

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720091152165

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

环氧二烯 Mycoepoxydiene 在抑制胆管癌发
生发展中的作用及机理研究

The role of Mycoepoxydiene in inhibiting the progression of
human cholangiocarcinoma (CCA)

李 文 娇

指导教师姓名: 俞春东 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2012 年 05 月

论文答辩时间: 2012 年 06 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 06 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言	1
1.1 胆管癌	1
1.1.1 胆管癌的分类.....	1
1.1.2 胆管癌的发病原因.....	1
1.1.3 胆管癌发病的分子机制.....	2
1.1.4 胆管癌的侵袭能力.....	2
1.1.5 胆管癌的治疗现状.....	3
1.2 环氧二烯 Mycoepoxydiene	3
1.2.1.MED 的介绍.....	3
1.2.2 MED 的研究现状.....	4
1.3 细胞周期调控与肿瘤	4
1.3.1 细胞周期蛋白.....	5
1.3.2 周期蛋白依赖性蛋白激酶.....	6
1.3.3 周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制物.....	6
1.3.4 Cyclin、CDKs、CKIs 与肿瘤	7
1.4 细胞凋亡与肿瘤	7
1.5 肿瘤细胞迁移及 MMPs 家族	8
1.5.1 MMPs 家族结构及其在肿瘤迁移中的功能.....	8
1.5.2 与 MMPs 调控有关的信号通路.....	10
1.5.2.1 MAPKs 通路参与调控 MMPs 的表达	10
1.5.2.2 NF- κ B 通路参与调控 MMPs 的表达	11
1.6 本文立题背景、内容和意义	11
第二章 材料和方法	13

2.1 材料	13
2.1.1 菌株、细胞与质粒	13
2.1.1.1 菌株	13
2.1.1.2 细胞	13
2.1.1.3 质粒	13
2.1.2 主要试剂	13
2.1.3 主要仪器	15
2.2 方法	16
2.2.1 DNA 相关实验及方法	16
2.2.1.1 大肠杆菌感受态细胞的制备和 DNA 转化	16
2.2.1.2 质粒 DNA 的提取	17
2.2.2 RNA 相关实验及方法	17
2.2.2.1 RNA 的提取	17
2.2.2.2 反转录合成 cDNA	18
2.2.2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)	19
2.2.3 蛋白质相关实验及方法	19
2.2.3.1 蛋白质样品制备	19
2.2.3.2 蛋白质浓度测定 (BCA 法)	20
2.2.3.3 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析	20
2.2.4 细胞相关实验及方法	21
2.2.4.1 细胞培养及传代	21
2.2.4.2 细胞瞬时转染	22
2.2.4.3 细胞毒性实验 (MTT 法)	22
2.2.4.4 细胞荧光素酶活性检测	22
2.2.4.5 细胞侵袭实验 (Transwell 法)	23
2.2.4.6 明胶酶谱实验	24
2.2.4.7 DAPI 染色实验	24
第三章 结果与讨论	26
3.1 实验结果	26

3.1.1 MED 对胆管癌细胞生长的影响.....	26
3.1.2 MED 通过诱导胆管癌细胞的凋亡影响其生长.....	26
3.1.3 MED 对胆管癌细胞侵袭能力的影响.....	28
3.1.4 MED 对胆管癌细胞表达基质金属蛋白酶（MMPs）的影响.....	30
3.1.5 MED 明显抑制 TPA 诱导的 NF- κ B 信号通路.....	32
3.1.6 MED 明显抑制 TPA 诱导的 IKK 及 I κ B α 的磷酸化.....	33
3.2 分析与讨论.....	34
参考文献	36
致谢.....	39

厦门大学博士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

Abstract (Chinese)	I
Abstract (English)	II
INTRODUCTION	1
1.1 Cholangiocarcinoma(CCA)	1
1.1.1 Classification of CCA	1
1.1.2 Predisposing factors of CCA	1
1.1.3 Molecular mechanism of CCA	2
1.1.4 Invasion ability of CCA	2
1.1.5 Present status of treatment for CCA.	3
1.2 Mycoepoxydiene	3
1.2.1 Introduction of MED.....	3
1.2.2 Present research status of MED	4
1.3 Modulation of cell cycle and tumorigenesis	4
1.3.1 Cyclin.....	5
1.3.2 CDKs.....	6
1.3.3 CKIs	6
1.3.4 Cyclin、CDKs、CDKIs in cancer	7
1.4 Cell apoptosis and cancer	8
1.5 Tumor metastasis and MMPs family	8
1.5.1 Structure of MMPs and their function in cancer.....	9
1.5.2 Relative signaling pathways in regulating MMPs	10
1.5.2.1 MAPKs regulates the expression of MMPs.....	10
1.5.2.2 NF- κ B regulates the expression of MMPs.....	11
1.6 Background, content and significance of this thesis	11
MATERIALS AND METHODS	13
2.1 Materials	13
2.1.1 Strains, cell and plasmids.....	13
2.1.1.1 Strains	13
2.1.1.2 Cell	13

2.1.1.3 Plasmids.....	13
2.1.2 Major reagents	13
2.1.3 Major equipments	15
2.2 Methods	16
2.2.1 DNA experiments	16
2.2.1.1 Preparation of competent cell and transformation	16
2.2.1.2 Plasmid isolation	17
2.2.2 RNA experiments.....	18
2.2.2.1 RNA isolation.....	18
2.2.2.2 Reverse transcription.....	18
2.2.2.3 Real-time PCR.....	19
2.2.3 Protein experiments	19
2.2.3.1 Preparation of protein samples	19
2.2.3.2 Measurement of protein concentration	20
2.2.3.3 SDS-PAGE and Western blotting analysis	20
2.2.4 Cell experiments	21
2.2.4.1 Cell culture and generation.....	21
2.2.4.2 Transient transfection	22
2.2.4.3 MTT assay	22
2.2.4.4 Luciferase assay.....	22
2.2.4.5 Transwell Invasion	23
2.2.4.6 Gelatin Zymography.....	23
2.2.4.7 DAPI staining experiment	24
RESULTS AND DISCUSSION	26
3.1 Results.....	26
3.1.1 The effect of MED on CCA cells growth	26
3.1.2 MED suppressed CCA cells growth by inducing apoptosis	26
3.1.3 The effect of MED on CCA cells invasion ability.....	28
3.1.4 The effect of MED on the expression of MMP-9 in CCA cells	30
3.1.5 MED significantly inhibited the TPA-induced NF- κ B signaling pathway..	32
3.1.6 MED significantly inhibited the TPA-induced phosphorylation of IKK and	

I κ B α	33
3.2 ANALYSIS AND DISCUSSION	34
REFERENCES.....	36
ACKNOWLEDGEMENT	40

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

环氧二烯 (MED) 是海洋木栖真菌菜豆间坐壳菌 (*Diaporthe phaseolorum*) 的次级代谢产物, 是一个以含有氧桥的八元环二烯为骨架的化合物, 已有研究发现其具有很好的抗肿瘤活性, 但是该化合物在胆管癌发生和发展过程中的作用并不清楚, 我们用胆管癌细胞株 SK-ChA-1 和 Mz-CHA-1 通过细胞水平首次揭示了 MED 在胆管癌中的抗肿瘤活性。

首先我们通过 MTT 试验发现 MED 显著抑制胆管癌细胞的生长, 这提示我们 MED 在胆管癌中可能具有良好的抗肿瘤活性。接着我们进一步研究了 MED 抑制胆管癌细胞生长的机理。通过 Western blotting 实验我们发现 MED 显著诱导胆管癌细胞的凋亡, 并且上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-X_L 的表达; 另外, 我们也检测到 MED 明显上调细胞周期重要调控因子 P21 的表达。这提示我们 MED 不仅通过诱导凋亡来抑制胆管癌细胞的生长, 可能也通过抑制增殖来影响其生长, 其具体的机理有待进一步研究。胆管癌细胞具有很强的侵袭能力, 是导致患者术后存活率很低的一个重要因素, 因此我们也检测了 MED 对于胆管癌细胞侵袭能力的影响。Matrigel 侵袭实验显示 MED 显著抑制 TPA 诱导的胆管癌细胞的侵袭。进一步实验证实, MED 通过抑制 TPA 诱导的 NF- κ B 通路活性来抑制 MMP-9 的表达, 从而降低胆管癌细胞的侵袭能力。

综上所述, MED 可以促进胆管癌细胞的凋亡, 同时可通过抑制 NF- κ B 信号通路来抑制 MMP-9 的表达从而抑制胆管癌细胞的侵袭能力。所以, MED 可以有效地抑制胆管癌的发生与发展, 发挥较为理想的抗肿瘤活性。本研究为进一步将 MED 开发成为一种抗肿瘤药物提供了一定的理论依据。

关键词: 环氧二烯; 凋亡; 侵袭

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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.

厦门大学博硕士论文摘要库