

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720090153558

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

***Sfmbt2* 基因第十个内含子携带的
microRNA-669e-5p/3p 通过负调控抗凋亡基
因 *Bcl2* 促进细胞程序性凋亡**

***Sfmbt2* 10th intron hosted microRNA-669e-5p/3p promote
cellular apoptosis by targeting anti-apoptotic gene *Bcl2***

王涛

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: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 7 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 6 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(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

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略语对照表	V
第一章 前言	1
1.1 细胞凋亡与细胞周期调控.....	1
1.2 MicroRNA (miRNA)	6
1.3 BCL2 蛋白家族.....	20
1.4 结直肠癌.....	25
1.5 本文的研究目的及科学意义.....	29
第二章 材料与方法	31
2.1 实验材料.....	31
2.2 实验方法.....	36
2.3 统计分析.....	57
第三章 结果与分析	58
3.1 miR-669e-5p/3p 通过与 <i>Bcl2</i> -3'UTR 特异性识别位点结合影响 <i>Bcl2</i> 的转录后调控.....	58
3.2 过量表达 miR-669e-5p/3p 抑制 <i>Bcl2</i> 的 mRNA 和蛋白表达水平.....	67
3.3 过量表达 miR-669e-5p/3p 在小鼠结肠癌细胞 CT26 中引起显著的细胞凋亡和细胞周期阻滞	72
3.4 miR-669e-5p/3p 引起细胞凋亡主要是通过调控 <i>Bcl2</i> 引起的.....	77
3.5 过量表达 miR-669e-5p/3p 抑制 CT26 细胞的克隆形成和裸鼠成瘤能力..	81
3.6 hsa-miR-669e-5p 基因的克隆.....	84
3.7 miR-669e-5p/3p 与 <i>Bcl2</i> 在人和小鼠的结直肠癌组织中的表达呈负相关关系	

.....	92
3.8 5-FU 和 OXA 上调 hsa-miR-669e-5p 抑制 BCL2 的表达.....	98
第四章 讨论	100
参考文献.....	104
在学期间研究成果	118
致谢.....	119

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Content

Abstract in Chinese.....	I
Abstract.....	III
Abbreviations	V
Chapter I Introduction.....	1
1.1 Apoptosis and cell cycle	1
1.2 MicroRNA (miRNA)	6
1.3 BCL2 protein family	20
1.4 Colorectal cancer.....	25
1.5 Aims and significance of the proposed research project	29
Chapter II Materials and Methods	31
2.1 Materials.....	31
2.2 Experimental methods	36
2.3 Statistical analysis.....	58
Chapter III Results and Analysis	58
3.1 miR-669e-5p/3p regulate <i>Bcl2</i> posttranscriptionally	57
3.2 miR-669e-5p/3p significantly downregulate <i>Bcl2</i> at mRNA and protein levels.....	67
3.3 miR-669e-5p/3p sensitize CT26 cells to apoptosis and cell cycle arrest	72
3.4 <i>Bcl2</i> is potentially involved in miR-669e-5p/3p induced apoptosis.....	77
3.5 miR-669e-5p/3p suppress colony formation <i>in vitro</i> and tumorigenicity <i>in vivo</i>	81
3.6 Cloning of hsa-miR-669e-5p	84
3.7 miR-669e-5p/3p and <i>Bcl2</i> were inversely correlated in mouse and human	

CRC samples	92
3.8 5-FU and OXA-inducible hsa-miR-669e-5p suppresses BCL2 expression .	98
Chapter IV Discussion	100
References	104
Publication	118
Acknowledgement	120

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

细胞凋亡是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程,对有机体的正常运行和体内稳态有重要作用。细胞凋亡一旦受到抑制,很可能导致肿瘤发生。然而,肿瘤发生发展过程中细胞凋亡调控的有关机制还不完全清楚。microRNAs (miRNAs) 是一类非编码的小分子 RNA, 它们具有调节基因表达活性的功能, 在细胞的各个进程(如细胞凋亡, 分化和发育中)发挥着重要的作用。在肿瘤中 miRNAs 有可能通过调节与凋亡相关基因的表达, 参与肿瘤细胞凋亡的调控。

miR-669e-5p 和 miR-669e-3p 是小鼠 *Sfmbt2* 基因第十个内含子所携带的一个编码超过 42 种 miRNAs 的 miRNA 基因簇中的成员。虽然研究已表明 *Sfmbt2* 蛋白在许多基因的表观遗传学调控中有重要作用, *Sfmbt2* 基因所携带的 miRNAs 的生物学功能却不清楚。不过, 相关初步研究提示 *Sfmbt2* 基因所携带的 miRNAs 在细胞增殖、周期循环和凋亡中可能有重要作用。在本项研究中, 我们对 miR-669e-5p 和 miR-669e-3p 在 *Bcl2* 表达和细胞凋亡中的调控作用进行了研究。我们的生物信息学分析表明, 细胞抗凋亡基因 *Bcl2* 的 3'UTR 上有三个 miR-669e-5p 的结合位点和三个 miR-669e-3p 的结合位点。细胞转染实验显示, miR-669e-5p/3p 过表达可以显著抑制 *Bcl2*-3'UTR 报告基因的荧光素酶活性和 *Bcl2* 的 mRNA 和蛋白表达水平, 抑制细胞生长并诱导细胞凋亡。反过来, 利用 siRNA 抑制 miR-669e-5p 后 *Bcl2* 的表达水平显著升高, 细胞凋亡显著受到抑制, 细胞增殖得到促进。进一步的研究发现, 过表达 miR-669e-5p/3p 显著抑制了 CT26 细胞的克隆形成能力和在裸鼠体内的成瘤能力。另外, 我们首次从人 *Sfmbt2* 基因的第 10 个内含子中克隆了人 miR-669e 基因 (hsa-miR-669e-5p), 并在人细胞中验证了 hsa-miR-669e-5p 对 *Bcl2* 的调控作用。qPCR 分析还显示, miR-669e-5p/3p 在人和小鼠结肠癌细胞、C57BL/6-*Apc*^{min/+} 小鼠结直肠癌组织和人结直肠癌组织中均呈现很低的表达水平, 表明 miR-669e-5p/3p 的异常下调可能对肿瘤细胞凋亡的异常调控有重要贡献。这些研究一起揭示, miR-669e-5p/3p 是细胞凋亡的重要调控因子, 有可能可以被开发用于细胞凋亡相关的肿瘤和人类疾病的预防与治疗。

关键词： 细胞凋亡， miR-669e-5p/3p， BCL2， 结直肠癌， 基因治疗

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Apoptosis, or programmed cell death, is involved in embryonic development and immune defense and many other fundamental processes of life. Defects in apoptosis might cause severe diseases including cancers. However, how apoptosis is regulated during cancer development and progression is not fully understood. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding small RNAs that serve as important regulators of gene expression that control apoptosis, differentiation and development. Studies have shown that microRNAs might play important roles in various types of cancers by controlling the expression of tumor suppressors or oncogenes. In particular, they might be able to contribute to tumorigenesis by regulating the expression of apoptosis-related genes.

In mouse, miR-669e-5p and miR-669e-3p are encoded together with more than 42 miRNAs by a miRNA gene cluster, which is hosted by the 10th intron of the *Sfmbt2* gene. Although *Sfmbt2* protein is well-known to be involved in the epigenetic regulation of many genes, little is known about the biological roles of *Sfmbt2*-hosted miRNAs. In spite of this, a few preliminary studies suggested that *Sfmbt2*-hosted miRNAs might play important roles in cell proliferation, cell cycle regulation and apoptosis. In our current study, we investigated the role of miR-669e-5p and miR-669e-3p in the regulation of *Bcl2* expression and apoptosis. Our bioinformatics analysis suggested that on the 3'UTR of the anti-apoptotic gene *Bcl2* there are six conserved miRNA recognition sites for miR-669e-5p/3p, which include three for miR-669e-5p and three for miR-669e-3p. Interestingly, overexpression of miR-669e-5p/3p significantly repressed the activity of luciferase reporter containing the *Bcl2*-3'UTR, reduced the endogenous mRNA and protein level of BCL2, promoted apoptosis and suppressed cell growth in mouse colorectal cancer CT26 cells. Conversely, inhibition of miR-669e-5p significantly up-regulated *Bcl2* expression, suppressed cell apoptosis and promoted cell proliferation. Moreover, overexpression of miR-669e-5p/3p dramatically suppressed the ability of CT26 cells to form colonies

in vitro and the ability to develop tumors *in vivo* in nude mice. To demonstrate the applicability of regulation of *Bcl2* by miR-669e-5p in human cells, we cloned putative hsa-miR-669e-5p from the 10th intron of human *Sfmbt2* and showed that putative hsa-miR-669e-5p also regulates the expression of *Bcl2* in human cells. Real-time quantitative RT-PCR (qPCR) analysis also showed that the expression of miR-669e-5p/3p were significantly reduced in mouse and human colorectal cancer cells and colorectal cancer tissues from C57BL/6-*Apc*^{min/+} and clinical samples, suggesting that this aberrant down-regulation of miR-669e-5p/3p might be associated with the abnormal regulation of apoptosis in cancer cells. Taken together, our data suggest an important regulatory role of miR-669e-5p/3p in cell apoptosis. miR-669e-5p/3p thus might be an important diagnostic or therapeutic target for apoptosis-related cancers and other human diseases.

Key words: Apoptosis, miR-669e-5p/3p, BCL2, Colorectal cancer, Gene therapy

缩略语对照表

缩略语	英文	中文
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
EDTA	Ethylene diaminetetrasetic 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 sulfate	十二烷基硫酸钠
CRC	Colorectal cancer	结直肠癌
MRE	microRNA recognition elements	microRNA 识别元件

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](#)”.

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.