

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520121153142

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

ET-1 干扰后对肺癌的凋亡、侵袭、增殖的影响  
**Impact on the apoptosis, invasion, proliferation ET-1  
interfere with the formation of lung cancer**

张振宇

指导教师姓名: 江兴堂 教授

专 业 名 称: 内科学 (呼吸内科)

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 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(厦门大学附属中山医院呼吸内科(江兴堂教授))课题(组)的研究成果,获得(厦门大学附属中山医院呼吸内科(江兴堂教授))课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学附属中山医院)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

## 缩略词表

缩略词	英文全称	中文名称
ET	endothelin	血管内皮素
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
PEDF	pigment epithelium-derived factor	色素上皮衍生因子
COX	cyclo-oxygenase	环氧化物水解酶
ECE	endothelin-converting.Enzyme	内皮素转换酶
PLC	phospholipase C	磷脂酶 C
PKC	Protein kinase C	蛋白激酶 C
PTK	Protein tyrosine kinase	蛋白酪氨酸激酶
IGF	insulin-like growth factors	胰岛素生长因子
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$	低氧诱导因子-1 $\alpha$
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2	基质金属蛋白酶-2
uPA	urokinasetype plasminogen activator	尿激酶纤溶酶原
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
ROCK	Rho associated kinase	Rho-相关的丝/苏氨酸蛋白激酶
HER2	human epidermal growth factor receptor-2	表皮生长因子受体
DMEM	Dulbeccos modified Eagle medium	改良eagle 培养基
FBS	Fetal bovine	胎牛血清
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
BSA	Albumin from bovine serum	牛血清白蛋白

## 摘要

### 目的:

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一，威胁着全世界人民生命和健康。同时，它也是世界上发病率和死亡率增长最快的疾病之一，而且大多数肺癌患者到晚期才被诊断。在现阶段肺癌的治疗中，它仍然是无法治愈的。Endothelin (ET)由内皮细胞合成，是一种生物活性肽，是一种强烈的血管收缩剂，具有很强的收缩血管作用，随着对内皮素研究的不断深入，人们发现内皮素与肿瘤关系密切，对肿瘤细胞的生长、增殖、转移、凋亡及化学耐药等方面都有影响。ET 能够产生细胞生长因子，可以促进肿瘤 DNA 合成，基因表达和肿瘤细胞增殖。ET 有 21 种氨基酸组成。有研究发现，内皮素家族有四个同分异构体亚型包括 ET-1 ET-2 ET-3 和 ET-4。目前的研究中，大部分的研究集中在 ET-1。ET-1 能够通过直接或间接分泌的方式促进肿瘤血管生成。ET-1 蛋白水平在部分恶性肿瘤中是升高的，如膀胱癌、结直肠癌、前列腺癌、卵巢癌，包括肺癌。研究表明，ET-1 在肺癌中高度表达并且参与了肺癌细胞增殖。但是，内皮素与肿瘤的生长和转移之间的关系尚未完全阐明。我们通过研究 ET-1 干扰对肺癌的影响来了解 ET-1 与肺癌的增殖、侵袭、凋亡关系，从而为 ET-1 作为肺癌治疗靶点提供依据，并且通过目前广泛应用于临床的抗肿瘤药物恩度观察两者是否具有协同作用。

### 方法:

1.构建含有干扰 ET-1 质粒(设计 3 个不同的质粒编号 538、297、321)的载体，通过荧光定量 PCR 方法从中筛选出干扰效率最高的质粒载体（编号 321），并将干扰效率最高的质粒转染 A549 细胞株，检测转染效率。

2.ET-1 干扰后细胞增殖侵袭凋亡能力的检测：设立 ET-1 正常表达组，ET-1 干扰组，空载组，恩度组，ET-1 干扰联合恩度组，空载+恩度组 5 个实验组。利用 CCK-8 检测细胞增殖变化；流式细胞仪检测细胞的凋亡细胞周期情况；Transwell 检测侵袭能力。

3.WB 检测 RhoA/C, VEGF, PEDF, AKT, E-cadherin, and Cox-2 相关增殖、侵袭、凋亡相关蛋白的变化。

4. ET-1 干扰后稳转细胞组，注射裸鼠皮下。12 只裸鼠随机分为两组，对照组和实验组。对照组接种 A549 sh-NC 细胞；实验组接种 A549 sh-ET-1 细胞。待成瘤后游标卡尺测量瘤子大小；待瘤子长大后将裸鼠处死，取出瘤子进行称重。

#### 结果：

1.ET-1 siRNA 对 A549 细胞增殖的影响 通过研究发现,ET-1 siRNA 能有效抑制 A549 细胞增殖。此外, 通过 Endostar 与 ET-1 siRNA 联合组的影响比单独使用 Endostar 或 ET-1 siRNA 组对增殖的影响都要明显。

2.ET-1 siRNA 对 A549 细胞侵袭能力检测 通过研究发现 ,ET-1 SiRNA 可以显著降低肿瘤细胞的侵袭力。ET-1 SiRNA 与 Endostar 联合组抑制肿瘤侵袭力的效果与其他组相比更明显。

3.ET-1 siRNA 对 A549 细胞凋亡能力检测 通过研究发现,ET-1 SiRNA 可以显著增加肿瘤细胞的凋亡, ET-1 siRNA 与 Endostar 二者对增加肿瘤细胞凋亡效应有协同作用。

4. ET-1 siRNA 对 A549 细胞周期的影响 通过研究发现, ET-1 siRNA 能有效抑制 A549 细胞增殖。此外, 通过 Endostar 与 ET-1 siRNA 联合组的影响比单独使用 Endostar 或 ET-1 siRNA 组对增殖的影响都要明显。

5.ET-1 siRNA 通过 WB 检测了 RhoA/C, VEGF, PEDF, AKT, E-cadherin, and Cox-2 等相关蛋白的变化 通过研究发现,在 ET-1 SiRNA 能明显降低肺癌细胞侵袭、增殖能力, 增加肺癌细胞的凋亡能力。 ET-1 siRNA 与 Endostar 二者对抑制肺癌细胞的侵袭、增殖, 增加肺癌细胞的凋亡能力有协同作用。

6.ET-1 SiRNA 裸鼠体内成瘤测量瘤体肿瘤体积重量 我们发现 ET-1 SiRNA 在体内能有效抑制肿瘤生长。

#### 结论：

1.高表达的 ET-1 肺癌细胞株 A549, 通过抑制 ET-1 表达后我们发现能抑制肺癌细胞的增殖、侵袭能力, 增强肺癌细胞的凋亡。

2.ET-1 沉默后联合恩度能使抑制肿瘤细胞增殖、侵袭能力, 增强肺癌细胞的凋亡的效果更加明显。

**关键词：** ET-1 A549 增殖 侵袭 恩度

## Abstract

Lung cancer is one of the most common malignant tumor, which is threatening the people's life and health around the world. It is also one of the fastest growing disease process lead to morbidity and mortality. Most patients diagnosed lung cancer in late stage. At present, the lung cancer could not be cured. Endothelin (ET), synthesized from endothelial cells, is a kind of biological active peptide, also a powerful vasoconstrictor and strong angiotonics. Although the deepen research on ET is found closely associated with tumor, it has influenced on the growth, proliferation, apoptosis, metastasis of tumor cells, and chemical resistance etc. In addition, ET can produce cell growth factor that promotes the synthesis of tumor DNA, gene expression and tumor cell proliferation. ET have 21 kinds of amino acid composition, some research has found that endothelin family has four isomers including ET-1, ET-2 , ET-3, and ET- 4. Current study is focused on ET - 1, ET - 1 can go directly or indirectly through the paracrine to promote the tumor angiogenesis. ET - 1 protein level rises in some part of the malignant tumor, such as bladder cancer, colorectal cancer, prostate cancer, ovarian cancer, also including lung cancer. Studies have shown that ET-1 plays a crucial role in lung cancer cell proliferation and developed lung cancer. However, the relationship between endothelin and tumor growth and metastasis has not been fully elucidated. By studying ET-1 interference to lung cancer we are aware of the relationship between ET-1 and the proliferation, invasion, and the apoptosis of lung cancer. Therefore, it may provide the cornerstone for ET - 1 base lung cancer treatment targets, and also the interference of ET – 1 for the treatment method of lung cancer

Methods:

1. Establish ET - 1 interference A549 cell line.
2. The ability of detection of cell proliferation apoptosis after ET – 1 interference: set up ET - 1 normal expression, interfere with the group, ET – 1 no-load group, endostar

group, ET-1 interference united endostar group, and no-load plus endostar group, .Use CCK 8 to test cell proliferation change; use Flow cytometry instrument to detect the cell apoptosis; uses Transwell to test invasion ability.

3. Detection of WB RhoA/C, VEGF, PEDF, AKT, E - cadherin, and cox-2 protein related changes.

4. ET-1 Interference after stabilizing cell group, given subcutaneous injections of nude mice. 12 nude mice were randomly divided into two groups, control and experimental group. The control group inoculates A549 sh - NC cells; The experimental group inoculates cells A549 sh - ET - 1. After it grows into tumor use vernier caliper to measure tumor size; killed the nude mice after the tumor grows bigger in size, then removed the tumor from each mice and weight.

Results:

1. ET - 1 siRNA effect on A549 cell proliferation, through this study we have found that ET 1 siRNA can effectively inhibit proliferation of A549 cells. In addition, it was more obvious on the influenced by using united group of Endostar and siRNA ET - 1, instead of using alone.

2. SiRNA ET - 1 on A549 cell invasion detection: through this study we figured out that ET 1 siRNA can be significantly reduced the aggressivity of tumor cells. The united group of SiRNA and Endostar ET - 1 was more obvious on the influence of inhibiting tumor invasion compared to other groups.

3. SiRNA ET - 1 on A549 cell apoptosis detection: through the study we learned that ET-1 siRNA could be significantly increased the apoptosis of tumor cells, both ET - 1 siRNA and Endostar have synergistic effect upon increasing the tumor cell apoptosis.

4. By WB , ET - 1 siRNA, tested the RhoA/C PEDF and VEGF, AKT, E - cadherin, and cox-2 protein related changes: In the entire study we were aware of siRNA ET - 1 can obviously reduced the lung cancer cell invasion and proliferation, increase the ability of lung cancer cell apoptosis. both ET - 1 siRNA and Endostar have a synergistic effect upon inhibition of lung cancer cell invasion ,proliferation, and increasing ability of lung cancer cell apoptosis.

5. ET - 1 i SiRNA tumor measurement and gross tumor volume tumors of nude mice,



we found that ET - 1 SiRNA can effectively inhibit the growth of tumor in the body.

Conclusion:

1. The high expression of ET - 1 lung cancer cell line A549, We figured out that the inhibition of ET - 1 can inhibit the proliferation , invasion ability and enhanced lung cancer cell apoptosis.
2. After silence the united ET -1 and endostar is more obvious to influence the inhibition of tumor cell proliferation, invasive ability and improved the effect of lung cancer cell apoptosis.

**Keywords:** ET – 1 ;A549 ;proliferation;invasion;endostar

# 目 录

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
第 1 章 引言 .....	1
第 2 章 综述 .....	3
2.1 ET 及其受体.....	3
2.2 ET 影响肿瘤生长及转移的机制 .....	4
2.2.1 ET 促进肿瘤细胞增殖.....	4
2.2.2 ET 与肿瘤血管生成.....	4
2.2.3 ET 促进肿瘤转移.....	4
2.3 ET 与肺癌.....	5
2.3.1 ET 与肺癌血管的生成.....	7
2.3.2 ET 与肺癌的转移.....	7
2.3.3 ETB 受体表观遗传沉默与肺癌 .....	8
2.4 ET 与其他肿瘤.....	8
2.4.1 头和颈部肿瘤 .....	8
2.4.2 乳腺癌 .....	9
2.4.3 胃癌、结肠癌与直肠癌 .....	9
2.4.4 膀胱癌与前列腺癌 .....	9
2.4.5 卵巢癌 .....	9
2.4.6 软骨肉瘤 .....	10
2.4.7 黑色素瘤 .....	10
2.5 结语.....	10
2.6 本实验研究目的.....	11
第 3 章 实验材料与方法 .....	12
3.1 实验材料.....	12

3.1.1 供试细胞及动物 .....	12
3.1.2 实验材料及设备 .....	12
3.1.3 主要溶剂配制 .....	14
<b>3.2 实验方法 .....</b>	<b>16</b>
3.2.1 A549 细胞培养 .....	16
3.2.2 建立 ET-1 干扰肺癌细胞株 .....	16
3.2.3 体外检测肺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 .....	23
3.2.3.1 cck-8 法检测细胞增殖效应 .....	23
3.2.3.2 实时荧光定量 PCR .....	25
3.2.3.3 侵袭功能检测 .....	26
3.2.3.4 Western blot 检测侵袭、增殖、凋亡相关蛋白的变化 .....	26
3.2.3.5 凋亡功能检测 .....	29
3.2.3.6 细胞周期检测 .....	31
3.2.4 体内肿瘤抑制试验 .....	31
<b>3.3 统计学分析 .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4 结果与分析 .....</b>	<b>32</b>
3.4.1 建立 siET-1 A549 细胞 .....	32
3.4.2 ET-1siRNA 对 A549 细胞增殖的影响 .....	33
3.4.3 ET-1siRNA 对 A549 细胞侵袭能力的检测 .....	34
3.4.4 ET-1siRNA 对 A549 细胞的凋亡的影响 .....	35
3.4.5 ET-1siRNA 对 A549 细胞的周期的影响 .....	38
3.4.6 Western Blot 检测与细胞增殖、侵袭、凋亡相关蛋白的表达 .....	42
3.4.7 ET-1siRNA 裸鼠体内成瘤肿瘤大小的影响 .....	43
<b>第 4 章 讨论 .....</b>	<b>44</b>
<b>参 考 文 献 .....</b>	<b>48</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>56</b>
<b>攻读硕士学位期间发表文章及待发表的文章 .....</b>	<b>57</b>

# Table of Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English.....</b>	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapter 2 Review.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1ET promote tumor metastasis.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2ET influence mechanism of tumor growth and metastasis.....</b>	<b>4</b>
2.2.1ET to promote tumor cell proliferation.....	4
2.2.2 ET and tumor angiogenesis.....	4
2.2.3 ET promote tumor metastasis .....	4
<b>2.3ET and lung cancer.....</b>	<b>5</b>
2.3.1 ET and the formation of blood vessels with lung cancer.....	7
2.3.2The transfer of ET and lung cancer.....	7
2.3.3 ETB receptor epigenetic silencing and lung cancer.....	8
<b>2.4ET with other tumor .....</b>	<b>8</b>
2.4.1 Head and neck tumors.....	8
2.4.2 Breast cancer.....	9
2.4.3 Cancer of the stomach, colon and rectal cancer.....	9
2.4.4 Bladder cancer and prostate cancer.....	9
2.4.5 Oovarian cancer.....	9
2.4.6 Chondrosarcoma.....	10
2.4.7 Melanoma.....	10
<b>2.5 Epiloque.....</b>	<b>10</b>
<b>2.6 The purpose of this experimental study.....</b>	<b>11</b>

<b>Chapter 3 Materials and Methods.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Materials.....</b>	<b>12</b>
3.1.1 The selected cells and animals.....	12
3.1.2 The experimental materials and equipment.....	12
3.1.3 Main solvent.....	14
<b>3.2 Methods .....</b>	<b>16</b>
3.2.1 A549 cell culture.....	16
3.2.2 Establish interference ET - 1 lung cancer cell lines.....	16
3.2.3 Lung cancer cell proliferation, invasion, and apoptosis in vitro were tested .....	23
3.2.3.1 CCK 8 method to detect cell proliferation effect.....	23
3.2.3.2 Real-time PCR.....	25
3.2.3.3 Invasive feature detection.....	26
3.2.3.4 Western blot detecting invasion, proliferation, apoptosis related proteins	26
3.2.3.5 Apoptosis examination.....	29
3.2.3.6 Cell cycle function test.....	31
3.2.4 In vivo tumor inhibition test.....	31
<b>3.3 Statistical analysis .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4 results and analysis.....</b>	<b>32</b>
3.4.1 Establish siET - 1 A549 cells.....	32
3.4.2 ET - 1 siRNA effects on A549 cell proliferation .....	33
3.4.3 ET - 1 siRNA ability on A549 cell invasion.....	34
3.4.4 ET - 1 siRNA effects on apoptosis of A549 cells.....	35
3.4.5 ET - 1 siRNA effects on Cyclic of A549 cells.....	38
3.4.6 Western Blot detection and cell proliferation, invasion, the expression of apoptosis related proteins.....	42

3.4.7 ET - 1 in vivo sirna nude mice into a tumor the size of the tumor.....	43
<b>Chapter 5 Discussion.....</b>	<b>44</b>
<b>References.....</b>	<b>48</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>56</b>
<b>Publications and awards.....</b>	<b>57</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第 1 章 引言

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一，威胁着全世界人民生命和健康。同时它也是世界上发病率和死亡率增长最快的疾病之一，而且大多数肺癌患者到晚期才被诊断。在现阶段肺癌的治疗中，它仍然是无法治愈的。癌症是一个由多种基因参与多步骤的一个极其复杂过程，肺癌的治疗过程中防止肺癌的侵袭和转移是影响肺癌治疗成败的关键。尽管目前世界上已经有许多新的治疗干预措施，但在过去的十年中发病率和死亡率不断增加。目前肺癌仍是一个很难攻克的医学问题。因此，很有必要去寻找一种有效和安全治疗肺癌的方法。

Endothelin (ET), 由内皮细胞合成, 是一种生物活性肽, 是一种强烈的血管收缩剂, 1988 年由 Yanagisawa 发现<sup>[1]</sup>。越来越多的研究表明, ET 不仅可以加强血管和心肌的收缩, 促进神经内分泌功能, 同时具有强大促进细胞增殖和促进有丝分裂的作用, 在肿瘤的生长过程中参与多种肿瘤的生长和诱导血管生成。此外, ET 能够产生细胞生长因子可以促进肿瘤 DNA 合成, 基因表达和肿瘤细胞增殖。ET 有 21 种氨基酸组成, 有研究发现, 内皮素家族有四个同分异构体亚型包括 ET-1 ET-2 ET-3 和 ET-4, 前三个亚型可在人体内表达。目前的研究中, 大部分的研究集中在 ET-1, 它强大的生物活性作用。ET 在肿瘤的发展中起着重要的作用, 它可以在其他生长因子的协调作用下能够激活原癌基因和促进细胞分裂和增殖<sup>[2]</sup>。被激活的原癌基因能够促进细胞增殖在肿瘤的发展中起着重要的作用<sup>[3]</sup>。并且 ET-1 能够通过直接或间接旁分泌的方式促进肿瘤血管生成<sup>[4]</sup>。研究表明, ET-1 在肺癌中高度表达并且参与了肺癌细胞增殖<sup>[5]</sup>。但是, 内皮素与肿瘤的生长和转移之间的关系尚未完全阐明。

血管内皮生长因子 (VEGF) 是最有效的促血管生长因子。在肿瘤的生长、转移依赖新生血管的形成中扮演重要的角色。E-cadherin 是一类与钙粘蛋白粘附的物质, 在选择性细胞聚集起着重要的作用。在肿瘤细胞侵袭转移的过程中具有重要的影响, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)也被称为蛋白激酶 B(PKB), 它至少有三个家庭成员: Akt1, Akt2, Akt3。并且 Akt 在调节细胞周期、细胞凋亡和血管生成等发挥着重要的作用。目前认为是细胞增殖中重要的信号通道, 前列腺素(PG)

合成限速酶,是一种非常重要的炎症介质, COX- 2 参与多种病理生理过程,在不同高度恶性肿瘤中均有表达, 与肿瘤入侵和转移有关。Rho 是一种 GTP 三磷酸鸟苷酶结合发挥活性的一种蛋白。Rho 与肿瘤入侵和转移发生有关,色素上皮衍生因子(PEDF)是一种有效的抑制血管生成因子,具有诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。

我们将通过研究 ET-1 干扰后与肺癌增殖、侵袭、凋亡的影响, 从而为肺癌复杂发病机理的阐明提供有意义的资料, 从而为肺癌靶向治疗新靶点打下基础。



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.