

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720081152604

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**miR-574-5p 负调控肿瘤抑制基因 *Qki6/7* 以
影响结肠癌发生发展的机制研究**

**miR-574-5p negatively regulates tumor suppressors *Qki6/7*
to impact the development of colon cancer**

张君

指导教师姓名: 杨云青 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 年 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 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（ 杨云青 ）课题（组）的研究成果，获得（ 杨云青 ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ 杨云青 ）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

摘 要	1
Abstract.....	2
缩略语对照表	3
第一章 前 言	4
1.1 结肠癌.....	4
1.2 MicroRNAs (miRNAs)	7
1.3 Quaking信号蛋白	14
1.4 细胞周期调控与肿瘤.....	22
1.5 立题目的及意义.....	27
第二章 材料与方 法	29
2.1 实验材料.....	29
2.2 实验方法.....	34
2.3 统计分析.....	50
第三章 结果与分析	51
3.1 C57BL/6J- <i>Apc</i> ^{Min} /J小鼠、人结肠癌组织中miR-574-5p表达水平上升, QKI 表达水平下降	51
3.2 在不同结肠癌细胞株中, 过表达miR-574 后QKI表达水平下降, 抑制 miR-574-5p后QKI表达水平上升	56
3.3 miR-574-5p调控 <i>Qki6/7</i> 3'UTR活性, 且识别位点具有特异性.....	64
3.4 通过下调miR-574-5p导致 <i>Qki</i> 表达升高进而抑制结肠癌细胞增殖	68
3.5 通过抑制miR-574-5p导致 <i>Qki</i> 表达升高, 或直接过表达 <i>Qki7</i> , 可影响SW-480 细胞周期	70

3.6 抑制miR-574-5p后与G1/S期阻滞相关的基因的变化	71
3.7 通过抑制miR-574-5p导致 <i>Qki</i> 上调, 抑制SW-480 细胞克隆形成和裸鼠成瘤能力	73
第四章 讨论	78
参考文献	82
在学期间研究成果	89
致谢	90

厦门大学博硕士学位论文摘要

Table of Content

Abstract (In Chinese)	1
Abstract (In English)	2
Abbreviations	3
Chapter I Introduction	4
1.1 1.1 Colorectal cancer	4
1.2 MicroRNAs (miRNAs)	7
1.3 Quaking	14
1.4 Modulation of cell cycle and tumorigenesis	22
1.5 Aims and significance of the proposed research project	27
Chapter II Materials and Methods	29
2.1 Materials	29
2.2 Exprimental methods	34
2.3 Statistical analysis	50
Chapter III Results and Analysis	51
3.1 The expression of miR-574-5p is up-regulated,and the expression of QKI is down-regulated in CRC tissue	51
3.2 Overexpression of miR-574-5p down-regulated the expression of QKI, inhibition of miR-574-5p up-regulated the expression of QKI	56
3.3 miR-574-5p control Qki6/7 3'UTR activity	64
3.4 Downregulation of miR-574-5p or upregulation of Qki7 inhibit SW-480 cell line growth	68
3.5 Downregulation of miR-574-5p or upregulation of Qki7 inhibit cell cycle	

of SW-480 cell line.....	70
3.6 Downregulation of miR-574-5p enhances the expression of PCNA	71
3.7 Downregulation of miR-574-5p or upregulation of Qki7 inhibit SW-480 cell line colony formation and tumorigenesis in nude mice	73
ChapteR IV Discussion	78
References.....	82
Publication.....	89
Acknowledgement.....	90

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

Quaking (QKI) 是信号转导和RNA活化蛋白家族 (STAR) 的一个信号蛋白, 在结肠癌组织中异常显著下调甚至缺失。最新研究表明, QKI可以通过调控p27和beta-catenin等, 影响Wnt信号转导、结肠上皮细胞的增殖与分化以及结肠癌的发生与发展, 提示*Qki*是结肠癌的一个肿瘤抑制基因。然而, QKI在结肠细胞中的表达的调控机制却不清楚。

我们在研究中发现, 在C57BL/6J-*Apc*^{Min/J}小鼠和结肠癌病人的结肠癌组织中, miR-574-5p的表达水平显著升高, 而QKI的表达水平恰与之相反且呈现负相关趋势。在小鼠、人结肠癌细胞中, 过表达miR-574-5p后QKI的mRNA和蛋白表达水平下降, 抑制miR-574-5p后QKI的mRNA和蛋白表达水平显著升高。由于QKI有多个异构体, 我们又对不同异构体对其进行分析, 发现miR-574-5p主要是通过调控*Qki6/7*, 进而影响结肠癌的发生和发展。在细胞水平上, 我们通过MTT、流式细胞术、克隆集落分析等多种手段, 验证了在敲降miR-574-5p后, *Qki*表达得到一定的恢复, 导致结肠癌细胞增殖能力、克隆形成能力下降。同时, 在裸鼠成瘤实验中, 我们也验证了抑制miR-574-5p后, QKI显著上调并表现出显著的抑癌作用。

通过研究miR-574-5p在结肠上皮细胞中调控*Qki*且参与结肠癌发生发展的机制, 可望揭示结肠癌发生发展的一个新机制, 相关机制的阐明也将为结肠癌的预防和治疗提供新的思路与方法。

关键词: QKI; 结肠癌; MicroRNAs

Abstract

The RNA-binding protein quaking (QKI) belongs to the evolutionarily conserved signal transduction and activation of RNA (STAR) family, which is significantly downregulated and even absent in some colon cancers. A recent study indicated that QKI is a tumor suppressor capable of suppressing the expression of beta-catenin to contribute to colon epithelial cell differentiation and colorectal tumorigenesis. However, the mechanisms of QKI regulation in colon cells are still unknown.

Here, we show that miR-574-5p expression is aberrantly elevated in C57BL/6J-*Apc*^{Min/J} mouse and human colon cancer tissues, whereas *Qki* is down-regulated in colon cancer tissues, which inversely correlates with the expression of miR-574-5p. Further investigation revealed that miR-574-5p overexpression significantly reduced the expression level of *Qki*, whereas the miR-574-5p inhibition up-regulated *Qki* expression. Moreover, we analyzed the expression of three Qki isoforms (QKI5, 6 and 7) and found that miR-574-5p may affect the occurrence and development of colon cancer mainly through targeting *Qki6/7*. *In vitro*, we also adopted MTT, flow cytometry, cloning formation and other means to verify the decrease of cell's proliferation, colony formation ability decreased after knocking down miR-574-5p. Finally, *in vivo*, we also demonstrated that after the inhibition of miR-574-5p, QKI was significantly increased to suppress the growth of xenografted tumor.

Taken together, these results indicate that miR-574-5p may exert its oncogenic function via targeting *Qki*. Our data suggest an important role of miR-574-5p in the molecular etiology of colon cancer that might serve as a molecular target for colon cancer therapy.

Key words: QKI; Colorectal cancer; MicroRNAs

缩略语对照表

缩略语	英文	中文
STAR	signal transduction and activation of RNA	信号转导与 RNA 激活复合体
5'UTR	5'-untranslated region	5'非翻译区
3'UTR	3'-untranslated region	3'非翻译区
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
miRNA	MicroRNA	微小 RNA
MBP	myelin basic protein	髓磷脂碱性蛋白
RLU	relative luciferase unit	相对荧光素酶单位
MTT	methyl thiazolyl tetrazolium	甲基噻唑基四唑
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
EDTA	ethylene diaminetetrasetie acid	乙二胺四乙酸
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
Tris	trimethylsilyl	三(羟甲基)氨基甲烷
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠

第一章 前言

1.1 结肠癌

结肠是一长管状结构，位于人体腹腔周边及骨盆腔之后。结肠包括升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和直肠。结肠癌是因结肠或直肠内细胞异常生长而形成的。在男女主要癌症的死亡原因顺序中，结肠癌占到第四位。在男性方面，仅次于肝癌、肺癌、胃癌；而女性方面，仅次于肺癌、肝癌和子宫颈癌。在欧美国家中，结肠癌的发生率与死亡率更高，如在美国结肠癌占全部癌症死亡原因的第二位，约为我国的二至三倍。年纪越大则患上结肠癌的机会越高，特别是50岁以上的人，60岁以上的老年人若患结肠癌则有50%会长结肠息肉^[1]。

结肠的任何部位都可能发生癌症，但以直肠发生癌症的机会最高，约占43%，其它部位依次是乙状结肠25%、升结肠15%、降结肠5%、横结肠3%。结肠癌有95%为腺癌，1%为鳞状细胞癌。癌细胞会持续生长，并逐渐扩散，结肠癌细胞可以由血液循环转移到身体的其它部位，如肝、肺、脑等，也可以由淋巴循环转移至邻近的淋巴结或淋巴腺^[2]。

根据TNM分类法（T代表原发性肿瘤、N代表局部淋巴结、M代表远端转移），结肠癌可分为0期至IV期。第0期，即原位肿瘤，肿瘤局限在上皮细胞层或只浸染到固有层；第I期，肿瘤浸染到黏膜下层或肌肉层，没有淋巴结及远端转移；第IIA期，肿瘤浸染至浆膜层，或浸染没有浆膜覆盖的结肠及直肠的周围组织，没有淋巴结及远端转移；第IIB期，肿瘤直接浸染至其它器官或组织，以及穿过腹膜的脏器层，没有淋巴结及远端转移；第IIIA期，不论肿瘤浸染的程度，有一至三个局部淋巴结转移；第IIIB期，有四个以上的局部淋巴结转移；第IV期，不论浸染及转移的程度，只要有远端转移的，一律称为第IV期。

1.1.1 结肠癌的发病机制

结肠癌的形成是由许多因素及多步骤地演变导致，主要认为与食物或者遗传有关。在食物方面，随着肉类、蛋白质、脂肪摄取量的提高，结肠癌有明显增加的趋势，病人的年龄趋势也逐渐下降。在遗传方面，结肠癌患者的子女患结肠癌的危险性比一般人群高2~4倍，约三分之一的结肠癌发生在一级亲属中有患结肠癌的人群中，因而对这些高危人群的筛查和诊断工作与降低结肠癌的发病率和病

死亡率密切相关。总而言之，结肠癌产生的原因主要包括以下因素：高动物脂肪和低纤维（如蔬果）的饮食习惯；缺乏运动；结肠长期发炎（又称溃疡性结肠炎）或长出息肉；家族中曾有人患上结肠直肠癌或遗传性肠病。这些危险因素与宿主间相互作用，最终导致细胞发生基因突变，失去正常功能，从而导致癌症发生^[3]。

在遗传变异过程中，涉及到的基因主要有 APC 途径的所有基因（APC, β -catenin 和 Axin），p53 途径基因（p53, MDM2 和 Bax）以及 RAS 途径基因（K-Ras 和 B-Raf）。除此之外，染色体遗传不稳定性（CIN）和卫星 DNA 遗传不稳定性（MIN）也扮演着重要的角色。

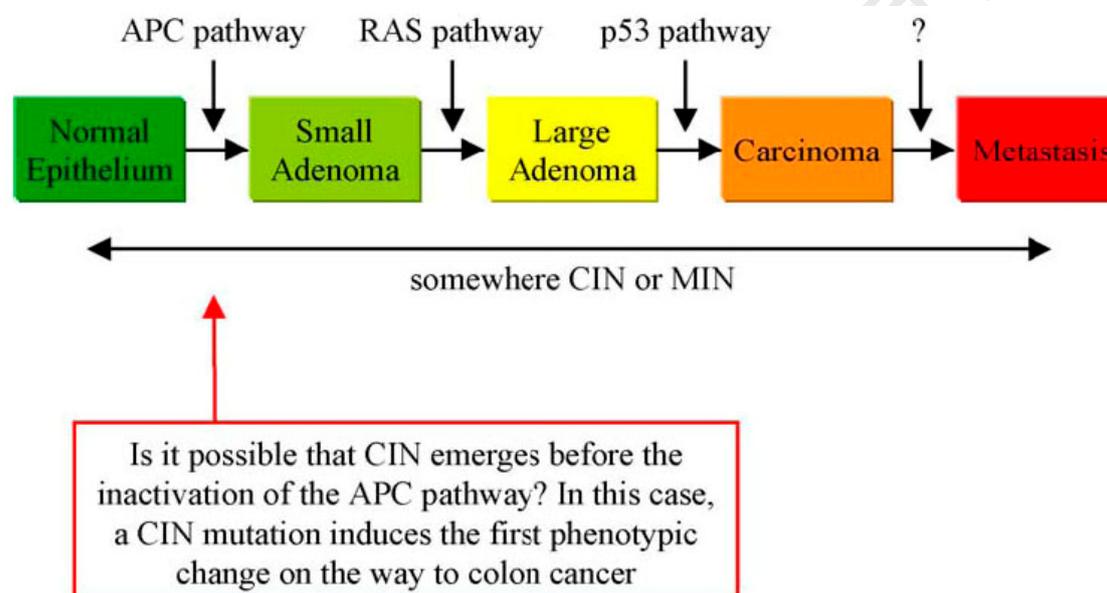


图 1 CRC 肿瘤发生发展的遗传模型^[4]

Fig. 1 Genetic model of CRC tumor development^[4]

(1) *APC* 基因

APC 基因是一个肿瘤抑制基因，位于染色体 5q21。其 cDNA 克隆系列分析显示为 8535 bp 生成的开放阅读框架，共有 21 个外显子，第 15 外显子最大，为 6571 bp，占该基因编码区的 75% 以上^[5]。该阅读架 5' 端含有一个甲硫氨酸密码子，其上游 9 bp 处有一框内终止密码子，3' 端有数个框内终止密码子。密码子第 1286-1513 号之间的 10% 左右的编码区集中了约 65% 体细胞的突变，被称为“突变密集区”

（MCR），MCR 位于第 15 外显子内。*APC* 蛋白的羧基末端常发生基因突变，表明该区域是主要抑制生长的。*APC* 基因突变是腺瘤发生的早期事件^[6]。

(2) *p53* 基因

p53 基因位于染色体 17P13 上，全长 16-20 kb，含有 11 个外显子和 10 个内含子，第 1 外显子不编码，外显子 2、4、5、7、8 分别编码 5 个进化上高度保守的结构区。它编码的产物是分子量为 53 kD 的核磷酸蛋白，具有转录因子的特性，调控细胞代谢，DNA 修复和合成及编排细胞的死亡等^[7]。

p53 基因变化最多见的是等位基因中一个缺失、另一个发生点突变，二者相伴行；但突变并不局限于伴等位基因缺失的肿瘤，也见于保留正常 17P 等位基因的一些肿瘤；超过 75% 结肠癌中存在着 17P 的大片段丢失。其次，突变多为错义突变。约 86% 突变集中在 4 个高度保守区，其中存在四个热点（175、248、273、251 位）。不同组织类型突变热点频率和分布不同、不同突变的 *p53* 等位基因具有不同生物学性质^[8]。*p53* 基因通过诱导细胞凋亡来触发细胞死亡，阻止具有癌变倾向的基因突变细胞的产生。*p53* 基因缺乏或突变可导致异常的基因表达，进而使细胞无限制生长。

(3) *ras* 基因

ras 基因是最早被确定的癌基因。其家族包括 H-*ras*，K-*ras* 和 N-*ras*，属于细胞内信号传导蛋白类原癌基因，其基因编码产物 p21 结构上类似于控制腺苷酸活化酶活性的 GN 蛋白，可分 GDP，GTP 结合并有 GTP 酶活性。当 *ras* 基因发生点突变而活化时，p21 蛋白可为细胞生长传递持续性促有丝分裂信号，导致细胞不断增殖，从而诱发肿瘤的发生，有报道其上的突变 85% 为 Ki-*ras* 第 12 或 13 位密码子点突变^[9]。Vogstein 等报道早期腺瘤为 7%，中期腺瘤为 57%，并认为 *ras* 基因突变发生于早期腺瘤向中期腺瘤转变阶段，可能是结肠癌恶变的始动基因^[10]。

1.1.2 结肠癌的治疗

结肠癌在治疗上主要以手术治疗为主，辅以局部或全身的化疗及放疗。对早期的结肠癌而言，外科手术切除常常是唯一的根除性治疗法。但是结肠癌手术后会有很多副作用，如暂时性的腹泻、还会影响男性病人的性功能等，且术后易复发及肝转移的问题，这是现在无法控制和难以根本解决的。根据医学统计，第 I 期的病人五年存活率可高达 90% 以上，第 II 期约为 70%，第 III 期为 50%，而第 IV 期愈后最糟，五年存活率也仅只 18% 左右。因此防治结肠癌的最佳方法就是定期检查，争取及早发现、及早治疗。通过在分子水平对大量人群结肠癌密切相关基因突变的鉴定，我们能及早发现哪些人群比较容易发生结肠癌，并及时采取措施

加以防范。

随着分子生物学技术的迅猛发展和对结肠癌发病机制认识的不断深入，结肠癌的基因治疗也越来越受到人们的重视，并且取得了一定的效果：

1、联合基因治疗：可克服单基因治疗时局部浓度不高，作用时间不长的缺点。将自杀基因与其他的目的基因联合应用以求增强疗效获得最佳抗肿瘤效果。

2、针对患者个体情况，采用联合基因治疗结合传统的手术、化学和放射疗法力求延长患者的生存时间，提高生活质量，这也是目前较为理想的综合治疗措施。

3、临床研究提示，抗血管内皮生长因子和抗表皮生长因子单克隆抗体在大肠癌早期的治疗中发挥着重要作用。

4、运用基因抑制预防性治疗大肠癌高危人群（如家族性腺瘤性息肉病），将成为预防大肠癌发生发展的重要手段。在运用传统的腺病毒、反转录病毒、质粒等基因载体的基础上研究更有效，更安全的载体将是下一阶段的研究重点。

5、肿瘤是多基因、多因素疾病，单个癌基因的抑制往往很难达到治疗效果。但RNAi技术能够同时抑制多个不同基因而且抑制效果互不干扰。此外，RNAi识别可以精确到一个核苷酸，对由野生型点突变形成的癌基因，如ras、p53等能够产生准确有效的封闭效果，野生型基因则不受影响。科学家预测，RNAi技术比基因敲除技术更方便快捷地显示出基因的功能，尤其有希望用于抑制癌基因或突变基因引起的癌症的基因治疗之中。

总之，结肠癌与其他恶性肿瘤一样，是在内外多因素影响下发生的多基因表达调控失调的一种个体化的疾病，因而设计出更为特异性的治疗方案极为重要。在病毒学，组织细胞学，分子生物学等基础学科不断发展的基础上，随着人们对结肠癌认识的不断深入和基因技术的日渐成熟，基因治疗将会成为治疗结肠癌的有效手段之一。

1.2 MicroRNAs (miRNAs)

1.2.1 miRNA 研究概况

近年来小RNA的研究是生物学研究的热点之一，2002年Science杂志评选的十大科技成就中，“Small RNA & RNAi”荣列年度榜首，同时Nature杂志亦将Small RNA评为年度重大科技突破之一，2003年，小RNA的研究再次入选“十大科技

突破”，2006年RNAi的研究获得了诺贝尔医学/生理学奖，小RNA研究的突破性进展成为生物医学领域近20年来可与人类基因组计划相提并论的最重大研究成果之一。随着RNAi技术在生命科学领域的广泛应用，siRNA早已为人们所熟知，而同属小分子RNA的miRNA则是近年来才逐渐得到认识，它作为普遍存在于动植物体内的一类调节内源性基因表达的因子，同时它在各种生理及病理过程中发挥重要作用。

1.2.2 miRNA 基因的发现

miRNA是一类新近发现的长度约18-25个核苷酸的内源性非编码单链小RNA分子，它通过与编码蛋白质的mRNA的3'UTR的互补序列进行碱基配对结合，发挥对基因表达的转录后调节作用^[11]。1993年，Lee等在研究秀丽小杆线虫发育缺陷时发现了第一个miRNA: lin-4，它虽然不编码蛋白质，但是它能从时序上调控线虫胚胎后期发育的基因^[12]。在2000年，Reinhart等人又在线虫中发现了第二个miRNA-let-7，它是一个异时性开关基因，let-7通过调控它的靶基因来控制着线虫从L4到成虫阶段的发育转变^[13]。此后，研究人员运用多种试验方法在人类^[14]、水稻^[15]、拟南芥^[16]、线虫^[17]、果蝇^[18]、小鼠^[19]等生物中鉴别出4000多个miRNA。

一个miRNA一般具有以下特点^[20]：

- 1、通过Northern blot或其它实验方法可检测到它的成熟miRNA即表达为特定的长度大约为22个核苷酸的转录本；
- 2、成熟miRNA来源的前体应具有发夹或折返的特征性二级结构，不含有大的内部环状结构和突起，且成熟的miRNA一般应位于发夹结构的茎部；
- 3、成熟的miRNA应由Dicer加工而成，在Dicer缺陷的突变体中可检测到miRNA前体的积聚增加^[21-23]；
- 4、在不同物种间成熟miRNA的序列和预测的发夹结构应是保守的^[24-26]。

最初发现的miRNA基因一般是通过反向遗传学方法和构建富集miRNA的cDNA文库进行克隆的^[27]。但是对于表达丰度比较低、具有阶段特异性或在罕见细胞类型中表达的miRNAs，利用这种克隆的方法比较难鉴定，而且某一些miRNA自身的物理特性如序列组成和转录后修饰等就使其更难于克隆，因此通过直接克隆来发现miRNA具有明显的局限性。然而，用已有的方法鉴定的miRNA

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫