

【方法】 利用免疫组化检测鼻咽癌和正常鼻黏膜组织中的 MTA1 蛋白和 EMT 相关蛋白的表达情况,并结合临床病理特征和 EMT 相关蛋白进行相关性分析。构建 MTA1 过表达和干扰表达的鼻咽癌细胞系,蛋白质印迹和 transwell 实验检测 MTA1 对鼻咽癌细胞侵袭和 EMT 发生的影响。通过蛋白质印迹和免疫荧光检测 Wnt 通路和 β -catenin 核转位研究 MTA1 发挥功能的机制。以免疫组化检测鼻咽癌组织中 LMP2A 和 MTA1 的相关性,慢病毒技术构建 LMP2A 表达而 MTA1 缺失的细胞系,蛋白质印迹和 transwell 实验检测其侵袭能力和 EMT 的变化。进而建立裸鼠尾静脉注射和左心室注射模型,体内实验研究 MTA1 对鼻咽癌转移的影响。使用 mTOR 下游调控通路 4EBP1 的抑制剂 INK-128 和 siRNA 干扰 c-myc 表达,研究 LMP2A 激活 MTA1 表达的通路机制。

【结果】 免疫组化分析发现 MTA1 高表达与鼻咽癌 TNM 分期的 N 和 M 分期呈正相关。在鼻咽癌组织中 MTA1 高表达于癌巢和癌浸润发生部位。MTA1 的高表达与 E-cadherin 表达呈负相关,和 Vimentin 的表达呈正相关。低表达 MTA1 的细胞系 CNE-1 过表达 MTA1 后,侵袭能力增强,EMT 表型增加。高表达 MTA1 的细胞系 CNE-2 干扰其表达后,侵袭能力减弱,EMT 表型减少。裸鼠左心室注射,CNE-1-MTA1 细胞转移能力增强,CNE-2-siMTA1 细胞转移能力下降。CNE-1 的 MTA1 过表达促进了 Wnt1 的表达,促使 β -catenin 的入核。LMP2A 和 MTA1 的过表达具有正相关性。LMP2A 促进了 CNE-1 和 CNE-2 细胞系表达 MTA1。在 LMP2A 表达的细胞系中,干扰 MTA1 的表达能抑制肿瘤侵袭和 EMT 的发生。动物模型亦显示 CNE-1-LMP2A 的 MTA1 表达干扰抑制了肿瘤转移的发生。过表达 LMP2A 的 CNE-1 细胞系中 mTOR 和 4EBP1-eIF4E axis 通路活化。与 Rapamycin 相比较,INK-128 药物能特异性抑制 4EBP1-eIF4E axis 的活化,降低 CNE-1-LMP2A 的侵袭能力、 β -catenin 的入核及 EMT 的发生。对 C-myc 的干扰表达,能部分降低 MTA1 的表达及 CNE-1-LMP2A 的侵袭能力。

【结论】 MTA1 通过 Wnt1 通路活化促进了鼻咽癌的转移和 EMT 发生;LMP2A 能激活 mTOR 和 GSK-3 β 通路,4EBP1-eIF4E axis 的活化参与了 MTA1 mRNA 的稳定性等转录后调控,也参与 C-myc 对 MTA1 的转录调控,从而增强鼻咽癌侵袭转移能力并促进 EMT 发生。

关键词: 鼻咽癌;潜伏膜蛋白 2A;转移性肿瘤抗原 1;上皮间质转化

A-S4-16

MiR-130 调控 TSC1 促进卵巢癌发生发展的作用和机制

王玉琼¹,董瑞芬²,王思奇¹,许立美³,芦山¹,李宜诺¹;指导教师:刘招舰

1. 山东大学 2010 级临床医学八年制
2. 山东大学 2010 级妇产科学
3. 山东大学 2013 级细胞生物学

【目的】 抑癌基因 TSC1 是 mTOR 信号通路的负调控因子,TSC1 的突变或失活会引起 mTOR 的异常活化和不受控制的细胞生长和细胞增殖。TSC1 在神经胶质瘤、胃癌、结肠癌及卵巢癌等多种恶性肿瘤中表达降低,但具体机制尚不明确。本研究旨在寻找靶向调控 TSC1 的 miRNA,明确其对 TSC1 及 mTOR 信号通路的影响,并进一步研究该 miRNA 在卵巢癌中发生发展过程中的作用。

【方法】 通过生物信息学分析,初步确定候选 miRNA,瞬时转染 miRNA mimics 和 inhibitors,通过蛋白质印迹和 Luciferase 等方法明确靶向调控 TSC1 的 miRNA;蛋白质印迹检测 miRNA 对 mTOR 信号通路关键分子表达的影响;建立 miRNA 过表达和低表达的卵巢癌细胞系,研究 miRNA 及 TSC1 对卵巢癌细胞增殖、转化、侵袭能力及化疗敏感性的影响;最后通过动物实验明确靶向调控 TSC1 的 miRNA 与卵巢癌发生发展的关系。

【结果】 瞬时转染 mir-27、mir-130、mir-204 的 mimics 并检测 TSC1 的表达,发现转染 mir-130 的细胞中 TSC1 表达明显降低,mTOR 下游关键蛋白 mTOR、p70S6K、4EBP-1 的磷酸化水平升高,瞬时转染 mir-130 inhibitor 后,TSC1 含量上调,mTOR、p70S6K、4EBP-1 磷酸化水平降低,进一步佐证 mir-130 靶向调控 TSC1,利用收集的卵巢癌及正常组织检测 mir-130 的表达,显示 mir-130 在卵巢癌中含量升高。同时我们也成功构建了稳定转染 mir-130

的细胞系,为后续体内体外实验奠定了基础。

【结论】 Mir-130 通过靶向抑制 TSC1 的表达,使得 TSC1/TSC2 复合物含量减少,对 mTOR 的抑制作用减弱,从而使 mTOR 复合物过度磷酸化,继而磷酸化下游的靶蛋白 p70S6K、4EBP-1,促进蛋白的合成,尤其是与细胞周期有关的蛋白,从而促进细胞增殖和耐药等恶性行为。

关键词: mir-130; TSC1; mTOR 信号通路; 卵巢癌

A-S4-17

褪黑素抑制肿瘤细胞增殖中 microRNA 的表达改变

李文诗,柴佩韦,毕 普;指导教师:许伟榕

上海交通大学医学院 2010 级临床医学五年制留学生

【目的】 观察褪黑素作用于肿瘤细胞后细胞的增殖改变,探讨这种增殖是否与 miRNA 的表达有关。

【方法】 选择适宜浓度褪黑素刺激肿瘤细胞,CCK 法检测其增殖情况,流式细胞术检测处理后细胞凋亡与周期的改变。最后,通过 real-time PCR 和蛋白质印迹技术,从核酸和蛋白水平上进行 miRNA 和相关靶蛋白的检测。

【结果】 褪黑素能促进细胞凋亡,抑制细胞增殖。Real-time PCR 结果显示褪黑素能够明显上调 NB4 细胞中 mir-96 的表达,在 BxPC3 细胞中 mir-34a、mir-96、mir-100 均有不同程度的表达上调。蛋白质印迹结果显示 BxPC3 细胞中, mir-96 的靶蛋白 KRAS 在褪黑素处理后表达下调,并具有一定浓度依赖性。

【结论】 褪黑素能够抑制 BxPC3 和 NB4 肿瘤细胞的增殖并能促进其细胞凋亡,且具有浓度依赖性和时间依赖性。这种增殖抑制可能与相关 mirRNA 表达改变密切相关。

关键词: 褪黑素; miRNA; BxPC3; NB4; KRAS

A-S4-18

MiR-101 通过靶向 RAP1B 调节上皮间质转化并抑制乳腺癌的侵袭和转移

王 洋,付轶群,王书昌,朱鹏雄;指导教师:赵 倩

上海交通大学医学院 2010 级临床医学八年制

【目的】 探讨微小 RNA miR-101 在乳腺癌细胞转移与侵袭中的功能及靶点。

【方法】 首先通过脂质体转染的方法在 MDA-MB-231、BT549 和 MDA-MB-4355 细胞系中瞬时过表达 miR-101 模拟物,进而通过划痕实验、transwell 迁移和侵袭实验来反映细胞运动能力的改变;然后应用荧光素酶报告基因分析技术和蛋白质印迹技术寻找并验证 miR-101 的靶基因。

【结果】 在功能学上 miR-101 的过表达可显著抑制 MDA-MB-231、BT549 和 MDA-MB-4355 细胞的迁移和侵袭能力($P < 0.01$);在线软件预测 RAP1B 和 RAB5A 是 miR-101 的潜在靶基因;荧光素酶报告基因分析初步证明 RAP1B 是 miR-101 的靶基因;蛋白质印迹从蛋白质水平进一步验证 RAP1B 是 miR-101 的靶基因。

【结论】 在乳腺癌中,miR-101 可以通过靶向 RAP1B 抑制细胞的侵袭和转移能力,这是 miR-101 作为一种特殊的基因调节因子,在乳腺癌的发生发展中起的重要作用之一。

关键词: miR-101; 乳腺癌; RAP1B; 肿瘤转移; EMT