

学校编码: 10384
学号: 21620121152452

分类号 _____ 密级
UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Slit2 在肝癌细胞中作用的研究

A Study on Roles of Slit2 in Hepatocellular Carcinoma

Cells

朱韦林

指导教师姓名: 袁立教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015年4月

论文答辩时间: 2015年5月

学位授予日期: 2015年6月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2015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

目 录.....	I
目 录（英文）.....	III
摘 要.....	1
摘 要（英文）.....	3
前 言.....	5
1.1 配体 Slits 与受体 Robos 分子系统.....	5
1.2 配体 Slits 与受体 Robos 的表达及调控.....	7
1.3 配体 Slits 与受体 Robos 的功能作用.....	11
1.4 本研究的目的及意义.....	14
实验材料与仪器设备.....	15
2.1 材料与试剂.....	15
2.2 主要仪器.....	17
2.3 试剂配方.....	18
实验方法.....	20
3.1 Slit2 干扰载体构建.....	20
3.2 病毒的包装、浓缩与滴定.....	22
3.3 免疫印迹.....	24
3.4 Real-time PCR 技术.....	25
3.5 甲基化检测.....	27
3.6 细胞粘附、增殖和迁移实验.....	31
结果与分析.....	33
4.1 配体 Slit2 与受体 Robo1 在肝细胞癌中的表达变化.....	33

4.2 Slit2 细胞系的建立及检测	35
4.3 Slit2 对肝细胞癌增殖的影响	37
4.4 Slit2 对肝细胞癌粘附的影响	39
4.5 Slit2 对肝细胞癌迁移的影响	42
4.6 Slit2 对肝细胞癌侵袭的影响	45
4.7 Slit2 影响细胞转移的机制研究	47
4.8 甲基化对 Slit2 的表达调控	49
讨 论	55
参考文献	60
致 谢	73

CONTENTS

CONTENTS	I
CONTENTS(ENGLISH)	III
ABSTRACT	1
ABSTRACT(ENGLISH)	3
INTRODUCTION	5
1.1 Molecular Systems of Slits and Robos	5
1.2 Expressions and Regulations of Slits and Robos	7
1.3 Functions of Slits and Robos	11
1.4 Significance of Research	14
MATERIALS AND EQUIPMENT	15
2.1 Materials and Reagents	15
2.2 Equipment	17
2.3 Reagents Formula	18
METHODS	20
3.1 Vector Construction	20
3.2 Virus Packaging, Concentration and Titration	22
3.3 Immunoblotting	24
3.4 Real-time PCR Technology	25
3.5 MSP Array	27
3.6 Cell Adhesion, Proliferation and Migration Assay	31
RESULTS AND ANALYSIS	33
4.1 Expression Changes of Slit2 and Robo1 in Hepatocellular Carcinoma	33

4.2 Construction and Detection of Slit2 Cell lines	35
4.3 Impacts of Slit2 on Cell Proliferation	37
4.4 Impacts of Slit2 on Cell Adhesion	39
4.5 Impacts of Slit2 on Cell Migration.....	42
4.6 Impacts of Slit2 on Cell Invasion	45
4.7 Mechanism Research of Slit2 on Metastasis	47
4.8 Methylation on Expression Regulation of Slit2	49
DISCUSSION	55
REFERENCES.....	60
ACKNOWLEDGMENTS	73

摘要

Slit 家族蛋白是一种进化上高度保守的细胞外分泌糖蛋白。对 Slit 的研究最初的重点是它在神经生长的作用,Slit 作为配体通过与跨膜受体 Roundabout(Robo) 结合在中枢神经系统轴突导向中起到重要的作用。近些年的研究发现 Slits 与 Robos 在一些肿瘤中异常表达,说明 Slit/Robo 信号在肿瘤的发生发展过程中起到重要的作用。

Oncomine 数据库的检索结果显示,与正常组织相比,肝细胞癌中受体 Robo1 的表达量有显著的增加,而 Slit2 的表达量则有一定的差别,多数情况下表现为下调。并且多数研究发现,在不同的肿瘤中配体 Slits 与受体 Robos 的表达存在着不一致性,而且 Slit/Robo 信号在肿瘤的侵袭转移调控中起到促进还是抑制的作用仍有争议,由此可见 Slit/Robo 信号在肝癌的发生发展中应该存在复杂的作用机制。本实验旨在研究 Slit2 对肝癌细胞特性的影响及作用机制。

我们建立了 Slit2 的干扰细胞系,同时在两种肝癌细胞中过表达 Slit2,检测细胞功能特性的变化,包括细胞的增殖、粘附、迁移、侵袭;添加外源 Slit2 蛋白的方式与细胞自身过表达 Slit2 作对比,研究细胞自分泌与旁分泌在配受体结合中的差异;我们还采用去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷(5-Aza)分别对两种肝癌细胞加以处理,通过检测其对 Slit2 表达的影响分析了可能存在的表观遗传学作用;最后我们研究了 Slit2 对两种肝癌细胞在上皮-间质转化(EMT)改变转移能力方面的作用。

研究表明,调低 Slit2 的表达会促进肝癌细胞增殖、迁移、侵袭,同时减弱细胞的粘附能力;过表达 Slit2 会抑制肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭,同时增强细胞的粘附能力。在添加外源 Slit2 蛋白的实验中,我们得出与过表达 Slit2 一致的结果,只是前者的作用强度要弱于后者。添加去甲基化药物后,通过甲基化特异 PCR(Methylation Specific PCR, MSP)检测到 Slit2 启动子甲基化程度有所下降,相对应的 Slit2 在转录水平也有所提高。随后我们检测了与癌细胞黏附和转移相关的效应分子,结果显示在调低 Slit2 表达后出现 E-cadherin 降低,

N-cadherin 及 vimentin 的表达量则明显升高。在 Slit2 过表达的细胞中检测到 MMP2 及 MMP10 在转录水平表达有所下调, TIMP2 在转录水平则有相应的上调, 这些结果与 Slit2 过表达后抑制肝细胞癌的迁移和侵袭是吻合的。

根据以上的实验结果我们得出 Slit2 会抑制肝细胞癌的发展; 在肝细胞癌中 Slit2 的表达量普遍低调, 部分原因可能是其启动子甲基化造成的。有关 Slit/Robo 信号在肝细胞癌发展中的作用研究也为其机制的深入提供了新的探索方向。

关键词: Slit2 肝癌 转移 甲基化调控

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Slits are a family of secreted glycoprotein conserved in evolution. Early research of Slits was focused on their effects in neuronal guidance. Binding with a transmembrane receptor family of Roundabout (Robo), the ligand Slit plays a critical role in the central nervous system (CNS) axonal guidance. Recent studies showed that both Slits and Robos were abnormally expressed in some cancers, indicating that the Slit/Robo signal may play an important role in cancer occurrence and progression.

According to the Oncomine database, the expression of Robo1 in hepatocellular carcinoma was significantly increased compared with the normal tissue, while the expression of Slit2 was down regulated in most cases and up regulated in some other cases. Inconsistencies between the expression of Slits and Robos, and some controversial reports regarding to promoting or inhibiting tumor invasion and metastasis implied that the action mechanism of the Slit/Robo signaling maybe complex in liver cancer development. The present study is to explore the effects and mechanisms of Slit2 in hepatocellular carcinoma cells.

To this end, we established Slit2 silencing cell line and over-expression of Slit2 in two cell lines from hepatocellular carcinoma to examine the cancerous properties of the cells including cell proliferation, adhesion, migration and invasion. We also used Slit2 protein to treat the cells in comparison with the in-cell over-expression to evaluate the autocrine and paracrine signaling. Furthermore, we examined possible epigenetic impacts of Slit2 expression in the two cell lines by treatment with a demethylation agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza). Finally, we examined how Slit2 could affect the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of those cells in regarding to their capacity of metastasis.

The results showed that Slit2-downregulated cell lines had significant alternations of capabilities with reduced cell adhesion, enhanced cell proliferation, migration and invasion; Slit2-overexpression enhanced cell adhesion, and inhibited

cell proliferation, migration and invasion. Treatment of the cells by adding Slit2 protein had effects similar to but less strong than the in cell expression. We also found that demethylation agent could down-regulated the Slit2 promoter methylation level via MSP and up-regulated the expression of Slit2. Then we detected the expression of effector molecules related to cell adhesion and metastasis. Slit2-downregulation reduced expression of E-cadherin and increased expressions of N-cadherin and vimentin. Moreover, transcription of MMP2 and MMP10 were down-regulated and that of TIMP2 was up-regulated in the Slit2 over-expression cell lines, which was match with the inhibition of cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma.

Taken together, we concluded that Slit2 plays a role as a suppressor in the development of hepatocellular carcinoma with multiple mechanisms; Slit2 was usually down-regulated in hepatocellular carcinoma cells and methylation of its promoter could be at least in part responsible for the down-regulation. The study provides some new insights on Slit2/Robo1 signaling in the progression of hepatocellular carcinoma.

Key words: Slit2; Hepatocellular carcinoma; Metastasis; Methylation Regulation

前言

1.1 配体 Slits 与受体 Robos 分子系统

1.1.1 配体 Slits

Nüsslein-Volhard 等^[1]在 1984 年筛选与影响黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 幼虫表皮型式发生相关基因时首次发现了 *slit* 基因。1988 年, Rothberg 等^[2]首次克隆出果蝇的 *slit* 基因, 该基因在与生长中的轴突邻接的 6 个中线胶质细胞中表达水平相对较高, 而且在果蝇 *slit* 基因突变体中穿过和不穿过中线的轴突以同样的方式进入中线并停留在中线处, 表明 *slit* 基因在中枢神经系统的形成中起到重要的作用。Itoh 等^[3]在 1998 年克隆出与果蝇 *slit* 基因同源的人的 Slit2 基因, 同时也克隆出另外两种与人和大鼠都同源的 *slit* 基因, 被称作 Slit1 和 Slit3。

随着研究的深入, *slit* 基因家族目前已陆续在果蝇、线虫(*Caenorhabditis elegans*)^[4]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[5]、小鼠(*Mus musculus*)^[6]和人(*Homo sapiens*)^[3]等至少 30 多种动物中被发现或预测。目前只有 1 种 *slit* 基因存在于无脊椎动物, 而在脊椎动物中则存在有 3 种 *slit* 基因, 它们分别是 *slit1*、*slit2* 和 *slit3*^[7]。

Slit 蛋白是一种相对分子质量约 200kDa 的分泌型细胞外基质糖蛋白, 它的结构相对较大, 主要是由五个区域组成: 1 个 N-末端信号肽(ss)、4 个亮氨酸富集区(leucine-rich repeat, LRR)、7-9 个表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)样重复序列、1 个 ALPS (Agrin-Laminin-Perlecan-Slit)结构域和 1 个 C-末端富含半胱氨酸序列(cystein knot)^[8-10]。

slit 基因在不同物种中保守, 线虫 Slit 与果蝇 Slit 的序列同源性的 41%, 脊椎动物的 3 种 Slit 与果蝇和线虫 Slit 的序列同源性分别为 41%~44%和 39%~41%, 果蝇和人类的 Slit 分别包含 7 个和 9 个 EGF 样序列(图 1.1)^[7]。人类 *slit2* 基因含有 37 个外显子, 其蛋白 LRR-1 至 LRR-4 结构域的氨基酸残基范围分别为 27~258、271~479、505~713 和 726~908; 与果蝇的 Slit 蛋白相比, 人类 Slit2 的 LRR-3 结构域较大^[11]。

Slit 的第二个亮氨酸重复区(Slit2 D2)含有一个重要的肝素结合功能区, 位于 Slit 的两端。Slit 通过硫酸乙酰肝素这种细胞外基质与细胞表面结合^[12,13]。文献中有报道, Slit2 蛋白的 N 端和 Slit2 蛋白的 C 端以及 Slit3 都可以与肝素和硫酸乙酰肝素硫酸盐结合^[13,14]。Slit 蛋白和硫酸乙酰肝素之间的相互作用不仅对 Slit 蛋白与细胞外基质的结合是重要的, 同时也可以增强 Slit 配体与 Robo 受体的亲和力^[15]。该区域可以提高 Slit 与 Robo 相互作用的稳定性, 而且与 Slit 的结合定位有关, 是 Slit-Robo 信号通路的必要组成部分之一^[16]。Slit 的 EGF 区域能够通过蛋白水解作用释放出一个长的 Slit-N 端和一个短的 Slit-C 端, Slit-C 端没有生物学活性, 而 Slit-N 端却能激活并调节与 Robo 的结合^[17]。Slit2 经蛋白水解成 Slit2-N 端(相对分子质量约 140KDa)和 Slit2-C 端(相对分子质量约 55KDa), 其中 Slit2-N 端与细胞膜紧密相连, 而 Slit2-C 端是可扩散的^[7], 与细胞表面的结合比较疏松, 在条件培养基中可以检测到它的存在^[7, 18]。其中 Slit2 D2(第二亮氨酸重复区)的标准重复区与 Iba 糖蛋白的胞外区、Nogo 受体及果蝇 Slit 蛋白的第三亮氨酸重复区相似, 此区域的凹面是由八个 β 链组成, 包含 N 端 β -hairpin 和亮氨酸的六条平行链; 而凸面则由缺乏次级结构的封闭环组成, 且 Slit2D2 的 N 端、C 端的都含有两个二硫键^[19]。

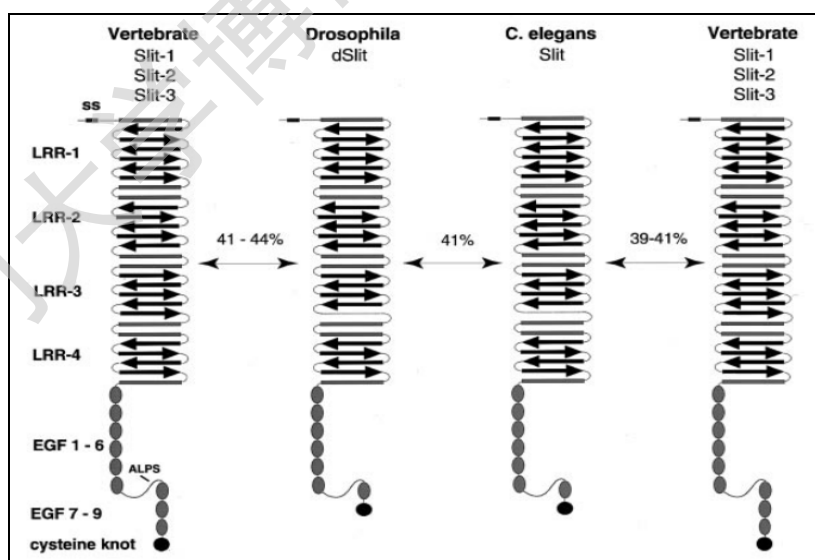


图 1.1 Slit 家族成员间结构和同源性比较 引自 Brose et al.(1999)^[7]

1.1.2 受体 Robos

1993 年, Seeger 等^[20]在大规模筛选果蝇突变基因时首次从黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)中克隆到 *robo* (*robo1*)基因。1998 年, Kidd 等^[21]在筛选

轴突导向突变效应相关基因时再次获得该基因, 并对其进行了初步的研究, 发现该基因位于果蝇第二染色体的 58F/59A 座位, 表达产物 Robo1 蛋白是神经细胞粘附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)家族成员之一; 随后 Rajagopalan 等^[22]在果蝇中又发现了 Robo 家族的其它两位成员, Robo2 和 Robo3。后续的研究发现在线虫(*Caenorhabditis elegans*)^[23]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[24]、小鼠(*Mus musculus*)^[25]、大鼠(*Rattus norvegicus*)和人(*Homo sapiens*)^[21]等物种中共有 4 种不同编码 Robo 蛋白的基因, 它们分别被命为 robo1/DUTT1、robo2、robo3/Rig-1 和 robo4/MRB, 脊椎动物的 Robo1 和 Robo2 蛋白结构与果蝇 Robo1 非常类似, 它们在胞内区均含有 4 个保守的 Robo 特异性序列 CC0~3^[24]。

Robo 受体家族是跨膜蛋白, 在哺乳动物中主要有 4 个成员, 分别是 Robo1、Robo2、Robo3 和 Robo4。其中 Robo1、Robo2 和 Robo3 结构比较相似, 主要有三部分组成: 胞外区, 包括 5 个免疫球蛋白样结构域和 3 个纤维连接蛋白结构域; 跨膜区; 胞内区, 由 4 个 Robo 特异性基序 CC0~3 组成^[25]。而 Robo4 的结构比较特殊, 它的胞外区只有 2 个免疫球蛋白样结构域和 2 个纤维连接蛋白结构域, 胞内区也仅有基序 CC0 和 CC2 组成^[26]。Robo 的第 1 个和第 2 个免疫球蛋白结构域(Ig1、Ig2)与 Slit2 的第 2 个 LRR 区结合。Robo1、Robo2 和 Robo3 通过 Ig1 功能域与 Slit 结合, 而 Robo4 没有这样与 Slit2 结合的关键位点^[11]。

1.2 配体 Slits 与受体 Robos 的表达及调控

1.2.1 Slits 在正常组织及肿瘤中的表达

Slit 在各种生物组织中广泛表达, 在底板(floor plate)、菱唇(rhombic lip)、面运动神经核(facial motor nucleus, FMN)等多种神经组织^[27, 28]以及在肌肉、血管、心脏等多种非神经组织^[29]中都有 Slit 的表达。

Slit1 只存在于神经系统中^[3]而 Slit2、Slit3 还可以在神经系统以外的地方表达, 如心脏, 血管等^[30]。Slit2 在人胚胎发育阶段和成年过程中都有表达。它可以在胎儿的肾脏和肺中表达^[3], 同时也可以成人的肾脏^[31], 女性的生殖道(子宫、输卵管和卵巢)^[32-34]。

Wang 等^[35]研究发现, 在恶性黑色素瘤、直肠黏液腺瘤、侵袭性乳腺癌和鳞状胃癌等常见肿瘤中, Slit2 在肿瘤细胞质中高表达。根据上述的结果推断 Slit

家族基因可能是癌基因，它们在肿瘤中的高表达对肿瘤的发生发展具有促进作用，因此，可能具有肿瘤治疗的靶点作用。而更多的报道却显示，由于启动子超甲基化和缺失突变等原因，Slit1、Slit2、Slit3 基因水平在直肠癌^[36]、肺癌、侵袭性乳腺癌^[37]以及宫颈癌^[38, 39]等常见恶性肿瘤中的表达下调。过表达 Slit2 可以显著抑制肿瘤细胞的生长，重组的 Slit2 能够抑制肿瘤细胞的侵袭^[40]。因而 Slit2 跟多的被认为是抑癌基因。

1.2.2 Slits 的表达调控

通过遗传、生物化学和细胞培养分析发现，在果蝇胚胎中枢神经系统的中线细胞同时存在 Single-minded、Fish-hook 和 Drifter 三个转录因子的共同表达，它们在影响 slit 基因的转录中起到了协同作用^[41]；除此之外，BTB 的转录因子 Lola 也可以加强果蝇 slit 的表达^[42]。最新的研究发现，在果蝇的 midline 突变体中，神经系统的中线两侧细胞表达的 slit 的 mRNA 大量减少，表明 T-box 转录因子 Midline 可能控制果蝇中线两侧细胞的 slit 的转录^[43]。

由于选择性剪接的结果，果蝇 slit 基因会编码出两种分别含有 1469 和 1480 个氨基酸残基两种不同蛋白，两者的区别在于最后一个 EGF 样序列的 C-末端相差 11 个氨基酸残基^[8]。而人类的 Slit2 则存在 Slit2A、Slit2B 和 Slit2C 三种不同的剪接形式(见图 1.2)^[44]。Slit2 存在不同剪切形式的变体，文献已知的报道主要有三种^[3, 7, 45]。Slit2A 由 1529 个氨基酸构成(ENSEMBL protein ID: ENSP00000422591)，Slit2B 由 1521 个氨基酸构成(ENSEMBL protein ID: ENSP00000427548)。

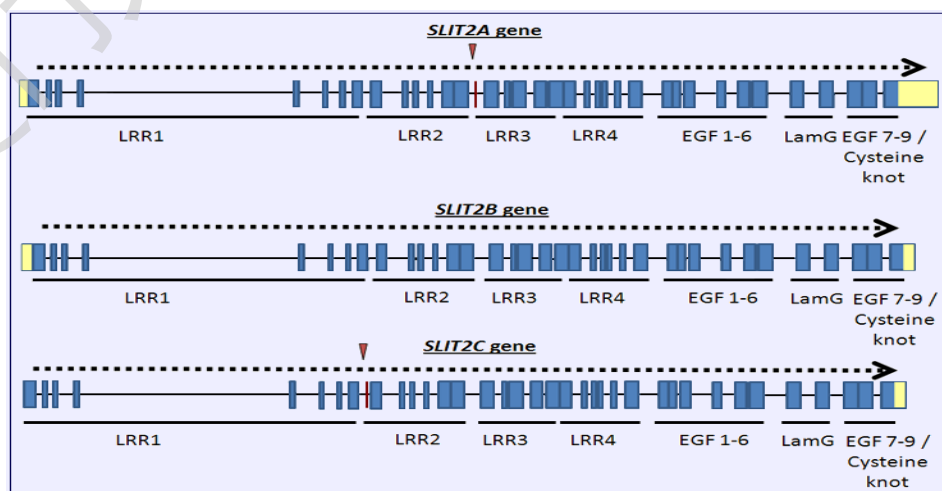


图 1.2 人类 Slit2 的三种不同剪切形式 引自 Little et al.(2002)^[44]

Slit2C由1525个氨基酸构成(ENSEMBL protein ID ENSP00000422261)。Slit2A在成人脊髓表达,也有在胎儿的肺和肾中低水平的表达^[3], Slit2B可以在出生后人体组织的中枢神经系统以外检测到表达^[45], Slit2C在大鼠胚胎发育的脊髓中有表达^[7]。有实验发现,在大鼠的大脑中表达的Slit1蛋白,尽管C-末端的选择性剪接会导致其产物Slit1 α 富含半胱氨酸序列结构域有缺陷,然而在体外水平该蛋白同样能够对嗅球神经轴突导向起到排斥作用^[46],不同的剪接变异体的功能意义尚不清楚。

1.2.3 Robos 在正常组织及肿瘤中的表达

robo 基因在神经^[21]、肌肉^[47]、心脏^[48]、气管^[49]等多种组织细胞表达,但是脊椎动物的 *robo3* 只有在神经组织表达^[50], *robo4* 也只在血管上皮细胞表达^[51]。

Ito 等^[3]通过对肝癌病人的组织和血清中 Robo1 的 mRNA 和蛋白质表达水平的检测发现 Robo1 在肝癌组织中表达相对较高,其表达强度与分化程度也有一定的相关性,因此 Robo1 被认为可以作为肝癌的诊断依据和治疗靶点。Robo1 和 Robo4 基因的表达水平同样也会在直肠癌中有明显上调,但是二者在细胞内定位有所不同,Robo1 主要分布在细胞质中,而 Robo4 则定位在血管内皮细胞上^[52]。然而有研究显示 Robo1 基因敲除小鼠可观察到肺部支气管异常增生^[53],并发生淋巴瘤和肺腺癌^[54], Robo1 可能是一种抑癌基因。这些矛盾的研究结果表明 Slit/Robo 信号功能的复杂性,有待深入细致的研究。

1.2.4 Robos 的表达调控

最新的研究发现一些转录因子可以通过自身的表达调控 Robo 家族在转录水平的表达。在小鼠中 Tbx1 起到调控转录因子 Gbx2 在后脑和咽弓动脉(pharyngeal arch arteries, PAA)发育的作用,同时发现在 Tbx1 和 Gbx2 突变体小鼠的咽区域 *robo1* 和 *slit2* 两种基因的表达都有下调^[55]。在小鼠中同源转录因子 Nkx2.9 的缺失会导致 Robo2 的 mRNA 和蛋白表达量的下降^[56]。Yuan 等^[57, 58]研究发现视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, RB)基因可以抑制 *robo3* 的启动子活性进而抑制 *robo3* 的功能。碱性螺旋转录因子 Sim1 和 Sim2 的突变会导致 Robo3 蛋白表达水平的上调,从而使乳头状轴突延伸向中线改变方向^[59]。Wilson 等^[60]研究表明 LIM-HD 蛋白是 Robo3 转录的活化剂。近年的研究表明 sox 转录因子在斑马鱼的肌节间血管发育过程中与 Robo4 共表达,进一步研究发现 sox7 和 sox18

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.