

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520131153495

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

姜黄素经胰岛素样生长因子1受体通路抑制
缺氧 HepG2 肝癌细胞 VEGF 表达的机制研究

Curcumin inhibit VEGF expression via IGF-1R pathway in
hypoxic-induced HepG2 human hepatocellular
carcinoma cells

陈艺辉

指导教师姓名: 刘静 副教授

专 业 名 称: 外科学 (肝胆方向)

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 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

摘 要

肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 是最常见的恶性肿瘤之一, 具有高度恶性、血供丰富、生长迅速及起病相对隐匿等特点。作为富血管实体瘤, HCC 的主要特征是肿瘤细胞失控性增殖导致肿瘤内缺氧微环境的形成, 促进新生血管生成, 从而促进肿瘤生长。

姜黄素是从草本姜科植物姜黄的根茎中提取出来的一种脂溶性酚类色素, 具有抗氧化、抗炎、抗凝、降脂、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗血管生成、保护肝功能及抗衰老消除自由基等广泛药理作用。姜黄素具有抗癌谱广、毒副作用小及价格低廉的优点, 使之成为近期的研究热点。但姜黄素抗肿瘤作用的机制复杂, 尤其抗血管生成作用的机制至今仍未彻底阐明。因此, 值得深入研究姜黄素抗肿瘤血管生成作用的机制。

细胞信号传导系统在细胞的生理和病理过程中均发挥重要的作用, 而且在与肿瘤的发生发展密切相关。我们课题组前期的实验研究表明, 胰岛素样生长因子 1 受体 (Insulin-like Growth Factor Receptor-1 receptor, IGF-1R) 通路及缺氧 HepG2 肝癌细胞 VEGF 的表达存在正相关性, 而且姜黄素可能通过 IGF-1R 通路抑制缺氧 HepG2 肝癌细胞 VEGF 的表达。因此, 本研究通过构建 IGF-1R 基因敲除 HepG2 细胞模型及诱导其缺氧体外模型, 来明确姜黄素是否通过 IGF-1R 通路抑制缺氧 HepG2 肝癌细胞 VEGF 的表达。

本实验先利用 CRISPR-Cas9 技术简单高效地成功构建了 IGF-1R 基因敲除 HepG2 肝癌细胞模型。以四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法观察 IGF-1R 基因敲除对 HepG2 肝癌细胞及姜黄素对野生型 HepG2 肝癌细胞和 IGF-1R 基因敲除 HepG2 肝癌细胞存活力的影响。结果表明, IGF-1R 基因敲除的 HepG2 肝癌细胞与野生型相比, 细胞增殖明显受抑制, 凋亡增加; 其次, 姜黄素抑制 IGF-1R 基因敲除的 HepG2 肝癌细胞增殖的作用要强于野生型。

为了探讨缺氧对 IGF-1R 基因敲除 HepG2 肝癌细胞存活力和 IGF-1R、HIF-1 α 、VEGF 表达及相关性的影响, 我们利用氯化钴 (CoCl₂) 构建缺氧模型, 以 MTT 比色法观察不同缺氧条件对 IGF-1R 基因敲除 HepG2 肝癌细胞存活力的影响; 利用

Western blot方法观察氯化钴诱导缺氧对IGF-1R基因敲除HepG2肝癌细胞IGF-1R、HIF-1 α 、VEGF蛋白表达的影响。结果表明，随着浓度的增加或作用时间的延长，细胞生存活力受到明显抑制，CoCl₂对IGF-1R基因敲除HepG2肝癌细胞毒性作用就越大；随着CoCl₂浓度和时间逐渐增加，HIF-1 α 和VEGF蛋白表达与IGF-1R基因敲除HepG2细胞缺氧存在明显的量效和时效关系，并且HIF-1 α 与VEGF蛋白表达在缺氧诱导量效和时效关系中均存在显著的正相关性，说明缺氧可以通过IGF-1R通路以外的途径诱导HIF-1 α 和VEGF蛋白的表达。

为了明确姜黄素是否经IGF-1R通路抑制缺氧HepG2肝癌细胞VEGF的表达，我们以MTT比色法观察姜黄素对缺氧IGF-1R基因敲除HepG2肝癌细胞存活力的影响，并将实验组分成以下4组：A组：缺氧；B组：缺氧+姜黄素；C组：IGF-1R KO+缺氧；D组：IGF-1R KO+缺氧+姜黄素，利用Western blot检测各组的IGF-1R、p-Akt、Akt、p-Erk1/2、Erk1/2、HIF-1 α 及VEGF蛋白的表达水平。结果表明，姜黄素能抑制缺氧IGF-1R基因敲除HepG2肝癌细胞的增殖，并呈时间-剂量依赖性；与A组：缺氧相比，我们发现IGF-1R、p-Akt、p-Erk1/2、HIF-1 α 及VEGF蛋白相对表达量在B组：缺氧+姜黄素中明显降低，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），这提示姜黄素可能通过IGF-1R通路抑制缺氧HepG2肝癌细胞HIF-1 α 及VEGF蛋白的表达。继而，A组与B组的差值明显大于C组与D组的差值，具有统计学意义（ $P < 0.01$ ），这说明相对于缺氧HepG2细胞，姜黄素对缺氧IGF-1R基因敲除HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF蛋白表达的影响明显降低。结合A组与B组的对比结果，我们得出姜黄素能通过IGF-1R通路抑制缺氧HepG2肝癌细胞HIF-1 α 及VEGF蛋白表达。此外，与C组：IGF-1R KO+缺氧相比，我们也发现p-Akt、p-Erk1/2、HIF-1 α 及VEGF蛋白相对表达量在D组IGF-1R KO+缺氧+姜黄素降低，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），这说明姜黄素还可以通过其他信号通路抑制缺氧HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF蛋白表达。

总之，本实验证实姜黄素可通过IGF-1R信号通路抑制缺氧HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF蛋白的表达，而且还可通过其他信号途径起类似作用，其机制有待进一步研究。本实验的研究结果将对姜黄素对肝癌的治疗及预防起一定的推动作用。

关键词： HepG2肝癌细胞；IGF-1R基因敲除；CRISPR-Cas9；姜黄素；缺氧；缺氧诱导因子-1 α ；血管内皮生长因子

Abstract

Hepatocellular carcinoma(HCC) is one of the most common malignant tumor in the world, which is highly malignant and rich in blood supply, grew rapidly and conceal onset. As a solid tumor with lots of blood vessels, the main characteristic of HCC is the uncontrolled cancer cell proliferation, which brings about a hypoxia microenvironment in the tumor, thus promotes the angiogenesis.

Curcumin (diferuloylmethane), extracted from the rhizome of the plant perennial herb *Curcuma longa*, is a liposoluble polyphenol pigment. Curcumin has a widespread pharmacological action, including antioxidant, anti-inflammation, anticoagulation, fat loss, anti-atherosclerosis, anti-neoplasm, anti-angiogenesis, liver protection, anti-aging, etc. Having advantages of extensive anti-neoplasm spectrum, little side-effect and low price makes curcumin the hot issue in recent research. However, the mechanism of the anti-angiogenesis for curcumin is clarified incompletely which is worth studying.

The cell signaling pathway plays an important role in the occur and development progress of neoplasm. The research, done by our laboratory group, has shown a positive correlation between the IGF-1R pathway and expression of VEGF in hypoxia-induced HepG2 cells. The purpose of the present study is to confirm whether the curcumin inhibited VEGF expression via IGF-1R pathway in hypoxia-induced HepG2 cells.

We constructed IGF-1R knockout HepG2 cell based on CRISPR/Cas9 technology simply and efficiently. MTT assay was used to observe the influence of IGF-1R knockout on HepG2 cells vitality, and curcumin on IGF-1R knockout HepG2 cells and HepG2 cells vitality. The results indicated, compared with HepG2 cells, IGF-1R knockout HepG2 cells proliferation was inhibited. And curcumin has a greater inhibitive effect on IGF-1R knockout HepG2 cells than HepG2 cells.

To observe the effect of IGF-1R knockout HepG2 cells vitality and IGF-1R, HIF-1

α , VEGF expressions induced by hypoxia. We set up the hypoxia model using the cobalt chloride (CoCl₂), and MTT assay was used to observe the influence of hypoxia on IGF-1R knockout HepG2 cells vitality. Western-blot assay was used to detect the IGF-1R, HIF-1 α , VEGF protein expressions. The results showed that CoCl₂ induced IGF-1R knockout HepG2 cells anoxic in a dose- and time-dependent manner, the cytotoxicity increased along with the time of culture and the increase of doses of CoCl₂. The HIF-1 α protein had significant positive correlations with the VEGF protein expressions in a dose- and time-dependent manner, which indicated that hypoxia could induced the HIF-1 α and VEGF protein expressions via other pathways.

To make sure whether curcumin inhibited the VEGF expression via IGF-1R pathway in hypoxia-induced IGF-1R knockout HepG2 cells. The influence of curcumin on cell survival in hypoxia-induced IGF-1R knockout HepG2 cells was accomplished by MTT assay. Western-blot was used to detect the IGF-1R, P-Akt, P-Erk1/2, HIF-1 α and VEGF protein expressions. The results suggested that curcumin inhibited hypoxia-induced IGF-1R knockout HepG2 cells vitality in a dose- and time-dependent manner. Curcumin can inhibit the HIF-1 α and VEGF protein expression in hypoxia-induced HepG2 cells via IGF-1R pathway and other pathways.

In summary, our research proved that curcumin can can inhibit VEGF expression in hypoxia-induced HepG2 cells not only via IGF-1R pathway, but also other pathways, which need further study. The results would improve the treatment and prevention of curcumin on liver cancer.

Key words: HepG2 cell; IGF-1R knockout; CRISPR-Cas9; Curcumin; hypoxia; HIF-1 α ; VEGF

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞性肝癌
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮因子
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1	缺氧诱导因子-1
EPO	Erythropoietin	促红细胞生成素
HO-1	Heme Oxygenase-1	血红素氧合酶
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase	诱导一氧化氮合酶
TACE	Transcatheter arterial chemoembolization	经动脉灌注化疗栓塞术
HRE	Hypoxia-responsive element	缺氧反应原件
TAVE	transcatheter arterial and portal vein embolization	经导管肝动脉联合门静脉 栓塞
bFGF	basic fibroblast growth factor	碱性成纤维生长因子
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板源性生长因子
TGF β	transforming growth factor- β	转化生长因子 β
IL-8	interleukin-8	白细胞介素-8
PIGF	placental-like growth factor	胎盘样生长因子
IKK	I κ B kinase	I κ B 激酶复合体
Cur	Curcumin	姜黄素
IFN- γ	Interferon- γ	抑制干扰素 γ
TNF- α	tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
LOX	Lipoxidase	脂肪氧化酶
COX	cyclooxygenase	环氧合酶
AP-1	Activator protein-1	激活蛋白-1
Ang-1/2	Angiotensin-1/2	血管紧张素 1/2
PI3K	phosphatidyl inositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3 激酶

英文缩写	英文全称	中文全称
Akt	protein kinase B	蛋白激酶 B
MAPK	mitogen-activated protein kinases	丝裂原活化激酶
Erk1/2	extracellular regulated protein kinases	细胞外调节蛋白激酶
DSB	double stranded break	DNA 双链断裂
NHEJ	non-homologous end joining	非同源末端连接
HDR	homology directed repair	同源重组
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats	规律成簇间隔短小回文重复序列
ZFNs	Zinc-finger endonuclease	锌指核酸内切酶
TALENs	transcription activator-like effector nuclease	类转录激活因子效应物核酸酶
sgRNA	single-guide RNA	单导向 RNA
CASCAD	CRISPR associated complex for antiviral defense	CRISPR 相关的病毒防御复合体

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
缩略词表.....	V
目 录.....	VII
CONTENTS.....	IX
前 言.....	01
一. 肿瘤缺氧后血管形成的研究.....	01
二. 姜黄素的性质及抗肿瘤作用.....	03
2.1 姜黄素的抗炎抗氧化作用.....	03
2.2 促进肿瘤细胞凋亡作用.....	04
2.3 阻断肿瘤细胞信号传导通路的作用.....	04
2.4 抗血管生成和抑制肿瘤细胞的侵袭及转移.....	05
2.5 其他.....	05
三. 姜黄素对胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF-1R) 信号通路的调节.....	05
四. CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑技术.....	07
五. 研究目的和内容.....	11
第一章 基于 CRISPR-Cas9 技术构建 IGF-1R 基因敲除 HepG2 肝癌细胞模型.....	12
一. 实验材料.....	12
1.1 细胞株.....	12
1.2 主要试剂及耗材.....	12
1.3 主要仪器及设备.....	14
1.4 主要溶液及耗材的配制.....	15
二. 实验方法.....	19
2.1 细胞培养.....	19

2.2	sgRNA 表达载体的构建流程	19
2.3	电转染靶细胞及单克隆的制备和生长	24
2.4	筛选 IGF-1R 基因 Knock out 阳性克隆	24
2.5	MTT 实验	27
2.6	Puro 最低致死浓度条件的摸索	28
2.7	统计学分析	28
三.	实验结果	28
3.1	HepG2 细胞电转条件摸索结果	28
3.2	HepG2 细胞最小全致死浓度摸索 (Puro)	30
3.3	IGF-1R 基因靶位点确定与引物合成	30
3.4	gRNA 表达载体构建	31
3.5	重组质粒电转染 HepG2 肝癌细胞的测序结果	35
3.6	单克隆 PCR 扩增产物的电泳及 Cruiser™ Enzyme 酶切结果	36
3.7	基因敲除阳性克隆的确定	37
3.8	阳性克隆测序结果	37
3.9	IGF-1R 基因敲除对 HepG2 肝癌细胞的影响	38
3.10	姜黄素对 IGF-1R 基因敲除 HepG2 肝癌细胞的影响	39
四.	讨论	40
第二章 姜黄素经胰岛素样生长因子 1 受体通路抑制缺氧 HepG2 细胞 VEGF 表达的机制研究		
44		
一.	实验材料	44
1.1	细胞株	44
1.2	主要试剂及耗材	44
1.3	主要仪器及设备	45
1.4	主要溶液及耗材的配制	46
二.	实验方法	46
2.1	细胞培养	46
2.2	细胞缺氧模型制作	46
2.3	细胞实验分组	47

2.4 MTT 实验 1	47
2.5 MTT 实验 2	47
2.6 Western blot	48
2.7 统计学分析	48
三. 实验结果	48
3.1 氯化钴诱导缺氧对 IGF-1R 基因敲除 HepG2 肝癌细胞的影响	49
3.2 缺氧诱导与 IGF-1R、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达量效关系	49
3.3 缺氧诱导与 IGF-1R、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达时效关系	51
3.4 姜黄素对缺氧肝癌 HepG2 细胞增殖的影响	52
3.5 姜黄素对缺氧 HepG2 细胞及缺氧 IGF-1R 基因敲除 HepG2 细胞 IGF-1R、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达的影响	53
四. 讨论	56
结论	60
本文存在的问题及今后应开展的研究	60
参考文献	62
致谢	68
研究生期间撰写的论文	69

CONTENTS

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreciation	V
CONTENTS	VII
Introduction	01
I Studies of angiogenesis in hypoxic tumor	01
II The character and anti-tumor effect of curcumin	03
2.1 The effect of anti-inflammation and antioxygenation	03
2.2 The effect of induced apoptosis	04
2.3 The inhibition of signaling pathways of tumor	04
2.4 anti-angiogenesis and inhibition of invasion and metastasis	05
2.5 Other	05
III The regulation of curcumin on IGF-1R signal pathway	05
IV CRISPR-Cas9 genome-editing technique	07
V The purpose and contents of this research	11
Chapter I The construction of IGF-1R knockout HepG2 cells via CRISPR-Cas9	12
I Materials	12
1.1 Cell lines	12
1.2 Main reagents	12
1.3 Main instrument	14
1.4 Main solutions	15
II Methods	19
2.1 The cultivation of cells	19
2.2 Construction of sgRNA vector	19
2.3 screening positive clones	24
2.4 MTT assay	27
2.5 Puro minimum lethal concentration	28
2.6 Statistical methods	28
III Results	28

3.1	The conditions of electric transfection	28
3.2	Result of Puro minimum lethal concentration	30
3.3	Design of target site of IGF-1R	30
3.4	sgRNA vector	31
3.5	Sequencing result of transfected HepG2 cells	35
3.6	Cruiser™ Enzyme digestion analysis	36
3.7	The determination of positive clone	37
3.8	Sequencing result of the positive clone	37
3.9	The effect of IGF-1R knockout on HepG2 cells	38
3.10	The effect of curcumin on IGF-1R knockout HepG2 cells	39
IV	Dicussion	40
Chapter II Curcumin inhibit VEGF expression via IGF-1R pathway in hypoxic-induced HepG2 cells		44
I	Materials	44
1.1	Cell lines	44
1.2	Main reagents	44
1.3	Main instrument	45
1.4	Main solutions	46
II	Methods	46
2.1	The cultivation of cells	46
2.2	Constructing the hypoxia mode	46
2.3	The groups of cells	47
2.4	MTT assay1	47
2.5	MTT assay2	47
2.6	Western blot assay	48
2.7	Statistical methods	48
III	Results	48
3.1	The effect of the proliferation of hypoxia induced IGF-1R knockout HepG2 cells	49
3.2	Dose-effect relationship between hypoxia and IGF-1R、HIF-1 α 、VEGF proein expression	51
3.3	The effect of the curcumin on hypoxia induced IGF-1R knockout HepG2	

cells proliferation.....	52
3.4 The effect of curcumin on hypoxia induced IGF-1R knockout HepG2 cells on IGF-1R, HIF-1 α and VEGF protein expression.....	53
IV Discussion.....	56
Conclusion	60
Problems of existing studies and future research need	60
References	62
Acknowledgments	68
Papers	69

厦门大学博硕士论文摘要库

前言

肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 是最常见的恶性肿瘤之一, 具有高度恶性、血供丰富、生长迅速、化疗耐药及起病相对隐匿等特点^[1, 2]。据统计, 在所有的恶性肿瘤中, HCC 的发病率排第 5 位, 并且在肿瘤相关性死亡的病因中排第 3 位, 在中国甚至高居第 2 位^[3-5]。由于肝炎病毒感染相对严重, 亚洲和非洲地区的发病率明显高于其他洲, 而且发病率仍然在逐年剧增。尽管外科手术和传统化疗水平的不断提高, 但是 HCC 被诊断发现时大多有肝硬化, 已是癌症中晚期, 总体生存率依然较低。因此, 迫切需要新的更有效的肝癌治疗方法。HCC 为富血管实体瘤, 其最主要的特征是肿瘤细胞失控性生长, 不断增多的肿瘤细胞使耗氧量增加, 从而导致肿瘤内缺氧微环境的形成。它将促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等相关促血管生成因子的表达, 这与肝癌的生长、浸润、转移、复发及预后密切相关^[6]。为此, 肿瘤靶向治疗尤其是抗肿瘤血管生成治疗, 成为肝癌缺氧治疗研究的新热点。

一、肿瘤缺氧后血管形成的研究

在肿瘤发生发展过程中, 当肿瘤细胞增长速度超过血管生成的速度而导致缺氧微环境的形成, 为了继续生长, 肿瘤细胞启动级联的缺氧适应性反应, 其中最主要的是缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor, HIF-1), 失控的增殖导致肿瘤内缺氧是 HCC 形成的特征性微环境。再者, 目前经肝动脉化疗栓塞 (TACE) 是治疗中晚期 HCC 非手术治疗最重要的方法。TACE 可以明显降低肿瘤负荷, 延长患者生存期, 提高不能切除的 HCC 患者生活质量, 大幅度改善预后。但是, TACE 也有其缺点和局限性。单纯 TACE 治疗后 HCC 既因缺血缺氧和化疗药物的细胞毒作用引起 HCC 细胞坏死, 但仅选择性阻断肝动脉, HCC 仍然可以通过门静脉获得部分血供, 也可通过肝周韧带或与周围组织粘连而获得侧支血供, 或通过因缺氧诱发 HCC 分泌 HIF-1, 促进肿瘤血管生成, 导致肿瘤复发和转移^[7]。

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.