

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学
博 士 后 研 究 工 作 报 告

RNA 螺旋酶 DHX32 促进结肠癌血管生成
的作用及机制研究

林华月

工作完成日期 年 月 日

报告提交日期 年 月 日

厦门大学

2017 年 5 月

RNA 螺旋酶 DHX32 促进结肠癌血管生成的作用及机制研究

DHX32 promotes angiogenesis in colorectal cancer through augmenting β -catenin signaling to induce expression of VEGFA

博 士 后 姓 名 林华月
流动站（一级学科）名称 生物学
专 业（二级学科）名称 生物化学与分子生物学

研究工作起始时间 2013 年 12 月

研究工作期满时间 2017 年 5 月

厦 门 大 学

2017 年 5 月

厦门大学博士后研究工作报告

著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

内 容 摘 要

肿瘤的生长和转移离不开肿瘤血管生成，因此抗血管生成是目前肿瘤治疗的重要途径之一，其中血管内皮生长因子 VEGF 及其信号通路是抗肿瘤治疗的重要靶点。DHX32 是近年来新发现的一种 RNA 螺旋酶，对其在肿瘤发生发展中的作用研究刚刚起步。我们的前期研究表明 DHX32 在结肠癌中表达上调，并能够促进结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭，抑制细胞凋亡；qPCR 芯片的筛选结果显示敲低 DHX32 抑制了血管生成因子 VEGFA 的 mRNA 水平，预示着 DHX32 可能参与了肿瘤血管生成的调控。本研究发现在结肠癌细胞中 DHX32 通过与 β -catenin 结合并稳定其蛋白水平从而上调 β -catenin 下游靶基因 VEGFA 的转录；由此提高了肿瘤微环境中 VEGFA 的蛋白水平，促进了血管内皮细胞的募集和肿瘤细胞的血管生成；裸鼠移植瘤实验结果表明敲低 DHX32 能显著降低结肠癌细胞裸鼠移植瘤的血管密度并抑制裸鼠成瘤；结肠癌患者组织水平的研究也验证了结肠癌组织中 DHX32 与 β -catenin 的蛋白表达水平及肿瘤血管密度呈正相关，并且癌组织中 DHX32 的高表达提示了结肠癌病人的不良预后。本研究发现了 DHX32 参与 β -catenin/TCF 复合物调控转录的新作用和 DHX32 作为促肿瘤血管生成因子的分子机制；为结肠癌的临床治疗提供了可能的靶点；也为结肠癌的辅助诊断和预后提供了新的潜在生物标志物。

关键词：DHX32；结肠癌； β -catenin；VEGFA；血管生成

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and accounts for 14% of all new cancer diagnoses. Tumor angiogenesis that is required for cancer growth and metastasis by nourishing cancer cells and helping spread of metastatic cells to distant tissues has been considered as a potential target for CRC treatment. Understanding the molecular mechanism by which CRC cells promote angiogenesis is required to develop effective antiangiogenesis treatment for CRC. RNA helicases are members of the DEAD/H-box family, which are characterized by the presence of a helicase domain and are involved in RNA posttranscriptional procession. In addition to their roles in RNA procession, multiple members of RNA helicases are also implicated in transcription regulations. Aberrant expression of these proteins have been reported in various solid and hematologic malignancies. We previously reported that overexpression of DHX32 contributes to the growth and metastasis of colorectal cancer (CRC) and is involved in tumor angiogenesis. However, the molecular mechanism by which DHX32 regulates tumor angiogenesis is largely unknown. Herein, we first time reported that DHX32 upregulated expression of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) at the transcription level mainly through interacting with and stabilizing β -catenin. This then promoted recruitment of endothelial cells and vessel formation for the tumor. Depletion of DHX32 in CRC xenografts significantly suppressed the vessel density and tumor growth. Furthermore, overexpression of DHX32 was positively associated with angiogenesis and poor outcome of CRC patients. The report that DHX32 regulates the activity of β -catenin and tumor angiogenesis highlights a novel mechanism by which DHX32 acts as a pro-angiogenic factor, provides a new strategy for CRC treatment by inhibiting DHX32, and suggests the potential of overexpressed DHX32 as a biomarker for CRC diagnosis and prognosis.

Keywords: DHX32, colorectal cancer, β -catenin, VEGFA, angiogenesis

目 录

1 前言.....	1
1.1 结肠癌与血管生成.....	1
1.2 RNA 螺旋酶与 DHX32.....	2
1.3 本课题的研究目的和意义.....	3
2 材料与方法	4
2.1 实验材料.....	4
2.2 实验方法.....	7
3 结果与分析	14
3.1 DHX32 促进结肠癌细胞血管生成.....	14
3.1.1 DHX32 促进血管内皮细胞侵袭.....	14
3.1.2 DHX32 促进血管内皮细胞迁移.....	15
3.1.3 DHX32 促进血管内皮细胞增殖.....	15
3.1.4 DHX32 促进血管内皮细胞的体外成管.....	15
3.2 DHX32 通过 β -catenin 诱导 VEGFA 表达	16
3.2.1 DHX32 诱导 VEGFA 和 β -catenin 的蛋白表达.....	17
3.2.2 DHX32 提高 β -catenin/TCF 的转录调控活性.....	17
3.2.3 DHX32 通过 β -catenin 诱导 VEGFA 表达.....	18
3.3 DHX32 提高 β -catenin 的蛋白稳定性	20
3.3.1 DHX32 与 β -catenin 相互结合.....	20
3.3.2 DHX32 通过抑制 β -catenin 泛素化降解提高其蛋白稳定性.....	22
3.4 DHX32 促进结肠癌细胞裸鼠成瘤.....	24
3.4.1 体内实验验证 DHX32 对结肠癌细胞成瘤的作用	24
3.4.2 DHX32 促进结肠癌移植瘤的血管生成.....	25
3.5 DHX32 与人结肠癌血管生成和病人预后的关系.....	25
3.5.1 DHX32 的表达与人结肠癌血管生成相关	25
3.5.2 DHX32 表达与结肠癌的恶性程度及患者的预后相关.....	27
4 讨论与展望	30
参 考 文 献	33
致谢.....	36
博士生期间发表的学术论文	37
博士后期间发表的学术论文与主持的研究课题.....	38
个人简历.....	39

1 前言

1.1 结肠癌与血管生成

结肠癌是全球最常见的恶性肿瘤之一，根据世界卫生组织国际癌症研究机构最新的统计显示，结肠癌的发病率居女性肿瘤第二位、男性肿瘤第三位¹。近年来随着环境和饮食结构的改变等一系列因素的影响，我国的结肠癌发病率呈现逐年上升的趋势²。由于缺乏有效的早期筛查手段，大部分结肠癌患者在确诊时已处于局部晚期状态或者已经发生了远处转移³。目前进展期结肠癌治疗的效果和预后仍然较差，死亡率位居肿瘤第三。因此，深入研究结肠癌的发病和转移机制，在此基础上探寻其诊断治疗的分子生物学靶点和方法具有重要的意义。

研究表明，肿瘤细胞在持续生长和转移的过程中均离不开肿瘤的血管生成，因此以肿瘤血管生成成为治疗靶点被认为是包括结肠癌在内的很多癌症重要的治疗策略⁴。肿瘤的血管生成是在已有血管上出芽形成新生血管的复杂过程，主要包括以下几个步骤：（1）肿瘤细胞释放大量促血管生长因子；（2）促血管生长因子与血管内皮细胞的表面受体结合并激活血管内皮细胞；（3）蛋白水解酶降解基底膜；（4）血管内皮细胞发生侵袭迁移、增殖并形成新生血管网⁵。在缺氧或癌基因被激活等情况下，肿瘤细胞会大量释放出血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor, FGF）、白细胞介素 6（Interleukin-6, IL-6）、白细胞介素 8（Interleukin-8, IL-8）和基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase, MMPs）等细胞因子促进肿瘤的血管生成。其中，目前已发现与结肠癌血管生成关系较为密切的有 VEGF 和 PDGF^{6,7}。

血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）是目前已知最重要的促血管生成因子，现已发现的 VEGF 家族成员包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和胎盘生长因子（placenta growth factor, PlGF）⁸。研究表明，VEGF 在血管内皮细胞中不表达，主要通过肿瘤细胞的旁分泌作用于血管内皮细胞。VEGF 通过与血管内皮细胞上的特异性受体 VEGFR 结合，启动 PI3K/Akt、p38/MAPK、Erk1/2、Src/NOS 等信号途径从而促进血管内皮细胞迁移侵袭、增殖和形成小管样结构，激活肿瘤的生长、转移和免疫耐受等过程⁹。根据文献报道，VEGF 在结肠癌组织中高表达，并且与 Dukes 分期、组织学分级、复发转移及生存期密切相关。手术切除患者肿瘤组织中的 VEGF 水平可以作为疾

病预后和生存的预测因子^{10,11}。在肿瘤发生发展过程中 VEGF 的表达水平受到多种信号通路的共同调控。目前已知多种转录调控因子能结合在 VEGFA 的启动子区调控其基因转录, 包括 Sp1, AP2, c-Jun, Egr-1, TCF 和 HIF-1^{12,13,14,15}。近年来的研究发现, 在结肠癌中起关键作用的信号转导途径 Wnt/ β -catenin 信号通路也参与了 VEGFA 的转录调控进而作用于肿瘤血管生成^{16,17}。结肠癌细胞中 Wnt 信号通路通常被过度激活, β -catenin 的泛素化降解被抑制, 从而募集入核与 TCF 结合在 VEGFA 的启动子区促进其转录。因此, VEGF 及其调控因子是结肠癌靶向治疗的重要靶点之一, 针对 VEGF 信号通路的抗血管生成治疗的探索具有很高的临床应用价值。

1.2 RNA 螺旋酶与 DHX32

RNA螺旋酶是通过水解三磷酸核苷 (NTP) 将RNA双链打开的一类水解酶; 具有8个高度保守的序列 (I, Ia, Ib, II-VI); 包含了三种结构域, 分别具有水解 NTP、结合RNA和解螺旋的活性。根据结构域II序列的不同, RNA螺旋酶分为DDX (DEAD box helicase) 和DHX (DEAH box helicase) 两大家族¹⁸。RNA螺旋酶通过调控RNA的解螺旋参与了包括RNA的翻译起始、mRNA剪接、mRNA转运、RNA降解、核糖体合成等重要的生物学过程¹⁹。

越来越多的研究发现许多RNA螺旋酶在肿瘤组织中表达失调, 与肿瘤发生发展密切相关²⁰⁻²³。RNA螺旋酶的致癌机制可能是RNA螺旋酶的功能异常导致了RNA的非正常加工及染色体易位导致的融合转录本的形成, 从而影响了癌基因或者抑癌基因的表达, 其中部分RNA螺旋酶被认为同时具有抑癌和致癌的作用。此外, RNA螺旋酶还通过与其他癌基因或抑癌基因相互作用参与肿瘤细胞增殖分化、细胞凋亡以及肿瘤耐药等过程。如DDX1与MYCN基因共同扩增, DDX5参与对原癌基因c-H-ras的选择性剪接, DDX6促原癌基因c-myc的翻译, DHX9与乳腺癌易感基因BRCA1相互作用, DDX2与凋亡相关蛋白4抗体Pdcd4相互作用影响肿瘤细胞的增殖和转移等^{20,22,24,25}。

目前已经发现多种RNA螺旋酶与结肠癌相关: rck/p54在结肠癌组织中表达上调, 参与了癌基因如c-myc、E1A的mRNA翻译, 促进癌细胞增殖和恶性转化²⁶; p68 (DDX5) 蛋白在良性和恶性结肠癌中均呈高表达并作为转录调节因子调控了AKT/FOXO3a的转录²⁷; DDX3在结肠癌中表达下调, 在结肠癌细胞中通过Snail/E-cadherin抑制细胞迁移和侵袭抑制结肠癌转移²⁸; DDX6在结肠癌组织中高

表达,通过DDX6/c-Myc/PTB1途径抑制结肠癌细胞的细胞凋亡²⁹。有趣的是,这些RNA螺旋酶发挥功能并不一定依赖于其螺旋酶活性。

本论文中研究的DHX32是2002年Abdelhaem教授在研究急性淋巴细胞白血病时新发现的一种RNA螺旋酶³⁰,国内外对DHX32功能及调控机制的研究近几年刚刚起步。目前国外对于DHX32基因的报道主要集中在对淋巴细胞和T细胞等免疫细胞的调节作用上³⁰⁻³²。Abdelhaem等的研究发现,在急性淋巴细胞白血病细胞、滤泡型淋巴瘤及Burkitt淋巴瘤细胞中DHX32的表达下调,而在B细胞淋巴瘤及霍奇金淋巴瘤中表达显著增加,其表达水平与淋巴细胞的增殖分化呈现正相关性。在Jurkat T细胞中,Alli等的研究表明DHX32的表达受到了T细胞活化细胞核因子(NF-AT)的调控,同时其蛋白水平与Fas介导的细胞凋亡相关,DHX32蛋白可能通过调节c-FLIP参与了T淋巴细胞的凋亡过程³³。这些研究结果说明DHX32与细胞增殖分化及细胞凋亡等过程的关系十分密切。

本课题组前期在筛选结肠癌进展和转移特异性标志物的实验中,应用基因差异显示技术(DD-PCR)发现DHX32在结肠癌组织的表达水平高于癌旁,并且与结肠癌的癌栓形成、淋巴结转移、组织学分级以及Dukes分期密切相关,说明该基因的异常表达可能参与了结肠癌发生发展的过程³⁴。我们在进一步的细胞功能研究中又发现DHX32能够促进结肠癌细胞的增殖、侵袭和迁移,抑制化疗药物诱导的细胞凋亡;qPCR array分析结果显示,参与细胞增殖、凋亡和侵袭迁移等功能的相关基因受到DHX32的调控,其中包括了肿瘤血管生成因子VEGFA,提示我们DHX32可能通过VEGFA参与了肿瘤血管生成的调控³⁵。

1.3 本课题的研究目的和意义

基于上述研究背景和前期基础,本课题将继续在细胞水平、动物模型和组织水平探索 DHX32 诱导 VEGFA 表达的调控机制及其通过 VEGFA 促进肿瘤血管生成的作用,进一步扩充 DHX32 的细胞功能和调控网络,为研究结肠癌发生发展的分子机理、寻找诊断治疗的靶点和方法提供新的思路 and 理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞

人结肠癌细胞SW480为本实验室保存细胞株，人脐静脉内皮细胞HUVEC购买于和元生物技术（上海）有限公司。课题组前期已构建了稳定敲低和过表达DHX32的SW480细胞及其相应的对照稳转细胞株，分别命名为DHX32 shRNA和Control shRNA、DHX32和NC。

2.1.2 菌株和质粒

Escherichia coli DH-5 α 、BL-21为本实验室保存的菌株。

实验中所用质粒：Flag-DHX32、His-DHX32和GST- β -catenin由本实验室构建和保存。 β -catenin、pTOPFLASH和pFOPFLASH由李博安教授惠赠；pRL-TK由王洪睿教授惠赠。

2.1.3 组织标本

人结肠癌组织和癌旁组织标本均取自2009-2013年厦门大学附属中山医院原发性结肠癌手术患者，所有组织标本经过病理检查确诊为结肠癌，患者术前未接受放、化疗。石蜡切片由厦门大学附属中山医院病理技术人员制备。组织标本的索取获得病人知情同意，且本研究已获得厦门大学附属中山医院伦理委员会的批准。患者的临床病理特征统计详见表1，其中结肠癌的TNM分期标准依照2010年美国癌症联合委员会（AJCC）/国际抗癌联盟（UICC）颁布的结肠癌TNM分期系统（第七版）。

表1. 临床结直肠癌病理标本信息
 Table 1. Clinicopathological characteristics of colorectal cancer samples

变量	例数
性别	
男	78
女	61
缺失	0
年龄	
≤50	37
>50	102
缺失	0
T 分期	
1+2+3	30
4	94
缺失	15
淋巴结侵犯	
有	73
无	51
缺失	15
远处转移	
有	98
无	25
缺失	16
分化程度	
低分化	60
中分化	51
高分化	22
缺失	6
神经侵犯	
有	44
无	90
缺失	5
脉管侵犯	
有	60
无	76
缺失	3

2.1.4 化学试剂和抗体

实验中所用的主要试剂、抗体及其商品信息如表2和表3所示。

表2: 主要试剂及来源

Table 2. Materials

试剂名称	货号	生产厂家
总 RNA 提取试剂盒	DP419	TIANGEN
逆转录试剂盒	A5001	PROMEGA
SYBR Premix EX Taq™ II kit	RR820A	TaKaRa
DMEM 高糖培养基	SH30022.01B	HYCLONE
RPMI 1640培养基	SH30809.01B	HYCLONE
FBS	P30-3302-P150104	PAN
Penicillin-Streptomycin	091670249	MP
胰酶(0.25% EDTA)	25200056	LIFE
广谱蛋白酶抑制剂	AR1182	BOSTER
30% 丙烯酰胺	A1010	Solarbio
BSA	A8020	Solarbio
APS	A8090	Solarbio
SDS	L5750	Sigma
Glycine	GAS	Solarbio
氯化钠	LHN-500G	国药集团
Tween-20	T8220	Solarbio
Tris	T8060	Solarbio
TEMED	T-8133	Biosharp
PageRuler Prest Protein Ladder	26616	FERMENTAS
ECL 化学发光液	K-12045	Advansta
DMSO	D2650	Sigma
质粒小提试剂盒	DP103	TIANGEN
ViaFect 转染试剂盒	E4981	Promega
4% 多聚甲醛	AR1069	BOSTER
Millicell EZ Slide	PEZGS0416	Millipore
Matrigel 细胞侵袭小室	354480	BD
<i>In vitro</i> angiogenesis kit	ECM625	Millipore
protein A/G beads	sc-2003	Santa Cruz
Glutathione Sepharose	28-9365-50	GE
Ni Sepharose	17-5318-01	GE
Dual-Glo Luciferase Assay	E1910	Promega
human VEGF ELISA kits	EK0575	BOSTER
ChIP kit	17-371	MILLIPORE
柠檬酸组织抗原修复液	MVS-0100	Maxim
抗体稀释剂	ABD-0030	Maxim
HRP anti-Rabbit IHC Kit	KIT-5004	Maxim
DAB 显色试剂盒	DAB-0031	Maxim

表3: 主要抗体及来源

Table 3. Antibodies

抗体名称	货号	生产厂家
Anti-DHX32 antibody	ab85459	Abcam
Anti-DHX32 antibody	HPA048872	Sigma
Anti-CD31 antibody	Ab28364	Abcam
Anti-VEGFA	ab46154	Abcam
Anti- β -catenin antibody	8480	Cell Signaling
Anti-ub antibody	3933	Cell Signaling
Anti- β -Actin	BM0627	BOSTER
Goat anti-rabbit IgG-HRP	BA1054	BOSTER
Goat anti-mouse IgG-HRP	BA1050	BOSTER
Alexa Fluor 555-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody	A-31572	Life Technologies
Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody	A-21202	Life Technologies

2.1.5 主要实验仪器

实验中所用的主要仪器及其信息如表4所示。

表4: 主要仪器

Table 4. Equipment

名称	厂家
CO ₂ 恒温培养箱	Thermo
高压灭菌锅	HIRAYAMA
ABI 7500荧光定量PCR扩增仪	ABI
垂直电泳仪	BIO-RAD
水平电泳仪	BIO-RAD
转膜系统	BIO-RAD
FluorChem HD2凝胶成像系统	ProteinSimple
高速离心机	Beckman
正置显微镜	Beckman
倒置荧光显微镜	OLYMPUS
激光共聚焦显微镜	Zeiss
Multiskan FC 酶标仪	Thermo

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

SW480 细胞及其稳转细胞用含有 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 1640 培养基培养。HUVEC 细胞用含有 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100

U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基进行培养。细胞培养箱的培养条件为 37 °C、5% CO₂、95% 的空气饱和湿度环境。

2.2.2 条件培养基的收集

用 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养相同密度的 SW480 稳转细胞 24 h 后换成 0.2% FBS 的 RPMI 1640 继续培养 24 h，培养基经 0.22 μm 的过滤器过滤收集，保存于 -20 °C。

2.2.3 细胞转染

2.2.3.1 过表达质粒瞬时转染

首先将细胞接种到细胞培养板中，第二天转染前细胞密度达到 70 至 80%。用无血清培养基将 DNA 稀释到 2 μg/100 μl，然后按照转染试剂：DNA=3：1 的比例加入 Viafect 转染试剂，室温静置 15 min 后滴入细胞培养液中，置于 CO₂ 培养箱中培养，24 至 48 h 后检测转染效率。

2.2.3.2 siRNA 瞬时转染

首先将细胞接种到细胞培养板中，第二天转染前细胞密度达到 70 至 80%。以 6 孔板为例，用无血清培养基将 siRNA 稀释到 300 ng/100 μl，加入 12 μl Hiperfect 转染试剂，室温静置 10 min 后滴入细胞培养液中，培养 24 至 48 h 后检测敲低效率。

2.2.4 RT-qPCR

2.2.4.1 总 RNA 提取

以 12 孔细胞培养板为例：(1) 吸去细胞培养板中的培养基，每孔加入 500 μl TRizol，吹打数次混匀，室温放置 5 min 后，收集裂解液于 1.5 ml Eppendorff 管中。(2) 按 1 ml TRizol/0.2 ml 氯仿的比例加入氯仿，剧烈振摇 15 s，室温孵育 3 min。(3) 12,000 g，4 °C，离心 15 min 之后样品分为三层，RNA 在上层水相中，小心将上层水相转入新的 Eppendorff 管中。(4) 往含上层水相的 Eppendorff 管中加入异丙醇 (1 ml TRizol/500 μl 异丙醇)，室温孵育 10 min。(5) 12,000 g，4 °C，离心 10 min，弃上清，管底的沉淀为 RNA。(6) 加入 500 μl 75% 乙醇，上下颠倒洗涤管壁，7,500 g，4 °C，离心 5 min，弃上清。(7) 开盖室温干燥 5 min，加入 10 μl RNase free dd H₂O 溶解沉淀。

2.2.4.2 逆转录 PCR

(1) 向 RNase-free 的 EP 管中分别加入 Nuclease-Free water 6 μl, Oligo(dT)Primer

1 μl , Random Primers 1 μl 和 RNA 2 μl , 总体积为 10 μl ; 置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min; 冰上冷却 5 min。(2) 依次加入 MgCl_2 2 μl , 5 \times Reaction Buffer 4 μl , Recombinant RNase Inhibitor (20 U/ μl) 1 μl , PCR Nucleotide Mix (10 mM) 0.4 μl , RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μl) 1 μl 和 Nuclease-Free Water 1.6 μl , 总体积 10 μl 。(3) PCR 反应条件为: 25 $^{\circ}\text{C}$, 5min; 42 $^{\circ}\text{C}$, 60min; 70 $^{\circ}\text{C}$, 15min。

2.2.4.3 RT-PCR

首先在PCR八联管中加入20 μl PCR反应混合液, 体系如下: Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2 \times) 10 μl , 正向引物 (10 μM) 0.4 μl , 反向引物 (10 μM) 0.4 μl , ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μl , Nuclease-Free Water 6.8 μl , 最后加入2 μl cDNA, 充分混匀后置于ABI 7500进行PCR反应。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, (95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 34 s) \times 45 cycles, 60 $^{\circ}\text{C}$ 时采集荧光信号绘制熔解曲线。实验中所用的引物序列如下:

DHX32:

sense: 5' GTCTTTCCATCCACTACCAGCAC

antisense: 5' ATGATGACCCCATAGCTACCCAA

β -Actin:

sense: 5' TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA

antisense: 5' CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

VEGFA:

sense: 5' AGGGCAGAATCATCACGAAGT

antisense: 5' AGGGTCTCGATTGGATGGCA

β -catenin:

sense: 5' CATCTACACAGTTTGATGCTGCT

antisense: 5' GCAGTTTTGTCAGTTCAGGGA

2.2.5 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与 Western blot 分析

以 12 孔细胞培养板为例: 吸去细胞培养板中的培养基, 每孔加入 100 μl lysis buffer, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 10 min。细胞完全裂解后, 收集细胞裂解液于 1.5 ml Eppendorff 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 rpm, 离心 10 min。从上清中取出 60 μl 转移到新管, 加入 20 μl 的 4 \times loading buffer, 样品加热至 95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 5 min, 使蛋白质变性, 制备好的样品可用于 Western blot 分析, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

将制备好的蛋白样品加入到所需浓度的 SDS-PAGE 胶中进行电泳分离目的蛋白。首先以 90 V 电压使蛋白样品在上层胶中进行压缩，进入下层胶以后加大电压至 120 V 进行蛋白分离。待样品中的溴酚蓝条带迁移到凝胶底部时，去除上层浓缩胶，将下层分离胶上的蛋白通过电转印系统转移到预先用甲醇激活的合适孔径的 PVDF 膜上，以 400 mA 的电流湿法转印 1 h。转印完成后取出 PVDF 膜放入 5% BSA 中，室温封闭 30 min。加入目的蛋白相应的一抗溶液，4 °C 孵育过夜，然后用 TBST buffer 洗 3 次，每次 5 min。加入相应的偶联了辣根过氧化物酶的二抗溶液，室温孵育 1 h，然后用 TBST buffer 洗 3 次，每次 5 min。最后将 PVDF 膜放置于 ECL 溶液中浸润 2 min，用凝胶成像分析系统分析目的蛋白的化学发光信号。

2.2.6 细胞侵袭实验

采用 BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber 进行细胞侵袭实验，根据聚碳酸酯膜双面被 Matrigel 包被后，可体外模拟细胞外基质（ECM）环境，通过计数穿过铺 Matrigel 胶小室的细胞数量来评价 HUVEC 细胞的体外侵袭能力，具体步骤如下：（1）平衡：将 RPMI 1640 培养液加入细胞培养板和小室中，孵育过夜水化基底膜；（2）消化 HUVEC 细胞，重悬到无血清 DMEM 培养基中，调整细胞浓度为 1.5×10^5 个/ml。上室加入 500 μ l 细胞悬液，下室加入 700 μ l 条件培养液，37°C 培养 12 h；（3）取出小室，吸干上室液体，用 PBS 洗一遍，甲醇室温固定 30 min；（4）PBS 洗三次，室温下倒置风干，结晶紫室温染色 15 min；（5）用水清洗数次，用湿棉棒小心擦去上室底部未穿过去的细胞。充分晾干后，置于显微镜下计数拍照。

2.2.7 划痕愈合实验

（1）将 HUVEC 细胞接种到 6 孔细胞培养板中培养 24 h；（2）用 200 μ l 的枪头在单层培养细胞上轻轻划痕，枪头始终保持与 6 板细胞培养孔的底部垂直；（3）用 PBS 洗去脱落的细胞，加入 2 ml 条件培养基进行培养；（4）分别在划痕 0 h 及 24 h 后置于显微镜拍照。

2.2.8 MTS 法检测细胞增殖

（1）将 HUVEC 细胞接种到 96 孔细胞培养板中，15000 个细胞/孔，每孔加入 100 μ l 条件培养基培养 48 h；每组 5 个复孔，并以培养基作为空白对照；（2）每孔加入 20 μ l MTS 试剂，培养箱内孵育 2 h；（3）用酶标仪测定在 450 nm 处的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库