

学校编码: 10384
学 号: 21620101152295

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**OVOL2 调控结直肠癌上皮-间质转化
过程的机制研究**

**The Mechanism Study of OVOL2 in Regulation of Epithelial-
mesenchymal Transition of Colorectal Carcinoma**

陈 晨

指导教师姓名: 李博安 教授
专 业 名 称: 生物化学与分子生物学
论文提交日期: 2013 年 05 月
论文答辩时间: 2013 年 05 月
学位授予日期:

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

2013 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.....	- 1 -
ABSTRACT.....	- 3 -
第一章 前言.....	- 5 -
1.1 WNT 信号通路概述	- 5 -
1.1.1 Wnt 信号通路的发现.....	- 5 -
1.1.2 Wnt 信号通路的分类.....	- 5 -
1.1.3 经典 Wnt 信号通路.....	- 5 -
1.1.4 β -catenin 蛋白.....	- 7 -
1.1.5 LEF/TCF 蛋白	- 8 -
1.1.6 经典 Wnt 信号通路的靶基因.....	- 9 -
1.2 上皮-间质转化概述.....	- 9 -
1.2.1 上皮-间质转化的概念	- 9 -
1.2.2 EMT 的生物学重要性.....	- 10 -
1.2.3 EMT 的三种类型.....	- 11 -
1.2.4 EMT 与肿瘤进展和转移	- 11 -
1.2.5 转录因子 SLUG	- 14 -
1.2.6 Wnt 经典信号通路与 EMT	- 17 -
1.3 <i>ovo</i> 基因与 OVO 蛋白研究进展	- 18 -
1.3.1 <i>OVO</i> 基因与 <i>OVO</i> 蛋白的结构.....	- 18 -
1.3.2 <i>OVO</i> 蛋白的功能.....	- 20 -
1.4 组蛋白去乙酰化酶概述	- 21 -
1.4.1 组蛋白去乙酰化酶的结构及分类.....	- 21 -
1.4.2 组蛋白去乙酰化酶与结直肠癌.....	- 22 -
第二章 材料与方法.....	- 24 -
2.1 常用的药品和试剂	- 24 -
2.2 基因克隆相关试验	- 24 -
2.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	- 24 -

2.2.2 质粒 DNA 的转化.....	- 25 -
2.2.3 质粒 DNA 小量抽提.....	- 26 -
2.2.4 质粒 DNA 中/大量抽提.....	- 26 -
2.2.5 <i>SLUG</i> 启动子荧光素酶报告质粒的构建.....	- 27 -
2.2.6 <i>SLUG</i> 启动子突变型荧光素酶报告质粒的构建.....	- 28 -
2.2.7 细胞基因组 DNA 的提取.....	- 29 -
2.3 细胞培养相关实验	- 29 -
2.3.1 细胞系.....	- 29 -
2.3.2 细胞冻存.....	- 30 -
2.3.3 细胞复苏.....	- 30 -
2.3.4 细胞传代.....	- 30 -
2.3.5 PEI 转染.....	- 30 -
2.3.6 TurboFect 试剂转染	- 31 -
2.3.7 脂质体转染.....	- 31 -
2.3.8 慢病毒的包装与感染.....	- 32 -
2.3.9 细胞划痕实验.....	- 32 -
2.3.10 细胞侵袭实验.....	- 33 -
2.4 RNA 相关实验	- 33 -
2.4.1 细胞 RNA 提取	- 33 -
2.4.2 RNA 的反转录	- 33 -
2.4.3 实时荧光定量 PCR.....	- 34 -
2.5 蛋白质相关实验	- 35 -
2.5.1 蛋白免疫印迹.....	- 35 -
2.5.2 核浆分离.....	- 36 -
2.5.3 免疫荧光实验.....	- 36 -
2.5.4 免疫共沉淀.....	- 37 -
2.5.5 染色质免疫沉淀.....	- 37 -
2.5.6 凝胶迁移实验.....	- 40 -
2.5.7 荧光素酶检测.....	- 42 -
第三章 实验结果.....	- 44 -
3.1 OVOL2 与结直肠癌进展的关系	- 44 -
3.1.1 在结直肠癌进展过程中 OVOL2 的表达会被下调	- 44 -
3.1.2 OVOL2 与 CDH1 的表达高度相关.....	- 45 -
3.2 OVOL2 调节结直肠癌 EMT 过程.....	- 46 -

3.2.1 OVOL2 调控结直肠癌细胞分布状况的变化	- 46 -
3.2.2 OVOL2 调控结直肠癌细胞侵袭与迁移能力的变化	- 47 -
3.2.3 OVOL2 调控结直肠癌 EMT 过程标志物表达水平的变化.....	- 49 -
3.3 OVOL2 通过下调 <i>SLUG</i> 的表达抑制结直肠癌 EMT 过程.....	- 50 -
3.4 OVOL2 对 <i>SLUG</i> 表达的下调是通过抑制 WNT/BETA-CATENIN 信号通路实现的.....	- 54 -
3.4.1 OVOL2 在 Wnt/ β -catenin 信号通路下游行使功能	- 54 -
3.4.2 OVOL2 对 <i>SLUG</i> 表达的抑制是通过与 TCF4、 β -catenin 的相互作用实现的.....	- 56 -
3.5 OVOL2 通过将 HDAC1 募集至 TCF4/BETA-CATENIN 复合体从而抑制 WNT 信号	- 58 -
第四章 讨论.....	- 63 -
参考文献.....	- 66 -
致谢.....	- 72 -

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

ABSTRACT IN CHINESE1

ABSTRACT IN ENGLISH3

CHAPTER 1 INTRODUCTION5

1.1 REVIEW ON WNT SIGNALING5

1.1.1 Discovery of Wnt Signaling Pathway5

1.1.2 Classification of Wnt Signaling Pathway5

1.1.3 Classical Wnt Signaling Pathway5

1.1.4 β -catenin.....7

1.1.5 TCF/LEF8

1.1.6 Target Gene of Wnt Signaling Pathway9

1.2 EPITHELIA-MESENCHYMAL TRANSITION9

1.2.1 Concept of EMT9

1.2.2 Importance of EMT.....10

1.2.3 Classification of EMT.....11

1.2.4 EMT and Tumor Progression.....11

1.2.5 Transcription Factor Slug.....14

1.2.6 Classical Wnt Signaling Pathway and EMT17

1.3 RESEARCH PROGRESS OF *OVO* GENE AND *OVO* PROTEIN18

1.3.1 Structure of *OVO* Gene and *OVO* Protein18

1.3.2 Function of *OVO*20

1.4 REVIEW OF HISTONE ACETYLASES21

1.4.1 Structure and Classification of HDACs.....21

1.4.2 HDACs and Colorectal Cancer22

CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS24

2.1 CHEMICALS AND REAGENTS24

2.2 MOLECULAR CLONING24

2.2.1 Preparation of Competent Cell *E.coli*24

Table of Contents

2.2.2 DNA Plasmids Transformation	25
2.2.3 Mini Extraction of DNA Plasmids	26
2.2.4 Midi/Max Extraction of DNA Plasmids	26
2.2.5 Construction of Slug Luciferase Reporter	27
2.2.6 Construction of Mutant Slug Luciferase Reporter	28
2.2.7 Extraction of Genomic DNA	29
2.3 CELL CULTURE.....	29
2.3.1 Cell lines	29
2.3.2 Cell Cryopreservation	30
2.3.3 Cell Recovery.....	30
2.3.4 Cell Passage	30
2.3.5 PEI Transient Transfection.....	30
2.3.6 TurboFect Transient Transfection	31
2.3.7 Liposome Transient Transfection.....	31
2.3.8 Package and Infection of Lenti-viruse	32
2.3.9 Wound Healing Assay	32
2.3.10 Transwell Assay	33
2.4 RNA.....	33
2.4.1 RNA Extraction from Cells.....	33
2.4.2 Reverse Transcription of RNA.....	33
2.4.3 Quantative Real-time PCR.....	34
2.5 PROTEIN	35
2.5.1 Western Blotting	35
2.5.2 Separation of Cell Nuclues of Cytoplasm.....	36
2.5.3 Immunofluorescence Analysis	36
2.5.4 Co-immunoprecipitation	37
2.5.5 Chromatin-immunoprecipitation.....	37
2.5.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay.....	40
2.5.7 Luciferase Assay	42
CHAPTER 3 RESULTS	44
3.1 OVOL2 INVOLVED IN CRC PROGRESSION	44
3.1.1 OVOL2 is Downregulated during CRC Progression.....	44
3.1.2 OVOL2 Correlates with CDH1 Expression.....	45
3.2 OVOL2 SUPPRESSES EMT OF CRC	46

Table of Contents

3.2.1 OVOL2 Controls the Morphology of CRC	46
3.2.2 OVOL2 Controls the Ability to Invasion and Migration of CRC.....	47
3.2.3 OVOL2 Controls the Expression of Genes Related to EMT.....	49
3.3 OVOL2 SUPPRESSES EMT OF CRC BY INHIBITION OF <i>SLUG</i> EXPRESSION	50
3.4 OVOL2 SUPPRESSES <i>SLUG</i> EXPRESSION VIA INHIBITION OF WNT/BETA-CATENIN SIGNALING.....	54
3.4.1 OVOL2 Acts at the Bottom of the Wnt/ β -catenin Signaling Transduction Cascade	54
3.4.2 OVOL2 Suppresses <i>Slug</i> Expression via Binding with TCF4 and β -catenin to Inhibit Wnt/ β -catenin Signaling Activity.....	56
3.5 OVOL2 INHIBITS WNT/BETA-CATENIN SIGNALING BY FACILITATING HDAC1 RECRUITMENT TO TCF4/BETA-CATENIN COMPLEX.....	58
CHAPTER 4 DISSCUSION.....	63
REFERENCE.....	66
ACKNOWLEDGEMENT.....	72

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

实验背景及研究目的: *ovo* 基因编码一组在进化上从果蝇、线虫、斑马鱼到哺乳动物保守的蛋白家族, 包括 OVOL1、OVOL2 及 OVOL3, 该蛋白家族是含有 4 个 C2H2 锌指结构的转录因子。OVOL3 只在胚胎早期表达, 目前几乎没有相关研究。尽管现在已有许多关于 OVOL1、OVOL2 在组织发育方面的研究, 但它们在肿瘤发生发展过程中的作用还是完全未知。在这篇文章中, 我们致力于发现 OVOL2 与结直肠癌上皮-间质转化过程之间的关系, 深入探究其内在分子机理。

实验方法: 划痕、Transwell 及细胞形态实验用于展示 EMT 相关表型; Real-time PCR、Western blotting 及 Luciferase 实验用于分析相关基因的表达; 免疫共沉淀实验用于证明蛋白-蛋白之间的相互作用; 染色质免疫沉淀和凝胶迁移实验用于证明蛋白-DNA 之间的相互结合作用。

结果: 在本篇论文中, 我们首次提出 OVOL2 与结直肠癌的进展有密切联系。在结直肠癌进展的过程中, OVOL2 的表达会被下调。通过数据库检索, 我们发现 OVOL2 与上皮-间质转化过程的标志物及相关基因 CDH1、CLDN7、EPCAM 及 KRT19 等的表达密切相关。通过细胞形态学、迁移能力、侵袭能力等多个方面的实验, 我们证明了 OVOL2 有抑制上皮-间质转化过程的能力, 在接下来一系列回补实验中我们得出该抑制作用是通过下调 Slug 表达而实现的结论。但是, OVOL2 并非直接对 Slug 进行调节, 而是通过 Wnt/ β -catenin 信号。在更深层次对分子作用机理的探究中, 我们发现, OVOL2 能分别与 TCF4、 β -catenin 及 HDAC1 结合。TCF4 与 HDAC1、 β -catenin 与 HDAC1 的结合能力会随 OVOL2 量的增加而增强。除此之外, OVOL2 并不会影响 TCF4 与下游靶基因 DNA 的结合。

结论: 结合我们的实验结果, 我们可以得出这样的结论, OVOL2 可以将 HDAC1 募集至 TCF4/ β -catenin 复合体, 从而下调 Slug 的表达, 最终实现对上皮-间质转化过程抑制的作用。本课题发现了一种控制 Wnt/ β -catenin 信号的新机制, 阐明了通过该机制调控结直肠癌进展方式。

关键词: 上皮-间质转化; OVOL2; Slug; Wnt/ β -catenin 信号通路

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

BACKGROUND & AIMS: The *ovo* gene family encodes evolutionarily conserved proteins within *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Zebrafish* and mammals. Ovo proteins including OVOL1, OVOL2 and OVOL3 contain four DNA-binding C2H2 zinc fingers at the C termini which possess transcriptional regulatory activities. Since OVOL3 is only expressed at the early stage of embryo, there is no special research on it. Currently, studies on OVOL1 and OVOL2 are mainly focused on tissue development; however, it is still unknown whether OVOL2 regulates the formation and progression of cancers. To address this issue, we present in this study, the biological function of OVOL2 on epithelial to mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer and the molecular mechanism of this process.

METHODS: Cell morphology observation, wound-healing assay and transwell invasion assay were used for analysing EMT phenotype. Expression studies were performed by utilizing luciferase assay, quantitative real-time PCR (qPCR) and western blotting. Co-immunoprecipitation (Co-IP) assay was applied for the detection of protein-protein interaction. Chromatin-immunoprecipitation and electrophoretic mobility shift assay were used for detecting protein-DNA interaction.

RESULTS: In this paper, we demonstrated, for the first time, that OVOL2 expression is downregulated along with the progression of colorectal cancer. After the advanced search from Oncomine database, we found that OVOL2 expression exhibited strong correlation with CDH1, CLDN7, EPCAM and KRT19, which are all related to EMT of cancer cells and CDH1 is the hallmark gene of this process. We confirmed the notion that OVOL2 controlled the CRC progression by inhibition of the EMT process via cell morphology observation, wound-healing assay and transwell invasion assay. Moreover, through a series of rescue assay, we concluded the inhibition of EMT was achieved by the downregulation of Slug. Instead of transcriptional repression of Slug directly, OVOL2 was found to inhibit Slug expression via Wnt/ β -catenin signaling.

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.