

· 基础研究 ·

胃癌组织 EB 病毒感染与 miR-101、EZH2、COX-2 表达关系的研究*

袁浩^{①③} 刘伟^② 姜楠^③ 王玉平^{①③} 陈兆峰^{①③} 刘敏^{①③} 周永宁^{①③}

摘要 目的:探讨甘肃省武威地区胃癌患者 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染状况及 miR-101、EZH2、COX-2 在 EBV 相关胃癌发生发展中的作用。方法:应用组织芯片、原位杂交和免疫组织化学技术检测 120 例胃癌组织及相应癌旁组织中 EBV 小 RNA (EBER)、miR-101、EZH2、COX-2 的表达情况。结果:120 例胃癌组织 EBV 阳性率为 10.0%, EBV 相关胃癌有较少的淋巴结转移,好发于贲门、胃体($P<0.05$)。miR-101、EZH2、COX-2 在 120 例胃癌组织和相应癌旁组织的阳性率差异有统计学意义($P<0.05$)。12 例 EBV 阳性胃癌组织 miR-101、EZH2、COX-2 和 108 例 EBV 阴性胃癌组织 3 个分子的表达率差异有统计学意义($P<0.05$)。胃癌组织 EBV 感染和 miR-101 表达呈正相关, EBV 相关胃癌组织 miR-101 表达和淋巴结转移、COX-2、EZH2 表达均呈负相关($P<0.05$)。结论:EB 病毒感染与武威地区胃癌的发生有一定关系; EBV 相关胃癌和 EBV 阴性胃癌在淋巴结转移和发生部位的差异有统计学意义; miR-101、EZH2、COX-2 与 EB 病毒相关胃癌的发展有一定关系。

关键词 EB 病毒 胃癌 原位杂交 miR-101

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.1988

Correlation of Epstein-Barr virus infection with the expression of miR-101, EZH2, and COX-2 in gastric cancer

Hao YUAN^{1,3}, Wei LIU², Nan JIANG³, Yuping WANG^{1,3}, Zhaofeng CHEN^{1,3}, Min LIU^{1,3}, Yongning ZHOU^{1,3}

Correspondence to: Yongning ZHOU; E-mail: yongningzhou@sina.com

¹The First Clinical Medical College of Lanzhou University; Department of Gastroenterology, The First Hospital of Lanzhou University; ²School of Basic Medical Sciences; ³Gansu Provincial Key Laboratory of Gastroenteropathy; Lanzhou University, Lanzhou 730000, China.

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81372145) and Management Project of Gansu Provincial Health Scientific Research Plan (No. GSWST09-03).

Abstract Objective: This study was conducted to investigate Epstein-Barr virus (EBV) infection in gastric cancer in Wuwei area of Gansu province (China) and the roles of miR-101, EZH2, and COX-2 in EBV-associated gastric carcinomas (EBVaGC). **Methods:** Tissue microarray technique, immunohistochemistry, and in situ hybridization were performed to detect the expression of EBV-encoded small RNAs (EBERs), miR-101, EZH2, and COX-2, in gastric cancer tissues ($n=120$) and the corresponding adjacent tissues ($n=120$). **Results:** The positive rate of EBV was 10.0% in 120 cases of gastric cancer tissues. EBVaGC was not significantly associated with lymph node metastasis and developed most often in the cardia and body ($P<0.05$). The differences in the positive rates of miR-101, EZH2, and COX-2 in 120 cases of gastric cancer tissues and corresponding adjacent tissues were significant ($P<0.05$). The differences in the positive rates of miR-101, EZH2, and COX-2 in 12 cases of EBVaGC and in 108 cases of EBV-negative gastric cancer (EBVnGC) tissues were significant ($P<0.05$). The infection of EBV in gastric cancer tissues was positively related to miR-101 expression. By contrast, miR-101 expression was negatively related to lymph node metastasis and expression of COX-2 and EZH2 in EBVaGC tissues ($P<0.05$). **Conclusion:** EBV infection was related to gastric cancer in Wuwei area of Gansu province. EBVaGC and EBVnGC have significant differences in lymph node metastasis and in the location of cancer. MiR-101, EZH2, and COX-2 were related to the development of EBVaGC.

Keywords: in situ hybridization, gastric cancer, miR-101

Epstein-Barr virus EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是最早发现的人类肿瘤病毒,属疱疹病毒科的γ

亚科。1993年Tokunaga等^[1]提出经EBER原位杂交证实胃癌细胞内存在EBV者,定义为EBV相关胃癌

作者单位:①兰州大学第一医院消化内科(兰州市730000);②兰州大学基础医学院;③甘肃省胃肠病重点实验室

*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:81372145)和甘肃省卫生行业科研计划项目(编号:GSWST09-03)资助

通信作者:周永宁 yongningzhou@sina.com

(EBV-associated gastric carcinomas, EBVaGC)。甘肃武威地区是胃癌高发区,胃癌检出率高达12.2%^[2],但关于该地区EBV感染对胃癌的影响未见报道。有研究表明^[3]EBV相关胃癌发生淋巴结转移较EBV阴性胃癌(EBV-negative gastric carcinomas, EBVnGC)少,其机制有待阐明。

微小RNAs(microRNAs, miRNAs)是一类非编码的内源性小RNA分子,许多microRNAs在胃癌组织中表达水平异常。其中,miR-101通过其靶基因能在体外抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移,也可在体内抑制肿瘤生长^[4]。Chakrabarty等^[5]证明miR-101可在转录后水平抑制COX-2的表达。生物信息学分析表明miR-101有EZH2的结合位点,可调节EZH2基因的表达。EZH2基因被认为是一种癌基因,在许多肿瘤组织中它的表达存在上调,其表达产物与肿瘤的侵袭和转移有关。COX-2为诱导性环氧化酶,其异常表达存在于多种肿瘤中。本研究旨在了解武威地区胃癌患者EBV感染状况,探讨miR-101、EZH2、COX-2在EBV相关胃癌侵袭转移中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般临床资料 选择甘肃省武威肿瘤医院2010年1月至2011年12月接受手术治疗的120例胃癌患者的术后石蜡标本为研究对象,其中癌组织120例,相应的癌旁组织120例(取材距癌组织边缘 ≥ 5 cm)。男92例,女28例;年龄35~78岁,中位年龄为57.5岁。全部病例均经病理诊断证实。患者术前均未进行放化疗治疗。

1.1.2 试剂 EBER原位杂交试剂盒(美国PanPath公司),EZH2兔抗人单克隆抗体、COX-2兔抗人单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司),地高辛标记的miR-101探针(美国Invitrogen公司),两步法免疫组织化学检测试剂盒、原位杂交检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的建立 将所有石蜡标本行4 μ m厚切片,HE染色后,于显微镜下定位具有代表性的组织位点,在对应的蜡块上找到相应位点并标记,用直径为2 mm的取样针取出供体蜡块中的目标组织,置于受体蜡块的对应位点,构建7 \times 6的组织阵列蜡块(共6个芯片蜡块,每个芯片蜡块40例标本,2例肾脏组织置于左上角用以定位),对制成的芯片蜡块行4 μ m厚连续切片,贴附于防脱片上,分别做常规HE染色、EBER、miR-101原位杂交以及EZH2、COX-2免疫组织化学。

1.2.2 原位杂交 EBER原发杂交操作按说明书进

行,组织芯片切片经二甲苯脱蜡,乙醇水化,胃蛋白酶37 $^{\circ}$ C消化30 min,逐级酒精脱水、空气干燥后,探针37 $^{\circ}$ C孵育16 h,辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体37 $^{\circ}$ C孵育30 min,DAB显色。用已知阳性的淋巴瘤组织切片作阳性对照,用PBS代替探针作阴性对照。miR-101原位杂交 组织芯片切片经常规脱蜡至水,3% H_2O_2 室温处理10 min,胃蛋白酶37 $^{\circ}$ C消化25 min,预杂交液37 $^{\circ}$ C孵育4 h,地高辛标记的miR-101探针37 $^{\circ}$ C杂交16 h,生物素化鼠抗地高辛抗体37 $^{\circ}$ C孵育60 min,SABC孵育后DAB显色。用PBS代替探针作阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。

1.2.3 免疫组织化学检测 采用Super Vision两步法,组织芯片切片经常规脱蜡至水,3% H_2O_2 室温处理10 min,柠檬酸盐抗原热修复,封闭液室温封闭10 min,分别滴加兔抗人EZH2单克隆抗体、兔抗人COX-2单克隆抗体后置于4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜,辣根过氧化物酶标记的抗兔抗体37 $^{\circ}$ C孵育30 min,DAB显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。用已知的阳性片作阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.4 结果判断 EBER表达定位于细胞核(图1A),呈棕黄色,几乎所有癌细胞均呈阳性表达,EBER阴性细胞不着色。miR-101阳性染色为棕黄色颗粒,定位于胃腺上皮或癌细胞胞质(图1B)。采用定性法判断结果:光镜下观察阳性染色的细胞比例(5个高倍视野下的均数),阳性细胞数少于10%为阴性,阳性细胞数为10%~50%为阳性,阳性细胞数多于50%为强阳性。EZH2蛋白以细胞核呈棕黄色为阳性(图1C),COX-2蛋白以细胞胞质呈棕黄色为阳性(图1D),采用半定量积分法判断结果,着色强度评分:无色为0分、浅黄色为1分、黄色为2分、棕黄色为3分;阳性细胞数评分:无为0分、1%~10%为1分、11%~50%为2分、51%~75%为3分、>75%为4分,两项乘积0~3分为阴性, ≥ 4 分以上为阳性。

1.3 统计学分析

Excel建立数据库,采用SPSS 15.0统计软件包进行统计学分析。计数资料的比较使用卡方检验,相关性分析用Spearman秩相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EBVaGC的比例及EBVaGC和EBVnGC临床病理资料的比较

原位杂交结果表明,120例胃癌标本中,EBVaGC占10.0%,而120例相应癌旁组织未检测到EBV感染,差异有统计学意义($\chi^2=12.632, P < 0.001$)。统计学分析表明,EBVaGC和EBVnGC在淋巴结转移及发生部位方面差异有统计学意义,EBVaGC与EBVnGC

相比有较少的淋巴结转移,好发于贲门、胃体。但年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、浸润深度在两组间的差异均无统计学意义(表1)。

2.2 胃癌及癌旁组织 miR-101、EZH2、COX-2 检测结果

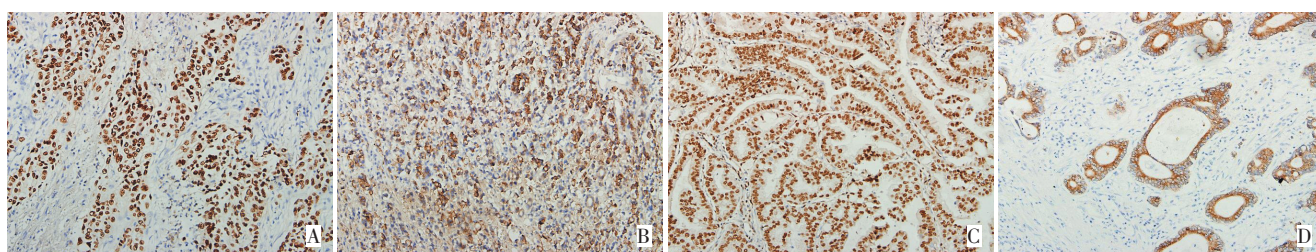
120例胃癌组织 miR-101 阳性率为 8.33%,相应癌旁组织 miR-101 阳性率为 40.83%,二者阳性率差异有统计学意义($\chi^2=32.452, P<0.001$);120例胃癌组织 EZH2 阳性表达率为 78.33%,相应癌旁组织 EZH2 阳性表达率为 35.83%,二者阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=42.520, P<0.001$);120例胃癌组织 COX-2 阳性表达率为 64.17%,相应癌旁组织 COX-2 阳性表达率为 29.17%,二者阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=28.142, P<0.001$)。

2.3 EBVaGC、EBVnGC 组织 miR-101、EZH2、COX-2 检测结果

12例 EBVaGC 组织 miR-101 阳性率为 41.67%,108例 EBVnGC 组织 miR-101 阳性率为 4.63%,二者阳性率差异有统计学意义($\chi^2=14.848, P<0.001$);12例 EBVaGC 组织 EZH2 阳性表达率为 50.00%,108例 EBVnGC 组织 EZH2 阳性表达率为 81.48%,二者阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=4.588, P=0.032$);12例 EBVaGC 组织 COX-2 阳性表达率为 33.33%,108例 EBVnGC 组织 COX-2 阳性表达率为 67.59%,二者阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=4.124, P=0.042$,表2)。

2.4 胃癌组织 EBV 感染和 EBVaGC 组织、EBVaGC 淋巴结转移、COX-2 表达、EZH2 表达的关系

胃癌组织 EBV 感染和 miR-101 表达呈正相关($r=0.402, P<0.001$);EBVaGC 组织 miR-101 表达和 EBVaGC 淋巴结转移、COX-2 表达、EZH2 表达均呈负相关($r=-0.845, P=0.001; r=-0.598, P=0.040; r=-0.845, P=0.001$)。



A. EBER expression in EBVaGC (ISH×200); B. miR-101 expression in EBVaGC (ISH×200); C. EZH2 expression in EBVnGC (IHC×200); D. COX-2 expression in EBVnGC (IHC×200)

图1 EBER、miR-101、EZH2、COX-2在EBVaGC和EBVnGC中的表达

Figure1 Expression of EBER, miR-101, EZH2, COX-2 in EBVaGC and EBVnGC

表1 EBVaGC和EBVnGC患者的临床病理特征

Table 1 Clinicopathological parameters of EBVaGC and EBVnGC

Pathologic feature	n	EBV(+)	EBV(-)	χ^2	P
Age (years)				0.442	0.506
<50	26	4	22		
≥50	94	8	86		
Gender				0.875	0.350
Male	92	11	81		
Female	28	1	27		
Tumor size (cm)				0.136	0.712
<5	51	4	47		
≥5	69	8	61		
Tumor site				4.106	0.043*
Cardia and body	52	9	43		
Antrum and pylorus	68	3	65		
Type				0.016	0.899
Well/Moderately	43	5	38		
Poorly	77	7	70		

表1 EBVaGC和EBVnGC患者的临床病理特征 (续表1)

Table 1 Clinicopathological parameters of EBVaGC and EBVnGC (Continued table 1)

Pathologic feature	n	EBV(+)	EBV(-)	χ^2	P
T satatus				<0.001	1.000
T ₁ -T ₂	21	2	19		
T ₃ -T ₄	99	10	89		
LN metastasis				4.588	0.032*
Yes	94	6	88		
No	26	6	20		

*P<0.05

表2 miR-101、EZH2、COX-2在癌、癌旁、EBVaGC、EBVnGC中的表达

Table 2 Expression of miR-101, EZH2, and COX-2 in cancer tissues, adjacent tissues, EBVaGC, and EBVnGC

Project	n	miR-101			COX-2			EZH2		
		+	χ^2	P	+	χ^2	P	+	χ^2	P
Cancer	120	10	32.452	<0.001	77	28.142	<0.001	94	42.520	<0.001
Adjacent	120	49			35			43		
EBVaGC	12	5	14.848	<0.001	4	4.124	0.042	6	4.588	0.032
EBVnGC	108	5			73			88		

3 讨论

大量研究表明,部分胃癌的发生与EBV有关,约2%~16%的胃癌组织EBV阳性。甘肃省武威地区是我国胃癌高发区之一,本研究采用原位杂交对120例胃癌进EBV检测,结果显示其EBV阳性率为10%,这一水平略高于李淑英等^[6]报道的全国平均水平8.23%,而与Zur Hausen等^[7]报道的全球平均水平10%基本一致,提示EBV感染不是武威地区胃癌高发的主要病因。检测出的12例EBVaGC发生淋巴结转移的有6例,发生于贲门、胃体的有9例,而108例EBVnGC中,发生淋巴结转移的有88例,发生于贲门、胃体的为43例,这两个临床病理指标在两组间的差异均有统计学意义。

miRNAs是肿瘤研究的重大发现,其广泛存在于真核生物细胞中,是一类基因表达转录后调控因子。近来研究表明,miRNAs可通过其靶基因影响信号传导途径、细胞因子及降低癌基因表达等方式抑制肿瘤的侵袭和转移。Luo等^[8]研究表明,miR-101低表达与黑色素瘤患者较短的生存期相关,过表达miR-101可以抑制黑色素瘤细胞的侵袭和增殖。miR-101还可抑制膀胱癌细胞的浸润、转移^[9]。研究发现^[4],过表达miR-101能抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。近年研究表明,EBV可以通过调节miRNAs的表达来参与肿瘤的发展过程。在EBV阳性鼻咽癌中,miR-203下调被证明是由EBV编码的潜伏膜蛋白1(LMP-1)所引起^[10],另外LMP-1可以激活

PI3K/Akt/FOXO3a通路,诱导miR-21表达从而抑制PDCD4和Fas-L的表达,进而引起EBV阳性鼻咽癌对顺铂的耐药^[11]。Rosato等^[12]的实验显示,EBV编码的核抗原EBNA1通过上调miR-21参与了EBV诱导B细胞转换过程。

本研究发现与癌旁组织相比,胃癌组织中miR-101表达下调,并且和EBVnGC相比,EBVaGC组织miR-101阳性率升高,相关性分析表明,胃癌组织EBV感染和miR-101表达呈正相关,12例EBVaGC组织miR-101表达和EBVaGC淋巴结转移呈负相关,提示EBV相关胃癌淋巴结转移较少可能和EBV所致miR-101的上调有关,具体机制方面是否有EBV编码的EBNA1或LMP-1介导有待进一步研究。

大量研究表明COX-2在多数人类肿瘤如结肠癌、胃癌、食管癌中异常表达,COX-2的过表达可通过抑制细胞凋亡、促进肿瘤血管形成等机制参与肿瘤的形成及浸润转移过程^[13]。本研究显示胃癌组织较相应癌旁组织COX-2表达升高。EZH2具有组蛋白甲基转移酶、HDAC和多种基因外的调控作用,EZH2高表达可以促进细胞增殖,还可通过抑制肿瘤转移抑制基因而促进肿瘤的侵袭和转移^[14]。本研究显示,胃癌组织EZH2表达高于癌旁组织,提示EZH2参与胃癌的发生发展过程。

miR-101可靶向调控COX-2、EZH2,并抑制二者的表达^[5, 15]。本研究结果表明,EBVaGC组织miR-101的表达和COX-2表达、EZH2表达均呈负相

关,提示EBV相关胃癌中,miR-101对淋巴结转移的影响可能是通过调控其靶基因COX-2、EZH2实现的。

综上所述,EBV与武威地区胃癌有一定关系,但不是武威地区胃癌高发的主要病因。EBV相关胃癌淋巴结转移较EBV阴性胃癌少,EBVaGC组织miR-101表达上调并进一步引起COX-2、EZH2表达下调可能是其中原因之一。

参考文献

- 1 Tokunaga M, Uemura Y, Tokudome T, et al. Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: a molecular patho-epidemiological study[J]. Acta Pathol Jpn, 1993, 43(10):574-581.
- 2 Zhou YN, Zhang ZY, Zhang ZK, et al. Analysis on the detection of gastric cancer in HEXI of Gansu province[J]. Chin J Dig, 2007, 27(10):696-697. [周永宁,张志镒,张正坤,等.甘肃省河西地区胃癌检出及趋势研究[J].中华消化杂志,2007,27(10):696-697.]
- 3 Truong CD, W Feng, W Li, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U S A[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28:14.
- 4 Xu L, Beckebaum S, Iacob S, et al. MicroRNA-101 inhibits human hepatocellular carcinoma progression through EZH2 downregulation and increased cytostatic drug sensitivity[J]. J Hepatol, 2013, pii: S0168-8278(13)00754.
- 5 Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, et al. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation[J]. Proc Natl Acad Sci, 2007, 104(38):15144-15149.
- 6 Li SY, Hu JH, Zhou TJ. Analysis of Epstein-Barr virus infections and gastric cancer in Tangshan region[J]. Chin J Gerontol, 2007, 27(23):2323-2325. [李淑英,胡金华,周天戟.唐山地区EB病毒感染与胃癌相关性分析[J].中国老年学杂志,2007,27(23):2323-2325.]
- 7 Zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, et al. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF1 gene[J]. Cancer Research, 2000, 60(10):2745-2748.
- 8 Luo C, Merz PR, Chen Y, et al. MiR-101 inhibits melanoma cell

- invasion and proliferation by targeting MTF and EZH2[J]. Cancer Lett, 2013, 341(2):240-247.
- 9 Hu Z, Lin Y, Chen H, et al. MicroRNA-101 suppresses motility of bladder cancer cells by targeting c-Met[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013,435(1):82-87.
- 10 Yu H, Lu J, Zuo L, et al. Epstein-Barr virus downregulates microRNA 203 through the oncoprotein latent membrane protein 1: a contribution to increased tumor incidence in epithelial cells[J]. J Virol, 2012, 86(6):3088-3099.
- 11 Yang, GD, Huang TJ. Epstein-Barr Virus Encoded LMP1 upregulates microRNA-21 to promote the resistance of nasopharyngeal carcinoma cells to cisplatin-induced Apoptosis by suppressing PDCD4 and Fas-L[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e78355.
- 12 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(11):2343-2352.
- 13 Huang F, Lin C, Shi YH, et al. MicroRNA-101 inhibits cell proliferation, invasion, and promotes apoptosis by regulating cyclooxygenase-2 in Hela cervical carcinoma cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(10):5915-5920.
- 14 Eskander RN, Ji T, Huynh B, et al. Inhibition of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is associated with decreased tumor cell proliferation, migration, and invasion in endometrial cancer cell lines[J]. Int J Gynecol Cancer, 2013, 23(6):997-1005.
- 15 He XP, Shao Y, Li XL, et al. Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth[J]. FEBS Journal, 2012, 279(22):4201-4212.

(2013-11-21收稿)

(2014-01-03修回)

(本文编辑:杨红欣)



作者简介

袁浩 硕士研究生。研究方向为消化系统肿瘤。

E-mail: yh230987@126.com

· 读者 · 作者 · 编者 ·

题名的规范

题名应简明、具体、确切,能概括论文的特定内容,有助于选定关键词,符合编制题录、索引和检索的有关原则。题名应该避免使用公式和不常见的缩略词、字符、代号等。必要时,可使用本行业通用缩写词。题名一般不宜超过20字。若题名语意未尽,可以用副题名补充说明论文中的特定内容;一般不要用陈述句,因为题名主要起标示作用,而陈述句容易使题名具有判断式的语义,且不够精炼和醒目。少数情况(评述性、综述性和驳斥性)下可以用疑问句做题名,因为疑问句有探讨性语气,易引起读者兴趣。同一篇论文的英文题名与中文题名内容上应一致,凡可用可不用的冠词均不用。

——《中国肿瘤临床》编辑部