

EB病毒潜伏膜蛋白 LMP2A 对人鼻咽癌细胞增殖与迁移特性的影响

陈志¹,何韶华²,蒋帅¹,刘鹏³,白月璐¹,冯振卿⁴,朱进³,陈仁杰^{1*}

(¹南京医科大学第二附属医院耳鼻咽喉科,江苏 南京 210011;²南京医科大学第一附属医院肿瘤科,江苏 南京 210029;
³南京军区军事医学研究所,江苏 南京 210002;⁴南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:制备重组慢病毒载体 pLMP2A,并检测其在人鼻咽癌细胞 CNE1 的表达情况及潜伏膜蛋白 2A(latent membrane protein 2A, LMP2A)对人鼻咽癌细胞 CNE1 增殖、迁移、侵袭的影响。方法:利用 DNA 重组技术将 EB 病毒编码的 LMP2A 基因克隆到慢病毒表达载体 pLV-GFP 中,通过酶切、测序验证,将重组慢病毒载体 pLMP2A 与包装质粒 pdelta-8.91、pVSVG 共转染人胚肾上皮细胞株 293T,包装重组慢病毒 LV-LMP2A,并感染人鼻咽癌细胞 CNE1,经单克隆筛选后,用 RT-PCR、免疫荧光和 Western blot 检测 LMP2A 在人鼻咽癌细胞 CNE1 的表达,CCK8 法检测 LMP2A 对人鼻咽癌细胞 CNE1 增殖的影响,划痕实验、Transwell 侵袭实验检测 LMP2A 对人鼻咽癌细胞 CNE1 迁移和侵袭的影响。结果:酶切及测序结果表明,成功制备了重组慢病毒载体 pLMP2A;RT-PCR、Western blot、免疫荧光结果显示筛选出的细胞克隆能高表达 EBV-LMP2A,CCK8 结果显示 LMP2A 能促进人鼻咽癌细胞 CNE1 增殖,划痕实验结果显示 LMP2A 能促进人鼻咽癌细胞 CNE1 迁移,Transwell 侵袭实验结果显示 LMP2A 能提高人鼻咽癌细胞 CNE1 侵袭能力。结论:成功制备了慢病毒载体 pLMP2A,包装的慢病毒能够成功感染人鼻咽癌细胞系 CNE1,使 LMP2A 基因得以高表达,并发现 LMP2A 能够促进人鼻咽癌细胞株 CNE1 增殖、迁移、侵袭,为进一步探讨 EB 病毒在鼻咽癌中的发病机制及基因治疗奠定了基础。

[关键词] EB 病毒;潜伏膜蛋白 2A;鼻咽癌;慢病毒载体

[中图分类号] R739.63

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-523-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20150415

Effects of EB virus latent membrane protein 2A on human nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration

Chen Zhi¹, He Shaohua², Jiang Shuai¹, Liu Peng³, Bai Luyue¹, Fen Zhengqin⁴, Zhu Jin³, Chen Renjie^{1*}

(¹Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ³Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002; ⁴Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the recombinant lentiviral vector containing LMP2A gene and measure the expression level of LMP2A in human carcinoma cell line of CNE1, as well as the effects of LMP2A on proliferation, migration and invasion on human carcinoma cell line of CNE1. **Methods:** The EB virus LMP2A fragment was amplified by PCR and subcloned into the lentiviral vector pLV by recombinant DNA technology. The resultant lentivirus was confirmed by PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing. To produce retroviral virus, packaging cells, 293T cells were co-transfected with recombinant retroviral expression vector pLMP2A and packaging plasmid pdelta-8.91 and pVSVG. CNE1 cells were infected by pLV-LMP2A, and the expression of LMP2A in CNE1 cells was confirmed by RT-PCR, immunofluorescence and Western blot by screening of monoclonal. CCK8 assay, Transwell invasion assay and Wound-healing assay were performed to determine the effects of LMP2A expression on the proliferation, invasion and migration. **Results:** The recombinant lentiviral vector carried the LMP2A gene was successfully constructed. Results of RT-PCR, immunofluorescence and western blot indicated that CNE1 transgenic cells could high express EBV-LMP2A. The LMP2A gene-transfected carcinoma cells grew vigorously and rapidly and up-regulated the ability of migration and invasion. **Conclusion:** The recombinant lentiviral vector pLMP2A was successfully constructed, and could be used to transfect human carcinoma cell line of CNE1. LMP2A could be highly expressed and can significantly promote CNE1 proliferation, migration and invasion, which laid a

[基金项目] 江苏省临床医学科技专项(BL2013038)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: renjiechen@aliyun.com

foundation of study on the biological function of Epstein-Barr virus and its potential role in gene therapy of tumors.

[Key words] Epstein-Barr virus; latent membrane protein 2A; nasopharyngeal carcinoma; lentiviral vector

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04): 523-528]

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)属人类 γ 亚科疱疹病毒,是传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)的病原体,与鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)、Burkitts淋巴瘤(burkitt lymphoma, BL)、胃癌(gastric carcinoma, GC)等^[1]多种肿瘤的发生有关。其中鼻咽癌是最常见的非淋巴细胞恶性鳞状上皮癌,在西方国家的发病率为1/100 000,在中国广东省的发病率高达30/100 000。鼻咽癌易发生淋巴结和远距离转移,感染类型属于潜伏感染II型,即仅表达低免疫原性的EBNA1^[2]、LMP1^[3]、LMP2^[4]病毒蛋白。潜伏膜蛋白基因2A(latent membrane protein 2A, LMP2A)是EBV潜伏期膜蛋白的一种,在体内外EBV潜伏感染的所有B细胞中均能检测出LMP2A,并且是NPC、BL等肿瘤细胞稳定表达的少数EBV保守抗原之一,提示LMP2A参与EBV在淋巴细胞中的长期潜伏,并且可能在恶性肿瘤的发生发展中起一定作用。由于LMP2A分子具有潜在的T细胞激活表位,能介导杀伤性T细胞发挥作用^[5]。因此越来越多的研究表明,LMP2A是治疗EBV相关肿瘤理想的靶抗原^[6]。本研究中,我们构建了EBV-LMP2A基因重组慢病毒载体并转染鼻咽癌细胞建立高表达细胞株,发现LMP2A能够促进人鼻咽癌细胞株CNE1增殖、迁移、侵袭,为进一步探讨EB病毒相关的鼻咽癌发病机制及研制病毒蛋白疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

慢病毒载体表达系统(plv-GFP、pdelta-8.91、pVSVG)由南京医科大学微生物与免疫学系陈云教授馈赠;CNE1细胞、B95.8细胞、293T细胞、*E.coli*. DH5 α 由南京医科大学卫生部抗体中心实验室保存;质粒提取试剂盒购自德国QIAGEN公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Invitrogen公司,DMEM培养基购自美国Gibco公司;大鼠抗人LMP2A购自美国Santa Cruz公司;免疫荧光染色试剂盒抗大鼠-cy3购自南通碧云天生物技术有限公司,HRP标记的兔抗大鼠二抗购自美国Jackson Immuno Research公司。

1.2 方法

1.2.1 LMP2A基因的扩增及鉴定

根据GenBank中EB病毒LMP2A的基因序列,设计2条引物,由金斯瑞公司合成,上游引物为5'-CCCGGATCCATGGGGTCCCTAGAAATGG-3',下游引物为5'-CCGACGCGTTTATACAGTGTTCGATA-3',以EB病毒转化的细胞系B95.8cDNA为模板,扩增LMP2A基因片段,反应条件为95 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 30 s;58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,循环35次,72 $^{\circ}$ C 10 min,将剩余PCR产物全部进行凝胶电泳回收;回收后插入pMD18-T,获得重组质粒pMD18-T/LMP2A,转化DH5 α ,挑取白斑进行测序鉴定。

1.2.2 重组慢病毒载体的制备和鉴定

挑选测序正确的重组质粒,将慢病毒表达载体plv-GFP和pMD18-T/LMP2A进行*Bam*H I和*Mlu* I双酶切,37 $^{\circ}$ C酶切1 h。酶切产物经琼脂糖凝胶回收后进行连接、转化,用LB氨苄平板培养过夜,得到重组慢病毒载体pLMP2A,经PCR、重组质粒电泳和双酶切进一步鉴定。

1.2.3 重组慢病毒的包装及提纯

转染前24 h将293T细胞转入6孔板中,(4~5) $\times 10^6$ 个/孔,加入2 ml含FBS的培养基,37 $^{\circ}$ C培养过夜,待细胞密度达80%~90%融合。将重组慢病毒载体pLM2A、pdelta-8.91、pVSVG重组慢病毒载体包装系统共转染293T细胞;同时将慢病毒表达载体plv-GFP与包装质粒pdelta-8.91、pVSVG重组慢病毒包装系统共转染另一组293T细胞,作为感染参照。转染48 h后收集病毒上清液,于4 $^{\circ}$ C 1 500 r/min离心5 min,除去细胞碎片,然后再用0.45 μ m滤膜过滤病毒液,用超滤法浓缩后,用慢病毒快速定量试剂盒检测病毒滴度。

1.2.4 人鼻咽癌细胞CNE1的慢病毒感染

将CNE1细胞铺入6孔板中,(2~3) $\times 10^6$ 个/孔,加入2 ml含FBS培养基,CO₂培养箱37 $^{\circ}$ C培养,待细胞密度达80%~90%时,将细胞分为两组:分别加入感染复数(MOI值)为10的重组慢病毒LV-LMP2A和慢病毒LV,6 h后更换含FBS的培养基继续培养。感染48 h后荧光显微镜下观察细胞内GFP的表达情况。

1.2.5 感染慢病毒的靶细胞鉴定

将经重组慢病毒 LV-LMP2A 感染过的 CNE1 细胞(LV-LMP2A-CNE1)和慢病毒 LV 感染过的 CNE1 细胞(LV-CNE1 细胞)扩大培养后进行鉴定。以 RT-PCR 检测 LMP2A mRNA 的表达;Western blot 检测目的基因 LMP2A 蛋白在 CNE1 细胞的表达,以 GADPH 为内参;免疫荧光检测目的基因 LMP2A 蛋白在 CNE1 细胞中的表达。

1.2.6 CCK8 法检测 LMP2A 对人鼻咽癌细胞 CNE1 增殖的影响

将 2×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,每株细胞设 4 个复孔,以只加培养基不加细胞的空白对照调零。检测时,每孔加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8, 37°C 孵育 2 h 后直接用酶联免疫检测仪测定 450 nm 处的吸光度,以时间为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制生长曲线。相同条件实验重复 3 次。

1.2.7 划痕实验检测 LMP2A 对人鼻咽癌细胞 CNE1 迁移的影响

接种细胞于 24 孔板中,待细胞密度长至 80% 时,用 $100 \mu\text{l}$ 枪头沿孔底直径笔直划痕,吹走滑落细胞,将细胞置于 37°C 5% CO_2 的培养箱中培养,并于 0、24、48 h 倒置显微镜下观察、拍照,每组选 3 个位点,测量划痕宽度。计算划痕愈合程度=(初始宽度-不同时间测量宽度)/初始宽度 $\times 100\%$ 。相同条件下实验重复 3 次。

1.2.8 Transwell 侵袭实验检测 LMP2A 对人鼻咽癌细胞 CNE1 侵袭的影响

将无血清 1640 稀释的 Matrigel 基质胶(3:1)加入 Transwell 小室中,放置 37°C 培养箱内 1 h,待 Matrigel 基质胶凝固。无血清培养基重悬细胞并将其浓度调整为 4×10^5 个/ml,取 $200 \mu\text{l}$ 加入上室,下室加入 $600 \mu\text{l}$ 含 20% 胎牛血清的培养基,Transwell 培养体系在 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。48 h 后棉签拭去上室非迁移细胞,75% 乙醇固定上室膜 1 h, PBS 洗去固定液,5 mg/L Hoechst33342 染色 10 min 后倒置荧光显微镜观察,沿直径选取 6 个视野,计数并拍照分析。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,各指标以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用独立样本 *t* 检验计算, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

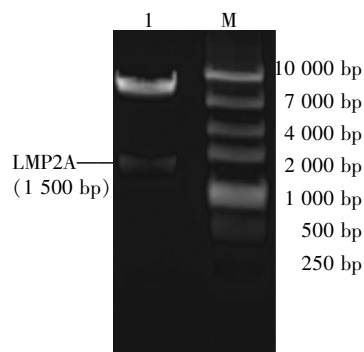
2 结 果

2.1 LMP2A 扩增基因产物鉴定

从 B95.8 细胞提取总 RNA,以 RT-PCR 扩增出 LMP2A 全长 cDNA,扩增后产物大小为 1 520 bp,插入 pMD18-T 载体后送金斯瑞公司进行 DNA 测序,所得结果与 GenBank 中注册的 EBV-LMP2A 序列完全一致。

2.2 重组慢病毒载体 pLMP2A 的鉴定

挑选测序正确的重组质粒,将慢病毒表达载体 pLV-GFP 和 pMD18-T/LMP2A 进行 *Bam*H I 和 *Mlu* I 双酶切,酶切产物经琼脂糖凝胶回收后进行连接、转化,得到重组慢病毒载体 pLMP2A,利用内切酶 *Bam*H I 和 *Mlu* I 进行双酶切,然后进行凝胶电泳,结果显示重组质粒能被完全切开,在 1 500 bp 处出现目的基因片段(图 1)。



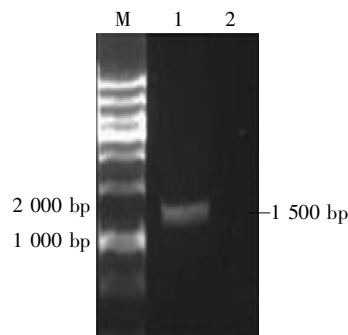
1: pLMP2A 酶切结果; M: DNA Marker。

图 1 重组慢病毒载体 pLMP2A 酶切鉴定结果

Figure 1 The enzyme digestion result of recombinant lentivirus vector

2.3 LV-LMP2A-CNE1 细胞的 RT-PCR 鉴定

TRIzol 抽提细胞 LV-LMP2A-CNE1 细胞和 LV-CNE1 细胞的总 RNA 后,经 RT-PCR 检测目的基因 LMP2A 的转录,可见 1 500 bp 左右的基因片段,而空载转染的 CNE1 细胞无特异性条带产生(图 2)。



M: DNA Marker; 1: LV-LMP2A-CNE1 RT-PCR 扩增产物; 2: LV-CNE1 RT-PCR 扩增产物。

图 2 RT-PCR 鉴定 LMP2A 在 LV-LMP2A-CNE1 细胞的表达

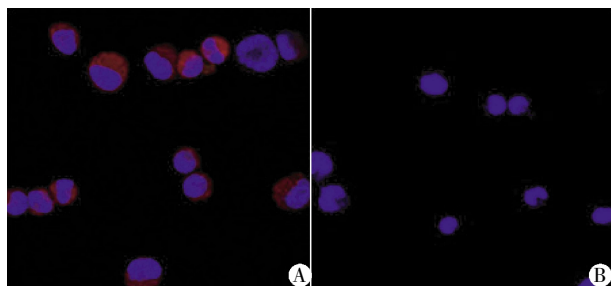
Figure 2 The expression of LMP2A mRNA was detected by RT-PCR

2.4 LV-LMP2A-CNE1 细胞的免疫荧光鉴定

免疫荧光法检测 LV-LMP2A-CNE1 细胞的 LMP2A 表达,同时设立阴性对照(LV-CNE1 细胞)结果显示,在 LV-LMP2A-CNE1 细胞可见 cy3 标记的红色荧光,而在空载组无特异性荧光产生(图 3)。

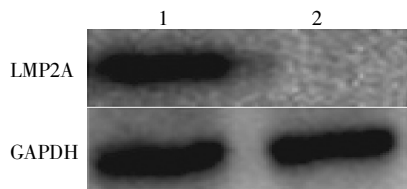
2.5 LV-LMP2A-CNE1 细胞的 Western blot 鉴定

将 LV-LMP2A-CNE1 细胞和 LV-CNE1 细胞扩大培养提取蛋白经 10%SDS-PAGE 蛋白电泳后,Western blot 检测结果显示,重组慢病毒转染组在 50 000 处可见目的条带,而 LV-CNE1 细胞无特异性条带产生(图 4)。



A:LV-LMP2A-CNE1 细胞;B:LV-CNE1 细胞。

图 3 免疫荧光鉴定 LMP2A 在 LV-LMP2A-CNE1 细胞的表达
Figure 3 Immofluorescence staining clearly showing the membrane localization of LMP2A in the CNE1 and LV-LMP2A-CNE1 cell lines



1:LV-LMP2A-CNE1 细胞;2:LV-CNE1 细胞。

图 4 Western blot 鉴定 LMP2A 在 LV-LMP2A-CNE1 细胞的表达

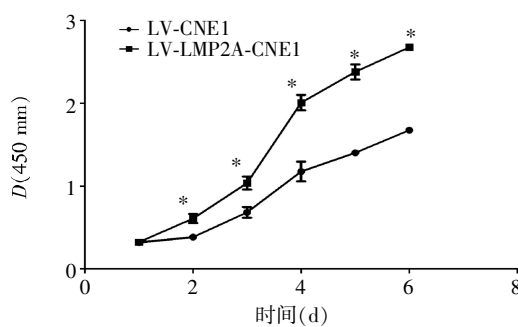
Figure 4 The Western blot result of LMP2A

2.6 LMP2A 转染人鼻咽癌细胞 CNE1 的增殖情况

LV-LMP2A-CNE1 细胞和 LV-CNE1 细胞贴壁后,进入指数生长期,LV-LMP2A-CNE1 细胞的增殖能力明显较 LV-CNE1 强(图 5),结果表明,转染 LMP2A 的鼻咽癌细胞增殖能力较强。从第 2 天开始其吸光值同对照组细胞相比,差异有统计学意义($P < 0.001, n=4$)。

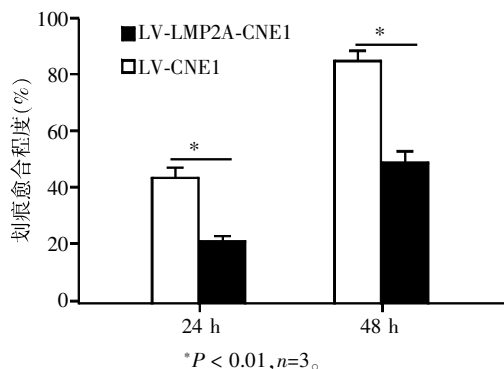
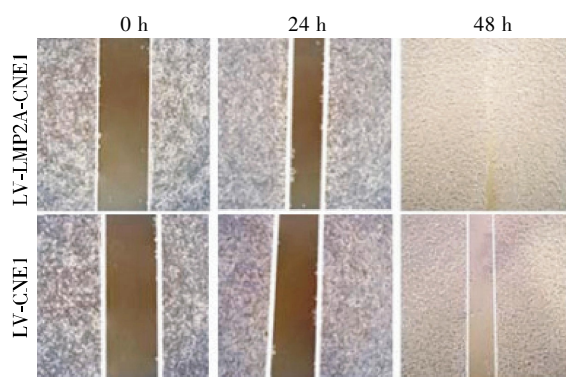
2.7 LMP2A 载体稳定转染后细胞迁移能力的变化

细胞划痕后 24 h 观察到 LV-LMP2A-CNE1 细胞组划痕宽度恢复近 45%,而 LV-CNE1 细胞组恢复约 22%;细胞划痕后 48 h, LV-LMP2A-CNE1 细胞组划痕宽度恢复已达到 86%,而 LV-CNE1 细胞组只恢复到约 50%(图 6),差异有统计学意义($P < 0.001, n=3$)。



与 LV-CNE1 细胞相比较, * $P < 0.001, n=4$ 。

图 5 CCK8 法检测 LMP2A 对 CNE1 细胞增殖的影响
Figure 5 Growth curve of LV-LMP2A-CNE1 cells and LV-CNE1 cells



* $P < 0.01, n=3$ 。

图 6 LMP2A 增强 CNE1 细胞的迁移能力
Figure 6 LMP2A enhances the migration ability of CNE1 cells

2.8 Transwell 侵袭实验

Transwell 侵袭实验细胞迁移 48 h 后 LV-LMP2A-CNE1 细胞组每视野平均穿膜细胞数 (131 ± 8)个明显多于 LV-CNE1 细胞组平均穿膜细胞数 (71 ± 10)个(图 7),差异有统计学意义($P < 0.001, n=6$)。

3 讨论

鼻咽癌是来源于鼻咽上皮的高度恶性肿瘤,因其病灶部位解剖结构复杂、位置隐蔽,肿瘤可生长空间大,早期临床症状不够明显,就诊患者中 III、IV 期占确诊病例数的 70%,预后较差。目前,临床上并

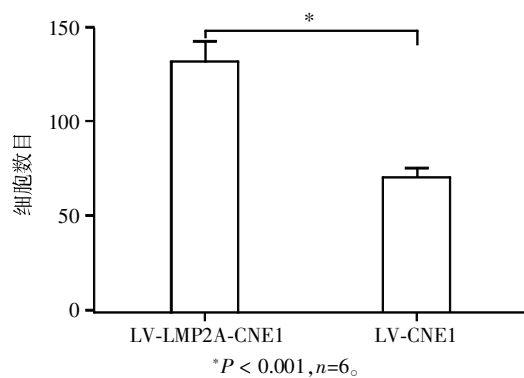


图 7 LMP2A 增强 CNE1 细胞的侵袭能力

Figure 7 LMP2A enhances the invasion ability of CNE1 cells

没有针对鼻咽癌的有效治疗方法,鼻咽癌通常不宜采用手术切除,虽然放射性治疗初次有效率能够达到 80%左右,但对部分病例并不能完全杀灭,尤其是转移病灶和循环血液中的肿瘤细胞更难清除,并且治疗产生的不良反应可进一步损伤机体免疫系统功能,部分患者易复发和转移,因此,寻找新型有效治疗方法成为迫切需求^[7]。鼻咽癌的发生和发展与 EBV 感染密切相关^[8],随着对 EBV 的分子生物学特点及病毒相关肿瘤免疫学效应机制的了解,细胞免疫治疗成为肿瘤治疗的新策略^[9],有望与传统的放疗、化疗、手术治疗方案联合运用,抑制肿瘤的发生发展,提高患者的生活质量。

研究发现,95%的 EBV 感染鼻咽癌患者 LMP2A 的 mRNA 水平检测阳性,其中 50%的患者 LMP2A 蛋白表达检测阳性;然而在 EBV 感染的鼻咽癌患者中只有 65%的患者 LMP1 mRNA 水平检测为阳性,其中 35%的患者 LMP1 蛋白表达检测阳性,由此可见无论在基因还是蛋白水平 LMP2A 的表达水平都比 LMP1 高^[10]。因此,与 LMP1 相比,LMP2A 在鼻咽癌中的作用可能更大。此外,LMP2A 能通过影响正常 B 细胞维持 EBV 的潜伏状态,是唯一能够在静止 B 细胞中检测到的 EBV 潜伏性感染的基因,在 EBV 相关肿瘤的发病机制中发挥重要作用。

恶性肿瘤的主要特征是细胞过度而异常的增生,国内有研究表明,LMP2A 能促进胃癌细胞增殖^[11]。国外也有研究表明,LMP2A 转染人角质化细胞株 HaCaT 后,能促进细胞增殖和转化,并可在裸鼠中形成肿瘤^[12]。LMP2A 对鼻咽癌细胞作用机制尚不明确。本研究表明,LMP2A 能够促进高分化鼻咽癌细胞 CNE1 的增殖能力。恶性肿瘤的另一个特征是易于转移,据国外研究表明,LMP2A 能促进原始鼻咽上皮细胞的迁移、侵袭能力^[13]及鼻咽癌的上皮间质转化 (EMT)^[14] 过程。本课题组利用划痕实验和

Transwell 侵袭实验研究 LMP2A 对人鼻咽癌细胞的影响,实验结果表明 LMP2A 能够增强人鼻咽癌细胞 CNE1 的迁移、侵袭能力,提示 LMP2A 在鼻咽癌细胞转移中的作用。

当前有多种基因转染方法,如物理法、化学法、逆转录病毒及腺病毒载体转基因法等。物理法和化学法转染效率低;逆转录病毒载体容纳外源基因的能力差,而且只能感染分裂期细胞;腺病毒载体难以实现长时间表达。而慢病毒载体能在体内稳定表达,免疫反应小,安全性较好,可感染非分裂细胞及分裂细胞,并能感染多种组织,已成为当前基因转移载体研究的热点^[15-16]。本研究使用慢病毒载体为“自杀”性病毒,即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。载体中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代,属于假型病毒。我们使用慢病毒载体系统使 LMP2A 在鼻咽癌中稳定表达,能更好地模拟病毒在细胞内表达潜伏蛋白的模式。

目前鼻咽癌的免疫治疗是鼻咽癌治疗研究的一个重要方向,研究表明 LMP2A 与鼻咽癌的发生发展密切相关,LMP2A 或许可以作为鼻咽癌免疫治疗中的一个靶向抗原,通过诱导机体产生对此抗原的特异性免疫反应去杀伤肿瘤细胞^[17-19]。本研究成功制备了重组慢病毒载体 pLMP2A,并建立了该基因的慢病毒表达系统,能够在 293T 细胞内包装出具有较高感染效率的慢病毒,成功使 LMP2A 基因在人高分化鼻咽癌细胞 CNE1 中得到高度表达。CCK8 法检测、划痕实验、Transwell 侵袭实验结果表明,LMP2A 能增强鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。为下一步探讨 LMP2A 基因在鼻咽癌中的作用机制以及为针对 LMP2A 的鼻咽癌免疫治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(3): 803-821
- [2] Wang L, Tian WD, Xu X, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) protein induction of epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Cancer, 2014, 120(3): 363-372
- [3] Yoshizaki T, Kondo S, Wakisaka N, et al. Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Lett, 2013, 337(1): 1-7
- [4] Kong QL, Hu LJ, Cao JY, et al. Epstein-Barr virus-encod-

- ed LMP2A induces an epithelial - mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like cancer cells in nasopharyngeal carcinoma [J]. *PLoS Pathol*, 2010, 6(6):262-264
- [5] Taylor GS, Jia H, Harrington K, et al. A recombinant modified vaccinia ankara vaccine encoding Epstein-Barr virus (EBV) target antigens: A phase I trial in UK patients with EBV-positive cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(19): 5009-5022
- [6] Wang B, Yao K, Liu G, et al. Computational prediction and identification of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A antigen-specific CD8⁺ T-cell epitopes [J]. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6(2):97-103
- [7] 王雪峰, 付宁, 曹建国. 鼻咽癌的临床进展 [J]. *江西中医药*, 2010 41(3):78-80
- [8] Iwakiri D, Samanta M, Takada K. Mechanisms of EBV-mediated oncogenesis [J]. *Uirusu*, 2006, 56(2):201-208
- [9] Bonner JF, Haas CJ, Fischer I. Preparation of neural stem cells and progenitors; neuronal production and grafting applications [J]. *Method Mol Biol*, 2013, 1078(7):65-88
- [10] Dawson CW, Port RJ, Young LS. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(2):144-153
- [11] 蒋叶, 冯国开, 陈健宁, 等. EBV LMP2A 对胃癌细胞生物学特性的影响 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2013 34(1):28-35
- [12] Scholle F, Bendt KM, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt [J]. *J Virol*, 2000, 74(22): 10681-10689
- [13] Pegtel DM, Subramanian A, Sheen TS, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion: possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis [J]. *J Virol*, 2005, 79(24):15430-15442
- [14] Lin Z, Wan X, Jiang R, et al. EBV-encoded LMP2A promotes EMT in nasopharyngeal carcinoma via MTA1 and mTOR signaling induction [J]. *J Virol*, 2014, 89(20): 11872-11885
- [15] Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2010, 58(2):107-119
- [16] Pluta K, Kacprzak M. Use of HIV as a gene transfer vector [J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(4):531-595
- [17] Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, et al. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts [J]. *J Virol*, 1992, 66(5):2689-2697
- [18] Niedobitek G, Young LS, Sam CK, et al. Expression of Epstein-Barr virus genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas [J]. *AM J Pathol*, 1992, 140(4):879-887
- [19] Heussinger N, Büttner M, Ott G, et al. Expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Pathol*, 2004, 203(2):696-699

[收稿日期] 2014-11-23