机软件程序预测大多数 vmiRNA 的作用靶点。因此,目前已检测出的 mRNA 靶点有限。

3.1 vmiRNA 与自身 mRNA 的关系

vmiRNA 能够对病毒蛋白编码区基因产生调控作用,调控水平取决于 miRNA 与靶基因 3'-UTR 互补结合的程度,这种调节作用将降低某些病毒蛋白的表达,使病毒感染从裂解感染转入持续潜伏性感染。持续潜伏感染是 EBV 致肿瘤作用的特点,目前已发现该病毒编码 20 多种与潜伏感染相关的 miRNA,如 miRNA-BART2 能够与编码病毒 DNA 聚合酶基因 BALF5 的 3'-UTR 完全互补结合。在裂解感染期大量病毒复制时,miRNA-BART2 表达水平降低,对 BALF5 基因的分解作用减弱,更有利于病毒复制循环;随着 miRNA-BART2 的选择压力变化,BALF5 的表达降低了 40%~50%,EBV 感染细胞释放的病毒颗粒减少了 20%,感染随即进入潜伏状态^[5]。EBV miR-BART1-5p、miR-BART16 和 miR-BART17-5p 与病毒编码 LMP1 的 mRNA 3'-UTR 不完全互补,LMP1 可诱导核因子 κ B(NF- κ B)表达,并与 P53 相互作用,能影响细胞周期蛋白以及细胞周期蛋白依赖激酶的活性,促进细胞的无限增殖^[6]。但 LMP1 表达过高时又会对宿主细胞产生毒性作用,病毒自身 miRNA 在转录后水平抑制 LMP1 的表达,既可以避免对宿主的毒性作用又可以降低自身免疫原性,从而逃避宿主免疫系统的攻击,维持潜伏感染状态^[7]。EBNA2 是一种可诱导 LMP1 和 LMP2 表达的病毒逆转录因子,可增强 B 细胞的生长和转化,在病毒由潜伏感染向裂解性复制转化过程中激活表达。Lund 等(2004)发现,miR-BART6 可降低 EBNA-2 的表达,可能是病毒维持潜伏感染的又一作用机制。Ramakrishnan 等^[8]用基因芯片的方法在 2 株 NK-TL 细胞株 SNK6 和 SNT16 中发现,分别有 19 个和 21 个 vmiRNA 表达显著增高,其中 miRNA-BART9 在 SNK6 中的表达与 LMP1 呈正相关,抑制 miRNA-BART9 表达不仅可以使 LMP1 mRNA 和蛋白的表达降低,还可以抑制 SNK6 的生长。由

以上研究可知,病毒编码的 miRNA 可通过抑制自身某些 mRNA 的表达以维持病毒的潜伏感染,调节病毒感染细胞的增殖。

3.2 vmiRNA 与宿主基因 mRNA 的关系

vmiRNA 一方面在进化过程中精确地调节自身的基因表达,形成有利于自身繁衍和潜伏的 miRNA 调节机制;另一方面可通过下调宿主细胞的 mRNA 表达达到有效的感染致病力。EBV 编码的 miR-BHRF1 在病毒引起的 B 细胞转化中起重要的调节作用,用 miR-BHRF1 突变的病毒株感染 B 淋巴细胞可以显著降低其转化效率,B 细胞的生长也受到影响,miR-BHRF1 或许可成为 EBV 相关淋巴瘤的治疗靶点^[9]。Xia 等^[10]报道 miR-BHRF1-3 在获得性免疫缺陷综合征相关的 DL-BCL 中表达增高,并与干扰素诱导的 T 细胞趋化因子 CXCL-Ⅱ/I-TAC 的表达水平相关,推测 CXCL-Ⅱ/I-TAC 是 miR-BHRF1-3 的作用靶点,病毒以此作为调节方式来干扰宿主的免疫监视和免疫清除作用,进而阻止受感染细胞发生凋亡。Iizasa 等^[11]分别在 I 型潜伏感染和 III 型潜伏感染的 BL 细胞系中发现,miR-BART6-5P 可以与 Dicer mRNA 3'-UTR 的 4 个作用位点特异性结合,从而抑制 Dicer 基因在细胞内的表达。miR-BART6-5P 通过抑制 Dicer 的表达可使受感染细胞内与病毒潜伏感染和裂解性感染相关的蛋白 EBNA2、LMP1、Zta 及 Rta 的表达量降低,还可以改变细胞内多种 miRNA 的表达水平,从而维持病毒在细胞内的特定潜伏感染状态,并调节病毒的生命周期。EBV 维持潜伏感染的另一机制为直接抑制宿主的免疫反应,逃避免疫攻击。如 IPO7 基因可以诱导促炎性因子白细胞介素-6 的产生,在固有免疫反应中发挥作用,现已证明 IPO7 是 EBV-miR-BART3 的靶基因,病毒通过表达 miR-BART3 抑制宿主抗病毒的固有免疫反应,维持长期的潜伏感染^[12]。NK 细胞是一种重要的固有免疫细胞,对病毒感染细胞和肿瘤转化细胞起主要的杀伤作用。Nachmani 等^[13]报道 miR-BART6 可与细胞压力诱导分子 MICB 的 3'-UTR 互补结合,MICB 表达降低使 NK 细胞表面的激活受体 NKG2D 不能得到足够的识别信号,故 NK 细胞不能有效地杀伤病毒感染细胞。研究表明 TOM22 是线粒体外膜移位酶的主要组成蛋白,可以识别细胞质中的线粒体功能蛋白并将其转运至线粒体内。用抗体直接干扰 TOM22 蛋白或用反义寡核苷酸抑制 TOM22 的表达均可以抑制细胞凋亡蛋白 Bax 与线粒体的交联,进而阻止 Bax 依赖的细胞凋亡^[14]。Dolken 等^[12]在 EBV 感染的 B 淋巴细胞中证实 EBV-miR-BART-16 可以靶向作用于 TOM22,猜想 EBV 通过 vmiRNA 抑制 TOM22 的表达,阻止受感染细胞内 Bax 依赖

的凋亡过程,促使细胞发生永生化。

4 EBV 对细胞 miRNA 的影响及其与淋巴瘤发生的关系

4.1 宿主 miRNA 的异常表达

Navarro 等^[15]证实 EBV 可以影响经典霍奇金淋巴瘤(cHL)内 miRNA 的表达。该研究分析 30 例 cHL 淋巴结标本中的 miRNA 表达水平时发现,miR-128a、miR-128b、miR-205 在 EBV⁺ 的标本中表达降低,而 miR-28、miR-130b、miR-132、miR-140、miR-330 的表达水平显著增高。但这些异常表达的 miRNA 在 HL 形成中的作用没有得到进一步分析。Leucci 等^[16]应用实时定量 PCR 的方法在 10 例 EBV 阳性和 10 例 EBV 阴性的 4%多聚甲醛固定-石蜡包埋的 BL 标本中检测发现,miR-127 在 EBV 阳性标本中的表达明显高于 EBV 阴性标本。随后他们发现 miR-127 在 EBV 阳性的 BL 细胞系中的表达也明显增高,并通过靶向作用于细胞分化调节基因 BLIM P-1 和 XBP-1 抑制细胞的分化,促使细胞无限增殖。为了证实 EBV 感染对细胞内 miRNA 表达的调节作用,许多学者又在细胞水平做了相关研究。Mrazek 等^[17]首次应用消减杂交的方法在 EBV⁻ 的 BL 细胞系 BL41 和 EBV 转染的淋巴母细胞系 LCL 进行了 miRNA 表达谱的分析,发现表达Ⅲ型潜伏基因的细胞系 LCL 高表达起癌基因作用的 miRNA (miR-155、miR-146a、miR-21、miR-34a、miR-29b、miR-23a、miR-27a),而发挥抑癌基因作用的 miRNA (miR-20a、miR-15a、miR-15b)表达水平显著降低。Cameron 等^[18]用基因芯片比较了 EBV 转化的 B 细胞系与正常外周 B 淋巴细胞的 miRNA 表达差异,结果显示有 41 个 miRNA 在Ⅲ型潜伏感染的 B 细胞中表达异常,其中 miR-155 和 miR-146a 表达水平显著增高。Skalsky 等^[19]应用光活性增强的核糖核苷交联和免疫共沉淀(PAR-CLIP)在 4 株 LCL 细胞系中也证实,miR-21、miR-155 和 miR-146a/b 等 11 种 miRNA 过度表达。

4.2 EBV 潜伏蛋白对宿主 miRNA 的调节

EBV 感染淋巴母细胞引起细胞内 miRNA 表达异常的机制成为研究的热点,但具体是哪种病毒蛋白通过何种机制促使 miRNA 的异常表达,至今尚无定论。目前多数学者致力于研究病毒潜伏蛋白 LMP1 对宿主细胞内 miRNA 的调节。Motsch 等^[20]发现 EBV Ⅲ型潜伏感染的 BL 细胞系中,miR-146a 的表达显著高于缺乏 LMP1 表达的Ⅰ型潜伏感染 BL 细胞系,潜伏感染蛋白 LMP1 通过调节 2 个位于 miRNA-146a 启动子区的 NF- κ B 结合位点诱导 miR-146a 表达。他们还通过荧光报告分析的方法进一步证明,LMP1 可通过 NF- κ B 介导的信号通路在 EBV⁺ 和 EBV⁻ 的 B 淋巴母细胞系中均

可激活 miR-146a 的表达。Cameron 等^[21]用表达 LMP1 的逆转录病毒感染 EBV⁻ 的 BL 细胞系,可以诱导 miR-146a 在内的 35 种 miRNA 表达,其中 miR-146a 表达水平的增高幅度最明显,miR-146a 可以通过直接或间接的作用机制抑制细胞内多个干扰素诱导基因的表达。EBV 可通过此种机制调节细胞对干扰素的敏感性,进而抑制细胞周围炎症反应,保护受感染细胞免于被杀伤。多项研究发现除 miR-146a 外,miR-155 的初级转录产物 BIC 和成熟 miR-155 在Ⅲ型潜伏感染的 BL 细胞系中的表达显著高于正常 B 淋巴细胞或Ⅰ型潜伏感染 BL 细胞系,且这种表达差异并非由细胞系的不同引起,而是由病毒Ⅲ型潜伏感染表达的基因决定^[22]。Lu 等^[23]证实 EBV⁻ 的 BL 细胞系中转染 LMP1 可以直接诱导 BIC/miR-155 表达增高,且转染 EBNA2 也可以促进 BIC 表达的轻度升高,但升高幅度不及前者明显。Linnstaedt 等^[24]用荧光标记的 miR-155 特异性抑制物转染 LCL 细胞系和 EBV⁺ 的 DLBCL 细胞系 IBL-1 后,发现实验组细胞多处于细胞周期 G1 期,且细胞出现自发凋亡数目显著高于对照组。由此可知 LMP1 可以诱导细胞内 miR-155 的表达增高,并通过影响细胞周期和抑制细胞凋亡的机制促进受感染细胞的过度增殖。然而,Anastasiadou 等^[25]发现 LMP1 转染 DLBCL 细胞系 U2932 可以上调细胞内 miR-29b 的表达,miR-29b 可在转录后水平抑制细胞内白血病基因 TCL-1 的表达,进而抑制肿瘤细胞的生长。目前 LMP1 在细胞生长中的作用,不同实验组得出了截然相反的结论,原因可能是此种病毒蛋白的功能除与自身的表达水平有关外,还依赖于其调节的细胞内 miRNA 的类型和受感染细胞的种系特异性。Rosato 等^[26]报道转染 LMP1 或 EBNA2 均可诱导 U2932 细胞内 miR-21 的过度表达,并首次证实 EBV 编码蛋白 EBNA2 在转录后水平诱导 U2932 细胞内 miR-21 表达,且通过调节 miR-21 的表达促进 B 淋巴细胞发生转化。

5 结语

EBV 编码的 miRNA 由 BHRF1 和 BART 转录而来,它们通过抑制宿主免疫反应或阻止受感染细胞凋亡建立病毒的持续潜伏感染。在 EBV 相关的淋巴瘤中,病毒潜伏感染可引起细胞内 miRNA 表达谱的改变,体外试验也已证实病毒编码 miRNA 可引起淋巴母细胞的恶性转化。但是病毒 miRNA 在不同肿瘤细胞中的表达有显著差异,其在维持病毒生命周期和肿瘤形成中的具体机制还需要深入研究,尤其是要寻找更多的 miRNA 靶基因以明确其不同的作用途径。目前对 EBV 感染致肿瘤作用的研究缺乏相应的动物模型,miRNA 在肿瘤形成中的作用也仅限在 EBV 阳性的细胞系中的研

究,这种研究的缺陷是并不能反映其在活体内的真实情况。因此,现阶段评估 EBV 编码 miRNA 及细胞内 miRNA 的改变在体内的生物学作用,还存在一定的困难。

参考文献

- [1] RAAB-TRAUB N. Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis[J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2: 453—458.
- [2] AMBROS V, CHEN X. The regulation of genes and genomes by small RNAs [J]. *Development*, 2007, 134: 1635—1641.
- [3] XING L, KIEFF E. Epstein-Barr virus BHRF1 micro- and stable RNAs during latency III and after induction of replication[J]. *J Virol*, 2007, 81: 9967—9975.
- [4] CULLEN B R. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs[J]. *Nature*, 2009, 457: 421—425.
- [5] BARTH S, PFUHL T, MAMIANI A, et al. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 666—675.
- [6] MOENS U. Silencing viral microRNA as a novel anti-viral therapy? [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 2009: 419539.
- [7] LO A K, TO K F, LO K W, et al. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 16164—16169.
- [8] RAMAKRISHNAN R, DONAHUE H, GARCIA D, et al. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e27271.
- [9] FEEDERLE R, LINNSTAEDT S D, BANNERT H, et al. A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1001294.
- [10] XIA T, O'HARA A, ARAUJO I, et al. EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by EBV-miR-BHRF1-3 [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 1436—1442.
- [11] 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]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 33358—33370.
- [12] DOLKEN L, MALTERER G, ERHARD F, et al. Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 7: 324—334.
- [13] 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[J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 5: 376—385.
- [14] BELLOT G, CARTRON P F, ER E, et al. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14: 785—794.
- [15] NAVARRO A, GAYA A, MARTINEZ A, et al. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma[J]. *Blood*, 2008, 111: 2825—2832.
- [16] LEUCCI E, ONNIS A, COCCO M, et al. B-cell differentiation in EBV-positive Burkitt lymphoma is impaired at posttranscriptional level by miRNA-altered expression[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126: 1316—1326.
- [17] MRAZEK J, KREUTMAYER S B, GRASSER F A, et al. Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: e73.
- [18] CAMERON J E, FEWELL C, YIN Q, et al. Epstein-Barr virus growth/latency III program alters cellular microRNA expression[J]. *Virology*, 2008, 382: 257—266.
- [19] SKALSKY R L, CORCORAN D L, GOTTWEIN E, et al. The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002484.
- [20] MOTSCH N, PFUHL T, MRAZEK J, et al. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a [J]. *RNA Biol*, 2007, 4: 131—137.
- [21] CAMERON J E, YIN Q, FEWELL C, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways[J]. *J Virol*, 2008, 82: 1946—1958.
- [22] YIN Q, MCBRIDE J, FEWELL C, et al. MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways[J]. *J Virol*, 2008, 82: 5295—5306.
- [23] LU F, WEIDMER A, LIU C G, et al. Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence[J]. *J Virol*, 2008, 82: 10436—10443.
- [24] LINNSTAEDT S D, GOTTWEIN E, SKALSKY R L, et al. Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus [J]. *J Virol*, 2010, 84: 11670—11678.
- [25] ANASTASIADOU E, BOCELLATO F, VINCENTI S, et al. Epstein-Barr virus encoded LMP1 downregulates TCL1 oncogene through miR-29b[J]. *Oncogene*, 2010, 29: 1316—1328.
- [26] ROSATO P, ANASTASIADOU E, GARG N, et al. Differential regulation of miR-21 and miR-146a by Epstein-Barr virus-encoded EBNA2[J]. *Leukemia*, 2012, 26: 2343—2352.