

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: B200436003

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

基于 RNA 干扰技术的 MMP-9 基因沉默胃癌细胞克隆

Establishment of gastric carcinoma cell clone with MMP-9
gene silence based on RNA interference

蔡建春

指导教师姓名: 张其清 教授/博士生导师

专 业 名 称: 高分子化学与物理

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 02 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

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
缩略词	5
前言	
1. MMP-9 基因功能的研究进展	6
1.1 MMP-9 基因的生物学特点	6
1.2 MMP-9 基因在恶性肿瘤细胞中表达的研究进展	8
2. RNA 干扰系统在肿瘤基因治疗中的研究进展	10
2.1 RNA 干扰基本原理及研究进展	10
2.2 RNA 干扰在恶性肿瘤实验研究中的应用	12
3. 胃癌体外浸润转移模型研究进展	15
3.1 肿瘤模型的体外构建原理和方法	15
3.2 胃癌体外模型应用和研究进展	16
4. 胃癌动物体内浸润转移模型研究进展	16
5. 本论文的思路、目的和意义	17
材料与方法	
1. 材料	18
1.1 主要仪器	18
1.2 质粒、细胞株、裸鼠、胃癌标本	18
1.3 试剂	19
1.4 常用溶液及培养基配制	19

2. 方法	20
2.1 常规细胞生物学实验方法	20
2.2 常用细胞克隆实验方法	22
2.3 常用蛋白检测实验方法	23
2.4 Boyden 小室构建	27
2.5 裸鼠对照实验分组	28
结果与分析	
第一部分 胃癌标本中 MMP-9 蛋白的表达	28
第二部分 shRNA 片段筛选和克隆	31
2.1 shRNA 的构建	31
2.2 转染条件的优化	32
2.2.1. DNA 量对转染效率的影响	32
2.2.2. 脂质体量对转染效率的影响	33
2.2.3. 转染时间对转染效率的影响	35
2.2.4. 细胞种类、DNA 质量等对转染效率的影响	36
2.3 预实验针对 MMP-9 基因的有效 shRNA 靶序列筛选	36
2.3.1. 化学合成的 shRNA 质粒有效性验证	36
2.3.2. 靶细胞目的 mRNA 表达变化	38
第三部分 MMP-9 基因沉默的 BGC823 胃癌细胞克隆构建	39
3.1 MMP-9 shRNA 质粒分子克隆	39
3.2 脂质体转染质粒进入胃癌细胞 BGC823	40
3.3 成功转染 shRNA 的胃癌细胞单克隆筛选	41
3.4 分析单克隆胃癌细胞株蛋白表达	43

第四部分 胃癌体外模型构建与应用	45
4.1 Boyden 小室的构建	45
4.2 Boyden 小室在胃癌细胞浸润转移研究中的应用	46
第五部分 胃癌裸鼠原位种植模型构建与应用	48
5.1 细胞数量与裸鼠分组	48
5.2 胃癌裸鼠原位种植模型构建与观察	49
讨论	
第一部分 MMP-9 蛋白与胃癌细胞浸润转移相关性研究	54
第二部分 RNA 干扰技术的应用前景	56
第三部分 筛选单克隆细胞的意义	58
第四部分 胃癌浸润转移研究模型建立	60
结论	64
参考文献	65
致谢	72

CONTENT

Abstract in Chinese.....	1
Abstract in English.....	2
Abbreviation.....	5
Perface	
1. MMP-9 gene function in progress.....	6
1.1. The biological characteristics of MMP-9.....	6
1.2. Expression of MMP-9 gene in cancer in progress.....	8
2. RNAi study in cancer gene therapy in progress.....	10
2.1. Basic principles and research of RNAi in progress.....	10
2.2. The application of RNAi in cancer laboratory research.....	12
3. Invasion and metastasis of gastric cancer in vitro in progress.....	15
3.1. Principles and methods of the tumor model in vitro.....	15
3.2. Research of gastric cancer in vitro model in progress.....	16
4. Invasion and metastasis of gastric cancer in vivo in progress.....	16
5. The thinking,purpose and significance	17
Materials and Methods	
1. Materials.....	18
1.1. Equipments.....	18
1.2. Plasmid and cells.....	18
1.3. Reagents.....	19
1.4. Common solutions and medium.....	19

2. Methods.....	20
2.1. Common methods of cell biology research.....	20
2.2. Common methods of cell cloning.....	22
2.3. Common methods of protein reasearch.....	23
2.4. Construction of Boyden chamber.....	27
2.5. Groups of nude mice in controlled trial.....	28
Results and Analysis	
1. Expression of MMP-9 protein in gastric cancer specimens.....	28
2. Screening and clone of shRNA.....	31
2.1. Construction of shRNA.....	31
2.2. Ptimization of transfection conditions.....	32
2.2.1. Efficiency of DNA in the transfection.....	32
2.2.2. Efficiency of liposomes in the transfection.....	33
2.2.3. Efficiency of time in the transfection.....	35
2.2.4. Efficiency of cell kinds,DNA quality in the transfection.....	36
2.3. Screening the effective shRNA sequence for gene MMP-9.....	36
2.3.1. Validation of chemical synthesis shRNA plasmid.....	36
2.3.2. Changes of target mRNA expression.....	38
3. Clone of gastric cancer cells with MMP-9 gene sinence.....	39
3.1. Clone of MMP-9 shRNA.....	39
3.2. Liposome transfer plasmid into gastric cancer cell BGC823...40	40
3.3. Screening of monoclonal gastric cancer cell.....	41
3.4. Analyze protein expression of monoclonal gastric cancer cell...43	43

4. Construction and application of gastric cancer model in vitro.....	45
4.1. Construction of Boyden chamber.....	45
4.2. Application of Boyden chamber in gastric cancer cell infiltration research.....	46
5. Construction and application of implanted secondary gastric tumor with nude mice.....	48
5.1 Grouping of cells and nude mice.....	48
5.2 Construction of gastric cancer model via orthotopic implantation in nude mice.....	49
Discussion	
1.Research of MMP-9 in gastric cancer cell invasion and metastasis.....	54
2.Prospects of RNAi application.....	56
3.Screening of monoclonal cells.....	58
4.Research of gastric cancer metastasis model.....	60
Brief Summary.....	64
References.....	65
Acknowledgement.....	72

摘要

恶性肿瘤的主要特征是浸润和转移。根据文献报道,在浸润和转移过程中,基底膜和细胞外基质(ECM)的降解是关键环节。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)作为蛋白水解酶的一种,它能特异性降解基底膜和ECM成分,从而促进肿瘤的浸润、转移及间质血管新生。胃癌组织MMP-9检测结果与临床病理资料对比研究表明,该酶的表达往往与胃癌的分化程度、病理类型、临床病理分期、浸润、转移和预后有关。但是,MMP-9在RNA干扰后对胃癌的影响机制尚不清楚。

RNA干扰是通过dsRNA介导的同源mRNA降解引起的相应转录后基因沉默,它被认为是一种广泛存在于酵母、真菌、植物、动物体内的生物防御机制。据报道,应用RNA干扰技术对线虫、果蝇、植物、动物和病毒的某些基因进行干扰,可以达到基因敲除或抑制病毒复制的目的。

本实验应用免疫组织化学技术研究46例手术切除的新鲜胃癌标本及其引流区域淋巴结MMP-9的表达。利用质粒载体将MMP-9特异性shRNA通过脂质体转染胃癌细胞,建立低分化胃腺癌细胞BGC823的MMP-9基因沉默细胞模型,经免疫荧光、Western blot、明胶酶谱分析等方法验证RNA干扰作用的效果。经反复筛选,最后构建单克隆胃癌细胞株,并应用它建立体外胃癌浸润模型和胃癌裸鼠原位种植模型,分析RNA干扰MMP-9基因后胃癌细胞株在体内体外浸润、转移能力的变化。

实验结果显示,MMP-9表达存在于正常胃小凹上皮和胃癌组织中,但在胃癌组织中的表达增强,而且在有些胃癌组织浸润前沿表达亦增强,在胃癌原发灶中MMP-9的表达和其淋巴结转移灶中的表达一致。另外,在有淋巴结转移的胃癌原发灶中,MMP-9的表达较无淋巴结转移的胃癌原发灶中的表达明显增强。通过RNA干扰模型建立的基因沉默胃癌细胞株BGC823,其mRNA和蛋白质表达均显著下降。在Boyden小室侵袭实验中,胃癌BGC823细胞的浸润能力在RNA干扰后明显低于在RNA干扰前。在裸鼠胃壁原位接种胃癌模型中,胃癌的转移能力在RNA干扰后明显低于在RNA干扰前。研究表明,胃癌细胞浸润、转移能力与MMP-9密切相关,它可能对胃癌的早期诊断、预后判断和基因治疗提供参考。

关键词: 胃肿瘤; 基质金属蛋白酶-9; RNA干扰; Boyden小室; 原位种植; 裸鼠

Establishment of gastric carcinoma cell clone with MMP-9 gene silence based on RNA interference

ABSTRACT

The major characteristics of malignant tumour cells are invasion and metastasis, of which proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM), including basement membrane by matrixmetalloproteinases (MMPs) is one of the essential events. As a kind of MMPs, matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) can specifically degradate ECM and basement membrane, which would facilitate the invasion, metastasis and interstitial angiogenesis. MMP-9 is expressed predominantly by tumour cells in various cancers. Immunohistochemical studies and clinicopathological data have shown that the expression of MMP-9 can often correlate with tumor differentiation degree, classification, pTNM stage, invasion, metastasis and prognosis in gastric carcinoma. But it is not certain what will happen, when MMP-9 gene is inhibited with RNA interference (RNAi).

Over the last years, RNAi has been recognized as a major mechanism of post-transcriptional gene silence in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the fruit fly *Drosophila*, as well as in plants, animal and virus. This phenomenon is based on double-stranded RNA (dsRNA) that triggers the silence of gene expression in a sequence-specific manner. Now, there are many study on the mechanism,

while has become a routine tool for transient knockdown of gene expression in a wide range of organisms.

In this experiment, The expression of MMP-9 protein was studied in 46 fresh specimens and regional lymph nodes of gastric carcinoma, then a modal with MMP-9 gene silence was constructed based on RNAi technique in poorly differentiated gastric carcinoma cell line BGC823. In the process of construction, a stable RNAi system with liposome transfection was cloned. Then, immunofluorescence technique, gelatin zymography and Western blot were applied to detect the expression of MMP-9 in BGC823. Finally, gastric carcinoma cell clones was applied to establish a model of gastric carcinoma invasion in vitro (Boyden chamber) and a model of gastric carcinoma via orthotopic implantation in nude mice. The changes of invasion and metastasis ability were analysed by successful RNAi of MMP-9 gene in gastric carcinoma cells.

The results showed that the expression of MMP-9 protein in the gastric carcinoma was found both in normal foveolar epithelial cells and gastric carcinoma cells, but was enhanced on gastric carcinomna. Nevertheless markedly strong staining was found at the front edge of some invasive carcinoma. Its expression in primary gastric carcinoma corresponds well to that in lymph node metastasis. In addition, its expression in gastric carcinoma with lymph node metastasis was markedly stronger than that without metastasis. The model of MMP-9 gene silence in gastric carcinoma cell line has been establishment

successfully by RNAi technique. MMP-9 has been significantly down-regulated in mRNA and protein expression level, and the invasion and metastasis ability were significantly declined in gastric carcinoma cells BGC823 for Boyden chamber and nude mice models respectively by RNAi technique. The results showed that there is a close relationship between the invasion and metastasis ability and MMP-9 in gastric carcinoma cell, and might provide evidences for early diagnosis, judging the prognosis, and gene therapy in gastric carcinoma.

Key Words: Stomach neoplasm; MMP-9; RNA interference; Boyden chamber; Orthotopic implantation; nude mice

缩略语表

Amp(ampicilin)	氨苄青霉素
bp(basepair)	碱基对
BM (Basement membrane)	基底膜
BSA(bovineserum albumin)	牛血清白蛋白
cDNA(complementary DNA)	互补DNA
DMSO(dimethylsulfoxide)	二甲基亚砷
ECM(extracellular matrix)	细胞外基质
EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)	乙二胺四乙酸
ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)	酶联免疫吸附实验
FN(fibronectin)	纤粘连蛋白
FBS(fetal bovine serum)	胎牛血清
FCM(flow cytometry)	流式细胞仪
HRP(horseradish peroxidase)	辣根过氧化物酶
IS (Inter stitialmatrix)	细胞间基质
IHC(immunohistochemistry)	免疫组织化学
kD(kilo-dalton)	千道尔顿
MMPs(matrixmetalloproteinases)	基质金属蛋白酶
OD(opticaldensity)	光密度
PBS(phosphate buffered saline)	磷酸盐缓冲液
PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PTGS (posttranscriptional gene silencing)	基因转录后沉默
rpm(rotation per minute)	每分钟转数
RISC (RNA induced silencing complex)	RNA 诱导沉默复合物
RDRP (RNA dependent RNA polymerase)	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
RNAi (RNA interference)	RNA 干扰作用
siRNA (small interfering RNA)	小干扰 RNA
SDS(sodium dodecyl sulfata)	十二烷基磺酸钠
TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases)	组织金属蛋白酶抑制剂

前 言

1.MMP-9 基因功能的研究进展

1.1.MMP-9 基因的生物学特点

浸润、转移作为恶性肿瘤重要的生物学特性一直是人们研究的热点。肿瘤的浸润、转移是一个复杂的过程：首先，肿瘤细胞与基底膜 (basement membrane, BM) 表面的整合素受体及非整合素受体相结合；其次，肿瘤细胞破坏由细胞间基质 (interstitial matrix, IS) 和 BM 组成的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)；最后，肿瘤细胞穿过 ECM 缺损处进入局部淋巴系统及毛细血管，在远隔部位再突破毛细血管和淋巴管结构，形成新的转移灶。在整个过程中 ECM 起着重要屏障作用^[1]。ECM 处在不断代谢更新、降解重塑的动态平衡中可维持肿瘤细胞生长的微环境，并可调节与其接触的肿瘤细胞的基因表达，从而影响肿瘤的演变、代谢、生长及转移，因此，任何可使 ECM 的这种动态平衡失调的物质都可能与肿瘤的浸润、转移相关^[2]。ECM 降解主要是由基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 家族完成。基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 是 MMPs 家族的重要成员，它们能够特异性降解 BM 主要成分—IV 型胶原，在肿瘤浸润、转移过程中起重要作用，其活性可被内源性组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 所抑制^[3]。

自 1962 年 Gross J 等发现特异性胶原降解酶 (胶原酶) 以来，人们又发现了许多降解 ECM 不同成分的酶^[4]，已知的有 6 种酶，即脯肽酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、糖苷酶及 MMPs。它们降解基质成份具有不同程度的特异性。其中，由结缔组织及肿瘤细胞合成分泌的 MMPs 构成了 ECM 降解最重要的蛋白水解系统。

迄今，科学家已发现人源 MMPs 家族有 26 个成员，大致分为 5 类^[5]。各种 MMPs 结构存在着以下的同源序列：①活性前区，含有一个半胱氨酸开关而具有信号肽的作用，保持酶的稳定性；②催化功能区，含有两个保守的组氨酸，它们是锌钙离子的结合位点；③羧基端功能区，此区决定了 MMPs 作用底物的特异性，亦参与 MMPs 与 TIMP-1, TIMP-2 的相互作用。此外 MT1-MMP (MMP-14)，MT2-MMP (MMP-15)，MT3-MMP (MMP-16) 的羧基端尚含有一跨膜区，见图 1。

MMPs 的主要功能之一是降解基质，一种 MMPs 可以直接降解某一种或几种 ECM，也可通过激活其它类型的 MMPs 而发挥作用，MMP-9 和 MMP-2（IV 型胶原酶）能够特异性降解 BM 或肌膜和 ECM 中的 IV 型胶原成份。除此之外，MMPs 在胚胎发育、细胞迁移、血管新生（angiogenesis）、伤口愈合、动脉粥样硬化、恶性肿瘤的浸润和转移等生理病理过程中发挥重要的作用^[6]。

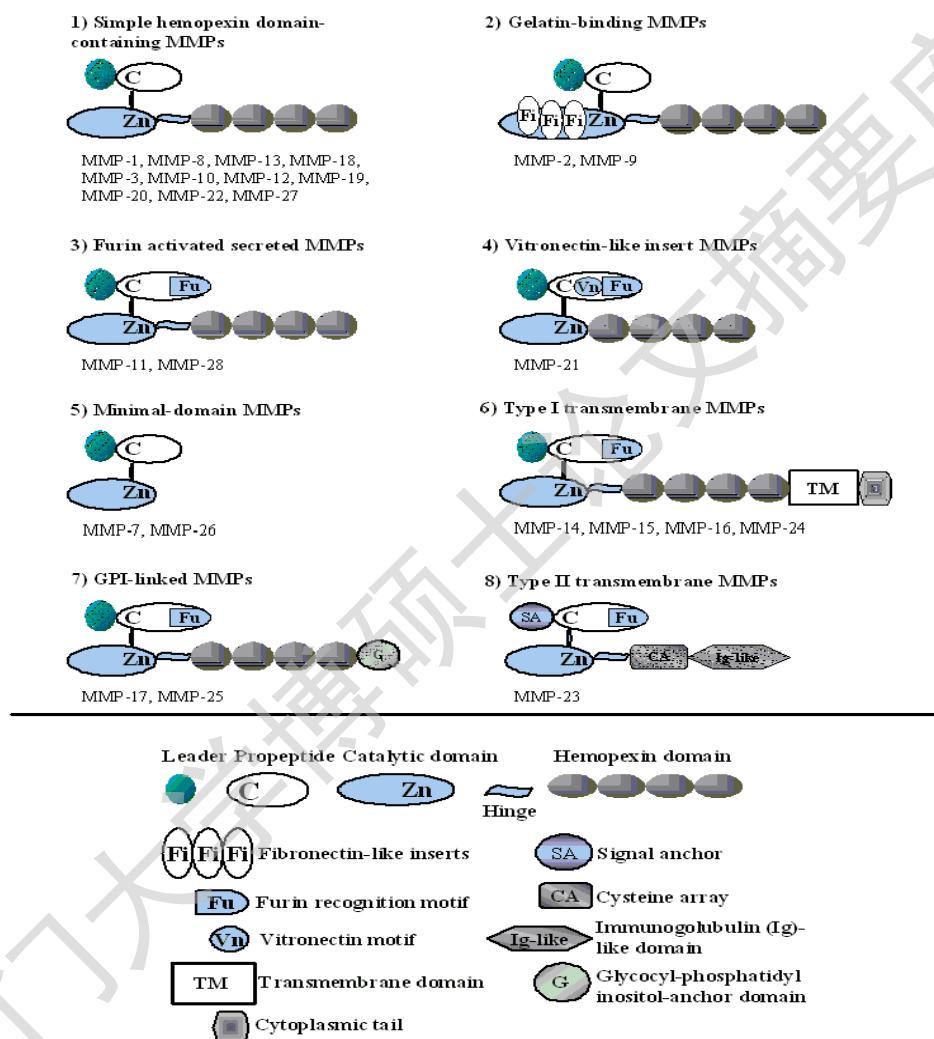


图 1 MMPs 家族结构域示意图

Fig1 Domain structure of MMP family

Source: Birkedal Hansen H. Matrix metalloproteinases.

Crit Rev Oral Biol Med, 1993; 4:97-115.

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts 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.

厦门大学博硕士论文摘要库