

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720081152667

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**miR-297b 负调控 *Mllt3* 以影响 EL4 淋巴瘤
细胞增殖和在裸鼠中的成瘤能力**

**miR-297b negatively regulates *Mllt3* to impact
proliferation of EL4 lymphoma cells and tumor growth in
the nude mice**

张田甜

指导教师姓名: 杨云青 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 05 月

论文答辩时间: 2011 年 06 月

学位授予日期: 2011 年 06 月

答辩委员会主席: 林天伟 教授

评 阅 人: _____

2011 年 06 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): 张田甜

2011年06月07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 2014 年 6 月 30 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）：张田甜

2011 年 06 月 07 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
缩略语对照表	III
第一章 前言	1
1.1 淋巴瘤 (lymphoma)	1
1.2 miRNA	5
1.3 MLLT3	11
1.4 本文的研究目的及科学意义	15
第二章 材料与方法	17
2.1 实验材料	17
2.2 实验方法	24
2.3 数据处理与统计学分析	35
第三章 结果与分析	36
3.1 生物信息学分析	36
3.2 miR-297b对MLLT3 的表达有抑制作用	37
3.3 稳定表达miR-297b的EL4 细胞中MLLT3 显著下调.....	42
3.4 MLLT3 下调影响淋巴瘤细胞增殖	44
3.5 MLLT3 下调影响淋巴瘤细胞迁移	47
3.6 MLLT3 下调引发淋巴瘤细胞周期阻滞	48
3.7 MLLT3 下调抑制淋巴瘤细胞裸鼠成瘤能力	51
第四章 讨论	54
参考文献	57
在学期间研究成果	67
致谢.....	69

Table of Content

Abstract in Chinese	I
Abstract	II
Abbreviations	III
Chapter I Introduction	1
1.1 Lymphoma	1
1.2 miRNA	5
1.3 MLLT3	11
1.4 Aims and significance of the proposed research project	15
Chapter II Materials and Methods	17
2.1 Materials	17
2.2 Experimental methods.....	24
2.3 Statistical analysis	35
Chapter III Results and Analysis	36
3.1 Bioinformatics analysis.....	36
3.2 miR-297b plays critical regulatory roles in the expression of MLLT3	37
3.3 Significant down-regulation of MLLT3 in miR-297b stable expression cell line	42
3.4 Down-regulation of MLLT3 reduces cell proliferation	44
3.5 Down-regulation of MLLT3 inhibits cell migration	47
3.6 Down-regulation of MLLT3 causes cell cycle arrest.....	48
3.7 Down-regulation of MLLT3 inhibits EL4 tumorigenesis in nude mice ...	51
Chapter IV Discussion	54
References	57
Publication	67
Acknowledgement	69

摘要

MLLT3 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, *Drosophila*); translocated to, 3), 又称 AF9, 是 YEATS 蛋白家族的一员。在急性白血病中 MLLT3 为常见的 MLL 的融合基因, 研究表明 MLLT3 蛋白的 C 端为转录激活结构域, 而且是白血病发生所必须的。此外, MLLT3 在多种癌症细胞中高表达。这些研究结果都提示了 *Mllt3* 可能作为一个原癌基因, 具有转录激活活性。但是, *Mllt3* 在肿瘤发生发展过程中的功能还不太清楚。

MicroRNA (miRNA) 是一类内源性的平均长度约为 18-25 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 它通过与编码蛋白质的 mRNA 的 3' 非翻译区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。它们通过调控癌症相关的靶基因, 影响肿瘤的发生和发展。

在本研究中, 我们研究了 miRNA 对 *Mllt3* 的表达调控作用及其在淋巴瘤发展中的生物学功能。通过生物信息学分析和 3' 非翻译区荧光素酶报告基因实验, 我们发现, miR-297b 可以通过与 *Mllt3* 的 3' 非翻译区的结合位点的相互作用来调控 MLLT3 的表达。在我们筛选出的稳定表达 miR-297b 的 EL4 细胞系中, MLLT3 蛋白表达受到显著抑制。淋巴瘤细胞系中 miR-297b 介导的 *Mllt3* 表达调降可以导致细胞周期阻滞, 淋巴瘤细胞增殖的抑制以及其在裸鼠体内成瘤能力的下降, 这些细胞生长的变化部分归因于 MLLT3 抑制引起的 PCNA 水平下调以及 p27^{Kip1} 水平上调。

以上初步实验结果证明抑制 MLLT3 蛋白表达, 可以通过引发细胞周期阻滞而抑制淋巴瘤细胞的增殖能力。因此, miR-297b 和 MLLT3 是调控淋巴瘤细胞生长的重要调节因子, 它们有可能成为淋巴瘤诊断和治疗的有效分子靶标。

关键词: 淋巴瘤; miR-297b; MLLT3/AF9

Abstract

MLLT3 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, *Drosophila*); translocated to, 3), also known as AF9, is a member of the YEATS family. MLLT3 is a common MLL fusion partner in acute myeloid leukemia, studies of MLLT3 show that the carboxy-terminal of MLLT3 contains the transactivation domain and is required for leukemogenesis. Additionally, recent evidence indicates that MLLT3 is highly expressed in several cancer cells. These observations suggest that *Mllt3* might be a proto-oncogene capable of transcriptional activation. However, the role of *Mllt3* in cancer development remains unclear.

MicroRNA (miRNA) is a family of 18-25 nucleotides small non-coding RNA in eukaryotic organisms, which can regulate genes at the post-transcriptional level by binding to the 3' untranslated regions of target mRNAs. Recent studies indicate that miRNA plays a critical role in the development of cancer by repressing the expression of important cancer-related genes.

In our current investigations, we studied the regulation of *Mllt3* by miRNA in EL4 lymphoma cells. Bioinformatic analysis and dual-luciferase assay revealed that miR-297b regulates *Mllt3* expression by binding to its 3' untranslated region. Using a line of EL4 cells stably expressing miR-297b, we found that MLLT3 expression is significantly reduced. Knocking down *Mllt3* in the EL4-pmiR-297b cell line caused cell cycle arrest, reduced EL4 lymphoma cell proliferation and inhibited tumorigenic potential in nude mice. These phenotypic changes caused by MLLT3 down-regulation correlated with increased expression of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} and decreased expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Collectively, our results demonstrated that miR-297b is able to down-regulate MLLT3 to inhibit lymphoma cell proliferation. Therefore, miR-297b and MLLT3 are critical regulators of lymphoma development and might be useful molecular targets for lymphoma diagnosis and treatment.

Key words: Lymphoma; miR-297b; MLLT3/AF9

缩略语对照表

缩略语	英文	中文
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
DAB	3, 3'-Diaminobenaidioe	二氨基联苯胺
EDTA	Ethylene diaminetetrasetie acid	乙二胺四乙酸
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
miRNA	MicroRNA	微小 RNA
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
RLU	relative luciferase unit	相对荧光素酶单位
5'UTR	5'-untranslated region	5'非翻译区
3'UTR	3'-untranslated region	3'非翻译区
Tris	trimethylsilyl	三(羟甲基)氨基甲烷
MTT	Methyl thiazolyl tetrazolium	甲基噻唑基四唑
SDS	Sodium dodecyl sulfat	十二烷基硫酸钠

第一章 前言

1.1 淋巴瘤 (lymphoma)

恶性淋巴瘤是免疫系统的恶性肿瘤^[1], 来源于淋巴细胞或组织细胞的恶变, 与淋巴组织免疫应答反应中增殖分化产生的各种免疫细胞有关, 可发生在身体的任何部位^[2]。在欧洲、美洲和澳大利亚等西方国家的发病率高达 11/10 万~18/10 万, 在美国每年至少发现新病例 3 万以上。近年来, 我国恶性淋巴瘤新发病例逐年上升, 每年至少超过 25000 例, 死亡率达到 1.5/10 万, 占有恶性肿瘤死亡位数的第 11~13 位。

1.1.1 淋巴瘤的分类

人们传统上以组织病理学为基础将恶性淋巴瘤分为: 霍奇金病 (Hodgkin disease) 和非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma) ^[3]。2008 年 WHO (World Health Organization) 淋巴瘤最新分类将淋巴瘤分为五大类型, 即原始淋巴细胞(前体淋巴细胞) 肿瘤、成熟 B 细胞肿瘤、成熟 T/NK 细胞肿瘤、霍奇金淋巴瘤 (HL), 以及移植后淋巴组织增殖性病变 (post-transplant lymphoproliferative disorders, PTLD) ^[4]。在这次的分类标准中 WHO 把每一类型的恶性淋巴瘤均定义为一种独立的疾病, 具有其独特的病理形态、免疫表型、遗传特点和临床表现。

1.1.2 淋巴瘤发病的分子机制

癌症的发生是一个多阶段逐步演变的过程。细胞通过一系列进行性的改变而向恶性发展^[5]。恶性淋巴瘤是原发于淋巴系统的一组不同病理类型和不同临床行为的肿瘤, 各型具有各自特征性的分子生物学改变。细胞周期调控和凋亡异常在淋巴瘤的发病中起着重要的作用。目前, 细胞遗传学、分子生物学和生物化学的研究进展已经揭示了多种淋巴瘤发病的分子机制^[6-8]。

(1) 染色体异常

易位引起前癌基因的激活, 易位把一个正常不表达或低水平表达的基因易位到编码抗原受体的基因位点, 使其表达受免疫球蛋白或 T 细胞受体 (TCR) 的增强子或启动子所调节, 以致其转录失去调节。Burkitt 淋巴瘤患者都有染色体结构

异常,起病的关键就是易位使*C-myc*置于Ig增强子的控制下,从而导致*C-myc*表达异常^[9]。*C-myc*与正调节的生长因子协同促进细胞增殖,而与具有负调控的生长抑制基因*Fas*、*Fasl*和*Bax*结合后可加速细胞凋亡^[10]。80% Burkitt淋巴瘤为t(8;14)(q24; q32)易位,使8q24位置上的*C-myc*基因与14q32上的免疫球蛋白重链(IgH)基因的C区融合,另各有10%的Burkitt淋巴瘤为t(2;8)(p12; q24)和t(8;22)(q24; q11)变异易位,分别累及IgK的C区和IgL的V区^[11]。

另一种机制是易位使一种癌基因与另一种基因融合,形成一种新的杂合基因(嵌合性基因)。在这情况中,染色体之间的重组发生在受累基因的内含子中,导致形成新的融合性转录物,并产生具有新的生物学特性的蛋白质产物。这种嵌合性基因产物能使细胞发生转化。黏膜相关淋巴组织淋巴瘤最常见的染色体结构异常t(11;18)(q21; q21)发生率为30%~50%,所累及*MLT*(MALT-Lymphoma associated translocation)基因产生的API2-*MLT*融合蛋白能使细胞程序性死亡抑制作用增强,从而赋予淋巴瘤细胞生存优势^[12]。

(2) 抑癌基因*p53*失活

人*p53*基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的一种基因,位于人17号染色体短臂上,由11个外显子组成^[13]。正常的*p53*蛋白定位于细胞质,受刺激后转运入细胞核,行使转录因子的功能,参与细胞周期的停顿及促凋亡,维持细胞的遗传稳定性^[14]。当细胞受到损伤时,*p53*蛋白会诱导细胞凋亡,阻止细胞向癌变发展。如果*p53*基因突变,蛋白功能丧失,受损的细胞就有可能生存下来,从而增加细胞的遗传不稳定性,促进肿瘤的发生和发展^[15]。高生长比例(High-growth fraction, HGF) B细胞淋巴瘤中*p53*基因突变最常见,见于17%~25%的大B细胞淋巴瘤和Burkitt淋巴瘤^[16]。此外,*p53*基因突变也与黏膜相关淋巴组织淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤的大细胞转化及套细胞淋巴瘤的母细胞变异型密切相关,这支持了*p53*失活是淋巴瘤自低度恶性向高度恶性进展的原因^[17]。

(3) *Bcl-6*异常表达

*Bcl-6*基因首先从伴有3q27转位的滤泡性淋巴瘤和大B细胞淋巴瘤中鉴定出来,具有调控细胞周期、细胞分化和免疫应答等多种功能^[18]。*Bcl-6*持续高表达,使得生发中心细胞CD40/CD40L信息通路异常,*Fas*凋亡系统功能下调,从而使生发中心细胞表型改变而发生恶性转化^[19]。*Bcl-6*异常表达被认为是相关淋巴细胞

恶性转化机制之一。Lossos等发现Bcl-6 高表达和体细胞突变的弥散性大B细胞淋巴瘤患者总生存期优于低表达和非突变者^[20]。

(4) 核因子 κ B (NF- κ B) 生存途径

NF- κ B是细胞主要的信号传递通道,除参与细胞生长、分化、免疫和炎症反应的调控外^[21],另一重要功能是通过诱导四种主要凋亡抑制因子(IAP-1、IAP-2、TRAF1 和TRAF2)的表达而抑制细胞凋亡^[22]。Furman等发现,未经刺激的B细胞慢性淋巴细胞白血病的B细胞核中NF- κ B活性明显增高,是正常B细胞的2.5倍,而且CD40 与配体(CD145)结合可进一步增强NF- κ B的活性,使肿瘤细胞生存期延长^[23]。

(5) p27^{Kip1}的改变

在G1/S期转变过程中, p27^{Kip1}能抑制包括cyclinE/CDK2 在内的多种G1 期 cyclin/CDK激酶活性,使细胞不能通过G1 期,从而防止细胞过度增殖形成肿瘤^[24]。在反应性淋巴组织和淋巴瘤中p27^{Kip1}表达与细胞增殖均呈负相关,休止期细胞p27^{Kip1}强表达,增殖期细胞低表达^[25]。除细胞周期调节功能外, p27^{Kip1}还是抑癌基因。研究证实,小鼠肿瘤模型p27^{Kip1}呈低表达^[26]。在多种实体瘤、淋巴瘤中p27^{Kip1}低表达,是不良预后的独立预测指标^[27, 28]。

1.1.3 淋巴瘤的诊断与治疗现状

淋巴瘤分类亚型众多,每个亚型的病变部位、症状体征和发病机理各有特点,因此恶性淋巴瘤的诊断主要依靠临床表现,病理诊断,影像学检查以及实验室检测。早期发现,早期诊断以及早期治疗是改善淋巴瘤预后的关键。若治疗得法,I、II及III期病人的5年生存率平均可达80%。

(1) 临床表现: 淋巴结肿大就是淋巴瘤的早期“信号”之一。肿大的淋巴结多在身体浅表部位,如耳朵下面、颈部、腋窝、腹股沟等处,尤其是成串出现的更为典型^[29, 30]。另外,长期不明原因的高烧并伴有消瘦,也是淋巴瘤的主要表现。目前国内外公认的恶性淋巴瘤分期标准系由1970年举行的Ann Arbor会议所建议^[31](见表1-1)。

表 1-1 淋巴瘤分期 Ann Arbor 标准

分期	侵犯范围
I 期	病变仅限于一个淋巴结区或单一的器官
II 期	病变限于横膈同一侧，且已累及二个或更多的淋巴结区或器官
III 期	横膈上下两侧均有病灶，可伴有脾累及
IV 期	病变已侵犯多处淋巴结及淋巴结以外的部位，如累及肺、肝及骨髓

(2) 病理诊断：淋巴瘤的典型淋巴结病理学特征有三^[32]，即①正常滤泡性结构为大量异常淋巴细胞或组织细胞所破坏；②被膜周围组织同样有上述大量细胞浸润；③被膜及被膜下窦被破坏。

(3) 实验室检查：包括血常规、血沉、骨髓穿刺、活组织检查、血清碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶及肝肾功能等。疾病活动期有血沉增速，血清乳酸脱氢酶活力增高， α 球蛋白及结合珠蛋白及血浆铜蓝蛋白增多^[33-36]。

(4) 影像学检查：包括X线检查、B超检查、CT检查及MRI检查^[37]。CT扫描对显示纵膈各组淋巴结肿大有特殊的优点^[38]，显著优于常规X线检查。在早期病变，纵膈轻度增宽时，CT扫描可显示肿块的部位和形态符合纵膈的肿大淋巴结，以及各组淋巴结受侵的范围，对诊断很有帮助^[39]。

除上述检查手段之外，分子生物学检查也为淋巴瘤的早期诊断开辟了新的天地。由于淋巴瘤的发生发展与许多基因的突变或异常表达紧密相关，如*p53*, *Fas*, *Bcl-6* 和*p27^{Kip1}*等^[40-42]。应用分子生物学技术对淋巴瘤相关基因的检测有利于对淋巴瘤的恶化程度，癌细胞的增殖及分化能力的认识，有助于确定淋巴瘤分期状态和制定合理的治疗手段。

目前，淋巴瘤治疗多采用综合治疗，即根据不同肿瘤、不同病理类型及亚型、不同生物学行为、不同病期及发展趋向、不同机体的行为状态及重要脏器功能，有计划的、有效地应用现有的治疗手段，以期最大限度地保护机体、杀灭肿瘤细胞，达到提高治愈率的目的。常用的治疗手段包括外科手术切除、骨髓移植、放射治疗（放疗）、化学治疗（化疗）、中医中药和生物反应修饰剂（BRM）等。手术结合放化疗对恶性淋巴瘤有较高的治愈率或缓解率，中医中药则对增强和恢复机体免疫功能，调动抗病能力，减轻机体对放化疗所致的不良反应方面起到增

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