

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 24520121153169

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

PI3K 和 MAPK 抑制剂对 FOXO1 的活性调节及其对胃间质瘤细胞系 GIST-T1 细胞生物学行为的影响

Regulation of PI3K and MAPK inhibitors on the activity of FOXO1 and their effect on biological behavior of GIST-T1 gastric stromal tumor cell lines

高 华

指导教师姓名: 闫峰

专 业 名 称: 外科学

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 6 月

答辩委员会主席:

评阅人:

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

目录

摘要.....	I
Abstract.....	IV
前言.....	1
1.1 胃肠道间质瘤概述.....	1
1.2 PI3K 与 MAPK 信号通路概述.....	3
1.3 FOXO1 概述.....	5
参考文献.....	8
第一章 胃肠道间质瘤细胞 GIST-T1 细胞学鉴定及其肿瘤相关因子 表达.....	13
1.1 材料与方法.....	13
1.1.1 主要试剂及耗材.....	13
1.1.2 主要仪器和设备.....	14
1.2 细胞的培养.....	15
1.3 免疫细胞化学染色法对 GIST-T1 细胞肿瘤表面标志物 c-KIT 进行检测.....	15
1.4 Western blot 检测 FOXO1, Bcl2, Bax 蛋白在胃间质瘤细胞系 GIST-T1 中的表达.....	15
1.5 结果.....	16
1.5.1 免疫细胞化学染色检测胃间质瘤细胞的标志物.....	16
1.5.2 FOXO1、Bcl2、Bax 蛋白在胃间质瘤细胞系 GIST-T1 中的表达.....	17
1.6 讨论.....	18
参考文献.....	18

第二章 PI3K 抑制剂和 MAPK 抑制剂通过对 FOXO1 活性调节影响

GIST-T1 细胞的生物学行为	20
2.1 材料.....	20
2.1.1 主要试剂及耗材	20
2.1.2 主要仪器和设备	20
2.1.3 药物.....	21
2.1.4 细胞系	21
2.2 方法.....	21
2.2.1 CCK-8 检测 GIST-T1 细胞的增殖抑制率.....	21
2.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测 cDNA 样本中 FOXO1、Bcl2、Bax 基因相对含量.....	22
2.2.3 RNA 抽提	22
2.2.4 RNA 完整性和质量的鉴定	23
2.2.4.1 紫外分光光度仪测定提取总 RNA 的 OD 值	23
2.2.4.2 变性 RNA 琼脂糖凝胶电泳.....	23
2.2.5 去除总 RNA 样本中基因组 DNA 反应.....	24
2.2.6 反转录反应.....	25
2.2.7 实时荧光定量 PCR.....	25
2.2.7.1 引物设计.....	25
2.2.7.2 实时荧光定量 PCR 反应体系.....	26
2.2.7.3 实时荧光定量 PCR 反应循环程序.....	27
2.2.7.4 实时荧光定量 PCR 结果分析.....	27
2.2.8 Western blot 检测 FOXO1、p-FOXO1、Bcl2、Bax 蛋白的表达.....	28
2.2.9 免疫荧光检测 FOXO1 的细胞定位变化.....	28
2.2.10 流式细胞术检测细胞凋亡.....	29
2.2.11 流式细胞术检测细胞周期.....	29
2.2.12 统计学方法对数据进行分析.....	29

2.3 结果	30
2.3.1 CCK-8.....	30
2.3.2 RNA 纯度鉴定.....	31
2.3.3 RNA 完整性测定.....	32
2.3.4 实时荧光定量 PCR.....	32
2.3.5 Western blot	41
2.3.6 免疫荧光.....	43
2.3.7 流式细胞凋亡.....	44
2.3.8 流式细胞周期.....	45
2.4 讨论	47
参考文献	51
全文结论	54
在学期间取得的科研成绩	55
致谢	56

Table of contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	IV
Preface	1
1.1 Overview of gastrointestinal stromal tumors	1
1.2 PI3K and MAPK signaling pathways Overview	3
1.3 Overview of FOXO1	5
References	8
Chapter 1 Gastrointestinal stromal tumor GIST-T1 cytology identify and tumor-associated cell factor expression	13
1.1 Materials and Methods	13
1.1.1 Reagents and Consumables	13
1.1.2 Instruments and equipment	14
1.2 Cell culture	15
1.3 Immunocytochemical staining of GIST-T1 tumor cell surface marker c-KIT	15
1.4 Western blot analysis expression of FOXO1, Bcl2, Bax protein in gastric stromal tumor cell lines GIST-T1	15
1.5 Results	16
1.5.1 Immunocytochemistry detected surface marker of GIST-T1	16
1.5.2 Expression of FOXO1, Bcl2, Bax protein in GIST-T1	17
1.6 Discussion	18
References	18
Chapter 2 Regulation of PI3K and MAPK inhibitors on the activity of FOXO1 and their effect on biological behavior of GIST-T1 gastric stromal tumor cell lines	20
2.1 Materials	20

Table of contents

2.1.1 Reagents and Consumables.....	20
2.1.2 Instruments and equipment.....	20
2.1.3 Drugs.....	21
2.1.4 Cell Lines.....	21
2.2 Methods.....	21
2.2.1 CCK-8 to detect GIST-T1 cell proliferation inhibition rate.....	21
2.2.2 Real-time PCR technology to detect the Relative expression levels of FOXO1, Bcl2, Bax gene in cDNA samples.....	22
2.2.3 RNA extraction.....	22
2.2.4 Identification of RNA integrity and quality.....	23
2.2.4.1 UV spectrophotometer OD value of total RNA.....	23
2.2.4.2 RNA denaturing agarose gel electrophoresis.....	23
2.2.5 Removal of total RNA samples of genomic DNA reaction.....	24
2.2.6 Reverse transcription reaction.....	25
2.2.7 Real Time PCR.....	25
2.2.7.1 Primer design.....	25
2.2.7.2 Real time PCR reaction system.....	26
2.2.7.3 Cycle program of Real Time PCR reaction.....	27
2.2.7.4 Analysis of real time PCR.....	27
2.2.8 Western blot analysis expression of FOXO1, p-FOXO1, Bcl2, Bax protein.....	28
2.2.9 immunofluorescence to detect localization of FOXO1 in cells.....	28
2.2.10 Flow cytometry to detect cell apoptosis.....	29
2.2.11 Flow cytometry to detect cell cycle.....	29
2.2.12 Statistical methods for data analysis.....	29
2. 3 Results.....	30
2.3.1 CCK-8.....	30
2.3.2 RNA purity identification.....	31
2.3.3 RNA integrity measurement.....	32

Table of contents

2.3.4 Real Time PCR	32
2.3.5 Western blot	41
2.3.6 Immunofluorescence	43
2.3.7 Cell Apoptosis by flow cytometry	44
2.3.8 Cell Cycle by flow cytometry	45
2. 4 Discussion	47
References.....	51
Conclusions	54
Research achievements during the period of learning	55
Acknowledgements.....	56

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

胃肠道间质瘤（gastrointestinal stromal tumors,GISTs）是消化道最常见的间叶组织肿瘤。目前普遍认为 GISTs 起源于向 cajal 细胞分化的原始间叶细胞或幼稚干细胞，具有多向分化特征，可以向平滑肌、神经分化或不定向分化，是一种具有恶性潜能的胃肠道肿瘤，但其确切起源尚不明确。其发病率为 1~2/10 万人口,似乎正逐渐增加。近年来有研究表明，PI3K（磷脂酰肌醇-3-激酶）和 MAPK（丝裂原活化蛋白激酶）信号通路活性在胃肠道间质瘤显著增高。MAPK 通路和 PI3K 通路是传递细胞增殖信号的两个重要通路，二者之间存在一定程度的相互作用，而 FOXO1 蛋白正处于这两种信号途径的共同交汇点，参与细胞增殖与凋亡调节。FOXO 是 Forkhead 蛋白家族的一个亚群，其中 FOXO1 是 FOXO 家族中发现最早的成员之一。有研究证实 FOXO1 是抑癌基因，能够影响肿瘤的发生、发展。PI3K/Akt（磷脂酰肌醇-3-激酶）和 MAPK/ERK MAPK（丝裂原活化蛋白激酶）信号传导通路均可调节 FOXO1 转录因子的活性，在这两条信号通路异常激活的作用下，FOXO1 蛋白分子中的保守性位点发生磷酸化并从胞核输出，与 14-3-3 蛋白在胞质内结合，从而封闭了自身的核定位序列并定位于胞质中，远离了其自身的靶基因，进而抑制了 FOXO1 因子对靶基因的转录调控，并通过调节下游细胞周期及凋亡相关信号分子 Bim、Bcl2、Bax 等，影响细胞周期的进程和凋亡事件。已有研究指出下调 FOXO1 能够促进肿瘤细胞的增殖，但其确切机制尚不清楚。

目的 本实验选取 WI-38 细胞（人成纤维细胞）与 GIST-T1（胃间质瘤细胞）作为研究对象。采用 PI3K 信号通路抑制剂 LY294002 和 MAPK 信号通路特异性抑制剂 UO126 单独或联合处理细胞，研究胃间质瘤中 FOXO1、p-FOXO1、Bcl2、Bax 蛋白的表达，以及 PI3K（磷脂酰肌醇-3-激酶）和 MAPK（丝裂原活化蛋白激酶）信号通路对 FOXO1 的活性调节对胃间质瘤细胞生物学行为的影响。研究

胃间质瘤中 FOXO1、p-FOXO1、Bcl2、Bax 蛋白的表达, 以及 PI3K (磷脂酰肌醇-3-激酶) 和 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 信号通路对 FOXO1 的活性调节对胃间质瘤细胞生物学行为的影响。 **方法** 采用免疫细胞化学染色对 GIST-T1 细胞系进行鉴定; Western blot 检测 FOXO1、Bcl2、Bax 蛋白在胃间质瘤细胞系 GIST-T1 中的表达, 以及 PI3K 信号通路抑制剂 LY294002 和 MAPK 信号通路特异性抑制剂 UO126 单独或联合处理细胞后 FOXO1、p-FOXO1、Bcl2、Bax 等相关蛋白表达的变化; CCK-8 法检测其对细胞增殖的影响; 免疫荧光法检测 FOXO1 蛋白在 GIST-T1 细胞中的细胞定位的变化。流式细胞术检测药物作用后细胞凋亡及细胞周期变化。 **结果** 细胞 c-kit 免疫细胞化学染色结果阳性。CCK-8 结果显示, LY294002 和 UO126 单独、联合处理组 GIST-T1 细胞较 DMSO 组增殖明显受到抑制($P<0.05$), 且呈时间依赖性。Western blot 结果显示, 与对照组 WI-38 细胞 (人成纤维细胞) 相比, GIST-T1 细胞中总 FOXO1 蛋白及 Bax 蛋白表达相对较低, p-FOXO1、Bcl2 蛋白表达相对较高。LY294002 和 UO126 单独、联合处理后, 总 FOXO1 蛋白表达水平未见明显变化($P>0.05$), 而 p-FOXO1 及 Bcl2 蛋白表达下降($P<0.05$), Bax 蛋白的表达增加($P<0.05$)。免疫荧光显示药物处理后 FOXO1 在 GIST-T1 细胞中的细胞核移位明显增多。LY294002 和 UO126 联合处理 GIST-T1 细胞较药物单独应用时蛋白表达变化及细胞定位变化均增加($P<0.05$)。流式细胞仪检测发现药物处理组细胞凋亡明显增加, 细胞周期 G1 期细胞比例增加, S 期细胞比例下降, 且联合用药组作用效果更加显著。 **结论** 培养的 GIST-T1 细胞 c-kit 免疫细胞化学染色阳性; PI3K 和 MAPK 抑制剂能够抑制胃肠道间质瘤细胞系 GIST-T1 细胞增殖。PI3K 和 MAPK 抑制剂能够通过调节 FOXO1 磷酸化, 使 FOXO1 由胞浆向胞核移位; PI3K 和 MAPK 抑制剂能够增强 FOXO1 转录活性, 调节下游 Bcl2 和 Bax 的表达, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡; PIK 和 MAPK 抑制剂在抑制 GIST-T1 细胞增殖, 促进 GIST-T1 细胞凋亡方面具有交互作用。 **关键词:** 胃肠道间质瘤 磷脂酰肌醇-3-激酶 丝裂原活化蛋白激酶 叉头框蛋白 O1

Abstract

Gastrointestinal stromal tumors are the most common gastrointestinal mesenchymal tumors. It is generally believed GISTs originate from primitive leaf cells or immature stem cells which differentiate to cajal cell. It has multiple differentiation characteristics, can differentiate to smooth muscle, neural differentiation or non-directional differentiation, is a kind of malignant potential Gastrointestinal tumors, but its exact origin is not clear. The incidence rate is 1 to 2 / 100,000 population, it seems to be increasing. In recent years, studies have shown that, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) and MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling pathway activity in gastrointestinal stromal tumors was significantly higher. MAPK pathway and the PI3K pathway are two important signal pathways of cell proliferation, there is a certain degree of interaction between the two signal pathways, and FOXO1 protein is in the common intersection of these two signaling pathways involved in cell proliferation and apoptosis regulation. FOXO is a subgroup Forkhead family of proteins, which FOXO1 is one of the earliest members of the FOXO family to be found. Research has shown that FOXO1 is tumor suppressor genes, can affect tumorigenesis and development. PI3K / Akt and MAPK / ERK signaling pathway may regulate the activity of transcription factor FOXO1. Activation of These two signaling pathways abnormal make FOXO1 protein molecules to be phosphorylated, and output from the nucleus, and combine with 14-3-3 proteins in the cytoplasm, which closed its nuclear localization sequence and positioned in the cytoplasm, a

way from its target genes, thus inhibiting factor FOXO1 transcriptional regulation of target genes, and then adjusting the cell cycle of downstream apoptosis-related signaling molecule Bim, Bcl2, Bax, etc., affect cell cycle progression and apoptosis events.

Objective The experiments selected WI-38 cells (human fibroblasts) and GIST-T1 (gastric stromal tumor cells) as the research object. Using PI3K signaling pathway inhibitor LY294002 and MAPK signaling pathway inhibitor UO126 cells treat GIST-T1 alone or in combination, research FOXO1, p-FOXO1, Bcl2, Bax protein expression, and PI3K (phosphatidylinositol 3 - kinase) and MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling pathway regulates on biological behavior of gastric stromal tumor cells of FOXO1 activity. Research the regulatory mechanism of PI3K and MAPK signaling pathways on FOXO1 transcription factor activity and its inhibition effect on gastric stromal tumor cell biological behavior. **Objective** We aimed to study the protein expression of FOXO1, p-FOXO1, Bcl2 and Bax in gastric stromal tumors, and investigate involvement of the PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) and MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling pathways in regulating the activity of FOXO1 and its effect on the biological behavior of GIST-T1 cells. **Methods** Immunocytochemical staining was used to identify the stromal tumor cell line GIST-T1, while western blot was used to detect the expression of FOXO1, Bcl2 and Bax in the GIST-T1 cells and the changes following treatment with the PI3K signaling pathway-specific inhibitor LY294002 and the MAPK signaling pathway-specific inhibitor UO126 alone or in combination. The CCK-8 assay was used to evaluate effects on cell proliferation, while localization of FOXO1 was detected by immunofluorescence. Changes in apoptosis and the cell cycle were detected by flow cy

tometry. **Results** c-kit immunocytochemical staining was positive. The growth of GIST-T1 cells was significantly inhibited in a time-dependent manner following treatment with LY294002 or UO126 alone or in combination. Western blot showed that the expression of p-FOXO1 and Bcl2 were markedly reduced, while the expression of Bax remarkably increased following treatment with LY294002 or UO126 singly or in combination ($P < 0.05$). We did not find any significant change in the level of total FOXO1 ($P > 0.05$), and immunofluorescence showed that FOXO1 was redistributed to the nucleus. The changes of protein expression and localization in the combined group were more marked than in the single-treatment groups. Flow cytometry revealed that apoptosis in each drug-treated group was significantly increased, the proportion of cells in G1 phase was increased while that in S phase was reduced, and the effect of combined treatment was more significant. **Conclusion** immunocytochemistry of c-kit of cultured GIST-T1 cells were positive; PI3K and MAPK inhibitors can inhibit gastrointestinal stromal tumor cell lines GIST-T1. PI3K and MAPK inhibitors can regulate the phosphorylation of FOXO1 and make FOXO1 shift from the cytoplasm to the nucleus; PI3K and MAPK inhibitors can enhance FOXO1 transcriptional activity, regulate downstream expression of Bcl2 and Bax, inhibit cell proliferation and apoptosis; PI3K and MAPK inhibitors have interaction on inhibit cell proliferation and promote cell apoptosis in GIST-T1 cell.

Keywords: Gastrointestinal stromal tumors; PI3K; MAPK; FOXO1

前言

1.1 胃肠道间质瘤概述

胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumors, GISTs) 是消化道最常见的间叶组织肿瘤^[1]。以前依靠光学显微镜将这种肿瘤分为平滑肌瘤和平滑肌肉瘤, 1983年 Mazur 和 Clark 结合免疫组织化学染色和电子显微镜发现这种肿瘤既没有平滑肌也没有施万细胞的特征, 他们第一次用胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumors, GISTs) 定义了这一肿瘤^[2]。目前普遍认为 GISTs 起源于向 cajal 细胞分化的原始间叶细胞或幼稚干细胞, 具有多向分化特征, 可以向平滑肌、神经分化或不定向分化, 是一种具有恶性潜能的胃肠道肿瘤, 但其确切起源尚不明确。

GISTs 占消化道肿瘤 <1%, 其发病率为 1~2/10 万人口^[3-5], GISTs 发病率似乎正逐渐增加^[6]。GISTs 患者趋向于中老年人群, 其峰值出现在 60~70 岁^[7]。绝大多数的 GISTs 位于胃部 (50%~70%) 和小肠 (20%~30%) 但其可遍及整个消化道, 结肠和食管 (<5%), 腹膜、肠系膜、网膜发病率极低^[8]。

其特点是 85-95% 的 GISTs 表达 kit 基因和免疫组织化学染色 CD117 阳性^[9]。Kit 是作为干细胞因子受体的跨膜酪氨酸激酶, 质量为 145kD。Kit 与干细胞受体的绑定导致酪氨酸激酶受体和下游细胞内转导途径激活, 尤其是 RAS-RAF-MAPK 和 P13K-AKT-mTOR 途径^[10]。结果导致包括粘附、移动、分化、细胞增殖和细胞凋亡减少等细胞功能的改变。这些潜在的致瘤因素最终将导致肿瘤的发生。原癌基因 kit 突变倾向于集群在四个外显子, 即外显子 9 (细胞外域), 外显子 11 (细胞内近膜域), 外显子 13 (分裂激酶域), 和外显子 17 (激酶激活环)^[9, 11]。编码近膜域的外显子 11 是 kit 最常见的突变区域, 占肿瘤的 70%^[9]。Kit 外显子 11 一个或多个密码子框内缺失是最常见的突变, 占肿瘤的 60-70%。大多数的变异涉及 kit 外显子 11 近端部分, 在密码子 Gln550 和 Glu561 之间, 外显子 11 密码

子 Trp557 和 Lys558 缺失是 GISTs 中最普遍的简单缺失与肿瘤较差的治疗效果和较强的侵袭性有关^[12]。Kit 外显子 11 点突变在 GISTs 中占 20-30%，他们几乎全部包括近端的三个密码子 Trp557,Val559，Val560 和远端的 Leu576^[11]。外显子 9 突变发生在细胞外域，占 GISTs 的 10%，与小肠 GISTs 的恶性临床表现有关^[9,11]。几乎所有的外显子 9 突变都含有一致的编码 Ala502-Tyr503 的 6 核苷酸复制^[13]。原发性外显子 13 和外显子 17 突变极少见，小于 1%。外显子 13 错义突变导致 Glu 代替 Lys,具有较强的潜在恶性^[11]。

5-7%的 GISTs 含有 PDGFRA（血小板源性生长因子受体），它的突变发生在外显子 12、14、18，并依次减少^[14-16]。与 kit 一样它们激活相似的转导途径致使肿瘤的形成，但它们作用于不同的受体部位。大部分的 PDGFRA 突变的 GISTs 发生于胃部，侵袭性较强。它们拥有上皮样的形态学表现，CD117 免疫组织化学反应弱阳性或阴性。Todoroki 等的病例报告指出 PDGFRA 突变发生在胃大网膜免疫组织化学 CD117 弱阳性，显示出上皮样形态。80%的 PDGFRA 突变发生在外显子 18，大多数是错义突变导致 Val 代替 Asp，这些肿瘤通常对伊马替尼治疗产生耐药性，发生在外显子 14 的错义突变也有报道称 Lys 或 Tyr 取代 Asn，其预后较外显子 18 突变好，外显子 12 突变发生极少^[11]。

5-15%的 GISTs 既不发生 kit 突变也不发生 PDGFRA 突变，被称为野生型 GISTs,可以表现 CD117 阳性，易被错误当作伊马替尼敏感的 GISTs 进行治疗^[3]。然而，这一类型对伊马替尼治疗不敏感，预后较差。有研究指出 IGF1R（胰岛素样生长因子 1 受体)突变在成人和儿童野生型 GISTs 中高度表达。实验表明 IGF1R 活性降低将导致细胞毒性作用或诱导细胞凋亡^[3]。

现在,已经发现 DOG1 基因编码的蛋白质在大部分 GISTs 中过度表达,DOG1 是由人类染色体 11q13 上的 CCND1-EMS1 基因座所编码的 8 次跨膜蛋白。尽管发现 DOG1 在多种肿瘤中表达，但其明确的生物功能和超表达机制仍不清楚^[17]。同 kit 一样 DOG1 可能成为诊断标记物和新的治疗靶点。

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.