

附件 2.

学校编码：10384

密级_____

学号：24520101153272

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

RNAi 沉默 Notch1 基因对多发性骨髓瘤细胞致瘤性影响及机制研究

Effects and mechanisms of Notch1 gene silencing by RNA interference on oncogenicity of human Multiple Myeloma Cells

陈美琼

指导教师姓名：张鹏 副教授

专业名称：内科学

论文提交日期：2013 年 4 月

论文答辩日期：2013 年 5 月

2013 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

目的: 通过RNA干扰技术,靶向沉默人多发性骨髓瘤RPMI8226细胞Notch1基因,评估Notch1表达下调后对多发性骨髓瘤细胞增殖、凋亡,相关蛋白Hes-1、Jagged-1、Jagged-2及Bcl-2、PTEN/PI3K/AKT信号通路的影响,进一步探讨Notch1在多发性骨髓瘤发生发展中的作用及分子机制,为寻找新的骨髓瘤治疗靶点提供实验依据。

方法: 构建靶向沉默Notch1基因的shRNA表达载体pGshRNA-Notch1,转染入人多发性骨髓瘤RPMI8226细胞,G418筛选稳定转染细胞。实时荧光定量PCR及Western blot法检测转染后Notch1 mRNA和蛋白表达的变化。CCK-8法、流式细胞仪检测瘤细胞体外增殖、凋亡的变化。建立NOD/SCID小鼠多发性骨髓瘤模型,通过观察成瘤时间、大小以及ELISA法检测血清中分泌IL-6、VEGF水平以研究Notch1基因沉默对致瘤性的影响。运用Western blot法检测Notch1信号通路相关蛋白Hes-1、Jagged-1、Jagged-2、Bcl-2、PTEN、AKT、p-AKT的表达情况。

结果: 筛选出稳定转染细胞,实时荧光定量PCR及Western blot法检测Notch1 mRNA和蛋白表达的变化,实验组相对于阴性对照组表达量明显下调($P<0.05$)。CCK-8法及流式细胞术检测结果显示,实验组细胞的增殖活力明显低于阴性对照组($P<0.05$),且对细胞凋亡有明显促进作用($P<0.05$)。动物实验结果显示Notch1沉默细胞皮下成瘤体积小,血清中分泌IL-6和VEGF较阴性对照组减少($P<0.05$)。实验组Jagged-1、Jagged-2和AKT蛋白表达水平与对照组相比无明显变化,而下游蛋白Hes-1、Bcl-2、p-AKT明显下调,PTEN明显上调。

结论: 1. 沉默Notch1基因可抑制骨髓瘤RPMI8226细胞体内外增殖,促进细胞凋亡,明显减低骨髓瘤细胞的致瘤性; 2. 作用机制可能与下调下游蛋白Hes-1表达以调节PI3K/AKT信号通路以及瘤细胞分泌IL-6和VEGF的能力减低有关; 3. Notch信号通路可能作为新的治疗骨髓瘤的靶点。

关键词: 多发性骨髓瘤 shRNA Notch信号 PTEN/AKT信号

Abstract

Objective: To illustrate the mechanisms of Notch1 gene silence on cell proliferation, apoptosis and PTEN/PI3K/AKT signaling pathway of multiple myeloma RPMI8226 cells, and therefore provide the evidences for novel targeted therapeutic strategy for MM.

Materials and Methods: Notch1 short hairpin RNA(Notch1-shRNA) was transfected into RPMI 8226 cells and selected by G418. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to analyze the silencing efficiency. In vitro, the cell proliferation activities were detected by CCK-8, and apoptosis were assayed by flow cytometry. The xenograft model of NOD/SCID mouse was used to detect the impact in vivo and IL-6, VEGF in blood serum of mice were observed by ELISA. The expression levels of Hes-1、Jegged-1、Jegged-2、Bcl-2、PTEN、AKT、p-AKT were determined by Western blot.

Results: Real-time quantitative PCR and Western bolt showed that Notch-1 mRNA and protein expression in Notch1-shRNA transfected cells have been effectively inhibited. Silencing Notch1 gene of human MM RPMI8226 cell line decreased cell proliferation and promoted apoptosis in vitro. In the xenograft experiment, the model of Notch1 silenced RPMI8226 cell was inhibited in the growth of tumor and secretion of IL-6, VEGF in blood serum. The protein levels of Hes-1, AKT, p-AKT and Bcl-2 were down-regulated, but the one of PTEN was up-regulated.

Conclusion: 1. Silencing of Notch1 gene by shRNA interference of RPMI 8226 cell line can decrease cell proliferation in vitro and in vivo, induced cell apoptosis, and significantly reduce oncogenicity.

2. The effects on Notch1 gene silencing may be related to Hes-1/PI3K/AKT pathway and secretion of IL-6 and VEGF.

3. Notch signaling is a potential target for multiple myeloma therapeutics.

Keywords: Multiple Myeloma; shRNA; Notch; PI3K/AKT

英文缩略词表 LIST OF ABBREVIATION

缩略词	英文全称	中文注释
MM	Multiple Myeloma	多发性骨髓瘤
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
shRNA	RNA-Short hairpin RNA	短发卡 RNA
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RT-PCR	reverse transcription PCR	逆转录 PCR
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	互补 DNA
PI	propidium Iodide	碘化丙啶
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
DEPC	diethyl pyrocarbonate	二乙基焦磷酸胺
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
CCK-8	Cell Counting Kit	细胞增值与活性检测
OD	Optical Density	光密度
AP	ammonium persulfate	过硫酸铵
LB	luria-Bertani medium	LB 培养基
ECL	enhanced chemiluminescence	免疫印迹化学发光
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
SDS	sodium lauryl sarcosinate	十二烷基硫酸钠
TBS	Tris buffered saline	Tris 缓冲液
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20	Tris-tween20 缓冲液
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
英文缩略词表 LIST OF ABBREVIATION.....	III
第一章 绪 论	1
1. 骨髓瘤的概况和治疗现状.....	1
2. 恶性肿瘤的分子靶向治疗进展.....	1
3. Notch 信号通路研究	2
4. RNA 干扰技术的应用研究	5
5. 本研究的的目的和意义.....	6
第二章 Notch1-shRNA 靶向沉默多发性骨髓瘤细胞 Notch1 基因 ..	7
1. 前言	7
2. 材料与方法.....	7
3. 结果	20
4. 讨论	23
第三章 沉默 Notch1 基因对骨髓瘤细胞细胞增殖、凋亡的影响 ...	24
1. 前言	24
2. 材料与方法.....	24
3. 结果	28
4. 讨论	31
第四章 沉默 Notch1 基因对骨髓瘤细胞致瘤性影响和机制分析 ...	34
1. 前言	34
2. 材料与方法.....	34
3. 结果	38
4. 讨论	42
第五章 研究总结和展望	46

参考文献	47
致 谢.....	53
综 述.....	54
硕士研究生期间发表文章	59

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Abbreviations	III
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Silencing of Notch1 gene by Notch1-shRNA in Multiple Myeloma cells	7
1.Introduction	7
2.Material and methods	7
3.Results	20
4.Discussion	23
Chapter 3 Effects of Notch1 gene silencing on cell proliferation and apoptosis of Multiple Myeloma cells	24
1.Introduction	24
2.Material and methods	24
3.Results	28
4.Discussion	31
Chapter 4 Effects and mechanisms of Notch1 gene silencing on oncogenicity of Multiple Myeloma Cells	34
1.Introduction	34
2.Material and methods	34
3.Results	38
4.Discussion	42
Conclusion and prospect	46
Reference	47
Acknowledgement	53

第一章 绪论

1. 骨髓瘤的概况和治疗现状

多发性骨髓瘤（multiple myeloma, MM）是一种起源于骨髓浆细胞的恶性增殖性疾病。占有所有肿瘤的 1%，血液学肿瘤的 10%。多见于 50-60 岁中老年人，男性多于女性，近年随着人口老龄化发展，发病率有增高趋势。MM 可形成全身骨髓多灶性溶骨性改变及浆细胞的局灶性瘤块；骨髓瘤细胞分泌单克隆蛋白，抑制正常的多克隆免疫球蛋白合成。常表现为骨痛、病理性骨折、肾功能不全、贫血等症状。目前治疗方法主要包括传统化疗、造血干细胞移植及新型靶向治疗。得益于造血干细胞移植的发展及新药如沙利度胺、硼替佐米、来那度胺的出现，MM 的生存率显著上升，但目前仍被认为是不可治愈的疾病^[1,2]。即使通过目前的规范联合化疗和干细胞移植，仍有很大一部分患者最终死于疾病复发，主要原因是多次化疗后形成了对化疗药物的耐受。因此，深入研究 MM 发生发展机制，克服耐药及探索新的靶向治疗药物具有重要意义。随着人们对 MM 细胞生物学特性、病理生理发生机制、基因遗传学等深入研究，更多新的药物治疗靶点不断涌现出来。

2. 恶性肿瘤的分子靶向治疗进展

恶性肿瘤是多因素、多步骤、多环节相互作用的结果，涉及到细胞遗传学改变、生长信号的转导、细胞增殖、凋亡、周期调控、免疫逃逸、微血管生成等多方面。分子靶向治疗可特异性针对肿瘤细胞的恶性表型分子、细胞受体、信号通路等，达到抑制肿瘤细胞生长、促进凋亡的作用。因特异性作用于肿瘤细胞，毒性较常规化疗药物小，一定程度上克服了患者无法耐受的缺点。如伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病、全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病等已成为肿瘤靶向治疗的经典，为延长患者生存期甚至达到治愈作出巨大贡献。

MM 病因不明，目前知道其发生与细胞因子 IL-6 有关，与癌基因异常的甲基化，信号系统异常激活有关，如 p53、PTEN/AKT、NF- κ B、HGF/Met 等。因此，寻找到一个有效且单一的治疗靶点极具挑战。

目前用于临床的靶向治疗药物有免疫调节药物沙利度胺、雷利度胺及蛋白酶体抑制剂硼替佐米。更多的免疫调节药物、新一代的蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂、热休克蛋白抑制剂、PI3K/Akt/mTOR 通路抑制剂、胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 受体抑制剂、c-Met 酪氨酸激酶抑制剂及单克隆抗体 (抗 CD20、IL-6、CS1、VEGF) 等已逐步开始用于临床试验^[3], Notch 信号通路、丙酮酸脱氢酶 (PDK1)、TGF- β 、Hh 信号通路等亦成为 MM 治疗的研究新靶点^[4-6]。

3. Notch 信号通路研究

Notch 信号通路已证实广泛存在从无脊椎动物到哺乳动物的生命体中, 是一条在进化中高度保守的信号转导途径, 作为介导细胞和细胞之间直接接触的主要信号通路之一, 在细胞的分化、增殖和凋亡过程中发挥着重要作用^[3]。Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体和 DNA 结合蛋白组成。在哺乳动物中, Notch 受体有 4 种: Notch1-4, Notch 配体有 5 种: Delta-like-1, Delta-like-3, Delta-like-4, Jagged-1 和 Jagged-2。Notch 受体和配体都是 I 型跨膜糖蛋白, Notch 编码一条分子量约 300kD 的单链跨膜受体蛋白, 主要包括胞外区、跨膜区和胞内区。受体胞外段为数量可变的 EGF 样重复序列和 3 个 LNR (Lin/Notch repeats), 胞内区为 RAM 结构域 (CBF1/RBPJK 主要结合部位)、6 个 cdc10/ankyrin 重复序列、2 个核定位信号和 PEST 结构域 (与 Notch 降解有关)。Notch 受体蛋白合成后, 在高尔基体被 Furin 首次切割为 2 个片段, 在细胞膜形成异二聚体。经典的 Notch 信号通路即 CLS 依赖途径, Notch 通路未被激活时, 可特异性招募 SMRT、SKIP、I / II 型组蛋白去乙酰化酶等蛋白形成共抑制复合物, 抑制下游基因的转录。当 Notch 信号通路被激活, 即 Notch 配体与受体胞外区结合后, 受体先后经过 ADAM 家族的蛋白酶肿瘤坏死因子 α 转化酶 (TACE, TNF- α -converting enzyme) 作用的膜外 S2 切割和 γ -分泌酶复合体 (γ -secretase complex) 作用的膜内 S3 切割, 之后受体胞内区 NICD 释放。NICD 进入细胞核后, 通过 RAM 区与转录因子 CLS (CBF-1/Suppressor of hairless/Lag) 结合, 取代 Su (H) 募集的协同抑制分子 SMRT 及其相关的组蛋白去乙酰化酶 HDAC, 进而激活 CBF1、Su (H)、Lag-1 等转录因子的转录, 并募集 GCN5、MAML I 等协同活化分子, 形成三元络合转录激活物后编码碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH, basic helix-loop-helix) 家族转录因子, 激活下游靶基因 HES 家族和 HERP (Hes-related repressor protein) 或 H

ey 家族如 Hes-1、cyclin D、Hey-1 等表达，发挥调节细胞的分化、增殖和凋亡等作用^[7-9]。

Notch 信号通路激活的过程不需第二信使和蛋白激酶参与，可直接接收邻近细胞的信号，激活相关转录因子的表达，虽不能放大信号，但对细胞分化起始过程的精确调控十分必要^[10]。Notch 信号通路被认为决定着细胞的命运，可诱导细胞的分化、抑制细胞分化、维持干细胞未分化状态以及参与细胞增殖、凋亡、黏附等过程^[11-12]。因此探究 Notch 信号通路在肿瘤发生发展中的作用，以及相关的靶向治疗逐渐成为热点。目前研究发现 Notch 信号通路的紊乱可影响肿瘤的发生发展，但其作用复杂，依据细胞种类和环境的不同，既可作为癌基因，亦可作为抑癌基因。如在肝癌、肺腺癌、黑色素瘤、舌鳞状癌、肠癌、乳腺癌、星型细胞瘤等多种实体肿瘤中表达明显上调并起到癌基因的作用^[13-19, 20]，而在小细胞肺癌、皮肤肿瘤、甲状腺癌、胃肠道间质瘤及子宫内膜癌等中 Notch 信号通路显示出抑制肿瘤形成和生长的作用^[21-26]。如在小细胞肺癌的相关研究发现，过度表达活化的 Notch1、Notch2 可通过上调 p21^{cip1}、p27^{kip1}，导致细胞周期停滞^[26]。Jonusiene^[25]等用定量 PCR 的方法分析了 50 对子宫内膜癌及癌旁组织的 Notch 受体（Notch1-4）、配体（Jagged1-2, DLL1）及下游靶基因 Hes1，发现子宫内膜癌组织 mRNA 的表达量均低于癌旁组织，且 Notch1、Notch3 和 DLL1 在 IB 期子宫内膜癌组织中的表达量明显低于 IA 期，说明 Notch 信号通路可阻碍子宫内膜癌的发生发展。Amaury^[24]等发现 Notch1 mRNA 在多个胃肠道间质瘤细胞株及患者的肿瘤标本中低表达，回顾性分析结果显示高表达下游靶基因 Hes1 的患者无复发生存期显著延长，而组成性激活的 Notch1 形式抑制人胃肠道间质瘤细胞株的生长，增强化疗敏感性。然而在更多的肿瘤细胞中，Notch 信号通路扮演者癌基因的角色，具有促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移，抑制凋亡的作用。Notch1 受体在人肝细胞癌组织中的表达较癌旁正常肝脏组织明显上调，且与肿瘤大小、分期、转移及患者的生存时间等相关，研究表明 Notch1 激活后通过 Notch1/COX-2/Snail/E-cadherin 通路提高了肝癌细胞由缺氧引起的粘附和转移能力^[13, 27, 28]。同样在肺腺癌、黑色素瘤、舌鳞状癌、肠癌、乳腺癌、星型细胞瘤等多种实体肿瘤中表达明显上调，与肿瘤的分期、转移、浸润，患者的生存期有密切关系，Notch 激活后通过与其他信号通路及细胞因子的相互作用促进肿瘤细胞生长，抑制凋亡^[13-20]。

在血液系统肿瘤中也发现 Notch 受体、配体及下游基因的异常表达且主要发挥癌基因的作用。最早于 1991 年发现 T-ALL 患者的 t(7;9)(q34;q34.3)染色体异位,染色体易位使 9 号染色体上 Notch1 基因的胞内段编码区与 7 号染色体上 T 细胞受体(T cell receptor, TCR) β 基因的增强子和启动子区融合,导致 Notch 信号组成性激活,胞内区产生了活化的 Notch1 片段^[29],虽然在 T-ALL 患者中这种染色体易位很少见 (<1%),但约 56%出现 Notch1 的突变激活^[30,31]。其他如急性髓性白血病(AML)、霍期金淋巴瘤、非霍期金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)亦发现 Notch 表达上调^[32-34]。Notch1 突变已证实为慢性淋巴细胞白血病预后的独立影响因素,可缩短治疗后无病生存期,高风险向 Richter 转变,预后较差^[35]。Skrtić 等对 80 例初诊患者骨髓活检标本进行免疫组化染色,Notch1 及 Jagged1 的阳性率分别为 92.31%和 92.21%,但二者的表达虽较非骨髓瘤来源标本高,但与患者的总体生存率无关^[36]。Houde 等^[37]采用 RT-PCR 方法从基因水平检测 4 种骨髓瘤细胞株 K620、KMSM1、KMSM2 和 RPMI8266 均高表达 Jagged2 mRNA,而正常浆细胞 PC 和 MUTZ 几乎无法检测到 Jagged2 表达。进一步使用 Western blot 方法从蛋白水平检测 Notch1-4, Jagged1、Jagged2 表达,结果发现四种多种骨髓瘤细胞株 Notch1、Notch3、Notch4、Jagged2 均可检测到,但 Notch2 及 Jagged1 只在 RPMI8226 细胞中有明显表达。Notch 受体与配体结合可诱导骨髓基质细胞分泌白细胞介素-6(IL-6)、血管内皮生长因子(VEGF)和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)。Yulia Nefedova 等^[38]研究表明 γ -分泌酶抑制剂(GSI)可通过抑制 Notch 信号系统以促进 MM 细胞凋亡和提高化疗敏感性。

磷酸肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路是一条经典的信号途径,发挥着促进细胞生长、抑制凋亡的作用,与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移,肿瘤血管的生成以及肿瘤的化疗耐药有密切关系。AKT, 又称蛋白激酶 B (protein kinase B,PKB), 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 PI3K 信号通路中最为重要的下游靶点基因。哺乳动物中存在 3 种 AKT 家族成员: AKT1 (PKB α)、AKT2(PKB2 β)及 AKT3(PKB3 γ), 分别位于染色体 14q32, 19q13, 1q44。AKT 的三个亚型在氨基酸序列上有 80%以上的同源性且结构相似, 均有三个不同的功能区域组成, 包括一个氨基末端 PH 结构域 (plecstrin homology domain, PH)、激酶催化区 (T308/AKT1) 和一个羧基末端调节区 (AKT 丝氨酸残基磷酸化调节区 S473/AKT1)。AKT 在 PI3K/AKT

信号通路中处于中心位置，PI3K/AKT 信号通路要发挥其调节生命活动的作用，依赖于 AKT 的激活。PI3K 激活后产生第二信使 PIP3 与 AKT 的 PH 区结合，诱导无活性的 AKT 从细胞质转位到细胞膜且构象发生改变，暴露出 Ser473 和 Thr308 磷酸化位点。AKT 的激活需要 Ser473 和 Thr308 同时发生磷酸化，即受到双重调控，AKT 完全活化后引起下游底物的磷酸化级联反应，从而发挥促进肿瘤细胞的生长、增殖，侵袭、转移，促进血管生成，抑制细胞凋亡等功能^[39-41]。

PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)是 1977 年发现的具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因，此后在对人类肿瘤 PTEN 基因缺失或突变的研究中发现 PTEN 基因的突变、等位基因的缺失或低表达发生在广泛的人类肿瘤中，成为肿瘤发生发展和产生耐药的重要机制。PTEN 基因表达的蛋白可通过多种信号途径实现负调控作用，在 PI3K/AKT 信号通路中，PTEN 可使 PIP3 脱磷酸化转化成为 PIP2，第二信使 PIP3 的减少使得 PI3K/AKT 信号通路下游底物的相应反应受到抑制，从而影响下游信号分子的变化，抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡^[42-44]。Notch1 信号通路与 PI3K/AKT 信号通路存在相互作用关系，如在干细胞的分化中两者有协同作用。但 Notch1 信号通路激活后并不直接作用于 PI3K 或者 AKT，而是通过下游靶基因 Hes-1 表达的蛋白作用于抑癌基因 PTEN，使 PTEN 基因表达受到抑制，降低其负调控作用，间接通过 PI3K/AKT 信号通路促进肿瘤细胞生长，抑制凋亡或产生耐药^[45-48]。

4. RNA 干扰技术的应用研究

随着分子生物学等基础科学的发展，更多的实验方法和技术被运用于科学研究中。基因沉默技术目前广泛运用于研究目的基因表达受抑制时的功能影响，较常用的方法为反义 RNA 技术及 RNA 干扰(RNAi)。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指一种分子生物学上由双链 RNA 诱发的基因沉默现象，其机制是当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时，该 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默^[49]。这主要发生于转录后的基因水平,所以又称为转录后基因沉默 (post-transcription gene silencing, PTGS)。RNAi 具有特异性和高效性，能对靶向基因产生特异性抑制效应，使特定基因沉默而不影响其他基因的表达。RNAi 有望成为分析人类基因组功能的有力工具，在肿瘤病因、免疫机制及治疗等方面的研究上有广阔的发展前景。目前最常用的实验方法是直接转染双链 siRNA，

但其转染入细胞后易降解，无法实现稳定的基因沉默效果。另一种常用的为 shRNA (RNA-Short hairpin RNA) 即短发夹 RNA，是设计为能够形成发夹结构的非编码小 RNA 分子，包括两个短反向重复序列，中间由一茎环 (loop) 序列分隔的，组成发夹结构，由 pol III 启动子控制。随后再连上 5-6 个 T 作为 RNA 聚合酶 III 的转录终止子。通过转染靶向基因沉默的 shRNA 表达载体可在多种细胞内实现持续和稳定抑制靶向基因的表达。

5. 本研究的目的是和意义

国内外关于 Notch 研究结果显示 Notch 信号在多种肿瘤包括骨髓瘤中异常活化，是刺激瘤细胞增殖的主要原因，抑制 Notch 信号能够抑制瘤细胞增殖，促进细胞凋亡，以 Notch 信号为靶点成为潜在的新的骨髓瘤治疗途径。本课题组前期实验结果显示 Notch 信号抑制剂 PHI 和 GSI 均能抑制体外培养的骨髓瘤细胞株 RPMI8226 细胞增殖，诱导细胞凋亡，并使细胞阻滞于 sub-G1 期，这种增殖抑制作用在一定范围内具有时间-剂量依赖性，Notch 信号可能作为新的治疗骨髓瘤的靶点。但是抑制 Notch 信号通路对 MM 细胞的作用机制及对体内致瘤性的影响尚待进一步探讨。

本研究拟从基因水平验证 Notch 信号作为 MM 靶向治疗位点的可行性。将靶向 Notch1 的 shRNA 表达载体转染入人多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞，筛选获得 Notch1 基因稳定沉默的细胞，研究其体外增殖、凋亡以及体内致瘤性的变化，并检测 Notch1 信号通路相关蛋白 Hes-1、Jagged-1、Jagged-2、Bcl-2、PTEN、AKT、p-AKT 的表达情况，以探讨相应变化的可能作用机制，为寻找新的骨髓瘤治疗靶点提供实验依据。

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