

学校编码: 10384
学号: 32320141153393

分类号____ 密级____
UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

ST5 在乳腺癌细胞系中的功能及机制探索

The function and mechanism of ST5 in breast cancer

李明莉

指导教师名称: 曾骥孟教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2017年04月

论文答辩日期: 2017年05月

学位授予日期: 2017年 月

答辩委员会主席: __

评阅人: __

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录	
第 1 章 前言	4
1.1 乳腺流行病学研究与发病机制	4
1.2 组织芯片技术	5
1.3 DNA 甲基化	5
1.3.1 DNA 甲基化简介.....	5
1.3.2 DNA 甲基化与癌症.....	6
1.3.3 DNA 甲基化与乳腺癌.....	7
1.4 ST5 基因简介	8
1.5 MAPK 信号通路	9
1.5.1 ERK1/2 基因简介.....	9
1.5.2 P38 基因简介.....	9
1.5.3 JNK1 基因简介.....	10
1.5.4 MAPK 信号通路功能.....	10
第 2 章 材料与方法	12
2.1 材料	12
2.1.1 细胞系、组织、质粒、感受态细菌.....	12
2.1.2 实验常用试剂.....	12
2.1.3 所用主要耗材与仪器.....	14
2.1.4 实验所用抗体.....	15
2.1.5 试剂制备方法.....	16
2.1.5.1 分子克隆的主要试剂制备方法.....	16
2.1.5.2 Western blot 主要试剂制备方法.....	17
2.1.5.3 细胞培养所用主要试剂制备方法.....	18
2.1.5.4 免疫组化所用试剂配制方法.....	18
2.2 方法	19
2.2.1 ST5 过表达载体质粒的构建.....	19

2.2.1.1 ST5 的引物合成.....	19
2.2.1.2 Trizol 法提取细胞总 RNA.....	19
2.2.1.3 cDNA 的制备.....	20
2.2.1.4 PCR 扩增 ST5 片段	20
2.2.1.5 琼脂糖凝胶电泳.....	22
2.2.1.6 PCR 产物胶回收.....	22
2.2.1.7 DNA 质粒小提回收.....	23
2.2.1.8 DNA 质粒中提回收.....	24
2.2.1.9 DNA 纯化回收.....	25
2.2.1.10 感受态细胞的制备.....	25
2.2.1.11 DNA 限制性内切酶消化.....	26
2.2.1.12 DNA 的连接.....	26
2.2.1.13 DNA 的转化.....	27
2.2.1.14 ST5-pcDNA3.1(+)-质粒的构建过程.....	28
2.2.2 乳腺癌细胞的培养方法.....	29
2.2.2.1 乳腺癌细胞的复苏.....	29
2.2.2.2 乳腺癌细胞的培养.....	29
2.2.2.3 乳腺癌细胞的传代.....	30
2.2.2.4 乳腺癌细胞的冻存.....	30
2.2.3 乳腺癌细胞株的 RT-PCR 实验方法	31
2.2.4 乳腺癌细胞株的瞬时转染.....	32
2.2.5 siRNA 稀释.....	33
2.2.6 乳腺癌细胞株 siRNA 转染.....	33
2.2.7 稳转细胞系的筛选.....	34
2.2.8 WESTEN-BLOT 实验方法.....	34
2.2.8.1 胞/组织蛋白质样品的准备.....	34
2.2.8.2 分离胶和浓缩胶的配制方法.....	36
2.2.8.3 SDS-PAGE 电泳跑胶.....	37
2.2.8.4 SWESTEN-BLOT 转膜及孵育抗体.....	38
2.2.9 免疫组化实验方法	39

2.2.10 MTT 实验方法.....	40
2.2.11 PI 检测细胞周期实验方法.....	42
2.2.12 细胞凋亡检测.....	43
2.2.13 细胞划痕实验.....	44
2.2.14 Transwell 迁移实验.....	44
2.2.15 MSP 法检测乳腺癌细胞的 ST5 基因甲基化改变.....	46
2.2.15.1MSP 引物设计.....	46
2.2.15.2 细胞中总 DNA 的抽提.....	47
2.2.15.3DNA 纯化与亚硫酸盐修饰.....	48
2.2.15.4 聚合酶链反应.....	48
第 3 章 实验结果.....	50
3.1 不同恶性程度的乳腺癌细胞中 ST5 表达情况.....	50
3.2 乳腺癌组织样本中 ST5 的表达情况.....	51
3.3 乳腺癌病理组织学与 ST5 表达的关联性分析.....	51
3.4 ST5 过表达载体构建.....	52
3.5 筛选稳定转染的 ST5-pcDNA3.1(+)和 pcDNA3.1(+)空载的细胞系.....	54
3.6 转染 siRNA 干扰 ST5 的表达.....	54
3.7 上调或下调 ST5 对乳腺癌细胞系表型的影响.....	55
3.7.1 上调或下调 ST5 对乳腺癌细胞系增殖的影响.....	55
3.7.2 上调或下调 ST5 对乳腺癌细胞系迁移的影响.....	55
3.7.2.1 划痕实验	56
3.7.2.2 Transwell 迁移实验.....	56
3.7.3 上调或下调 ST5 对乳腺癌细胞系细胞周期的影响	57
3.7.4 上调或下调 ST5 对乳腺癌细胞系细胞凋亡的影响.....	58
3.8 DNA 甲基化对 ST5 在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中表达调控.....	59
3.8.1 去甲基化试剂 5-aza 处理 MDA-MB-231 细胞对 ST5 表达量影响..	59
3.8.2 去甲基化试剂 5-aza 处理 MDA-MB-231 细胞对细胞表型的影响....	59
3.8.2.1MTT 细胞增殖实验	60
3.8.2.2 Transwell 迁移实验.....	60
3.8.3 ST5 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化状态.....	61

3.8.4 ST5 介导的分子机制.....	62
第 4 章 讨论和展望.....	63
4.1 讨论.....	63
4.1.1 ST5 在乳腺癌样本和细胞系中的表达	63
4.1.2 乳腺癌病理分级与 ST5 表达的关联性分析.....	63
4.1.3 敲除或过表达 ST5 对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 表型影响....	63
4.1.4 去甲基化试剂 5-aza 处理 MDA-MB-231 细胞对 ST5 蛋白表达量的影响	64
4.1.5 去甲基化试剂 5-aza 处理 MDA-MB-231 细胞对细胞表型的影响	65
4.1.6 ST5 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化状态.....	65
4.1.7 ST5 介导的分子机制的探讨.....	65
4.2 展望	67
参考文献.....	69
硕士期间所发学术论文.....	75
致谢.....	76

Table of Contents

Chapter 1 Introduction.....	4
1.1 Epidemiology and pathogenesis of breast disease.....	4
1.2 Tissue microarray technology.....	5
1.3 DNA methylation	5
1.3.1 Introduction of DNA methylation	5
1.3.2 DNA methylation and tumor.....	6
1.3.3 DNA methylation and breast cancer.....	7
1.4 ST5 gene profile.....	8
1.5 MAPK signaling pathway.....	9
1.5.1 Introduction of ERK1/2.....	9
1.5.2 Introduction of P38	9
1.5.3Introduction of JNK1.....	10
1.5.3The function of MAPK pathway.....	10
Chapter 2 Materials and Methods.....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Cell lines, tissue,plasmid, bacteria.....	12
2.1.2 The main reagents.....	12
2.1.3 Equipment and consumable.....	14
2.1.4 Antibody used in experiment.....	15
2.1.5 Reagent preparation.....	16
2.1.5.1 Molecular cloning reagent preparation:.....	16
2.1.5.2 Western blot reagent preparation:.....	17
2.1.5.3 Reagent preparation for cell culture:.....	18
2.1.5.4 Reagent preparation for Immunohistochemistry:.....	18
2.2 Method.....	19
2.2.1 The construction of ST5 vector plasmid.....	19
2.2.1.1Synthesis of ST5 primer.....	19
2.2.1.2 Extracting total RNA cells by Trizol method.....	19
2.2.1.3 cDNA preparation	20

2.2.1.4 PCR amplification of ST5 fragment.....	20
2.2.1.5 Agarose gel electrophoresis.....	22
2.2.1.6 PCR product recoveryDNA	22
2.2.1.7 Recovery of DNA plasmid.....	23
2.2.1.8 DNA Plasmid Extraction.....	24
2.2.1.9 DNA purification recycling.....	25
2.2.1.10 The preparation of feeling state of cell.....	25
2.2.1.11 DNA restriction enzyme digestion.....	26
2.2.1.12 DNA connection.....	26
2.2.1.13 DNA transformation.....	27
2.2.1.14The construction ST5- pcDNA3.1 (+) plasmid.....	28
2.2.2 The cultivation of the breast cancer cells.....	29
2.2.2.1 The recovery of breast cancer cells	29
2.2.2.2 The cultivation of the breast cancer cells.....	29
2.2.2.3 The batches of breast cancer cells.....	30
2.2.2.4 The cryopreserved of breast cancer cells.....	30
2.2.3 RT-PCR experiment of the breast cancer cell lines.....	31
2.2.4 Transient transfection of the breast cancer cell lines.....	32
2.2.5 SiRNA dilution	33
2.2.6 SiRNA transfection of breast cancer.....	33
2.2.7 Screening of stable cells	34
2.2.8 Westen blot experimental method.....	34
2.2.8.1 Cell/tissue protein sample preparation.....	34
2.2.8.2 Dispensing method of separation and enrichment adhesive.....	36
2.2.8.3 Sds-page electrophoresis.....	37
2.2.8.4 Transfer film and antibody incubation.....	38
2.2.9 Immunohistochemical method	39
2.2.10 MTT method.....	41
2.2.11 PI Method to detect the cell cycle experiment.....	42
2.2.12 Apoptosis detection.....	43
2.2.13 Cell scratch test.....	44
2.2.14 Transwell migration experiment	44
2.2.15 Detection of methylation of ST5 gene in breast cancer cells by.....	46
2.2.15.1 MSP primer design	46

2.2.15.2 DNA extraction in cells	47
2.2.15.3 DNA purification and bisulfite modification	48
2.2.15.4 polymerase chain reaction.....	48
Chapter 3 The Experimental Results.....	50
3.1 Expression of ST5 in breast cancer cells with different degrees of malignancy.....	50
3.2 Expression of ST5 in breast cancer tissue samples.....	51
3.3 Correlation analysis of histopathology and ST5 expression in breast cancer	51
3.4 Construction of ST5 expression vector.....	52
3.5 Stable transfection of ST5-pcDNA3.1 (+) and pcDNA3.1 (+) cell lines ..	54
3.6 Transfection of siRNA interference ST5 expression.....	54
3.7 Effects of up regulation or down regulation of ST5 on the phenotype of breast cancer cell lines	55
3.7.1 Effects of up regulation or down regulation of ST5 on proliferation of breast cancer cell lines.....	55
3.7.2 Effects of up regulation or down regulation of ST5 on the migration of breast cancer cell lines.....	55
3.7.2.1 Scratch test	56
3.7.2.2 Transwell Migration Experiment.....	56
3.7.3 Effect of up regulation or down regulation of ST5 on cell cycle of breast cancer cell line.....	57
3.7.4 Effect of up regulation or down regulation of ST5 on apoptosis of breast cancer cell line.....	58
3.8 Regulation of ST5 expression in breast cancer cell line MDA-MB-231 by DNA methylation.....	59
3.8.1 Effect of demethylation reagent 5-aza on ST5 expression in MDA-MB-231 cells.....	59
3.8.2 Effect of 5-aza on cell phenotype of MDA-MB-231 cells treated with demethylation reagent.....	59
3.8.2.1 MTT cell proliferation assay.....	60
3.8.2.2 Transwell Migration Experiment.....	60
3.8.3 Methylation status of 5 'CpG island in the promoter region of ST5	

gene.....	61
3.8.4 Molecular mechanisms mediated by ST5.....	62
Chapter 4 discussed and prospected.....	63
4.1 Discuss.....	63
4.1.1 Expression of ST5 in breast cancer samples and cell lines	63
4.1.2 Analysis of correlation between pathological grade and ST5 expression in breast cancer	63
4.1.3 Effects of knockdown or overexpression of ST5 on the phenotype of breast cancer cell line MDA-MB-23.....	63
4.1.4 Effect of demethylation reagent 5-aza on the expression of ST5 protein in MDA-MB-231 cells	64
4.1.5Effect of 5-aza on cell phenotype of MDA-MB-231 cells treated with demethylation reagent.....	65
4.1.6Methylation status of 5 'CpG island in the promoter region of ST5 gene.....	65
4.1.7 Molecular mechanism of ST5 mediated.....	65
4.2 Prospected.....	67
References.....	69
academic papers.....	75
Acknowledgement.....	76

摘要

背景和目的: 近期的研究发现 ST5 是参与肿瘤生物学过程, 与肿瘤相关的基因。目前, 尽管 ST5 在肿瘤中有过报道, 但研究相对较少, 尤其是在乳腺癌中, 因此, 深入研究 ST5 与乳腺癌的发生、发展的关系具有十分重要的意义, 可以为乳腺癌治疗提供更可靠依据。本课题研究目的旨在通过分子生物学等方法对 ST5 在乳腺癌发生、发展过程中的作用与生物学功能的调控进行初步探索。

方法和结果: 首先运用 Western Blot 和 RT-PCR 方法检测了 ST5 在不同恶性程度的乳腺癌中 mRNA 和蛋白的表达水平, 发现随着细胞恶性程度的增加, ST5 的 mRNA 和蛋白的表达量显著下降。通过免疫组织化学染色显示, ST5 在乳腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织, 且与乳腺癌病理分级呈负相关性。通过上调或下调 ST5 的表达, 通过 MTT、划痕实验、transwell、流式细胞检测法, 验证了 ST5 可能在肿瘤发展中扮演重要的角色, 发挥肿瘤抑制的生物学作用。甲基化是引起肿瘤抑癌基因失调的重要原因, 用去甲基化试剂 5-aza 处理 MDA-MB-231 细胞后, Western Blot 实验显示 ST5 的蛋白表达量显著上升, MTT、transwell 说明细胞功能的抑制作用得到解除。同时, 利用 MSP 实验也证明 MDA-MB-231 中 ST5 基因启动子区 5'CpG 岛发生了异常高甲基化。上调 ST5 表达后, ERK1/2 蛋白的磷酸化水平显著降低, 而总蛋白水平没有明显变化。

结论: ST5 可能通过抑制 ERK1/2 蛋白磷酸化水平, 以封闭 MAPK 信号通路, 从而抑制乳腺癌细胞系的增殖、迁移, 促进细胞凋亡, 发挥抑癌基因的生物学作用; 因而可能作为一个肿瘤治疗的潜在靶基因, 为进一步揭示了乳腺癌的发病的分子机制提供依据。

关键词: 乳腺癌; ST5; MAPK 信号通路;

Abstract

Background and Aims: ST5 is a tumor related gene involved in tumor biology. At present, although ST5 has been reported in tumors, but relatively few studies, especially in breast cancer, therefore, has very important significance in the occurrence and development of the relationship between the in-depth study of ST5 and breast cancer, can provide more reliable basis for the treatment of breast cancer. The purpose of this study was to explore the role of ST5 in the occurrence and development of breast cancer cells and the regulation of biological functions by using molecular biology methods.

Methods and Results: First, using Western Blot and RT-PCR method to detect the expression of ST5 mRNA in different malignant degree of breast cancer and protein, it is found that with the increase of malignant transformation of cells, expression of mRNA protein and ST5 decreased significantly. Immunohistochemical staining showed that the expression level of ST5 in breast cancer tissues was significantly lower than that in adjacent tissues, and was negatively correlated with the pathological grade of breast cancer. The expression of ST5 was up-regulated or down regulated by MTT, scratch assay, Transwell and flow cytometry. The results indicated that ST5 might play an important role in tumor development and play a biological role in tumor suppression. The methylation of tumor suppressor gene causes cancer caused by important disorders, with demethylation agent 5-aza in MDA-MB-231 cells after treatment with Western, Blot showed significantly increased expression of ST5 protein, MTT and Transwell showed inhibition of cell function release. At the same time, it was also proved that the ST5 gene promoter region 5 'CpG island of MSP was abnormally methylated in MDA-MB-231. Up regulation of ST5 expression, the phosphorylation level of ERK1/2 protein was significantly reduced, but the total protein level was not significantly changed.

Conclusion: ST5 may inhibit the phosphorylation of ERK1/2 protein, to close the MAPK signaling pathway, thereby inhibiting breast cancer cell proliferation, migration, apoptosis, play a biological role of tumor suppressor genes; potential target genes and thus may be used as a cancer treatment, provide the basis for further research to reveal the molecular mechanisms of the pathogenesis of human milk is low the differentiation of gastric adenocarcinoma.

Key words: breast cancer ; ST5; MAPK signaling pathway;

厦门大学博硕士论文摘要库

第 1 章 前言

1.1 乳腺癌的流行病学研究和发病机制

在乳腺癌患者中，多以女性为主，男性乳腺癌患者仅占 1-2%左右；乳腺癌是女性癌症死亡的主要原因，据统计，每年超过一百万名女性被诊断患有乳腺癌 [1]，其发病率呈现逐年上升的趋势。在美国乳腺癌患者约占女性常见恶性肿瘤的 30%左右，是女性最为常见的恶性肿瘤。同样，有关广州、上海等沿海大城市的统计报告结果也显示，乳腺癌在我国也是威胁女性健康的主要因素。流行病学的调查显示，乳腺癌的发病高峰年龄在 40-50 岁之间；且同年龄组中，相对于已婚女性，未婚女性发病率较高。乳腺癌的发病为全球范围，北美洲、大洋洲多为高发区，其次是拉丁美洲、欧洲，发病率最低的是亚洲和非洲；且发病率存在明显的地区差异，与内陆地区相比，沿海地区的发病率和死亡率明显较高；此外，城市人群的发病率和死亡率高于农村地区；且总体来看，其发病率与死亡率的地区分布基本呈现一致。除此之外，乳腺癌的发病率也具有一定种族差异性，从全球范围看，白种人的发病率要高于黑种人；在我国，汉族人群发病率远远高于少数民族人群。

乳腺癌的发病机制是多种多样的，是一种多因素的疾病，目前认为除了遗传因素外，乳腺癌可因环境因素不同而不同，包括年龄、初潮年龄、初产年龄、胎次、哺乳期、更年期状态、绝经年龄、激素替代治疗、身体质量指数、身高、饮酒 [2]。虽然中国已开展早期乳腺癌的筛查，但是发病率和死亡率仍然呈显著上升趋势 [3]。作为一类异质性较高的恶性肿瘤，不同类型的乳腺癌在组织形态上、免疫表型、生物学行为以及治疗的效果上有着很大的不同；其中，三阴性乳腺癌由于组织分化极差，临床预后效果不佳，且容易出现局部复发以及向远端转移等特征，同时一旦复发转移，可供选择的治疗药物极少，目前医学上缺乏有效针对性的规范化治疗策略。自 20 世纪 70 年代以来，三苯氧胺（它莫西芬）已被广泛应用于一线治疗激素敏感性乳腺癌 [4, 5]，作为一种选择性雌激素受体（ER）调制器，它能够竞争性阻断雌激素诱导的 DNA 转录抑制因子，从而破坏细胞周期

调控, 实现细胞凋亡 [6, 7]; 然而, 超过 40%的乳腺癌患者在治疗开始时就出现了获得性耐药, 这意味着乳腺癌仍然有可能存在复发甚至转移。因此, 进一步弄清乳腺癌的发病机制, 为乳腺癌的分子分型与个体化诊疗提供科学的基础以及寻找新的治疗方法, 则显得尤为重要。

1.2 组织芯片技术

生物芯片技术已被广泛应用于疾病的发生与发展研究以及治疗过程追踪、后基因组学的分析、新药的开发等新领域。由于分布于芯片上的检测物质的不同, 从而将芯片分为分为基因芯片(gene chip)、蛋白质芯片(protein chip)、细胞芯片(cell chip) 和组织芯片(tissue chip, TMA)。作为生物芯片技术的重要分支, 组织芯片又称组织微阵列, 主要应用于检测在不同肿瘤、同一肿瘤不同类型以及同种类型肿瘤的不同发展阶段中的肿瘤相关基因的表达水平, 从而为进一步研究肿瘤的分化、转移、预后及复发, 提供了新的理论支持和决策依据。

生物芯片的基本原理是将多个不同组织样本以一定顺序排列在同一玻片上, 借助免疫组织化学(IHC)、原位杂交(ISH)以及荧光原位杂交(FISH)等原位组织检测技术, 从而可对同一指标进行研究分析。因其具有精确、高效、易于标准化、信息量大、可比性强等优点, 使其广泛应用于临床、科研领域 [8]。

1.3 DNA 甲基化

1.3.1 DNA 甲基化简介

表观遗传学(epigenetics)是遗传学科的一门分支, 参与基因表达调控, 在细胞生长、分化、凋亡以及正常功能方面具有重要的意义[9, 10], 主要包括 DNA 甲基化、基因沉默、基因组印记、组蛋白修饰及非编码 RNA 等; 其在不改变 DNA 序列的条件下, 对个体的生长、发育、基因组稳定性以及基因的表达模式有着重要的调控作用, 同时在肿瘤的发生、发展以及炎症的发生中具有十分重要的作用 [11, 12], 是生命科学领域新的研究热点之一。作为最常见的表观遗传修饰 [13, 14], DNA 甲基化对于基因沉默、X 染色体的失活是至关重要的[15], 基因启动

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