

上海交通大学医学院博士学位论文

miR-30a-5p 调控人胆囊癌细胞增殖转移的机制研究

专 业：外科学（普通外科）

博 士 生：叶园园

研 究 方 向：胆囊癌的基础与临床研究

申请学位级别：博士

导 师：刘颖斌教授

培 养 单 位：上海交通大学医学院附属新华医院

学 号：015722910232

基金资助项目：国家自然科学基金（编号：81272402）

2018 年 5 月

Shanghai Jiaotong University School of Medicine

Doctoral Dissertation

**The mechanism of miR-30a-5p modulating cell proliferation
and metastasis in gallbladder cancer**

Professional discipline: Surgery (General Surgery)

Name: Yuan-Yuan Ye

Research direction: Basic and clinical research of GBC

Application degree: Ph.D

Supervisor: Prof. Ying-Bin Liu

Training institution: Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao
Tong university School of Medicine

Student ID: 015722910232

Grant foundation: National Natural Science Foundation of
China (81272402)

May 2018

中文摘要

目的 胆囊癌是胆道系统最常见的恶性肿瘤，其侵袭性高，预后差。microRNA 是一类非编码小RNA分子，参与了肿瘤发生发展的各个方面。microRNA-30a-5p (miR-30a-5p)作为重要的肿瘤抑制分子，目前在胆囊癌中的研究仍有待突破。研究miR-30a-5p在胆囊癌中的作用及分子机制，为探寻胆囊癌治疗新的靶点提供理论依据。

方法 qRT-PCR检测42对胆囊癌患者的癌组织和癌旁组织中的miR-30a-5p的表达情况，分析miR-30a-5p表达与胆囊癌患者临床病理资料和预后的关系。在胆囊癌细胞系中敲减和过表达miR-30a-5p，采用CCK-8、克隆形成、transwell和细胞划痕实验检测对细胞增殖、侵袭和迁移的影响；细胞周期和细胞凋亡实验进一步探讨miR-30a-5p影响细胞增殖的可能原因；裸小鼠移植瘤模型和肝转移模型检测miR-30a-5p在体内对细胞生长和转移的影响。蛋白印迹、免疫荧光和免疫组化实验检测上皮间质转化（Epithelial-mesenchymal transition, EMT）相关蛋白的表达和 β -连环蛋白（ β -catenin）核转位的影响。接下来结合网站预测，胆囊癌基因芯片和文献调研的结果筛选miR-30a-5p下游靶基因，双荧光素酶报告基因实验进行验证。回复实验解析miR-30a-5p与E2F转录因子7（E2F transcription factor 7, E2F7）在胆囊癌中的调控关系。

结果 miR-30a-5p在胆囊癌组织中呈低表达（ $P<0.001$ ），与胆囊癌患者的无病生存率（Disease-free survival, DFS）、总生存率（Overall survival, OS）相关（ $P<0.001$ ）。低表达miR-30a-5p的患者肿瘤更小，淋巴结转移率更低（ $P<0.05$ ）。体内外实验显示上调miR-30a-5p可抑制胆囊癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力，使胆囊癌细胞阻滞在G1期，抑制EMT和 β -catenin的核转位。双荧光素酶报告基因证实E2F7可与miR-30a-5p直接结合。E2F7在胆囊癌组织中明显高表达，且与miR-30a-5p呈负相关。回复实验显示E2F7可以部分回复miR-30a-5p对胆囊癌细胞的抑制作用。

结论 miR-30a-5p可通过下调E2F7的表达来抑制胆囊癌细胞的增殖、侵袭和迁移

的过程，提示miR-30a-5p为一肿瘤抑制分子，可能成为判断胆囊癌预后的标志物或分子治疗靶点。

【关键词】 miR-30a-5p； 胆囊癌； E2F7； 预后

The Mechanism of miR-30a-5p Modulating Cell Proliferation and Metastasis in Gallbladder Cancer

Abstract

Objective The most common malignant tumour of the bile duct, gallbladder carcinoma (GBC), is highly aggressive and has a poor prognosis. microRNA is a non-coding RNA which participates in many aspects of carcinogenesis and cancer development. microRNA-30a-5p (miR-30a-5p) is an important tumour suppressor. However, the role of miR-30a-5p in GBC development remains to be determined, as do the mechanisms underlying its effects in GBC. Exploring the mechanism of miR-30a-5p in GBC can provide theoretical basis for new target of GBC treatment.

Methods miR-30a-5p expression levels were measured in samples collected from 42 subjects with GBC by qRT-PCR. The association between miR-30a-5p expression and clinicopathological characteristics and prognosis of patients with GBC were analysed statistically. GBC cell lines expressing miR-30a-5p or miR-30a-5p inhibitors were utilized to assess GBC cell proliferation, invasion, and migration by using CCK-8, clone formation, transwell and wound healing assays. Cell cycle and apoptosis assays were explored further mechanism of miR-30a-5p on cell proliferation. These cell lines were also injected into nude mice to assess GBC cell growth and metastasis *in vivo*. Western blot, immunofluorescence and immunohistochemical assays were used to evaluate expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins and β -catenin nuclear translocation. Combing website prediction, GBC gene microarray and literature search, we selected downstream target gene of miR-30a-5p and confirmed it using dual luciferase reporter assay. The relationship between miR-30a-5p and E2F transcription factor 7 (E2F7) were assessed by rescue experiments.

Results miR-30a-5p expression levels were significantly downregulated in GBC ($P < 0.001$) and were closely associated with disease-free survival (DFS) and overall

survival (OS) in 42 patients with GBC ($P<0.001$). The subjects with low miR-30a-5p expression had larger tumour size and higher rate of lymph node metastasis ($P<0.05$). Our gain- and loss-of-function experiments showed that miR-30a-5p inhibited GBC cell proliferation, invasion, migration, G1 arrest, EMT and β -catenin nuclear translocation *in vitro* and *in vivo*. E2F7 was a direct target of miR-30a-5p and negatively correlated with miR-30a-5p expression. E2F7 antagonized the effects induced by miR-30a-5p down-regulation in GBC cells.

Conclusions miR-30a-5p attenuates cell proliferation, invasion, and migration in GBC cell lines by targeting E2F7, suggesting miR-30a-5p is a tumor suppressor that may serve as a novel potential prognostic biomarker or molecular therapeutic target for GBC.

Keywords miR-30a-5p; Gallbladder cancer; E2F7; Prognosis

目 录

符号及英文缩略词说明	1
绪论.....	2
第一部分:胆囊癌中 miR-30a-5p 的表达及其与临床预后的关系.....	5
1. 引言.....	5
2. 材料和方法.....	5
2.1 主要材料与仪器.....	5
2.2 实验方法.....	9
3. 实验结果.....	12
4. 讨论.....	15
5. 小结.....	16
第二部分:miR-30a-5p 对胆囊癌细胞系增殖、转移的影响.....	17
1. 引言.....	17
2. 材料和方法.....	17
2.1 主要实验材料和仪器.....	17
2.2 实验方法.....	21
2.3 统计学分析.....	37
3. 实验结果.....	37
4. 讨论.....	48
5. 小结.....	49
第三部分 miR-30a-5p 通过调控 E2F7 影响胆囊癌细胞的增殖转移.....	50
1. 引言.....	50
2. 材料和方法.....	50
2.1 主要材料和仪器.....	50
2.2 实验方法.....	54
3. 实验结果.....	66
4. 讨论.....	79
5. 小结.....	81
全文结论.....	82
参考文献.....	83

符号及英文缩略词说明

英文缩写	英文全称	中文全称
miR-30a-5p	microRNA-30a-5p	微小 RNA-30a-5p
GBC	Gallbladder carcinoma	胆囊癌
mRNA	Messenger RNA	信使核糖核酸
E2F7	E2F transcription factor 7	E2F 转录因子 7
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时定量 PCR
OS	Overall Survival	总生存率
DFS	Disease-Free Survival	无病生存率
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
3'UTR	3'untranslated Region	3'非编码区
WT	Wild type	野生型
MUT	Mutant type	突变型
AJCC	American Joint Committee on Cancer	美国癌症联合会
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
EMT	Epithelial to mesenchymal transition	上皮-间质转化

miR-30a-5p 调控人胆囊癌细胞增殖转移的机制研究

绪 论

胆囊癌致死率高，预后差，五年生存率仅有 0%-10%，是胆道系统最常见的恶性肿瘤^[1]。胆囊癌的发病率随年龄增长，在女性中的发病率是男性的两倍到六倍^[2]。胆囊癌好发于南美、印度北部、日本、中国等国家和地区，具有一定的地域差异性。文献报道，印度北部的胆囊癌发病率极高（在德里，每 10 万名男性中有 4.5 人发病，每 10 万名女性中有 10 个人发病），而在印度南部，像金奈，孟买，特里凡得琅，班加罗尔等城市中胆囊癌的发病率较低（每 10 万男性中有 1-2 人发病，每 10 万女性中有 0-9 人发病）^[3]。地域、种族和文化的差异导致了胆囊癌发病率的不同，提示我们遗传和环境因素包括饮食和生活习惯对胆囊癌发生发展的影响，而认识和消除这些因素可有效的预防和控制胆囊癌的发生发展。

近年来胆囊癌在中国的发病率呈缓慢上升趋势，如何提高早期诊断率和有效治疗率也受到越来越多的关注。胆囊癌的发病机制复杂，可能与胆囊结石、胆囊慢性炎症和胆囊息肉等因素相关，其中 65%-90%的胆囊癌病人中发现有胆囊结石^[4]。胆囊癌起病隐匿，其早期缺乏特异性的症状，大部分胆囊癌患者被诊断时往往已是中晚期。从胆囊发育不良、原位胆囊癌发展到进展期胆囊癌大约需要 15 年的时间^[5,6]。因此，了解胆囊癌的进展过程对选择包括外科手术在内的适合的治疗手段尤为重要。Fahim 等^[7]人将胆囊癌的扩散模式总结如下：直接浸润、淋巴转移、血管转移、神经转移、腹腔内转移和导管内转移。胆囊癌的治疗手段包括手术、放疗、化疗、内分泌治疗和分子靶向治疗。治疗方法个性化的选择依赖于患者的症状及与肿瘤特征相关的不同因素。年龄、营养状况、心肺功能、肝肾系统功能状态和其他系统器质性疾病都会影响治疗方案的选择。目前最可能治愈胆囊癌的方法是手术切除，但是胆囊癌患者的根治性手术切除率低，仅有 10-30% 的病人可进行手术治疗。然而即使是少数可行根治性手术的胆囊癌患者，术后的复发率也相当高^[8]。而进展期胆囊癌患者的可选治疗方案有限，且疗效不佳。因此，探究胆囊癌的新的分子治疗靶点就显得尤为重要。

miRNAs 是一类进化保守的非编码小 RNA 分子，在 mRNA 翻译过程中起到关键的调控作用，同时可与 mRNA 的 3'UTR 区域特定碱基序列配对结合，调控

mRNA 的降解^[9,10]。自从在 *Caenorhabditis* 线虫中发现这类小 RNA 分子以来, miRNAs 被认为在调控细胞功能的多个方面发挥着重要的作用^[11-16]。在人类和许多其他物种中, miRNAs 的分布千差万别,有的分布在基因间,有的分布在非编码 RNA 的内含子或者基因的外显子中。成熟 miRNA 的生物合成起始于 RNA 聚合酶 II 转录出前体 miRNAs, 之后这些转录本被 Drosha 酶等剪切去除基部双链形成 pri-miRNAs, 通过 Ran-GTP/Exportin5 转运至胞浆中, 经 Dicer 酶处理形成成熟的双链 miRNAs^[17]。与 RNA 诱导沉默复合体 (RISC) 组装后, 在引导链的帮助下成熟 miRNAs 与靶 mRNA 结合, 导致靶基因的沉默或降解。虽然 miRNAs 生物合成的过程是严格调控的, 但在肿瘤细胞中发现生物合成通路的 Drosha, Dicer, AGO2 等蛋白的变化会导致 miRNAs 的下调^[18-20]。除了自发的肿瘤细胞基因改变外, 肿瘤微环境也可以直接影响 miRNAs 水平的变化。每一条 miRNA 可直接或间接靶向几百条转录本, 同时多条 miRNAs 也可以共同调控一个靶基因^[21,22]。大量研究证实 miRNAs 可作为肿瘤抑制分子或者促癌分子参与了肿瘤的发生发展过程^[23,24]。它作为关键调节因子几乎参与了正常细胞和肿瘤细胞生命活动的全过程, 包括细胞分化、细胞凋亡、细胞增殖等等^[25]。这些发现总体上提示我们系统研究肿瘤中 miRNAs 功能的必要性, 并可通过表观药物调节 miRNAs 表达, 抑制致癌 miRNAs 和回复肿瘤抑制 miRNAs, 为肿瘤的治疗提供新的靶点。

miRNAs 在胆囊癌中的研究始于 2010 年的一项病例对照研究, Kshitij Srivastava^[26]等人在印度北部地区的胆囊癌病人和正常对照组人群中分析了 pre-miRNA 的三种单核苷酸多态位点与胆囊癌易感性的关系, 首次发现 miRNA 的常见变异可能与印度北部地区人群胆囊癌的易感性无关。到目前为止, 研究报道发现 miRNAs 的异常表达与胆囊癌的发生发展密切相关。现有文献中绝大多数的 miRNAs 在胆囊癌组织中的表达与癌旁组织相比表达下调, 如 miR-29c-5p、miR-143-3p、miR-125b-5p 等分别通过调控 CPEB4、ITGA6 和 BCL-2 来抑制胆囊癌的生长、血管形成和促进化疗耐药^[27-29]。另外有少许 miRNAs 在胆囊癌组织中表达上调, miR-145、miR-182 等分别通过调控 MRAP1、CADM1 来促进胆囊癌的化疗敏感性和细胞转移^[30,31]。这些研究表明, 在某种程度上胆囊癌的发生发展确实是受到某些 miRNAs 调控的。

miRNA-30 家族成员包括 miR-30a-5p、miR-30b-5p、miR-30c-5p、miR-30d-5p、miR-30e-5p，它们具有类似的序列，尤其是相似的种子序列（2-7 个核苷酸）决定了 miRNA-30 家族成员可以进行 miRNA 的替代疗法。miR-30a-5p 定位于 6 号染色体长臂 1 区 3 带，在多种肿瘤中差异表达，参与了肿瘤增殖、侵袭、转移等过程，但在胆囊癌中的作用仍未见报道。本课题组收集了 4 对胆囊癌组织和相应的癌旁组织，进行 miRNA 芯片分析，筛选出差异表达 miRNAs，其中 miR-30a-5p 在胆囊癌组织中明显下调。目前研究表明 miR-30a-5p 在乳腺癌中表达下调，可通过调控 Eya2、slug、vimentin、metadherin 来抑制乳腺癌细胞的增殖、转移、EMT 等生物学行为^[32-35]。同时，miR-30a-5p 在结肠癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌等肿瘤中表达下调，而在胶质瘤中，miR-30a-5p 表达上调，通过诱导 Wnt/ β -catenin 通路来促进胶质瘤细胞的侵袭、转移^[36-40]。

在本研究中，我们首先通过检测 miR-30a-5p 在胆囊癌组织和癌旁组织的表达，发现 miR-30a-5p 在癌组织中表达明显下调，与文献中 miR-30a-5p 在其他肿瘤组织中的表达下调一致。进一步分析其与胆囊癌患者的临床病理资料和预后的关系，发现低表达 miR-30a-5p 的患者具有更大的肿瘤直径和更高的淋巴结转移率，且无病生存率和总生存率更差。之后通过体内、外细胞实验研究 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞生物学功能的影响，寻找到其直接作用的靶基因，初步揭示 miR-30a-5p 影响胆囊癌细胞生物学行为的作用机制，为胆囊癌寻找新的潜在分子治疗靶点。

第一部分

胆囊癌中 miR-30a-5p 的表达及其与临床预后的关系

1. 引言

胆囊癌是恶性程度很高的一种胆道系统肿瘤，占消化道恶性肿瘤的第五位^[41]。包括我国在内，世界范围内胆囊癌的发病率逐年上升。因起病隐匿，且缺乏有效的筛查手段，胆囊癌患者早期诊断率低，多数患者就诊时已是中晚期，根治性手术的切除率仅有 10%-30%。胆囊癌患者预后很差，5 年生存率不足 5%^[42]。因此，明确胆囊癌的病因和发病机制，探寻行之有效的诊断靶点和治疗手段就显得尤为重要。

尽管近几十年来有关胆囊癌的诊断和治疗有了大幅的进展，但是由于早期转移的发生和诊断延迟的原因，胆囊癌的临床预后并没有得到明显的改善。目前临床上缺乏有效的胆囊癌分子诊断标志物，尽管近期的研究表明一些血清中的趋化因子如 CXCL12、SDF-1、c-MET 和基因的表观遗传状态如 CDO-1 启动子区的甲基化程度可能作为潜在的诊断和预后靶标，但是几乎没有可在临床上成熟使用并得到推广^[43-45]。目前外科手术治疗是唯一可能治愈胆囊癌的方法，而对于已发生转移的胆囊癌尚缺乏有效的治疗方法。因此，阐明胆囊癌发生发展的分子机制，包括遗传和表观遗传的变异，目前迫在眉睫。

miRNAs 是一类长约 18-25 个核苷酸的非编码小 RNA^[46]。作为基因表达的内源性抑制分子，它可以与 mRNA 的 3'UTR 区域的特定序列结合，导致 mRNA 的降解和抑制蛋白的翻译，调控了几乎所有基因的表达。miRNAs 调控了肿瘤发生发展的各个方面，在多种实体肿瘤如肝癌、胃癌、乳腺癌、肺癌等中的生物学功能也随着 miRNAs 研究的深入而逐渐被揭示。miR-30a-5p 参与调控了多种肿瘤的发生发展，目前在胆囊癌中尚未见报道。对于 miR-30a-5p 在胆囊癌中的生物学功能和可能机制的探索，可能为胆囊癌的诊断和治疗提供新的靶点。

2. 材料和方法

2.1 主要材料和仪器

2.1.1 主要试剂

试剂名称	生产厂家
Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
氯仿	上海润捷化学试剂有限公司
异丙醇	上海润捷化学试剂有限公司
无水乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
Nuclease-Free Water	美国 Ambion 公司
DEPC 水	上海翊圣生物科技有限公司
95%乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
PrimeScript TM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒	大连 Takara 公司
Mir-X TM miRNA First-Strand Synthesis Kit	宝日医生物技术有限公司
SYBR [®] Premix Ex Taq TM II RT-PCR Kit	大连 Takara 公司
TE buffer	生工生物工程股份有限公司
引物	铂尚生物技术有限公司
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司
石蜡	Sakura
4%多聚甲醛 (DEPC 水)	武汉赛维尔生物科技有限公司
PBS 缓冲液 (DEPC)	武汉赛维尔生物科技有限公司
20×SSC 洗脱液	武汉赛维尔生物科技有限公司
BSA	武汉赛维尔生物科技有限公司
蛋白酶 K	武汉赛维尔生物科技有限公司
核固红染液	武汉赛维尔生物科技有限公司
中性树胶	国药集团化学试剂有限公司
杂交缓冲液	武汉赛维尔生物科技有限公司

anti-DIG-AP

jackson

BCIP/NBT 显色剂

武汉博士德生物技术有限公司

2.1.2 主要仪器

仪器名称

生产厂家

涡旋混合器 Vortex-5

江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

微型离心机

江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

低温高速离心机

德国 Eppendorf 公司

PCR 仪

杭州博日科技有限公司

-20 度冰箱

青岛海尔股份有限公司

4 度冰箱

青岛海尔股份有限公司

-80 度超低温冰箱

日本三洋公司

通风橱

上海鑫玺实业有限公司

NanoDrop2000 超微量分光光度计

美国 Thermo Scientific 公司

八连管

美国 genebrick 公司

StepOnePlus™ Real-Time PCR 仪

赛默飞世尔科技有限公司

脱水机

武汉俊杰电子有限公司

原位杂交用载玻片

武汉赛维尔生物科技有限公司

盖玻片

江苏世泰实验器材有限公司

病理切片机

上海莱卡仪器有限公司

原位杂交用离心管

美国 Axygen 公司

摇床(钟摆式)

武汉赛维尔生物科技有限公司

涡旋混匀器

武汉赛维尔生物科技有限公司

Gene tech pen

基因科技股份有限公司

正置光学显微镜成像系统

日本尼康

恒温箱

武汉奥普森试验设备有限公司

高压灭菌锅

上海申安医疗器械厂

包埋机

武汉俊杰电子有限公司

冻台

武汉俊杰电子有限公司

组织摊片机

浙江省金华市科迪仪器设备有限公司

2.1.3 病例资料和组织样本的收集

本研究第一部分所收集的42例病例均来自于上海交通大学医学院附属新华医院普外科2012年到2015年接受手术治疗的胆囊癌患者。入组标准包括：1) 均为原发性胆囊癌，排除复发的病人；2) 排除其他系统的恶性肿瘤；3) 术前未进行新辅助放疗、化疗和内分泌治疗等；4) 所有患者的病理切片均经过两名病理科医生确认为胆囊癌的病理组织学标准；5) 所有病例的病理资料完善，无遗漏；6) 所有病例均经过上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会批准同意。所有标本用作qRT-PCR分析，获得病例的临床病理资料见表1-1。

表1-1 胆囊癌患者的临床病理特征

Table 1-1 Clinicopathologic Characteristics of Patients with GBC

项目	例数
病人	42
性别	
男	14
女	28
年龄(年)	47-84, 中位数=67
肿瘤大小 (厘米)	1.0-10.0, 中位数=2.0
组织学分化	
高分化	9
中分化	18
低分化	15
浸润深度	
Tis-T ₂	10
T ₃ -T ₄	32
淋巴结转移	
有	19
无	23
TNM 分期	
I-II	9
III-IV	33
随访时间 (月)	1-34, 中位数=8

TNM, tumour-nodes-metastasis, based on the American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer Staging Manual (7th edition, 2009)

2.2 实验方法

2.2.1 组织样本 RNA 提取

- 1) 将收集的胆囊癌组织和癌旁组织从液氮中取出，迅速切下黄豆粒大小的一块放入研磨碗中，加入少许液氮后进行研磨。
- 2) 充分研磨后将组织转移至1.5 ml的EP管中，每管加入1 ml Trizol置于冰上裂解组织。
- 3) 每管加入 200 μ l 氯仿，在 Vortex 上剧烈振荡 15s。氯仿的作用主要有三个：一，使蛋白质变性，并在沉淀离心后去除蛋白，也可以通过变性作用抑制 RNase 的活性；二，去除 Trizol 中可微溶于水相的苯酚，减少苯酚对核酸的损伤；三，可作为溶剂去除样品中的脂溶性杂质。
- 4) 冰上静置 2-3 分钟后，4 度 12000 rpm 离心 15 分钟。
- 5) 轻轻取出 EP 管，用 200 μ l 的移液枪缓慢吸出上层水相至新的标记好的 1.5 ml EP 管中，置于冰上。注意不要吸到中间层的白色沉淀。
- 6) 每管加入等体积的异丙醇，上下颠倒混匀后置于冰上静置 15 分钟。异丙醇的作用是为了沉淀核酸。
- 7) 之后 4 度 12000 rpm 离心 10 分钟。
- 8) 缓慢倒掉上清，将配置好的 75%的乙醇（无水乙醇：DEPC 水 3：1）1ml 加入到 EP 管中，上下轻轻颠倒混匀，4 度 8500 rpm 离心 5 分钟。
- 9) 轻轻倒掉上清，每管再加入 1 ml 75%的乙醇，4 度 8500 rpm 离心 5 分钟。
- 10) 轻轻倒掉上清，室温晾干 EP 管内的水分，每管加 10-20 μ l 的 Nuclease-Free Water，移液枪吹打混匀，Nano Drop2000 超微量分光光度计测量 RNA 的浓度和纯度。

2.2.2 RNA 反转成 miRNA

- 1) miRNA 反转录使用的是 Clontech Laboratories 的 Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit,每管加入如下体系：

表 1-2 miRNA 反转反应体系

Table 1-2 The miRNA Reverse Transcription PCR components

试剂	使用量
mRQ Buffer (2x)	5.0 μl
RNA sample (0.25-8 μg)	3.75 μl
mRQ Enzyme	1.25 μl
Total volume	10 μl

2) 上下颠倒混匀后微离，置于 PCR 仪上，设置程序：37 度 60 分钟，85 度 5 分钟。

3) 每管加入 90 μl 双蒸水稀释反转录好的 miRNA，放在-20 度冰箱备用。

2.2.3 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR)

1) 实时荧光定量 PCR 使用的是 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II RT-PCR Kit

引物设计如下：

U6 F CTCGCTTCGGCAGCACA

U6 R AACGCTTCACGAATTTGCGT

hsa-miR-30a-5p TGACCGATTCTCCTGGTGTTC

2) 引物由铂尚公司合成，微型离心机微离后，轻轻打开管盖，每管加入相应体积的 TE buffer，溶解引物至浓度 100 μM ，双蒸水稀释引物至工作浓度 10 μM 。

3) 按照引物配置总管，八连排每管加入如下体系：

表 1-3 qRT-PCR 反应体系

Table 1-3 The qRT-PCR components

试剂	使用量	终浓度
SYBR Premix Ex Taq II (2x)	10 μl	1×
PCR Forward Primer (10M)	0.8 μl	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μl	0.4 μM
ROX Reference Dye (50x)	0.4 μl	1×
灭菌水	6 μl	
模板 (miRNA 溶液)	2 μl	
Total	20 μl	

4) 盖上盖子，上下颠倒混匀后，低速离心机离心。注意管内不要有气泡。

5) 将八连排放入 StepOne 的 PCR 仪中，设置程序如下：一个循环：95 度 30 秒；40 个循环：95 度 5 秒，60 度 34 秒。

6) 程序结束后, 首先分析引物的融解曲线, 验证引物的特异性, 计算目的 miRNA 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$, 进行数据分析。

2.2.4 原位杂交技术

1) Hsa-miR-30a-5p 探针序列:

5'-DIG-CTTCCAGTCGAGGATGTTTA CA-3'.

2) 组织固定: 组织取出后用 PBS 洗干净, 立即放入固定液 (DEPC 水配制) 中组织固定 2-12 小时。

3) 脱水: 固定完成后将组织放入梯度酒精中脱水、浸蜡, 然后进行包埋。

4) 切片: 用切片机切片, 摊片机捞片, 然后放入 62°烘箱烤片 2 小时。

5) 石蜡切片脱蜡至水: 将切片依次放入二甲苯溶液 I 15 分钟-二甲苯溶液 II 15 分钟-无水乙醇 I 5 分钟-无水乙醇 II 5 分钟-85%酒精 5 分钟-75%酒精 5 分钟, 最后用 DEPC 水清洗。

6) 消化: 根据组织固定时间的长短, 将切片放入修复液中煮沸 15 分钟左右, 待其自然冷却。然后用疏水笔在切片组织周围画圈, 滴加蛋白酶 K (20 μ g/ml) 37°消化半小时。纯水冲洗后用 PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。

6) 预杂交: 切片上滴加预杂交液, 37 度孵育 1 小时。

7) 杂交: 小心吸去预杂交液, 滴加含探针 hsa-miR-30a-5p 的杂交液, 浓度 8ng/ μ l, 37 度杂交过夜。

8) 杂交后洗涤: 洗去杂交液, 2 $\times$ SSC, 37 度洗 10 分钟, 1 $\times$ SSC, 37 度洗 2 次, 每次 5 分钟, 0.5 $\times$ SSC 室温洗 10 分钟。

9) 滴加封闭液: 切片上滴加 BSA 后, 室温封闭 30 分钟。

10) 滴加鼠抗地高辛标记碱性磷酸酶 (anti-DIG-AP): 轻轻吸去封闭液, 滴加 anti-DIG-AP 至切片上。37°C 孵育 40 分钟, 之后用 TBS 洗 4 次, 每次 5 分钟。

11) BCIP/NBT 显色: 于切片上滴加 BCIP/NBT 显色液, 放在显微镜下连续观察阳性后, 用纯水冲洗。

12) 复染细胞核: 于切片上滴加核固红染液, 染核至合适程度后用纯水冲洗。

13) 封片: 将切片置于室温风干后, 用中性树胶封片。

14) 倒置显微镜观察、拍照, 数据分析。

2.3 统计学分析

所有实验数据使用 SPSS19.0 进行统计学处理。所有实验都进行了三次独立重复。采用配对 t 检验来比较胆囊癌组织和相对应的癌旁组织中的 miRNA 表达的差异；将 miR-30a-5p 的表达按照中位数分为高表达组和低表达组，两组胆囊癌患者的临床病理特征用 Pearson's χ^2 检验进行分析；miR-30a-5p 的表达和胆囊癌患者预后之前的关系采用 Kaplan-Meire 法进行分析；生存率的统计采用 Log-rank 检验方法进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学上的显著性意义。

3. 实验结果

3.1 miR-30a-5p 在 42 对胆囊癌组织和相应的癌旁组织中的表达情况

为了明确 miR-30a-5p 在胆囊癌中的表达水平，我们通过 SYBR 荧光实时定量 PCR 检测了 42 对胆囊癌组织和相对应的癌旁组织中 miR-30a-5p 的表达，发现在 42 例胆囊癌患者中，绝大多数的 miR-30a-5p 的表达是下调的，仅有 9 例在胆囊癌组织中的表达高于相对应的癌旁组织中（图 1-1）。胆囊癌组织和癌旁组织相比，miR-30a-5p 在癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织中，差异具有统计学上的显著性意义（ $P < 0.001$ ）（图 1-2）。

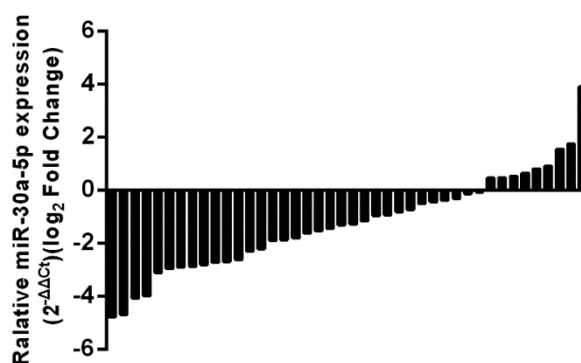


图 1-1 42 例胆囊癌病人中 miR-30a-5p 的表达情况

Figure1-1 Relative miR-30a-5p expression levels in 42 patients with GBC

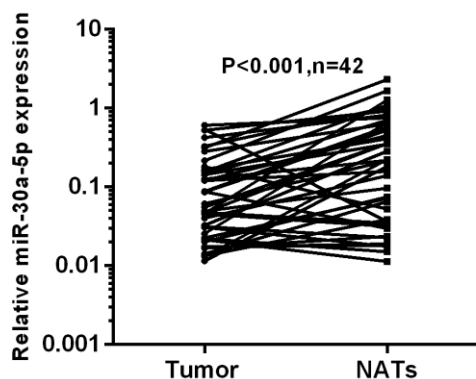


图 1-2 42 对胆囊癌组织和相对应的癌旁组织中 miR-30a-5p 的表达水平

Figure1-2 Relative miR-30a-5p expression levels in GBC tissues (Tumour) (n=42) and non-tumour adjacent tissues (NATs) (n=42) ($P<0.001$)

3.2 原位杂交技术检测胆囊癌组织和癌旁组织中 miR-30a-5p 的表达

为了更加直观的检测miR-30a-5p在胆囊癌组织和相对应的癌旁组织中的表达差异，我们设计了miR-30a-5p的地高辛探针，在组织切片上检测miR-30a-5p的表达情况，蓝紫色为探针阳性，红色是细胞核。如图1-3所示，miR-30a-5p在胆囊癌组织中的蓝紫色的阳性表达显著低于在相对应的癌旁组织中的表达。

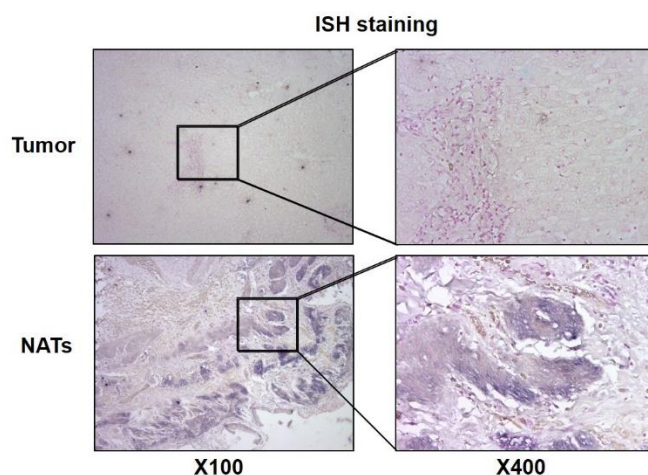


图 1-3 原位杂交技术检测 miR-30a-5p 在胆囊癌组织和癌旁组织中的表达

Figure1-3 Representative images of the ISH staining analyses of GBC tissues and NATs using anti-miR-30a-5p probe

3.3 miR-30a-5p 在胆囊癌组织中的表达和临床病理参数的分析

前面我们发现miR-30a-5p在42对胆囊癌组织中的表达明显下调，之后收集了42例胆囊癌患者的临床病理资料进行分析发现：

42例胆囊癌患者中60岁以下的有10人，60岁及以上的患者有32人；男性有14人，女性有28人；肿瘤长径小于3cm的有25人，3cm及以上的有17人；分化程度较好的有27人，分化程度差的有15人；肿瘤侵袭程度Tis-T2的占10人，T3-T4的占32人；19人淋巴结转移阳性，23人淋巴结转移阴性；TNM分期中I-II期的占9人，III-IV期的占33人。

如表1-4所示，将miR-30a-5p的表达水平按照中位数分成低表达组（n=21）和高表达组（n=21），分析miR-30a-5p表达高低两组与临床病理资料的关系，发现miR-30a-5p低表达组的胆囊癌病人的肿瘤直径更大（ $\chi^2=4.842$, $P<0.05$ ），淋巴结转移率更高（ $\chi^2=11.629$, $P<0.05$ ）。

表1-4 miR-30a-5p表达与胆囊癌病人的临床病理资料的关系

Table 1-4 Association of miR-30a-5p expression with the GBC clinicopathological

characteristics

变量	分组	miR-30a-5p 表达水平		χ^2	P
		Low (n=21)	High (n=21)		
年龄	<60	4	6	0.525	0.359
	≥60	17	15		
性别	男	7	7	0.000	0.628
	女	14	14		
肿瘤大小(cm)	<3	9	16	4.842	0.029
	≥3	12	5		
组织学分化	高分化/中分化	14	13	0.104	0.500
	低分化	7	8		
局部浸润(AJCC)	Tis-T ₂	6	4	0.525	0.359
	T ₃ -T ₄	15	17		
淋巴结转移	Yes	15	4	11.629	0.001
	No	6	17		
TNM stage(AJCC)	I-II	5	4	0.141	0.500
	III-IV	16	17		

黑体数值显示差异具有统计学上的显著性意义， $P<0.05$

3.4 miR-30a-5p 在胆囊癌组织中的表达水平与胆囊癌患者的临床预后相关

本组 42 例胆囊癌患者均得到有效随访，随访时间为 1-34 个月，中位随访时间为 8 个月。如图 1-4, 1-5 所示，Kaplan-Meier 生存分析曲线显示 miR-30a-5p 低表达的胆囊癌患者的无病生存率明显差于 miR-30a-5p 高表达组的胆囊癌患者 ($P<0.001$)，同样 miR-30a-5p 低表达的胆囊癌患者的总生存率也明显差于 miR-30a-5p 高表达组的胆囊癌患者，差异具有统计学上的显著性意义 ($P<0.001$)。

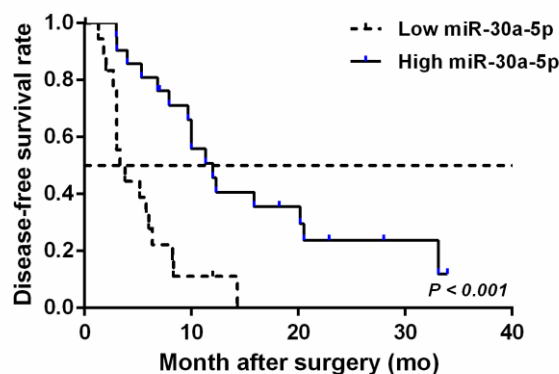


图 1-4 miR-30a-5p 高低表达组的无病生存率曲线

Figure1-4 Kaplan-Meier curve for DFS in patients with GBC with high (n=21) and low (n=21) miR-30a-5p expression levels ($P<0.001$).

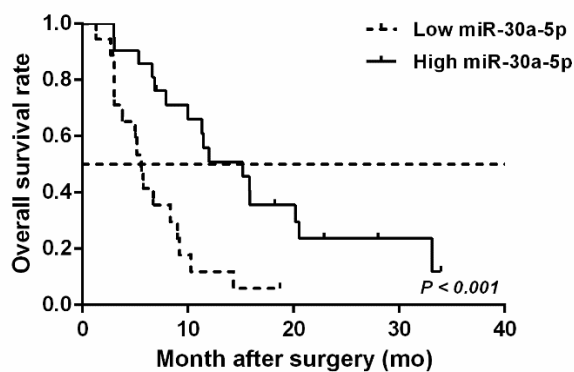


图 1-5 miR-30a-5p 高低表达组的总生存率曲线

Figure1-5 Kaplan-Meier curve for OS in patients with GBC with high (n=21) and low (n=21) miR-30a-5p expression levels ($P<0.001$).

4. 讨论

胆囊癌是一种严重危害人民健康的恶性肿瘤，近年来发病率呈缓慢上升的趋

势。因其早期诊断困难，胆囊癌患者被诊断时往往已是中晚期，无法进行根治性手术的切除，预后极差。因此，积极探索胆囊癌的病因，影响胆囊癌预后的临床病理因素及行之有效的治疗手段是目前治愈胆囊癌的关键。

miRNAs几乎参与了细胞生命活动的各个方面，包括细胞分化、细胞增殖、细胞凋亡、细胞免疫监控等等。尽管miRNA在乳腺癌、肝癌、胃癌、肺癌等肿瘤中的作用机制研究较多，但是在胆囊癌中的研究仍处于初级阶段，且现有的研究均集中在miRNA差异表达在胆囊癌中的表型研究，具体的机制仍有待深入。

本研究聚焦于miR-30a-5p在胆囊癌中的表达异常，并探索miR-30a-5p影响胆囊癌发生发展的潜在机制。首先在42对胆囊癌组织和相对应的癌旁组织中使用qRT-PCR检测miR-30a-5p的表达情况，发现miR-30a-5p在胆囊癌组织中表达明显下调，78.6%（33/42）的胆囊癌患者的miR-30a-5p表达下调，21.4%（9/42）的胆囊癌患者的miR-30a-5p表达上调。之后通过原位杂交技术在胆囊癌组织切片上检测miR-30a-5p的表达，发现蓝紫色的探针阳性染色在癌旁组织中明显多于胆囊癌组织中，进一步直观的观察到miR-30a-5p在胆囊癌中的表达下调。通过收集分析42例胆囊癌病人的临床病理资料，发现miR-30a-5p低表达组的患者具有更大的肿瘤直径和更高的淋巴结转移率。而Kaplan-Meier生存曲线分析发现miR-30a-5p的表达水平和胆囊癌患者的预后是相关的，miR-30a-5p低表达的胆囊癌患者的无病生存率和总生存率更差，差异具有统计学上的显著性意义（ $P<0.001$ ）。

5.小结

- 1、miR-30a-5p 在胆囊癌组织中的表达明显低于癌旁组织中；
- 2、miR-30a-5p 在胆囊癌组织中的表达水平和胆囊癌患者的肿瘤大小及淋巴结转移呈负相关；
- 3、miR-30a-5p 在胆囊癌患者中表达水平的高低与患者预后相关，低表达组胆囊癌患者的无病生存率和总生存率更差，差异具有统计学上的显著性意义（ $P<0.001$ ）。

第二部分

miR-30a-5p 对胆囊癌细胞系增殖、转移的影响

1. 引言

在第一部分中,我们研究发现miR-30a-5p在胆囊癌组织中明显低表达,并且其表达水平的高低和胆囊癌患者的临床病理资料及预后相关。miR-30a-5p表达水平低的患者具有更大的肿瘤直径和更好的淋巴结转移率,且胆囊癌患者的预后更差。基于以上结果,我们不禁思考,既然miR-30a-5p的表达水平与胆囊癌患者的肿瘤大小和淋巴结转移相关,那么miR-30a-5p是否可以通过影响胆囊癌细胞的增殖、转移来影响胆囊癌的发生发展,而它的具体机制又是什么呢?接下来,我们在细胞水平和动物水平继续探究miR-30a-5p影响胆囊癌细胞的生物学行为和潜在机制。

2. 材料和方法

2.1 主要实验材料和仪器

2.1.1 主要实验材料

细胞株名称	购买厂家
人胆囊癌 GBC-SD 细胞株	购于中国科学院上海生命科学院细胞库
人胆囊癌 NOZ 细胞株	购于日本大阪健康科学研究资源库
人胆囊癌 EH-GB1 细胞株	购于中国科学院上海生命科学院细胞库
人胆囊癌 SGC-996 细胞株	购于中国科学院上海生命科学院细胞库
人胆囊癌 OCUG-1 细胞株	购于日本大阪健康科学研究资源库
实验动物	
4-6 周的 SPF 级 BALB/c 雄性裸小鼠	购于中国科学院上海动物实验中心
试剂名称	
PBS 缓冲液	美国 HyClone 公司

0.25%胰酶&0.02%EDTA	吉诺生物医药技术有限公司
细胞培养青霉素/链霉素	美国 Gibco 公司
DMSO	美国 Sigma 公司
DMEM 细胞培养基	美国 Gibco 公司
Williams 细胞培养基	吉诺生物医药技术有限公司
RPMI 1640 细胞培养基	美国 Hyclone 公司
胎牛血清	美国 Invitrogen 公司
MicroRNA mimics NC	上海拓然生物科技有限公司
miR-30a-5p mimics	上海拓然生物科技有限公司
MicroRNA inhibitor NC	上海拓然生物科技有限公司
miR-30a-5p inhibitors	上海拓然生物科技有限公司
Opti-MEM®培养基	美国 Gibco 公司
Lipo2000 转染试剂	美国 Invitrogen 公司
RFect 转染试剂	常州百代生物科技有限公司
Viafect 转染试剂	美国 Progema 生物技术有限公司
慢病毒	上海吉凯基因化学技术有限公司
SDS 十二烷基硫酸钠	上海翊圣生物科技有限公司
胰蛋白胨	英国 OXOID 公司
酵母提取物	英国 OXOID 公司
氯化钠	上海翊圣生物科技有限公司
琼脂粉	北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司
DH5 α 感受态细胞	天根生化科技有限公司
甘油	美国 Sigma 公司
无内毒素质粒小提中抽试剂盒	天根生化科技有限公司
CCK-8 试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I 试剂盒	美国 BD Pharmigen 公司
细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司

Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
氯仿	上海润捷化学试剂有限公司
异丙醇	上海润捷化学试剂有限公司
无水乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
Nuclease-Free Water	美国 Ambion 公司
DEPC 水	上海翊圣生物科技有限公司
95%乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
Mir-XTM miRNA First-Strand	宝日医生物技术有限公司
Synthesis Kit	
SYBR® Premix Ex Taq™ II RT-PCR	大连 Takara 公司
Kit	
TE buffer	生工生物工程股份有限公司
PMSF	碧云天生物技术研究
RIPA	碧云天生物技术研究
BCA 显色液	碧云天生物技术研究
BSA	美国 Sigma 公司
6 × loading buffer	碧云天生物技术研究
SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒	碧云天生物技术研究
75%乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
预染蛋白 marker	美国 Invitrogen 公司
脱脂奶粉	上海润捷化学试剂有限公司
一抗稀释液	碧云天生物技术研究
二抗稀释液	碧云天生物技术研究
ECL 发光液	美国 Pierce 公司
兔抗人 GAPDH 单抗	美国 Cell Signaling Technology
兔抗人 E-cadherin 单抗	美国 Cell Signaling Technology
兔抗人 vimentin 单抗	美国 Cell Signaling Technology
兔抗人 β -catenin 单抗	美国 Cell Signaling Technology

兔抗人 Histoneh1 单抗	美国 Cell Signaling Technology
兔抗人 β -actin 单抗	美国 Cell Signaling Technology
Triton X-100	美国 Sigma 公司
Tween 20	上海翊圣生物科技有限公司
20xTBS	上海翊圣生物科技有限公司
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司
DAB 显色液	福州迈新生物技术开发有限公司
柠檬酸钠缓冲液	生工生物工程股份有限公司
双氧水	上海润捷化学试剂有限公司
浓盐酸	上海润捷化学试剂有限公司

2.1.2 主要仪器

仪器名称	生产厂家
细胞冻存管	美国 Corning 公司
液氮罐	成都金凤液氮容器有限公司
细胞培养皿、板	美国 Corning 公司
15ml、50ml 离心管	美国 BD 公司
1.5ml、200ul EP 管	美国 Axygen 公司
电热恒温水温箱	上海贺德实验设备有限公司
细胞冻存盒	美国 Nalgene 公司
低速离心机	上海卢湘仪离心机仪器有限公司
生物安全柜	美国 Thermal 公司
二氧化碳恒温培养箱	美国 Thermo Fisher 公司
荧光倒置显微镜	德国 Lecia 公司
血球计数板	上海求精生化试剂仪器有限公司
细胞计数仪	美国 Millpore 公司
垂直层流洁净工作台	上海上净净化设备有限公司
电热恒温干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
NanoDrop2000 超微量分光光度计	美国 Thermo Scientific 公司

光吸收酶标仪	美国 Molecular Devices 公司
轨道摇床	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
阅片灯箱	福建国德医疗科技股份有限公司
Transwell 小室	美国 Corning 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
微型离心机	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司
PCR 仪	杭州博日科技有限公司
-20 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
4 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
-80 度超低温冰箱	日本三洋公司
八连管	美国 genebrick 公司
StepOnePlus™ Real-Time PCR 仪	赛默飞世尔科技有限公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
化学发光仪	美国 GE 公司

2.2 实验方法

2.2.1 胆囊癌细胞系 GBC-SD、NOZ、SGC、EH-GB1、OCUG-1 细胞的复苏

- 1) 将水浴锅提前设置到 37 度预热，所有培养基、PBS 缓冲液、0.25%胰蛋白酶等均提前复温到 37 度。
- 2) 将细胞冻存管从液氮中拿出，拧紧冻存管管盖，立刻放入预热的 37 度水浴锅中解冻。因为细胞冻存液 DMSO 对细胞有毒害作用，为减少这种损失，要遵循慢冻速溶的原则，将细胞冻存管在 37 度水浴锅中快速摇动至完全融化。
- 3) 将解冻的细胞冻存管迅速放入室温离心机中，1500 rpm 离心三分钟。
- 4) 用无菌的枪头小心吸取细胞冻存液，弃去，每管加入 1 ml 相应的细胞完全培养基（10%胎牛血清，1%的青霉素、链霉素双抗生素），轻轻吹打混匀，移至 10 ml 培养皿中，每皿加入 8 ml 完全培养基，“8”字或者“十”字混匀后，放入 37 度，5% CO₂ 的细胞培养箱中培养（GBC-SD 细胞用 10%的 DMEM 培养基，EH-GB1、OCUG-1 细胞用 15%的 DMEM 培养基，SGC-996 细胞用 10% RPMI640 培养基，

NOZ 细胞用 10% Williams 培养基培养)。

5) 细胞复苏的第二天, 将培养皿放在荧光倒置显微镜下进行观察, 看细胞密度和细胞分布是否均匀。待细胞完全贴壁后, 更换新的细胞培养基。待细胞密度长至 80% 时, 可进行细胞消化传代培养。

2.2.2 细胞换液和细胞传代

- 1) 首先开启细胞超净台的紫外灯进行消毒灭菌 20-30 分钟, 之后打开超净台, 用 75% 的消毒酒精擦拭超净台和双手, 操作过程注意无菌原则。
- 2) 将细胞培养皿自细胞培养箱中取出, 肉眼观察细胞培养基的颜色和量, 如果培养基颜色变黄, 说明细胞代谢产生的酸性物质过多, 需要更换培养基。
- 3) 将培养皿中的培养基弃去, 贴着侧壁加入新的完全培养基, 减少培养基的冲击力对细胞的损伤, 然后放入 37 度细胞培养箱中继续培养。
- 4) 如果显微镜下观察到细胞融合度超过 80%, 可进行细胞传代培养: 首先弃去细胞培养皿中的培养基, 加入 1ml PBS 缓冲液, 轻轻晃动培养皿, 使 PBS 缓冲液浸润整个皿底, 将残存的细胞培养基洗去。因为培养基中含有血清蛋白, 若不洗干净, 会与胰蛋白酶结合, 使其无法发挥消化细胞的作用。
- 5) 每皿加入 800 μ l 0.25% 的胰蛋白酶, 轻轻晃动细胞培养皿, 使其浸润整个皿底, 然后放入细胞培养箱中消化 2-3 分钟, 放到荧光倒置显微镜下观察细胞回缩、变圆, 呈单个球形, 或者肉眼观察细胞呈片状脱落, 即可弃去 600 μ l 胰酶, 加入 1 ml 细胞完全培养基, 终止消化。
- 6) 用 1 ml 无菌枪头吹打皿底细胞, 使其成片脱落, 移至 1.5 ml EP 管中, 1500 rpm 室温离心 3 分钟。
- 7) 离心完成后, 用酒精棉球轻轻擦拭管口, 将 EP 管中的上清小心吸出弃去, 加入 1ml 新的培养基重悬, 轻轻吹打细胞沉淀使其充分重悬, 然后按照 1: 3-1: 5 的比例将细胞悬液传至新的培养皿中继续培养。“8”字或者“十”混匀细胞培养皿, 放入培养箱中继续培养。

2.2.3 细胞冻存

- 1) 细胞冻存前一天更换新的培养基, 倒置显微镜下观察细胞融合度至 80% 左右, 细胞状态良好, 即可进行细胞冻存。

- 2) 细胞培养皿中弃去培养基, 贴侧壁轻轻加入 1 ml PBS 缓冲液, 摇晃培养皿, 使 PBS 缓冲液浸润整个皿底, 洗去残留的细胞培养基。
- 3) 每皿加入 800 μ l 0.25% 的胰蛋白酶, 轻轻晃动培养皿, 使其浸润整个皿底, 然后放置于细胞培养箱中进行细胞消化 2-3 分钟。
- 4) 倒置显微镜下观察细胞变成单个球形, 细胞间连接蛋白降解, 即可弃去部分胰蛋白酶, 加入 1 ml 完全培养基终止消化, 移液器吹打皿底使细胞成片脱落, 移至 1.5 ml EP 管中, 1500 rpm 离心 3 分钟。
- 5) 按照 DMSO: 胎牛血清: 培养基=1: 2: 7 的比例配制细胞冻存液。因为细胞冻存时会在细胞内外形成冰晶, 对细胞产生损害, 因此要遵循慢冻速溶的原则进行细胞冻存。用 1 ml 细胞冻存液重悬细胞, 使其混合均匀后移至细胞冻存管内, 拧紧管盖, 在管身做好标记, 记录冻存细胞的名称、所用的培养基种类、冻存时间、冻存人等信息。之后放入已恢复至室温的细胞冻存盒中, 放入-80 度低温冰箱冻存, 1 天后取出放入液氮中长时间保存, 记录好液氮位置, 方便使用。

2.2.4 细胞计数

- 1) 细胞培养皿中弃去细胞培养基, 1 ml PBS 缓冲液洗一遍, 0.25% 的胰酶消化 2-3 分钟, 加入 1 ml 完全培养基终止消化, 1500 rpm 离心 3 分钟。
- 2) 弃去培养基, 1 ml 完全培养基重悬细胞沉淀, 1 ml 移液器缓慢吹打细胞沉淀, 吹打均匀使其成单个细胞状态。
- 3) 细胞计数玻璃板及盖玻片用酒精擦拭干净, 吸取 10 μ l 细胞悬液, 缓慢地从玻璃板的一边加入细胞悬液, 注意不要有气泡产生。
- 4) 静置 1-2 分钟后, 放到倒置显微镜下进行观察, 计数 4 个中格, 每个中格 16 个小格, 计数时遇到压线的细胞遵循“计上不计下、计左不计右”的原则进行。
- 5) 四个中格计算出来的总数除以 4, 乘以稀释倍数, 再乘以 10^4 , 即为每 ml 溶液中的细胞数目。

2.2.5 细胞转染

2.2.5.1 miRNA 细胞转染

- 1) miRNA 细胞转染, 序列如下:

miRNA mimics NC: F: UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA

R: UCUACUCUUUCUAGGAGGUUGUGA

miR-30a-5p mimics: F: UGUAAACAUCUCGACUGGAAG

R: CUUCCAGUCGAGGAUGUUUACA

miRNA inhibitor NC: UCUACUCUUUCUAGGAGGUUGUGA

miR-30a-5p inhibitors: CUUCCAGUCGAGGAUGUUUACA

2) 转染前一天消化细胞, 重悬成细胞悬液, 六孔板内每个孔铺大约 10 万个细胞, “8”字混匀数次, 放置在倒置显微镜下观察孔内细胞分布是否均匀, 若不均匀, 继续摇晃直至细胞分布均匀, 放在 37 度细胞培养箱中静置培养。注意开关培养箱的门要轻, 以免用力过猛使还未贴壁的细胞晃动, 细胞分布不均匀。

3) 细胞转染前, 将六孔板放在倒置显微镜下进行观察, 细胞分布均匀, 细胞融合度约为 30%左右, 即可进行转染。

4) miRNA 以冻干粉的形式进行运输, 首先用微型离心机微离冻干粉, 使其聚集在管底, 然后轻轻打开管盖, 每管加入 125 μ l 的 DEPC 水, 配制成 20 μ M 的溶液, 然后分装成五管, 置于 -80 度保存, 避免反复冻融。

5) 稀释 miRNAs: 将 5 μ l miRNAs 加入到 100 μ l 的 Opti-MEM[®]中, 轻轻混匀, 孵育 5 分钟。

6) 稀释 Lipo2000 转染试剂: 将 5 μ l Lipo2000 加入到 100 μ l 的 Opti-MEM[®]中, 轻轻混匀, 孵育 5 分钟。

7) 将 5) 和 6) 中的试剂混在一起, 轻弹管壁使其混匀, 室温孵育 15 分钟。

8) 将六孔板中的培养基弃去, 每孔加入 1 ml 的 PBS 缓冲液浸润孔板底部, 洗去残存的培养基, 之后每孔加入 800 μ l 的 Opti-MEM[®]培养基, 然后将孵育好的转染混合液轻轻滴入孔板中, 轻轻晃动孔板使其混匀, 37 度细胞培养箱中继续培养, 4-6 小时换液。

2.2.5.2 慢病毒细胞转染

1) 公司构建 miR-30a-5p 的慢病毒

2) 细胞转染前, 将六孔板放在倒置显微镜下进行观察, 细胞分布均匀, 细胞融合度约为 30%左右, 即可进行转染。

3) 将慢病毒从 -80 度冰箱中取出冰浴融化, 按照 MOI 值计算感染细胞使用的病

毒量。每孔加入 1 ml 无抗生素完全培养基, 1 μ l 病毒液, 轻轻混匀培养基。注意所有接触病毒液的枪头都需要丢弃至含有 20% SDS 的容器中。

4) 感染 24 小时后, 弃去培养基至含有 20% SDS 的容器中, 更换新的不含双抗的完全培养基继续培养。

5) 感染 72 小时后, 将孔板放置在倒置荧光显微镜下, 拍摄荧光和白光明场的照片, 重合后观察荧光细胞在整个视野中所占的比例, 以评估病毒感染细胞的效率。

2.2.6 细胞增殖 CCK-8 检测

1) 细胞消化离心, 计数。

2) 96 孔板每组设 5 个复孔, 每孔加入 1000 个细胞, 根据分组和检测时间节点来计算总的细胞数, 在总体积的基础上多配 1 ml 左右, 防止因多次加样而导致的细胞损耗。

3) 用 1 ml 的移液器或者吸管吹打总的细胞悬液, 使其混合均匀, 然后用排枪来回吹打细胞悬液, 每孔加入 100 μ l 细胞悬液。

4) 96 孔板周围一圈的孔内加入 PBS 缓冲液, 防止在培养箱内培养时间过长导致的边缘孔液体蒸发。

5) 96 孔板静置 2-3 分钟后, 放置在倒置显微镜下进行观察, 每孔细胞分布是否均匀, 每组内复孔间的细胞数量是否接近, 组间各孔的细胞数量是否一致。

6) 将孔板放入 37 度细胞培养箱中静置培养, 注意轻轻开关门, 减少震动对未贴壁细胞的影响。

7) 培养 6 小时后细胞贴壁, 弃去每孔的培养基, 每孔加入 100 μ l 新的完全培养基和 10 μ l CCK-8 试剂的混合液, 37 度细胞培养箱孵育 2 小时后用酶标仪进行检测 OD 值, 测量波长为 450 nm。

8) CCK-8 检测细胞增殖的基本原理为: CCK-8 试剂中含有 WST-8, 即 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐。加入细胞培养基中后, 在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯 (1-Methoxy PMS) 的作用下, 细胞中的脱氢酶可以将其还原成可溶于水的黄色甲瓚产物。活细胞的数量与生成甲瓚的多少是成正比的, 甲瓚生成越多, 黄色越明显, OD 值越大, 说明活细胞数量越多, 细胞增殖能力越强, 反之亦然。

9) 后面继续测量第 1、2、3、4、5 天的细胞 OD 值, 以 6 小时的 OD 值为基准, 计算处理细胞各组的增殖曲线。

2.2.7 平板细胞克隆形成实验

- 1) 平板细胞克隆实验用于检测单个细胞形成克隆的能力, 进而检测单个细胞的增殖能力。
- 2) 将处理好的处于对数生长期的细胞进行消化离心。
- 3) 1 ml 完全培养基重悬细胞沉淀, 取 10 μ l 加入细胞计数板中进行计数。
- 4) 六孔板中每孔加入 400-800 个细胞不等 (根据不同的细胞、不同的处理加入不同量的细胞), 加入 2 ml 完全培养基。
- 5) “8”字或者 “十” 字法轻轻摇晃孔板, 使细胞分布均匀, 放入 37 度细胞培养箱中静置培养。
- 6) 每三天弃去培养基, 更换新的完全培养基。
- 7) 大约 1-2 周后, 肉眼可见的克隆球形成时, 或者倒置显微镜下观察大多数克隆含有 50 个以上的细胞时, 即可中止培养。
- 8) 弃去培养基, 每孔加入 1 ml PBS 缓冲液洗去残存的培养基。
- 9) 每孔加入 700 μ l 的 4%多聚甲醛固定液, 室温摇床振荡固定 15 分钟。
- 10) 弃去固定液, 每孔加入 700 μ l 结晶紫染料室温摇床染色 15 分钟。
- 11) 大烧杯中加入自来水, 将孔板置于烧杯中冲洗掉残存的结晶紫染液, 倒扣在纸上室温空气干燥。
- 12) 干燥后将孔板放置在阅片灯箱上进行拍照, 然后用 PS 软件进行克隆计数。

2.2.8 Transwell 实验

Transwell 小室按照底部有没有 Matrigel 分两种, 没有胶的用来检测细胞的迁移能力, 有胶的用来检测细胞的侵袭能力。

- 1) 将 transwell 小室放置在 24 孔板内, 小室里面称为上层小室, 小室和孔板之间成为下层小室。上下层之间通过聚碳酸酯膜相隔, 聚碳酸酯膜具有通透性, 下层小室的溶液可影响小室上层的细胞。
- 2) 取处理好的处于对数生长期的细胞进行消化离心, 每管加入 1 ml 无血清无抗生素的培养基重悬细胞沉淀。

- 3) 用 1 ml 移液器轻轻吹打细胞沉淀混匀, 每管取 10 μ L 进行计数, 一般没有胶的 transwell 每孔加入 2 万个细胞, 有胶的 transwell 每孔加入 3 万个细胞。
- 4) 每个小室下层加入 500 μ l 含有 10%胎牛血清的培养基, 小室上层加入相应数量的无血清培养基重悬的细胞, 注意不要产生气泡。
- 5) 37 度细胞培养箱内培养细胞 14-20 个小时, GBC-SD 细胞一般培养 18 个小时进行固定染色, 而 NOZ 细胞因为侵袭能力较强, 一般培养 14 个小时后即可进行固定染色, 当然具体时间也需要结合细胞的处理因素进行调整。
- 6) 取出孔板, 轻轻吸去小室上层和下层的培养基, 用 PBS 缓冲液小心清洗, 去掉残存的培养基。
- 7) 将小室放回孔板内, 每个小室下层内加入 500 μ l 4%的多聚甲醛固定液固定 15 分钟。
- 8) 弃去固定液, 每个小室下层内加入 500 μ l 结晶紫染色液, 室温染色 15 分钟。
- 9) 在烧杯中加入自来水, 用镊子夹住 transwell 小室边缘进行涮洗, 洗去多余的结晶紫染色液。小室下层的结晶紫染色液可进行回收。
- 10) 冲洗干净后, 用棉棒小心地擦去小室上层的细胞, 仅留下能够穿过聚碳酸脂膜的细胞。将小室倒扣在阅片灯箱上, 进行拍照, 对穿过小室的细胞有一个宏观的比较。
- 11) 然后将小室放置在干净的孔中, 置于倒置显微镜下进行拍照观察, 拍摄 10 $\times$ 物镜下的照片进行展示, 同时拍摄三个以上物镜 20 $\times$ 的视野用来计数, 取平均值。
- 12) 分析统计各处理组之间细胞数量的差异。

2.2.9 划痕实验

细胞划痕实验是在细胞融合度几乎达到 100%时, 人为地划一道痕迹, 模拟体内细胞损伤后周围细胞迁移愈合修复的过程。

- 1) 首先用直尺和 marker 笔在六孔板的背面划三道横线进行标记。
- 2) 取已进行处理的对数生长期的细胞进行消化离心计数, 每孔加入约含 50 万个细胞的悬液, “8”字或者“十”字混合均匀, 放在 37 度培养箱中进行培养。
- 3) 待细胞融合度接近 100%时, 用 200 μ l 的黄色枪头沿着六孔板盖子的一边进

行垂直划线，尽量力度适中，粗细均匀。

4) 弃去培养基，用 PBS 缓冲液清洗被划下来的悬浮的细胞，弃去 PBS 缓冲液，然后快速将六孔板放置在倒置显微镜下进行观察拍照。

5) 镜下观察纵向的划痕与横向的黑色线条的交点处是否粗细均匀，镜下拍照靠近交点处的划痕细胞，并做好标记。拍照完成后每孔加入 1.5 ml 的无血清培养基进行培养，排除细胞增殖对划痕实验的影响。

6) 之后按照 12、24、36、48 小时的时间节点进行同一位置的拍照，然后进行数据处理。用 PS 软件在划痕的两边细胞边缘画垂直线，然后测量不同时间的两条线的距离，用 48 小时的划痕宽度减去 0 小时的划痕宽度得到的差值再除以 0 小时的划痕宽度，即得到细胞划痕后迁移的比例。

2.2.10 流式细胞仪检测细胞凋亡

细胞凋亡又称为细胞程序性死亡，是指细胞在一定的生理条件下一系列顺序发生的事件组合，是细胞遵循一定的规律自发的结束生命的自主控制过程。细胞凋亡是一种主动的、高度有序的、基因控制的、一系列酶参与的过程。细胞凋亡时在形态上可以看见凋亡的细胞变圆、变亮、与周围细胞脱离接触，细胞膜向内皱缩、胞浆浓缩、内质网扩张、细胞核固缩破裂，形成了多个凋亡小体。

1) 流式细胞仪检测细胞凋亡采用的是 BD Pharmingen 的 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I 试剂盒。实验原理如下：细胞凋亡早期的最主要改变是细胞膜内的磷脂酰丝氨酸暴露到细胞膜外表面。而 Annexin V 是一种 Ca^{2+} 离子依赖的磷脂结合蛋白，容易结合到磷脂酰丝氨酸上，FITC 标记的 Annexin V 可以检测细胞的早期凋亡。

2) 将处理好的处于对数生长期的细胞收集上清，然后消化细胞，一起离心，用 4 度预冷的 PBS 缓冲液轻轻重悬细胞沉淀，1500 rpm 离心 3 分钟。

3) 弃去上清，再次加入 4 度预冷的 PBS 缓冲液轻轻重悬细胞沉淀，1500 rpm 离心 3 分钟。

4) 弃去上清后，每管加入 100 μl 用双蒸水稀释好的 1 $\times$ 的 binding buffer，轻轻吹打细胞沉淀，转移细胞悬液至流式管中。

5) 每管分别加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 和 5 μl 的 PI，轻弹管壁使其混匀，室

温避光孵育 15 分钟。

6) 之后每管加入 400 μl 的 $1\times$ binding buffer, 1 ml 移液器轻轻吹打混匀, 避光状态下使用流式细胞仪进行检测。

7) 结果分析: 结果分成四个象限, 左下象限的 Annexin V(-)、PI(-) 为正常细胞团, 左上象限的 Annexin V(-)、PI(+) 为裸核, 右上象限的 Annexin V(+)、PI(+) 为晚凋细胞, 右下象限的 Annexin V(+)、PI(-) 为早凋细胞, 计算细胞凋亡率时通常将右下和右上象限的细胞合并统计为凋亡细胞所占的比例。

2.2.11 流式细胞仪检测细胞周期

细胞周期是指细胞从一次分裂结束开始到下一次分裂结束为止的一个周期, 分为细胞分裂间期和分裂期。其中分裂间期是指细胞进行有丝分裂的准备时期, 在此期间, 细胞完成 DNA 的复制和蛋白的合成, 为有丝分裂做准备。分裂间期又分为 G1、S 和 G2 三个时期。细胞分裂期又称 M 期, 是细胞有丝分裂的时期。细胞周期反应了细胞的增殖状态。

1) 检测细胞周期使用的是碧云天的细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒。试剂盒中的碘化丙啶可以与双链 DNA 结合, 产生荧光, 并且荧光强度与 DNA 的含量成正比。

2) 将处理好的处于对数生长期的细胞收集上清, 然后消化细胞, 一起离心, 用 4 度预冷的 PBS 缓冲液轻轻重悬细胞沉淀, 1500 rpm 离心 3 分钟。

3) 弃去上清液, 不必完全吸尽, 避免丢失细胞, 每管加入 1 ml 4 度预冷的 70% 的乙醇, 1 ml 移液器轻轻吹打细胞沉淀, 4 度固定过夜。

4) 第二天取出离心管, 1500 rpm 离心 3 分钟。弃去上清, 可不完全吸尽, 以免丢失细胞。4 度预冷的 PBS 缓冲液轻轻吹打细胞沉淀, 离心洗两遍。

5) 每孔加入 500 μl 配制好的细胞染色液, 包括 500 μl 的染色缓冲液, 25 μl 的碘化丙啶染色液和 10 μl 的 $50\times$ RNase A, 37 度避光孵育 30 分钟。

6) 1 ml 移液器轻轻吹打细胞沉淀, 流式细胞仪上机检测。

7) 统计分析数据。

2.2.12 胆囊癌细胞 RNA 提取

1) 将处理好的处在对数生长期的细胞弃去培养基, 每孔加入 1 ml PBS 缓冲液,

轻轻晃动使其浸润整个皿底，弃去。

2) 每孔加入500 μ l Trizol，室温摇床上裂解5分钟。注意接触过Trizol的枪头丢在密闭的垃圾瓶内，避免有毒气体挥发，损害健康。

3) 用1 ml 的移液器轻轻吹打细胞，将悬液转移至无酶的1.5 ml EP 管中。

4) 每管加入200 μ l 氯仿，在Vortex上剧烈振荡15s。氯仿的作用主要有三个：一，使蛋白质变性，并沉淀离心后去除蛋白，也可以通过变性作用抑制RNase的活性；二，去除Trizol可微溶于水相的苯酚，减少苯酚对核酸的损伤；三，可作为溶剂去除样品中的脂溶性杂质。

5) 冰上静置2-3分钟后，4度12000 rpm 离心15分钟。

6) 轻轻取出EP管，用200 μ l 的移液枪缓慢吸出上层水相至新的标记好的1.5 ml EP管中，置于冰上。注意不要吸到中间层的白色沉淀。

7) 每管加入等体积的异丙醇，上下颠倒混匀后置于冰上静置15分钟。异丙醇的作用是为了沉淀核酸。

8) 之后4度12000 rpm 离心10分钟。

9) 缓慢倒掉上清，将配置好的75%的乙醇（无水乙醇：DEPC水3:1）1 ml 加入到EP管中，上下轻轻颠倒混匀，4度8500 rpm 离心5分钟。

10) 轻轻倒掉上清，每管再加入1 ml 75%的乙醇，4度8500 rpm 离心5分钟。

11) 轻轻倒掉上清，室温晾干EP管内的水分，每管加10-20 μ l 的RNase Free水，移液枪吹打混匀，Nano Drop2000超微量分光光度计测量RNA的浓度和纯度。

2.2.13 RNA 反转成 miRNA，荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 见第一部分

2.2.14 提取胆囊癌细胞蛋白

1) 将处理好的处于对数生长期的细胞取出，弃去培养基，每皿细胞内贴侧壁轻轻加入预温的PBS缓冲液，摇晃使其浸润整个皿底，洗去残留的培养基。

2) 将培养皿置于冰上，每皿加入700 μ l 含有1%蛋白酶抑制剂(PMSF)的RIPA裂解液，用细胞刮板轻轻刮下整个培养皿细胞，1ml 移液枪吹打细胞移至新的1.5ml 的EP管中，冰上静置20-30分钟裂解细胞。

3) 低温高速离心机4度预冷，将EP管放入，14000 rpm 离心10分钟。

4) 离心后可见上层透明液体和下层细胞碎片沉淀，小心吸取上层液体，移至新

的 1.5 ml EP 管中，冰上静置。

5) 取一块 96 孔板，加入标准品用来计算标准曲线，加入样品来计算相应的蛋白浓度。标准品为 1% 的 BSA 溶液，上样量为 0、1、2、4、8、12、16、20，总体积为 20 μl ，余下的用 PBS 缓冲液补齐。每孔加样品 1 μL ，PBS 缓冲液 19 μl 。每个样品设两个复孔。

6) 配置 BCA 显色液，A 液：B 液为 50：1，每孔加入 200 μl 的 A、B 混合液。

7) 将 96 孔板放置在 37 度烘箱中孵育 30 分钟。

8) 用酶标仪在波长为 562 nm 处测量 OD 值。

9) 计算蛋白样品浓度，根据标准品的数据得出标准曲线方程， R^2 值要大于 0.99 即认为本次加样较为准确，可以使用。根据标准曲线方程计算出相应的蛋白样品的浓度，标记在管壁上。

10) 按照最低浓度来配平其他蛋白样品，使所有蛋白样品终浓度一致。每管加入蛋白样品体积五分之一量的 6 $\times$ loading buffer，混匀后在 100 度的金属浴中煮沸蛋白样品 5 分钟，然后 -20 度冰箱保存。

2.2.15 蛋白质免疫印迹

蛋白质免疫印迹又称 Western blot 实验，是用来检测蛋白表达的一种方法。其基本原理是：首先将总蛋白进行凝胶电泳分离，根据 marker 指示剂在相应分子大小的区域通过转膜技术将目的蛋白转移到 PVDF 膜上以非共价键形式进行结合。之后封闭背景蛋白，使用目的蛋白的抗体作为探针与目的蛋白结合，最后用标记辣根过氧化物酶的二抗与一抗进行免疫反应，用显色液显示目的蛋白条带。

1) 配制 SDS-PAGE 胶，根据目的蛋白分子量的大小，选择合适的凝胶浓度。具体的最佳分离范围的胶浓度如图所示：

表 2-4 分离胶分离范围

Table 2-4 Separation range of separation gel

分离胶浓度	最佳分离范围
6%胶	50-150KDa
8%胶	30-90KDa
10%胶	20-80KDa

12%胶	12-60KDa
15%胶	10-40KDa

根据所选胶的浓度，进行配制分离胶。

2) 首先清洗玻璃板，注意玻璃板是否有缺损。用纱布蘸取少量洗洁精进行擦拭玻璃板，尤其是边缘易残存凝胶的地方要清洗干净，用自来水冲洗干净后，再用双蒸水冲洗一遍，注意双手不要触碰玻璃板的正反面，应拿在玻璃板的边缘位置。

3) 组装玻璃板，检查胶板夹上是否有残留的凝胶，应清洗干净。沿着边缘加入双蒸水，静置 10 分钟，观察是否有漏液。

4) 根据分离胶的浓度按顺序加入相应体积的双蒸水、30% Acr-Bis(29:1)、1 M Tris, pH8.8、10% SDS 和 10%过硫酸铵、TEMED，后面两种试剂可促进凝固，因此加入后迅速拧紧瓶盖，上下轻轻颠倒几次混匀，然后用 1 ml 的移液枪吹打几下，沿着玻璃板的一角慢慢加入凝胶液体，注意不要有气泡产生。

5) 最后缓慢滴入 1 ml 75%的乙醇封胶，边滴加边移动。室温静置半个小时以上。

6) 轻轻倾斜玻璃板，观察分离胶是否凝固。凝固后缓慢倒出上层封胶的乙醇，倾斜晾干后，配制上层的浓缩胶。每块胶加入 3 ml 浓酸胶，依次在离心管中加入蒸馏水 2.1 ml, 30% Acr-Bis(29:1) 0.5 ml、1 M Tris, pH8.8 0.38 ml、10% SDS 0.03 ml、10%过硫酸铵 0.03 ml 和 TEMED 0.003 ml。迅速吹打混匀后，用 1ml 移液枪沿着玻璃板的一角缓慢加至玻璃板顶部，插入 10 孔或者 15 孔的梳子，最后用浓缩胶液体补齐，室温静置半个小时以上。

7) 将凝胶组装到电泳槽中，注意卡住红色塑料胶条，防止漏液。向玻璃板间的内池中注满新的电泳缓冲液，外面可使用回收的电泳缓冲液至玻璃板的一半，如果内池中电泳缓冲液漏液，那么重新加满，并将外池中也加满电泳缓冲液。双手均匀用力缓慢将梳子拔出，尽量不要拔歪。

8) 将蛋白样品提前从-20 度冰箱中取出融化至室温，轻弹管壁混匀样品后，放置在微型离心机中微离。用 10 μ l 移液枪缓慢将蛋白样品和 marker 加入加样孔中，不要吐出气泡。边缘孔可加入 1 $\times$ 的 loading buffer 压胶。15 孔 1.5 mm 胶的单孔最大上样量为 20 μ l，10 孔 1.5 mm 胶的单孔最大上样量为 40 μ l。

9) 接通电源，注意正负极不要搞混了。根据样品中溴酚蓝指示蛋白样品电泳的

位置，在浓缩胶中电泳的电压调至 60-80V，使蛋白样品缓慢浓缩到基线位置；在分离胶中电泳的电压调至 110-120V。当溴酚蓝刚刚跑出凝胶底部时，即可终止电泳。

10) 电泳结束后，关掉电源，打开盖子，将胶板取出，放置在转膜液中暂放。

11) 组装转膜三明治，提前准备好 6 张滤纸、2 张海绵、一张 PVDF 膜，PVDF 膜大小与凝胶大小一致，可稍微大一点，海绵、滤纸与转移夹大小类似即可。将配制好的转膜液放在 4 度冰箱预冷。注意在准备滤纸和 PVDF 膜时要带干净的手套操作，以免外在蛋白污染滤纸和膜。

12) 将转移夹黑色面向下，按顺序放置一张海绵、3 张滤纸、凝胶、PVDF 膜、3 张滤纸、一张海绵，确保没有气泡产生，尤其是在凝胶和 PVDF 膜之间不能产生气泡，否则蛋白会无法转移过去。PVDF 膜在使用前要先浸泡在无水乙醇中激活上面的正电集团，以便与带负电荷的蛋白相结合，激活后浸泡在转膜液中平衡数分钟。凝胶要小心的撬开玻璃板后取出，根据目的蛋白的范围进行切割。

13) 将三明治小心移入提前放置在冰浴中的电泳槽中，注意黑面（负极）对黑面。加满预冷的电泳液，放入内置的冰盒。连接好电源后，调节转膜电压为 100V，转膜时间一般是根据目的蛋白的分子量进行调节，1KD 转膜 1 分钟恒压电转。

14) 转膜结束后，将转膜夹取出，用镊子小心夹出 PVDF 膜，浸泡在 TBST 溶液中，摇床上清洗数分钟。注意区分正反面，与凝胶接触的一面为正面，正面向上放置。

15) 配制 5% 的脱脂牛奶用来封闭背景蛋白，将 PVDF 膜转移至封闭液中，室温摇床封闭 1 小时。

16) 封闭完成后，将 5% 的脱脂牛奶进行回收，将 PVDF 膜浸泡在 TBST 溶液中，室温摇床清洗 3 次，每次 5 分钟。

17) 配制一抗，按照说明书上各个抗体推荐的稀释比例，用碧云天的一抗稀释液进行抗体稀释，将目的蛋白的条带按照 marker 指示的部位进行裁剪，放置在自制的抗体孵育盒中，用移液枪小心地将配制好的一抗滴加在 PVDF 膜上，通过表面张力固定在膜上孵育，盖好盖子，室温孵育 1.5 小时或者 4 度孵育过夜。

18) 一抗回收，4 度存放。PVDF 膜浸泡在 TBST 溶液中，室温摇床清洗 3 次，

每次 5 分钟。

19) 根据一抗的抗性, 用碧云天的二抗稀释液配制二抗, 室温下孵育 40-60 分钟。

之后在 TBST 溶液中, 室温摇床清洗 3 次, 每次 5 分钟。

20) 在暗室的环境下, PVDF 膜放置在显色板上, 将按照 1: 1 比例配制的显色液混合均匀后滴加在 PVDF 膜上, 反应 1-2 分钟后进行显色反应, 保存图片。

21) 统计分析数据。

2.2.16 免疫荧光染色

1) 将处理好的处在对数生长期的细胞消化离心、计数后, 将细胞种植在 24 孔板中, “8”字或者“十”字法混匀细胞, 放置在 37 度培养箱中进行细胞培养。

2) 第二天弃去培养基, 每孔加入 500 μl 的 PBS 缓冲液清洗残留的培养基, 之后每孔加入 200 μl 4%的多聚甲醛室温固定 15 分钟。

3) 弃去多聚甲醛, 每孔加入 200 μl 的 0.1 %的 Triton X-100 室温孵育 10 分钟进行细胞破膜。

4) 之后用 1 %的 BSA 封闭液室温封闭 1 小时。

5) 按照相应的推荐稀释比例配制一抗, 每孔加入 100 μl 一抗 4 度过夜或者室温孵育 2 个小时。

6) PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 分钟。

7) 每孔加入 100 μl 二抗, 避光室温孵育 1 小时。

8) PBS 缓冲液清洗 3 遍, 每次 5 分钟。DAPI 染核 2 分钟, PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 分钟。

9) 每孔滴一滴抗淬灭剂, 放置在荧光倒置显微镜或者激光共聚焦显微镜下进行观察拍照, 相应通道的荧光照片拍一张, 后期进行 merge 比较。

2.2.17 免疫组化染色

免疫组化是根据抗原和抗体特异性结合的原理, 通过化学反应使标记抗体的显色剂进行显色, 来观察组织、细胞内抗原的位置和含量, 对其进行定位、定性及相对定量研究的一门技术。

1) 石蜡切片。将标本修减成 1mm³ 大小的组织块, 用 4 %的多聚甲醛浸泡室温 2 小时以上, 或者 4 度浸泡过夜。

- 2) 70 %、80 %、90 %、95 %、100 %的酒精梯度脱水，二甲苯浸泡 20 分钟后，浸泡在石蜡中 2 小时包埋。
- 3) 将石蜡块固定在切片机的载物台上，调节切片厚度，手摇切片，贴片备用。
- 4) 石蜡脱水，将切片放入 60 度烘箱中 30 分钟，然后依次放置在 3 瓶二甲苯中各 10 分钟，100 %酒精放置 10 分钟，更换新的 100 %酒精放置 5 分钟，然后依次放置在 95 %、90 %、80 %的酒精中 5 分钟，之后用 PBS 缓冲液清洗 3 次，每次 5 分钟。
- 5) 将切片放置在 0.3 %的甲醇-双氧水溶液中，室温浸泡 20 分钟，PBS 缓冲液清洗 3 次，每次 5 分钟。
- 6) 将切片浸泡在柠檬酸钠缓冲液中，微波煮沸 4 次，自然冷却半小时后再用冷水冷却至室温。
- 7) 血清封闭半小时。
- 8) 按照推荐的稀释比例配制一抗，疏水笔画圈，滴加抗体至切片上，室温孵育 2 小时或者 4 度孵育过夜，PBS 缓冲液清洗 3 次，每次 5 分钟。
- 9) 按照推荐的稀释比例配制二抗，滴加抗体至切片上，室温孵育 1 小时，PBS 缓冲液清洗 3 次，每次 5 分钟。
- 10) 滴加链霉亲和素-过氧化物酶，室温孵育 1 小时，PBS 缓冲液清洗 3 次，每次 5 分钟。
- 11) 将切片浸泡在新鲜配制的 DAB 显色液中，观察显色程度，PBS 冲洗中止显色。
- 12) 苏木素染细胞核，梯度酒精脱水，二甲苯透明。
- 13) 滴一滴中性树胶在切片上，盖玻片沿一边轻轻放置封片，避免气泡产生，37 度烘箱干燥。
- 14) 倒置显微镜观察拍照。
- 15) 结果分析：染色的部位和深浅反映了抗原的位置和表达量。结果判读时需要鉴别特异性和非特异性染色，通过抗原分布的位置和着色特点进行区分。判读的标准需要严格设定，经由两名经验丰富的高年资病理科医生进行阅片评分。

2.2.18 BALB/c 裸小鼠移植瘤模型

- 1) 订购 4-6 周的雄性 BALB/c 裸小鼠，在动物房中饲养 1 周使其适应环境。
- 2) 将处理好的处在对数生长期的细胞进行消化离心，PBS 缓冲液洗一遍。
- 3) 细胞计数后用 PBS 缓冲液进行重悬，使细胞浓度保持在 10^6 个/ $100\ \mu\text{l}$ ，冰上保存。
- 4) 抓取固定好裸小鼠，用 1 ml 注射器抽取细胞悬液，沿着裸小鼠右侧肋弓处进针至腋下，将细胞悬液缓慢打出，撤出针头，用棉棒轻轻按压注射位置，防止细胞悬液沿着针道流出。
- 6) 之后每周观察裸小鼠皮下瘤生长情况并进行测量记录。按照肿瘤容积 = $4\pi/3 \times (\text{宽度}/2)^2 \times (\text{长度}/2)$ 的公式进行计算，并绘制肿瘤生长曲线。
- 7) 待到肿瘤的长径达到 2 厘米后，观察两组之间的肿瘤生长出现差异，即可处死裸小鼠，进行拍照。将肿瘤完整剥离下来后，两组肿瘤放在一起进行拍照，然后将瘤体进行称重，记录下来并进行统计。然后将肿瘤浸泡在 4% 的多聚甲醛中，石蜡包埋后进行染色。

2.2.19 裸小鼠肝转移模型

- 1) 订购 4-6 周的雄性 BALB/c 裸小鼠，在动物房中饲养 1 周使其适应环境。
- 2) 将处理好的处在对数生长期的细胞进行消化离心，PBS 缓冲液洗一遍。
- 3) 细胞计数后用 PBS 缓冲液进行重悬，使细胞浓度保持在 10^6 个/ $100\ \mu\text{l}$ ，冰上保存。
- 4) 抓取固定好裸小鼠，用 1 ml 注射器抽取 3 % 的戊巴比妥钠，从左下腹 45 度进针，回抽无血，即可将麻醉药打入。等待数分钟后，用镊子夹裸小鼠四肢根部，裸小鼠无反应即麻醉成功。
- 5) 将麻醉好的裸小鼠固定在塑料泡沫板上，用酒精棉球消毒腹部皮肤，在左上腹近腋中线处剪开皮肤、腹膜，用眼科镊轻轻地将脾脏夹出来，棉棒固定脾脏下端尽量将脾脏拉出多一点。
- 6) 将冰浴的细胞悬液用 1 ml 移液器轻轻吹打混匀，用胰岛素针管抽取 $100\ \mu\text{l}$ 细胞悬液，从脾脏下端平行进针到达脾脏上端，缓慢打进去，拔出针头，用棉棒按压针眼处 2 分钟，使细胞悬液随着脾静脉回流入肝脏。
- 7) 依次结扎脾脏动静脉，剪断脾脏，缝合腹膜和皮肤。将裸小鼠轻柔地放进笼

位里，明日观察裸鼠情况。

8) 每周观察裸小鼠腹部大小，直到腹部变大，有明显腹水形成时，处死裸小鼠，将肝脏取出，两组放在一起观察拍照。然后将肝脏浸泡在 4 %多聚甲醛溶液中，进行石蜡包埋后切片做免疫组化染色。

2.3 统计学分析

所有实验数据使用 SPSS19.0 进行统计学处理。所有实验都进行了三次独立重复。每组数据采用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示，两组均值比较采用独立 t 检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 表示具差异具有统计学上的显著性意义。

3. 实验结果

3.1 miR-30a-5p 在胆囊癌细胞系中的表达

在第一部分中，我们发现 miR-30a-5p 在胆囊癌组织中的表达相较癌旁组织中表达较低，临床病理资料分析发现低表达 miR-30a-5p 的胆囊癌患者具有更大的肿瘤直径和更高的淋巴结转移率。预后分析发现低表达 miR-30a-5p 的胆囊癌患者的 DFS 和 OS 更差，差异具有统计学上的显著性意义。然后我们在胆囊癌细胞系中检测了 miR-30a-5p 的表达水平。如图 2-1 所示，miR-30a-5p 在五种胆囊癌细胞中的表达水平有高有低，与临床病理资料分析中的淋巴结转移率相一致的是 miR-30a-5p 在迁移能力较强的 NOZ 细胞系中表达水平最低，而在迁移能力较弱的 GBC-SD 和 SGC-996 细胞系中的表达水平较高。

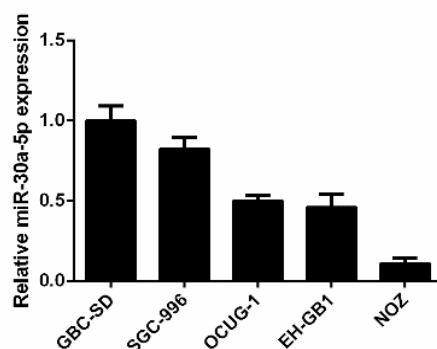


图 2-1 qRT-PCR 检测 miR-30a-5p 在五株胆囊癌细胞系中的表达

Figure 2-1 miR-30a-5p expression levels in five GBC cell lines were analysed by qRT-PCR

3.2 miR-30a-5p mimics 与 miR-30a-5p inhibitor 在胆囊癌细胞系中转染效率的验证

根据miR-30a-5p在胆囊癌细胞系中的表达情况,结合细胞系本身的特点,选择GBC-SD和NOZ细胞进行miR-30a-5p的敲减和过表达,转染48小时后,qRT-PCR检测敲减和过表达效率。如图2-2,2-3所示,转染miR-30a-5p mimics后,miR-30a-5p过表达倍数可达130-175倍;转染miR-30a-5p inhibitor后,miR-30a-5p敲减效率可达65%-70% (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。说明miR-30a-5p敲减和过表达的效率较高,可进行后续实验研究。

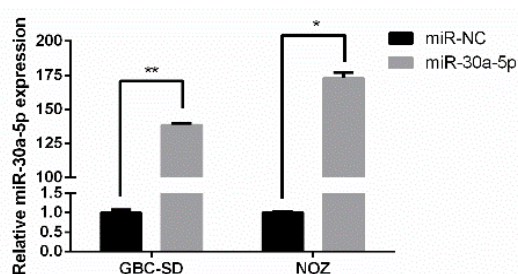


图 2-2 胆囊癌细胞中 miR-30a-5p 的过表达效率 ((* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 2-2 miR-30a-5p overexpression efficiency in GBC-SD and NOZ cells was confirmed by qRT-PCR (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

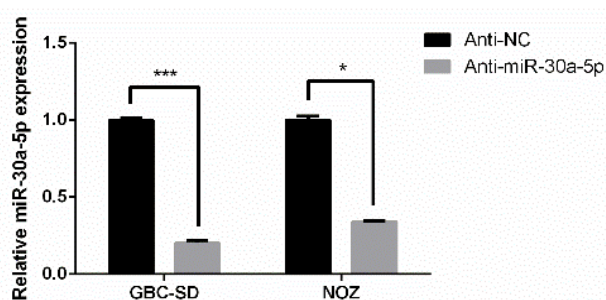


图 2-3 胆囊癌细胞中 miR-30a-5p 的敲减效率 (* $P<0.05$, *** $P<0.001$)

Figure 2-3 miR-30a-5p knockdown efficiency in GBC-SD and NOZ cells was confirmed by qRT-PCR (* $P<0.05$, *** $P<0.001$)

3.3 CCK-8 实验检测 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞增殖能力的影响

在第一部分中,我们分析胆囊癌临床病理资料发现miR-30a-5p的表达水平和肿瘤的大小相关。为进一步研究miR-30a-5p对胆囊癌细胞增殖的影响,我们分别在胆囊癌细胞GBC-SD和NOZ中转染miR-30a-5p inhibitor和mimics,用CCK-8实验检测胆囊癌细胞增殖活力的变化。结果发现:敲减miR-30a-5p后,与对照组相比,两株胆囊癌细胞的增殖能力增强 (** $P<0.01$) (图2-4, 2-5); 而与对照组相比,过表达miR-30a-5p后胆囊癌细胞的增殖受到明显抑制 (** $P<0.01$, *** $P<0.001$) (图2-6, 2-7)。

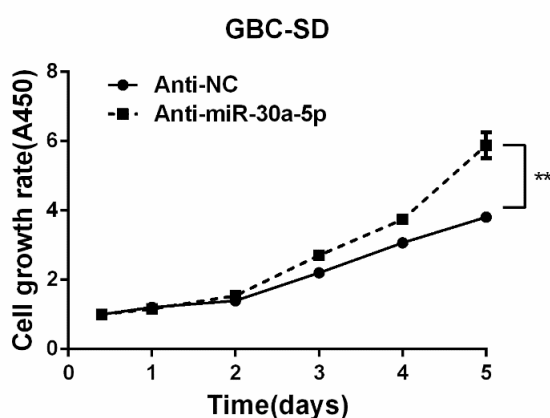


图2-4 敲减miR-30a-5p后对GBC-SD细胞增殖能力的影响 (** $P<0.01$)

Figure 2-4 Cell proliferation ability was assessed in GBC-SD cells infected with miR-30a-5p inhibitors or negative control miRNA inhibitors (** $P<0.01$)

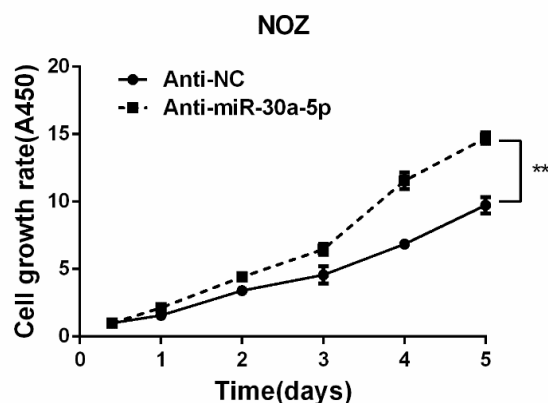


图2-5 敲减miR-30a-5p后对NOZ细胞增殖能力的影响 (** $P<0.01$)

Figure 2-5 Cell proliferation ability was assessed in NOZ cells infected with miR-30a-5p inhibitors or negative control miRNA inhibitors (** $P<0.01$)

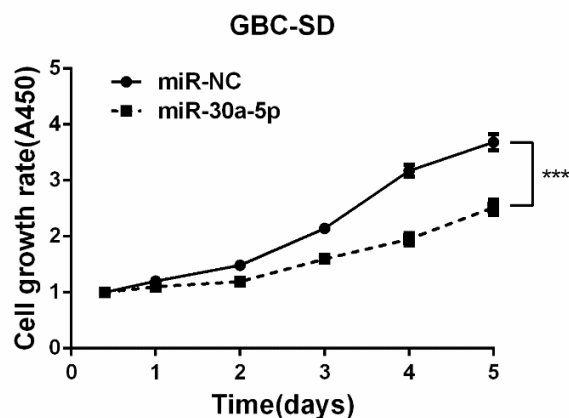


图2-6 过表达miR-30a-5p后对GBC-SD细胞增殖能力的影响 (**P<0.001)

Figure 2-6 Cell proliferation ability was assessed in GBC-SD cells infected with miR-30a-5p mimics or negative control miRNA mimics (**P<0.001)

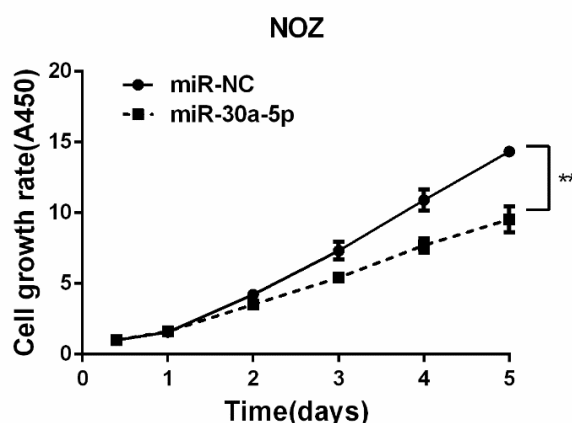


图2-7 过表达miR-30a-5p后对NOZ细胞增殖能力的影响 (**P<0.01)

Figure 2-7 Cell proliferation ability was assessed in NOZ cells infected with miR-30a-5p mimics or negative control miRNA mimics (**P<0.01)

3.4 miR-30a-5p 调控胆囊癌细胞平板克隆形成能力的研究

为了进一步研究miR-30a-5p对胆囊癌细胞增殖能力的影响,我们将过表达和敲减miR-30a-5p的胆囊癌细胞进行克隆铺板,培养10-14天后,观察单个细胞克隆形成的能力。结果发现:敲减miR-30a-5p的GBC-SD和NOZ细胞的克隆形成能力增强 (**P<0.01) (图2-8),而上调miR-30a-5p表达的胆囊癌细胞形成的克隆明显减少 (**P<0.01) (图2-9)。说明miR-30a-5p在体外可以抑制胆囊癌细胞的增殖能力。

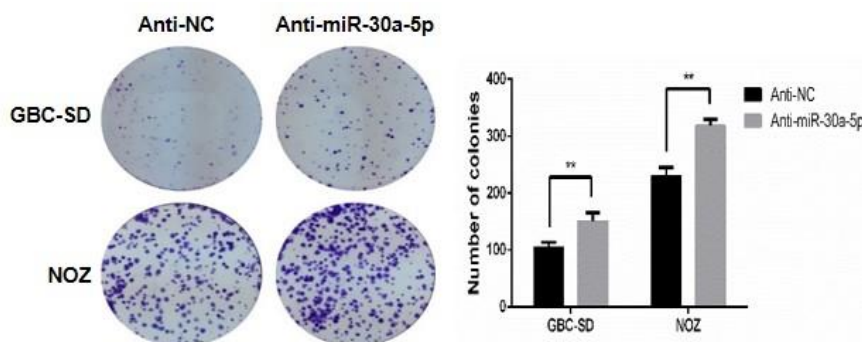


图 2-8 miR-30a-5p inhibitor 对胆囊癌细胞平板克隆形成能力的影响 (** $P<0.01$)

Figure 2-8 Representative results of the colony formation assay in which specific cell lines were treated with anti-NC and anti-miR-30a-5p (** $P<0.01$)

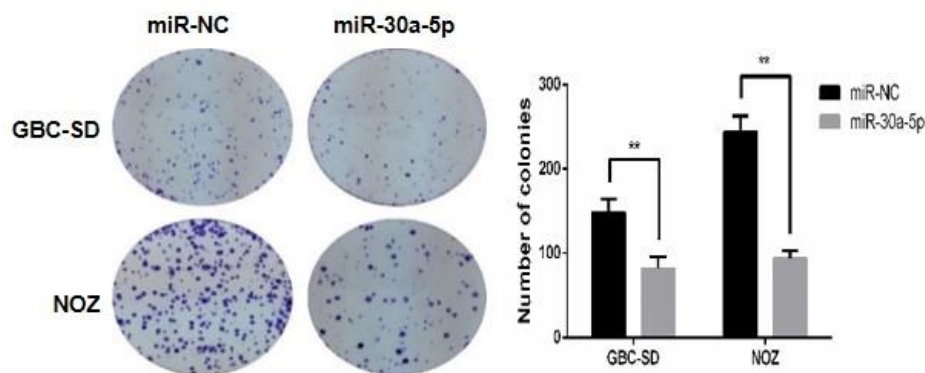


图 2-9 miR-30a-5p mimics 对胆囊癌细胞平板克隆形成能力的影响 (** $P<0.01$)

Figure 2-9 Representative results of the colony formation assay in which specific cell lines were treated with miR-NC and miR-30a-5p (** $P<0.01$)

3.5 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞凋亡的影响

由前可知, miR-30a-5p能够抑制胆囊癌细胞体外增殖的能力, 那么它究竟是通过什么机制来抑制胆囊癌细胞的增殖呢? 我们进一步检测了miR-30a-5p对细胞凋亡的影响。GBC-SD和NOZ细胞转染miR-30a-5p mimics 48小时后, 流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。如图2-10, 与对照组相比, GBC-SD细胞第二象限和第四象限凋亡细胞所占的比例为8.3 vs. 6.6%; NOZ细胞第二象限和第四象限凋亡细胞所占的比例为2.2 vs. 1.7%, 两组之间无明显差异, 提示miR-30a-5p对胆囊癌细胞增殖的抑制可能与细胞凋亡无关。

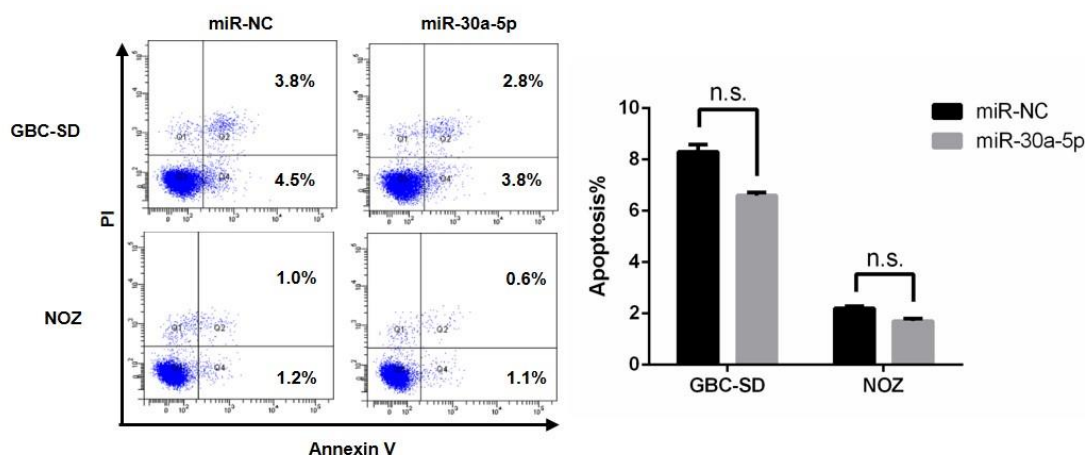


图2-10 miR-30a-5p对胆囊癌细胞凋亡的影响

Figure 2-10 The indicated cells stained with Annexin V and PI were analysed by flow cytometry

3.6 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞周期的影响

为了研究miR-30a-5p抑制胆囊癌细胞增殖的潜在机制，我们将转染miR-30a-5p的GBC-SD和NOZ细胞处理48小时后，流式细胞仪检测胆囊癌细胞周期的变化。如图2-11所示，与对照组相比，过表达miR-30a-5p的胆囊癌细胞处于G0/G1期的比例明显增多，G2/M期的细胞减少，出现了细胞G1/S期阻滞。提示miR-30a-5p对胆囊癌细胞增殖的抑制可能是通过细胞周期的影响起作用的。

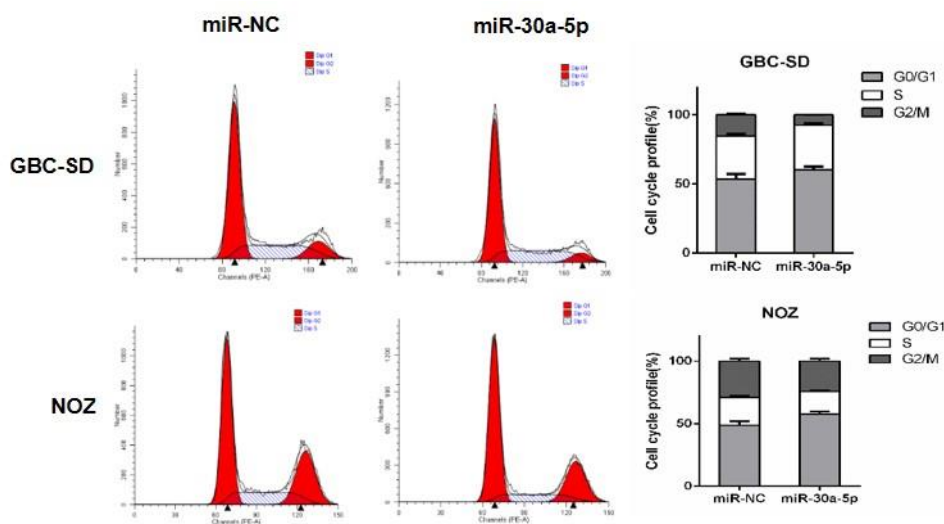


图 2-11 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞周期的影响

Figure 2-11 Representative results of the cell cycle analysis in which specific cell lines were treated with miR-NC and miR-30a-5p

3.7 miR-30a-5p 体内影响胆囊癌细胞成瘤性的研究

体外实验表明 miR-30a-5p 可以通过调控细胞周期来抑制胆囊癌细胞的增殖，

接下来探究 miR-30a-5p 在体内对细胞增殖的影响。将稳定过表达 miR-NC 和 miR-30a-5p mimics 的 NOZ 细胞消化离心、计数后，冰浴放置，注射到裸小鼠右侧上肢的皮下，观察肿瘤的生长情况。结果发现：过表达 miR-30a-5p 的 NOZ 细胞的皮下成瘤能力显著低于对照组的胆囊癌细胞，绘制肿瘤生长曲线可见 miR-30a-5p 过表达组的裸小鼠皮下瘤生长显著低于对照组，且差异具有统计学上的显著性意义 ($*P<0.05$)；皮下瘤剥离后称重测量，可见 miR-30a-5p 过表达组的裸小鼠皮下瘤的瘤重显著低于对照组，且差异具有统计学上的显著性意义 ($*P<0.05$) (图 2-12)。之后将皮下瘤固定、包埋、切片后，选择经典的增殖相关的蛋白 Ki-67 和 PCNA 进行免疫组化染色，如图 2-13 所示，与对照组相比，miR-30a-5p 过表达组的 Ki-67 和 PCNA 表达水平明显下调。综上所述，miR-30a-5p 可在体内抑制胆囊癌细胞的成瘤性。

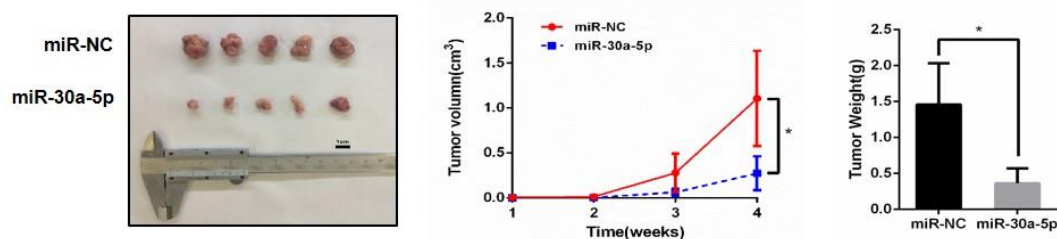


图 2-12 过表达 miR-30a-5p 体内抑制胆囊癌细胞的增殖 ($*P<0.05$)

Figure 2-12 Overexpression of miR-30a-5p inhibits gallbladder cancer cell proliferation ($*P<0.05$).

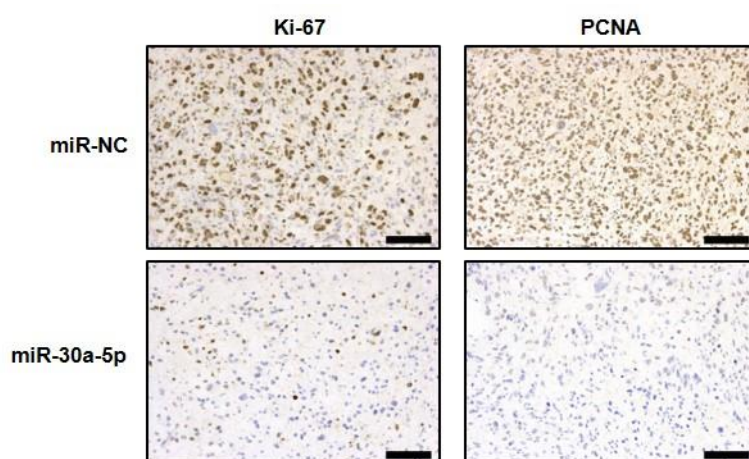


图 2-13 皮下瘤标本的 Ki-67 和 PCNA 的免疫组化染色

Figure 2-13 Immunohistochemical staining for Ki-67 and PCNA in tumour specimens from local tumour tissues, Scale bar=100 μ m.

3.8 Transwell 实验分析 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞的侵袭和迁移的影响

第一部分研究中,我们分析了miR-30a-5p的表达和胆囊癌患者临床病理参数之间的关系,发现miR-30a-5p低表达的患者具有更高的淋巴结转移率。接下来我们在细胞水平检测miR-30a-5p对胆囊癌细胞迁移的影响。在胆囊癌细胞系GBC-SD和NOZ中敲减、过表达miR-30a-5p,48小时后将细胞消化计数,均匀铺在Transwell小室中,培养14-18小时后进行固定、染色。结果显示:与对照组相比,敲减miR-30a-5p的胆囊癌细胞穿过有胶和无胶小室的数目更多,而过表达miR-30a-5p组穿过小室的细胞数目明显减少,差异具有统计学上的显著性意义(* $P<0.05$,** $P<0.01$) (图2-14)。说明miR-30a-5p可以抑制胆囊癌细胞的侵袭和迁移能力。

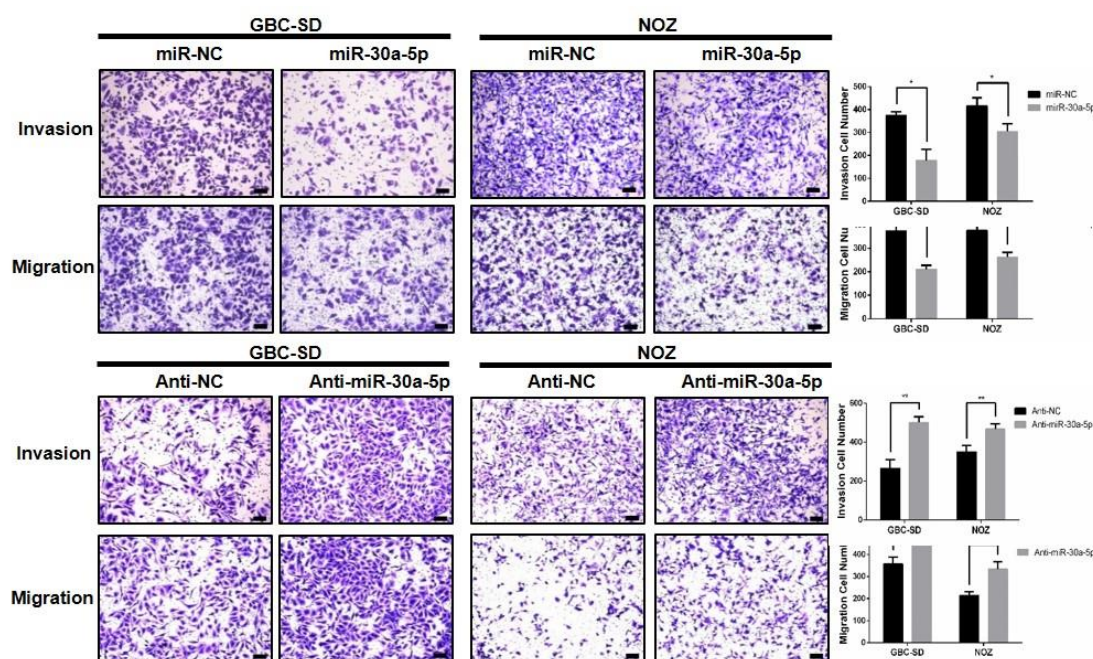


图 2-14 Transwell 实验检测 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞侵袭和迁移的影响(* $P<0.05$,** $P<0.01$)

Figure 2-14 Cell invasion and migration were assessed in GBC cells in which miR-30a-5p was inhibited or overexpressed, Scale bar=100 μm (* $P<0.05$,** $P<0.01$)

3.9 划痕实验检测 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞的迁移的影响

划痕实验反应了贴壁生长的肿瘤细胞运动迁移的能力。在胆囊癌细胞GBC-SD和NOZ中转染miR-30a-5p mimics和miR-30a-5p inhibitor,通过划痕实验检测miR-30a-5p对胆囊癌细胞迁移的影响。如图2-15所示,下调miR-30a-5p

表达的胆囊癌细胞的迁移能力比对照组明显增强,细胞移动的距离较长,而上调 miR-30a-5p 表达的胆囊癌细胞的迁移能力比对照组明显减弱,细胞移动的距离较短,差异具有统计学上的显著性意义 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

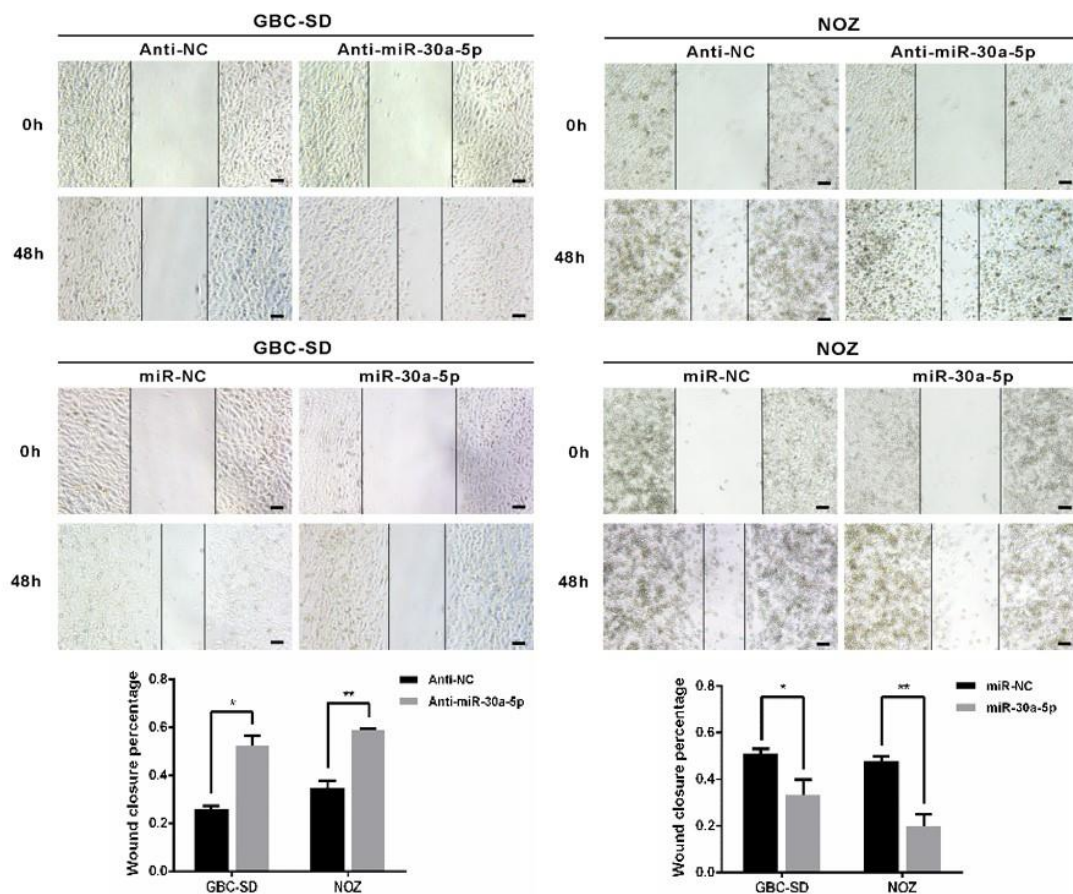


图 2-15 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞划痕的影响 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 2-15 Percentage of cells that passed through the membrane and wound closure percentage,

Scale bar=100 μm (* $P<0.05$,** $P<0.01$)

3.10 miR-30a-5p 影响胆囊癌细胞的 EMT

前期实验得出 miR-30a-5p 可以体外抑制胆囊癌细胞的侵袭和迁移,而 EMT 在多种肿瘤中参与了细胞侵袭、迁移的调控,因此我们接下来检测了 miR-30a-5p 敲减和过表达后胆囊癌细胞 EMT 相关蛋白的表达变化。Western blot 实验检测了 GBC-SD 和 NOZ 细胞敲减和过表达后 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达,结果显示,敲减 miR-30a-5p 后,上皮相关标志蛋白 E-cadherin 表达下调,间质相关标志蛋白 Vimentin 表达上调;而过表达 miR-30a-5p 后,上皮相关标志蛋白 E-cadherin 表达上调,间质相关标志蛋白 Vimentin 表达下调(图 2-16)。免疫荧光实验结果显示敲减 miR-30a-5p 后,上皮相关标志蛋白 E-cadherin 荧光减弱,

间质相关标志蛋白 Vimentin 荧光增强；而过表达 miR-30a-5p 后，上皮相关标志蛋白 E-cadherin 荧光增强，间质相关标志蛋白 Vimentin 荧光减弱（图 2-17）。

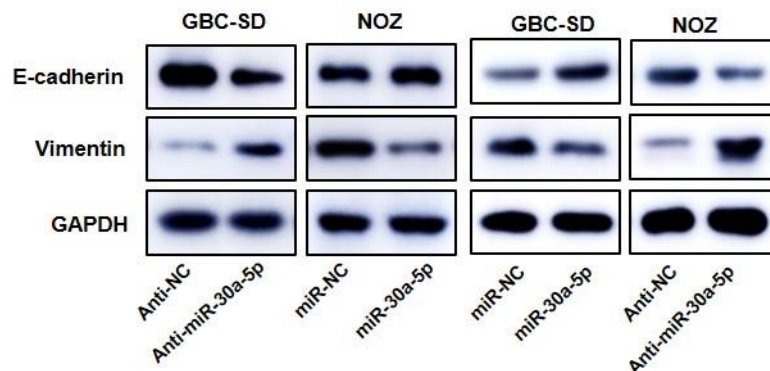


图 2-16 蛋白免疫印迹法检测 miR-30a-5p 敲减和过表达对 E-cadherin 和 Vimentin 表达水平的影响

Figure 2-16 E-cadherin and vimentin protein expression levels in the indicated cells were examined by western blot

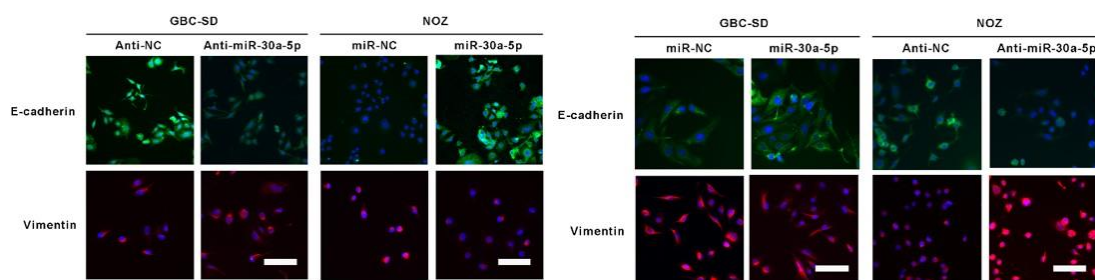


图 2-17 免疫荧光法检测 miR-30a-5p 敲减和过表达对 E-cadherin 和 Vimentin 表达水平的影响

Figure 2-17 E-cadherin and vimentin protein expression levels in the indicated cells were examined by immunofluorescence, Scale bar=100 μm

3.11 miR-30a-5p 影响胆囊癌细胞的 β -catenin 转位

miR-30a-5p 可以通过抑制 EMT 过程来影响胆囊癌细胞的侵袭、迁移能力。E-cadherin 作为 EMT 的重要成员，对 β -catenin 在胞膜上的稳定存在起着关键作用^[47]，E-cadherin 下调会导致 β -catenin 由细胞膜向细胞核移位，在细胞核内发挥激活 Wnt/ β -catenin 通路的作用。分别在 GBC-SD 和 NOZ 细胞中敲减和过表达 miR-30a-5p 后，分开提取细胞质和细胞核的蛋白，以 β -actin 和 Histone H1 分别作为细胞质和细胞核的内参，Western blot 实验检测 β -catenin 在细胞质和细胞核的表达水平的变化。如图 2-18 所示，敲减 miR-30a-5p 后， β -catenin 在细胞质中表达下调，在细胞核中表达上调，促进了 β -catenin 向细胞核转位。过表达

miR-30a-5p 后, β -catenin 在细胞质中表达上调, 在细胞核中表达下调, 抑制了 β -catenin 向细胞核转位。以上结果说明 miR-30a-5p 可通过调节 EMT 抑制胆囊癌细胞的侵袭、迁移, 而且可以促进 β -catenin 的细胞核转位。

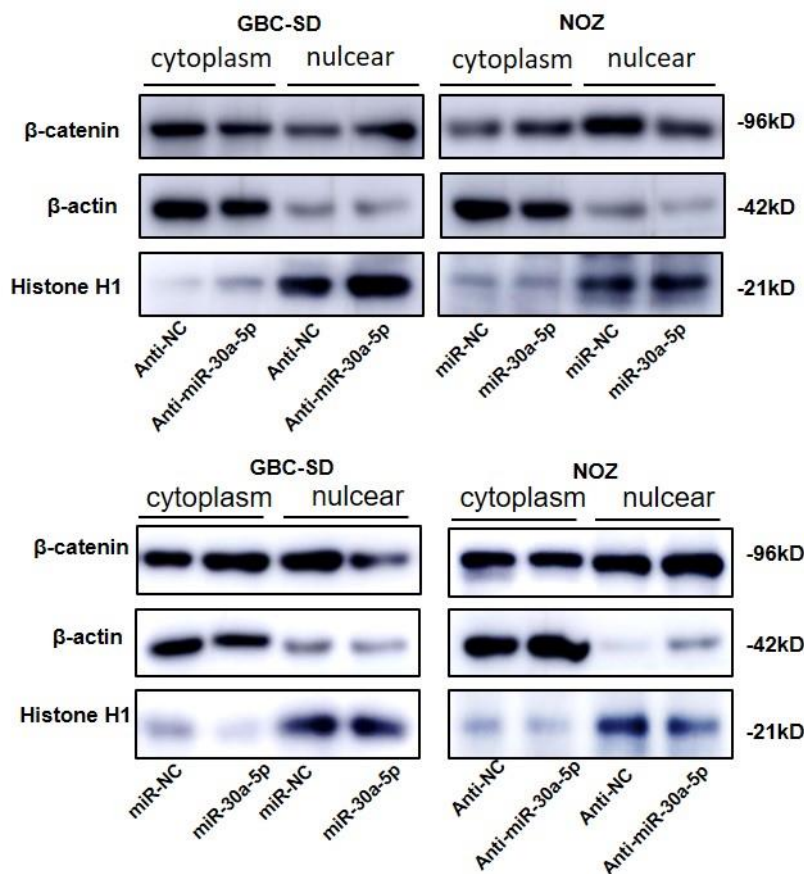


图 2-18 miR-30a-5p 敲减和过表达对 β -catenin 转位的影响

Figure 2-18 Subcellular β -catenin expression in indicated cells was detected by western blotting, β -actin and Histone H1 were used as a loading control

3.12 miR-30a-5p 体内抑制胆囊癌细胞的转移

体外实验提示我们 miR-30a-5p 可通过调节 EMT 抑制胆囊癌细胞的侵袭、迁移, 接下来在裸小鼠体内研究 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞转移的影响。将稳定过表达 miR-30a-5p 的胆囊癌细胞系 NOZ 消化计数后, 冰浴放置, 将细胞注射到裸小鼠的脾脏, 2 分钟后结扎脾动静脉, 切掉脾脏, 缝合伤口, 1-2 月后观察胆囊癌细胞肝转移的情况。如图 2-19 所示, 与对照组相比, miR-30a-5p 过表达组的裸小鼠肝脏肿瘤转移数量明显减少, 差异具有统计学上的显著性意义 (** $P < 0.01$)。将裸小鼠肝脏固定、包埋、切片后, 选取 EMT 相关的抗体进行免疫组化染色, 结果发现过表达 miR-30a-5p 的裸小鼠肝脏转移瘤中上皮相关的标志蛋白

E-cadherin 表达明显增加, 而间质相关的标志蛋白 N-cadherin、Vimentin 表达明显减少 (图 2-20)。说明 miR-30a-5p 可在体内通过调控 EMT 的进程来抑制胆囊癌细胞的转移。

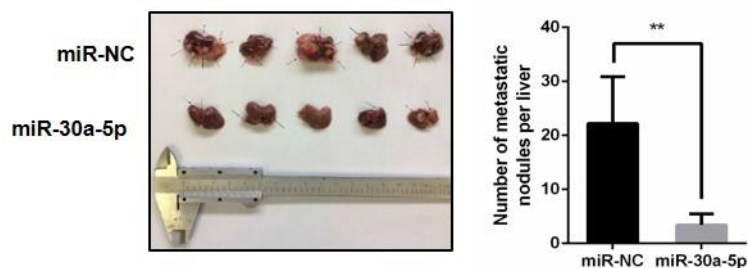


图 2-19 miR-30a-5p 过表达的胆囊癌细胞 NOZ 注射到裸鼠脾脏建立的肝转移模型 (** $P < 0.01$)

Figure 2-19 Representative example of liver metastases at 4 weeks after NOZ cells overexpressing miR-30a-5p were injected into the spleens of mice (** $P < 0.01$)

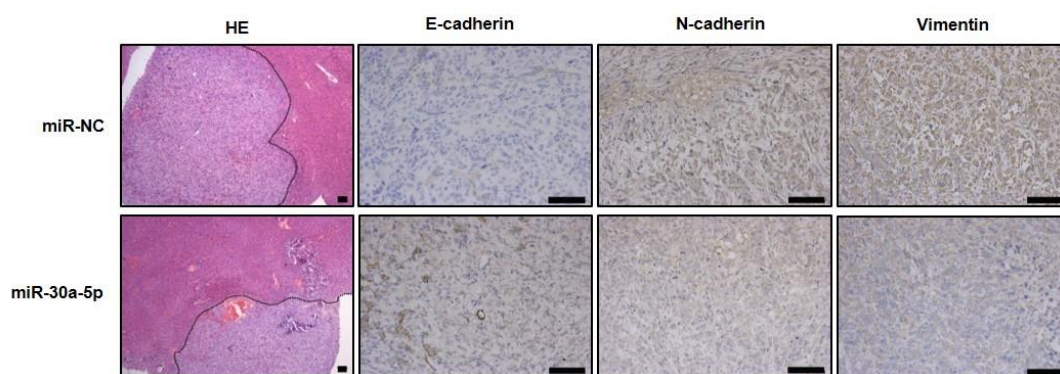


图 2-20 IHC 检测 miR-30a-5p 过表达肝脏切片中 E-cadherin, N-cadherin 和 vimentin 的表达

Figure 2-20 E-cadherin, N-cadherin and vimentin expression in the metastatic tumour tissue samples was determined by IHC, Scale bar=100 μ m

4. 讨论

第一部分的研究工作中, 我们通过 qRT-PCR 发现 miR-30a-5p 在 42 例胆囊癌组织中表达相较于癌旁组织明显下调, 分析 42 位胆囊癌患者的临床病理资料, 得出低表达 miR-30a-5p 的胆囊癌患者具有更大的肿瘤直径和更高的淋巴结转移率。由此, 我们猜测 miR-30a-5p 可以在细胞水平和动物水平调控胆囊癌细胞增殖、迁移和转移的能力。已有文献报道, miR-30a-5p 在多种肿瘤中表达下调, 参与调控了乳腺癌、结直肠癌和非小细胞肺癌等肿瘤细胞的增殖、转移^[48-51]。而有关 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞的调控目前仍未见报道。

我们首先检测了 miR-30a-5p 在五株胆囊癌细胞中的表达水平, 发现在侵袭

能力较强的 NOZ 细胞中, miR-30a-5p 的表达水平最低, 而在侵袭能力较弱的 GBC-SD 和 SGC-996 细胞中, miR-30a-5p 的表达水平较高, 与胆囊癌临床病理特征一致。结合胆囊癌细胞的生物学行为, 我们最终选择了 GBC-SD 和 NOZ 细胞进行后续的研究。首先在这两株细胞中转染 miR-30a-5p mimics 和 inhibitor, 48 小时后 qRT-PCR 检测 miR-30a-5p 的过表达和敲减效率较好, 可用于后续的实验研究。之后通过一系列的体外和体内实验研究, 探讨 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞增殖、转移的影响。CCK-8 实验、平板细胞克隆实验显示 miR-30a-5p 体外抑制胆囊癌细胞的增殖能力。接下来通过细胞凋亡和细胞周期实验, 提示我们 miR-30a-5p 可能通过影响细胞周期来调控胆囊癌细胞的增殖。体内裸小鼠皮下瘤实验证实 miR-30a-5p 可在体内抑制胆囊癌细胞的增殖能力, 并且过表达 miR-30a-5p 的裸小鼠皮下瘤中 Ki-67 和 PCNA 的表达明显下调。之后通过 Transwell 实验和细胞划痕实验检测 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞侵袭和迁移能力的影响, 发现 miR-30a-5p 可在体外抑制胆囊癌细胞的侵袭和迁移, 并且上调上皮相关标志物 E-cadherin 的表达, 下调间质相关标志物 Vimentin 的表达。进一步检测细胞质和细胞核内 β -catenin 的表达, 发现过表达 miR-30a-5p 上调了 β -catenin 在细胞核中的表达水平, 促进了核转位。体内裸小鼠脾脏肝转移模型的建立提示我们 miR-30a-5p 可在体内抑制胆囊癌细胞的转移能力, 并且上皮相关标志物 E-cadherin 的表达上调, 间质相关标志物 N-cadherin 和 Vimentin 的表达下调。

综上所述, miR-30a-5p 在胆囊癌细胞中发挥抑癌作用, 可通过调节细胞周期抑制胆囊癌细胞的增殖, 调控 EMT 和 β -catenin 的分布抑制胆囊癌细胞的侵袭和迁移。

5. 小结

- 1、体外和体内实验证实 miR-30a-5p 可以抑制胆囊癌细胞的增殖、侵袭和迁移;
- 2、miR-30a-5p 可能通过影响细胞周期来抑制胆囊癌细胞的增殖;
- 3、miR-30a-5p 可能通过影响 EMT 过程来抑制胆囊癌细胞的侵袭和迁移;
- 4、miR-30a-5p 可调控 β -catenin 的核转位来抑制 EMT 过程。

第三部分

miR-30a-5p 通过调控 E2F7 影响胆囊癌细胞的增殖转移

1. 引言

通过前两部分的研究,我们已经得知 miR-30a-5p 在胆囊癌组织中的表达相较于癌旁组织表达下调,并且分析胆囊癌患者的临床病理资料和预后发现 miR-30a-5p 的表达和肿瘤大小及淋巴结转移率呈负相关,低表达 miR-30a-5p 的胆囊癌患者的无病生存率和总生存率更差。之后在胆囊癌细胞系中敲减和过表达 miR-30a-5p,通过一系列的体外和体内实验,发现 miR-30a-5p 在胆囊癌中起到抑癌作用,可以通过调控细胞周期的变化来抑制胆囊癌细胞的增殖,同时 miR-30a-5p 也可以抑制胆囊癌细胞的侵袭和迁移。EMT 作为肿瘤发生发展和侵袭转移的重要步骤,我们检测了敲减和过表达 miR-30a-5p 后 EMT 相关标志物的变化,发现 miR-30a-5p 可以上调上皮相关标志物 E-cadherin 的表达,下调间质相关标志物 Vimentin 的表达,同时 miR-30a-5p 可以促进 β -catenin 的核转位。

我们知道 miRNAs 作为一种非编码小 RNA 分子,其发挥生物学功能主要是通过调控靶基因的表达来实现的^[52]。它可以和 mRNA 的特定序列结合,调控 mRNA 的降解,同时也可以抑制靶基因蛋白质的翻译过程^[53]。那么 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞增殖、转移的抑制作用是通过影响哪些靶基因的表达来调控的呢?我们在本部分中通过靶基因的网站预测、结合胆囊癌组织的基因芯片和文献调研筛选 miR-30a-5p 的下游靶基因,进行进一步的机制研究。

2. 材料和方法

2.1 主要材料和仪器

2.1.1 主要材料

试剂名称	生产厂家
双荧光素酶报告系统试剂盒	美国 Promega 公司
胰蛋白胨	英国 OXOID 公司

酵母提取物	英国 OXOID 公司
氯化钠	上海翊圣生物科技有限公司
琼脂粉	北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司
DH5 α 感受态细胞	天根生化科技有限公司
甘油	美国 Sigma 公司
无内毒素质粒小提中抽试剂盒	天根生化科技有限公司
E2F7 WT、MUT 质粒	上海龙钱生物科技有限公司
MicroRNA mimics NC	上海拓然生物科技有限公司
miR-30a-5p mimics	上海拓然生物科技有限公司
MicroRNA inhibitor NC	上海拓然生物科技有限公司
miR-30a-5p inhibitors	上海拓然生物科技有限公司
Opti-MEM [®] 培养基	美国 Gibco 公司
Lipo2000 转染试剂	美国 Invitrogen 公司
siRNA NC	上海拓然生物科技有限公司
siE2F7	上海拓然生物科技有限公司
Viafect 转染试剂	美国 Progema 生物技术有限公司
CCK-8 试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I 试剂盒	美国 BD Pharmigen 公司
细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
氯仿	上海润捷化学试剂有限公司
异丙醇	上海润捷化学试剂有限公司
无水乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
Nuclease-Free Water	美国 Ambion 公司
DEPC 水	上海翊圣生物科技有限公司
95%乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
Mir-XTM miRNA First-Strand	宝日医生物技术有限公司

Synthesis Kit

SYBR® Premix Ex Taq™ II RT-PCR 大连 Takara 公司

Kit

TE buffer 生工生物工程股份有限公司

PMSF 碧云天生物技术研究所以

RIPA 碧云天生物技术研究所以

BCA 显色液 碧云天生物技术研究所以

BSA 美国 Sigma 公司

6x loading buffer 碧云天生物技术研究所以

SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒 碧云天生物技术研究所以

75%乙醇 中国常熟市鸿盛精细化工有限公司

预染蛋白 marker 美国 Invitrogen 公司

脱脂奶粉 上海润捷化学试剂有限公司

一抗稀释液 碧云天生物技术研究所以

二抗稀释液 碧云天生物技术研究所以

ECL 发光液 美国 Pierce 公司

兔抗人 GAPDH 美国 Cell Signaling Technology

兔抗人 E-cadherin 美国 Cell Signaling Technology

兔抗人 vimentin 美国 Cell Signaling Technology

Triton X-100 美国 Sigma 公司

Tween 20 上海翊圣生物科技有限公司

20xTBS 上海翊圣生物科技有限公司

2.1.2 主要仪器

仪器名称 生产厂家

细胞冻存管 美国 Corning 公司

液氮罐 成都金凤液氮容器有限公司

细胞培养皿、板 美国 Corning 公司

15ml、50ml 离心管	美国 BD 公司
1.5ml、200 μ l EP 管	美国 Axygen 公司
电热恒温水温箱	上海贺德实验设备有限公司
细胞冻存盒	美国 Nalgene 公司
低速离心机	上海卢湘仪离心机仪器有限公司
生物安全柜	美国 Thermal 公司
二氧化碳恒温培养箱	美国 Thermo Fisher 公司
荧光倒置显微镜	德国 Lecia 公司
血球计数板	上海求精生化试剂仪器有限公司
细胞计数仪	美国 Millpore 公司
垂直层流洁净工作台	上海上净净化设备有限公司
电热恒温干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
NanoDrop2000 超微量分光光度计	美国 Thermo Scientific 公司
光吸收酶标仪	美国 Molecular Devices 公司
轨道摇床	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
阅片灯箱	福建国德医疗科技股份有限公司
Transwell 小室	美国 Corning 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
微型离心机	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司
PCR 仪	杭州博日科技有限公司
-20 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
4 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
-80 度超低温冰箱	日本三洋公司
八连管	美国 genebrick 公司
StepOnePlus™ Real-Time PCR 仪	赛默飞世尔科技有限公司
PVDF 膜	美国 Millpore 公司
化学发光仪	美国 GE 公司

2.2 实验方法

2.2.1 miR-30a-5p 下游靶基因的预测

常用的 miRNA 预测网站有 Targetscan、miranda、Pictar 等，相应的网站 <http://www.targetscan.org/>，<http://www.microrna.org/microrna/home.do>，<http://pictar.mdc-berlin.de/>，选择 Targetscan 这个网站，输入 miR-30a-5p，选择相应物种人的数据库，下载筛选出的靶基因。与实验室现有的 9 对胆囊癌组织和癌旁组织的基因芯片(GEO number: GSE76633)的数据取交集，之后在 Pubmed (PubMed[®], NCBI, Bethesda, MD, USA)上进行文献调研，选择在肿瘤中起到促癌作用的基因作为候选靶基因。

2.2.2 双荧光素酶报告基因实验

2.2.2.1 双荧光素酶质粒的构建

1) NCBI 上检索 E2F7 3'UTR 区的序列如下：

>E2F7-2047 Wild-Type sequence

```
TCCTATGGTGTATTATTTATTTTGTTCCTGAAATGGGATTTAGTGCAAAAAGTTT
ACAACTACAGTCTTTAACACATTTTTTTCAGGGTATGACGACTTGAATGTTT
ATACTTTTATTCTATAATTTGCCCTGCACTTATTTTACAACCTAGTAATAATGT
GGATAAATGTATCTACATGACACATGTCAAGACCAAAATAACTGTGAATGA
CACACCTTGCTGTAAATGAACTGTGCTAACCCTGACTGTGGGCTTGAGAAC
AAAGATGAACTCTAGAACTCTAGCAGCCTAACTGCTGCTTCTCAAATAACT
GTGTGAACAGTGAGATATTACTGTTTGTCTTCTAAAAATCCTACTGTGCCCAG
TTTCCTTCACTACATGCCCTGCATTTTTTTATTTAAATATTTAGCTGTAGCGCCA
TCAGATATGGATGCCTTCTAACAAATTGCTGTTTGTAAAATAAATCAGGATGG
TAGAAAGTGATTATATGGAATAATTGGAACCTGGATGAGACCTTTTCGTTGAA
TTCTGAAGAGTAATGATGTGAAAATTGATACAGGGCAAGAGATGATTCTTTT
GTTTTTCTTCTACTTCATGTCCAGAAGAGTAAGAGGGGAAAATGGACATATGT
TTCATATCCAAGGGTATTCAAACCTGTAGTTAGTTGGTACCTCTGAAAAATGA
GAATGGTGAGCGCACGGGTGGTTGTTCTAGCATGAATACAATTCTGGAAA
CTGTTATGCAATTTCCCTTTTTTAACCCACATTACTTTAGGGGTGCATTAAAGT
CGCCAAACTATACTAGTTCTTTGTATTCTTAGACTTGCTGATATTTACCTCTC
TCTTGCTCTTTCAGAGTAAATGGTTCCCTTCTTTCCCTTCTTCTCCTCTCTTA
AACTATCTTAGATGTAGAATCCTGGTGTAGGGTTTTATTTTATTTTATTTT
TGACCCAATAAAATGTTATATGAAAGAATGAAAATATTAATTTAAGAGACTC
TGGGAGTCTGAATAAAGTAGCTTTATATTAACACTACAGGATAATATTAGCCTTA
TTACCCCCACAAGATTTTTTTAAACTTGAGGTAGGTAGCTACATTAAATAAA
TTTGCTACTTATATAAAAATTTTTATCAACACTAACTTTTAAAGGTTTACAAG
```

TTTTTTTTTCTTTTTTACAGTCTTCTATAGAGTTAGGTTAAAAATGTGGTTC
 TAACCATCAACAATTGCATGGTTAAATGACCCTGAACTAAAACTGATGGGT
 TCCCTATCAAAACAAATAAAAAATATACCTTTTTTCAGGTTTCAATCTGTGCAG
 GGTATATGCATGTTAATTCTACCATGCTTAAGAACTTCCACAAAATATTTTCAT
 GGAGAGGTCTGCATTTAGACGGAAACAGAAATTGCTTTTCCCCTCACTGTT
 CCTGAATGCTCTATACTTGTTTTAACATTTTTTGCTATCTTTTTTTATTATTCTG
 ATCATGATATGACCATTAAACCTCAGAATTCATAATTCCTGAGGGGTGTAA
 GAAGCAGTCCCATTGGTGAGGATATTATGACTTGGTGACCATTCTTAGGAGT
 AGAAAACCAAGGACAATTGCTTCTGTATTTCAGTATCCACTTCTTAATGTGGC
 TTTATATGTAAAAATAATAATGCAGTGGTTGTTTCTGTCAGGAAAATAAATCT
 TACAGAACAACCTGGTGGAATTGAAGCTGCTGCGCTAGACTTGGATATTTTG
 GGTAGTGAAGAAGCAATGGCAATCTTGAGTCTATTATTGTATAATTTAGTAA
 AAGAAAAAATAATCGTTGGTGGTCCTACTAAGAGAATGCAGCTTTTTTGA
 GTTGTACAGAGGCTGTGTGTGCCCTACACTGACCAGGGTTTGTAACCC
 TTTTATTCTGGTACAAGAGTCGGGGGTATAACTTTTATACTTGAATCTACCTA
 CCAA**GTTTACA**TTTCTCAATTCCTTTTTGTAAAGGTGCTATTTCTGTATTAAAT
 AACTTT

绿色部分为网站预测可能与 miR-30a-5p 结合的位点，然后将结合位点分别单个和全部突变，序列如下：

>E2F7-2047 Mut1

TCCTATGGTGTTATTTATTTTGTTCCTGAAATGGGATTTAGTGCAAAAA**cacata**
tACTACAGTCTTTAACACATTTTTTTTCAGGGTATGACGACTTGAATGTTTATA
 CTTTTATTCTATAATTTGCCCTGCACTTATTTTACAACCTAGTAATAATGTGGA
 TAAATGTATCTACATGACACATGTCAAGACCAAATAACTGTGAATGACAC
 ACCTTGCTGTAAATGAACTGTGCTAACCCTGACTGTGGGCTTGAGAACAAA
 GATGAACTCTAGAACTCTAGCAGCCTAACTGCTGCTTCTCAAATAACTGTG
 TGAACAGTGAGATATTACTGTTTGTCTTCTAAAAATCCTACTGTGCCAGTTT
 CCTTCACTACATGCCCTGCATTTTTTTATTAAATATTTAGCTGTAGCGCCATC
 AGATATGGATGCCTTCTAACAATTGCTGTTTGTAATAAATCAGGATGGTA
 GAAAGTGATTATATGGAAAATTGGAACCTGGATGAGACCTTTTCGTTGAATT
 CTGAAGAGTAATGATGTGAAAATTGATACAGGGCAAGAGATGATTCTTTTG
 TTTTTCTTCTACTTTCATGTCCAGAAGAGTAAGAGGGAAAATGGACATATGTT
 TCATATCCAAGGGTATTCAAACCTGTAGTTAGTTGGTACCTCTGAAAAATGAG
 AATGGTGAGCGCACGGGTTGGTTGTTCTAGCATGAATACAATTCTGGAAAC
 TGTTATGCAATTTCCCTTTTTTAACCCACATTACTTTAGGGGTGCATTAAAGTC
 GCCAACTATACTAGTTCTTTGTATTCTTAGACTTGCTGATATTACCTCTCT
 CTTGTCTCTTCAGAGTAAATGGTTCCCTTCTTTCCTTCTACTTTCCCTTCATT
 CTCTCTTCCCTCCCTCCTTCTACTTCTTTTCTTCTTCTTCTTCTCTCTTAA
 AACTATCTTAGATGTAGAATCCTGGTGTAGGGTTTTATTTTATTTTTATTTTTT
 GACCCAATAAAATGTTATATGAAAGAATGAAAATATTAATTTAAGAGACTCT
 GGGAGTCTGAATAAAGTAGCTTTATATTAACCTACAGGATAATATTAGCCTTAT
 TACCCCCACAAGATTTTTTAAACCTTGAGGTAGGTAGCTACATTAAATAAAT

TTGCTACTTATATAAAAATTTTTATCAACACTAACTTTTAAAAGTTTACAAGT
TTTTTTTTTCTTTTTTACAGTCTTCTATAGAGTTAGGTTAAAAATGTGGTTCT
AACCATCAACAATTGCATGGTTAAATGACCCTGAACTAAAACTGATGGGTT
CCCTATCAAAAACAAATAAAAAATATACCTTTTTTCAGGTTTCAATCTGTGCAGG
GTATATGCATGTTAATTCTACCATGCTTAAGAACTTCCACAAAATATTTTCATG
GAGAGGTCTGCATTTAGACGGAAACAGAAATTGCTTTTCCCCTCACTGTTT
CTGAATGCTCTATACTTGTTTTAACATTTTTTGCTATCTTTTTTTATTATTCTGAT
CATGATATGACCATTAAACCTCAGAATTCATAATTCCTGAGGGGTGTTAAGA
AGCAGTCCCATTGGTGAGGATATTATGACTTGGTGACCATTCTTAGGAGTAG
AAAACCAAGGACAATTGCTTCTGTATTCAGTATCCACTTCTTAATGTGGCTT
TATATGTAAAAATAATAATGCAGTGGTTGTTTCTGTCAGGAAAATAAATCTTA
CAGAACAACCTGGTGGAATTGAAGCTGCTGCGCTAGACTTGGATATTTTGGG
TAGTGAAGAAGCAATGGCAATCTTGAGTCTATTATTGTATAATTTAGTAAAA
GAAAAAAATAATCGTTGGTGGTCTACTAAGAGAATGCAGCTTTTTTTGAGT
TGTCACAGAGGCTGTGTGTGCCCTACACTGACCAGGGTTTGTA AACCCCTT
TCATTCTGGTACAAGAGTCGGGGGTATAACTTTTATACTTGAATCTACCTAC
CAAGTTTACAATTTCTCAATTCCTTTTTTGTAAGGTGCTATTTCTGTATTTAAAT
AACTTT

> E2F7-2047 Mut2

TCCTATGGTGTTATTTATTTTGTTCCTGAAATGGGATTTAGTGCAAAAAAGTTT
ACA ACTACAGTCTTTAACACATTTTTTTCAGGGTATGACGACTTGAATGTTT
ATACTTTTATTCTATAATTTGCCCTGCACTTATTTTACAACCTAGTAATAATGT
GGATAAATGTATCTACATGACACATGTCAAGACCAAAAATAACTGTGAATGA
CACACCTTGCTGTAAATGAACTGTGCTAACCCCTGACTGTGGGCTTGAGAAC
AAAGATGAACTCTAGA ACTCTAGCAGCCTAACTGCTGCTTCTCAAATAACT
GTGTGAACAGTGAGATATTACTGTTTGTCTTCTAAAAATCCTACTGTGCCCAG
TTTCCTTCACTACATGCCCTGCATTTTTTTATTTAAATATTTAGCTGTAGCGCCA
TCAGATATGGATGCCTTCTAACAAATTGCTGTTTGTA AAAATAAATCAGGATGG
TAGAAAGTGATTATATGGAAAATTGGAACCTGGATGAGACCTTTTCGTTGAA
TTCTGAAGAGTAATGATGTGAAAATTGATACAGGGCAAGAGATGATTCTTTT
GTTTTTCTTCTACTTCATGTCCAGAAGAGTAAGAGGGGAAAATGGACATATGT
TTCATATCCAAGGGTATTCAA ACTGTAGTTAGTTGGTACCTCTGAAAAATGA
GAATGGTGAGCGCACGGGTGGTTGTTCTAGCATGAATACAATTCTGGAAA
CTGTTATGCAATTTCCCTTTTTTAACCCACATTACTTTAGGGGTGCATTAAGT
CGCCAAACTATACTAGTTCTTTGTATTCCTAGACTTGCTGATATTTACCTCTC
TCTTGCTCTTTCAGAGTAAATGGTTCCCTTCTTTCCTTCCCTACTTTCCCTTCAT
TCTCTCTTCCCTTCCCTCCTTCTACTTCTTTTCTTCCCTTCCCTCTCTCTTA
AACTATCTTAGATGTAGAATCCTGGTGTAGGGTTTTATTTTATTTTATTTTT
TGACCCAATAAAATGTTATATGAAAGAATGAAAATATTAATTTAAGAGACTC
TGGGAGTCTGAATAAAGTAGCTTTATATTA ACTACAGGATAATATTAGCCTTA
TTACCCCCACAAGATTTTTTTAAACTTGAGGTAGGTAGCTACATTAAATAAA
TTTGCTACTTATATAAAAATTTTTATCAACACTAACTTTTAAAACACATATAGTTT

TTTTTTTCTTTTTTACAGTCTTCTATAGAGTTAGGTAAAAATGTGGTTCTAA
CCATCAACAATTGCATGGTTAAATGACCCTGAACTAAAACTGATGGGTTCC
CTATCAAAACAAATAAAAAATATACCTTTTTTCAGGTTTCAATCTGTGCAGGGT
ATATGCATGTTAATTCTACCATGCTTAAGAACTTCCACAAAATATTTTCATGGA
GAGGTCTGCATTTAGACGGAAACAGAAATTGCTTTTCCCCTCACTGTTCCCT
GAATGCTCTATACTTGTTTTAACATTTTTTGCTATCTTTTTTTATTATTCTGATCA
TGATATGACCATTAAACCTCAGAATTCATAATTCCTGAGGGGTGTTAAGAAG
CAGTCCCATTGGTGAGGATATTATGACTTGGTGACCATTCTTAGGAGTAGAA
AACCAAGGACAATTGCTTCTGTATTAGTATCCACTTCTTAATGTGGCTTTAT
ATGTAAAAATAATAATGCAGTGGTTGTTTCTGTCAGGAAAATAAATCTTACA
GAACAACCTGGTGGAATTGAAGCTGCTGCGCTAGACTTGGATATTTTGGGTA
GTGAAGAAGCAATGGCAATCTTGAGTCTATTATTGTATAATTTAGTAAAAGA
AAAAAATAATCGTTGGTGGTCCTACTAAGAGAATGCAGCTTTTTTGAGTTG
TCACAGAGGCTGTGTGTGCCCTACACTGACCAGGGTTTGTA AACCTTTTC
ATTCTGGTACAAGAGTCGGGGGTATAACTTTTATACTTGAATCTACCTACCA
AGTTTACAATTTCTCAATTCCTTTTTGTAAAGGTGCTATTTCTGTATTAAATAA
CTTT

>E2F7-2047 Mut3

TCCTATGGTGTTATTTATTTTGTTCCTGAAATGGGATTTAGTGCAAAAAAGTTT
ACA ACTACAGTCTTTAACACATTTTTTTTCAGGGTATGACGACTTGAATGTTT
ATACTTTTATTCTATAATTTGCCCTGCACTTATTTTACAACCTAGTAATAATGT
GGATAAATGTATCTACATGACACATGTCAAGACCAAATAACTGTGAATGA
CACACCTTGCTGTAAATGAACTGTGCTAACCTGACTGTGGGCTTGAGAAC
AAAGATGAACTCTAGAACTCTAGCAGCCTAACTGCTGCTTCTCAAATAACT
GTGTGAACAGTGAGATATTACTGTTTGTTCCTAAAAATCCTACTGTGCCCAG
TTTCCTTCACTACATGCCCTGCATTTTTTTATTTAAATATTTAGCTGTAGCGCCA
TCAGATATGGATGCCTTCTAACAATTGCTGTTTGTA AAAATAAATCAGGATGG
TAGAAAGTGATTATATGGA AAATTGGAACCTGGATGAGACCTTTTCGTTGAA
TTCTGAAGAGTAATGATGTGAAAATTGATACAGGGCAAGAGATGATTCTTTT
GTTTTTCTTCTACTTCATGTCCAGAAGAGTAAGAGGGAAAATGGACATATGT
TTCATATCCAAGGGTATTCAAACCTGTAGTTAGTTGGTACCTCTGAAAAATGA
GAATGGTGAGCGCACGGGTGGTTGTTCTAGCATGAATACAATTCTGGAAA
CTGTTATGCAATTTCCCTTTTTTAACCCACATTACTTTAGGGGTGCATTAAGT
CGCCAAACTATACTAGTTCTTTGTATTCCCTAGACTTGCTGATATTTACCTCTC
TCTTGCTCTTTCAGAGTAAATGGTTCCCTTCTTTCCTTCCCTACTTTCCCTTCAT
TCTCTCTTCCCTCCCTCCTTCCCTACTTCTTTTCTTCCCTTCCCTCTCTTAA
AACTATCTTAGATGTAGAATCCTGGTG TAGGGTTTTATTTTATTTTTATTTTT
TGACCCAATAAAATGTTATATGAAAGAATGAAAATATTAATTTAAGAGACTC
TGGGAGTCTGAATAAAGTAGCTTTATATTA ACTACAGGATAATATTAGCCTTA
TTACCCCCACAAGATTTTTTAAAACTTGAGGTAGGTAGCTACATTAAATAAA
TTTGCTACTTATATAAAAATTTTTATCAACACTAACTTTTAAAGTTTACAAG
TTTTTTTTTTCTTTTTTACAGTCTTCTATAGAGTTAGGTAAAAATGTGGTTC

TAACCATCAACAATTGCATGGTTAAATGACCCTGAACTAAAACCTGATGGGT
TCCCTATCAAAACAAATAAAAAATATACCTTTTTTCAGGTTTCAATCTGTGCAG
GGTATATGCATGTTAATTCTACCATGCTTAAGAACTTCCACAAAATATTTTCAT
GGAGAGGTCTGCATTTAGACGGAAACAGAAATTGCTTTTCCCCTCACTGTT
CCTGAATGCTCTATACTTGTTTTAACATTTTTTGCTATCTTTTTTTATTATTCTG
ATCATGATATGACCATTAAACCTCAGAATTCATAATTCCTGAGGGGTGTTAA
GAAGCAGTCCCATTGGTGAGGATATTATGACTTGGTGACCATTCTTAGGAGT
AGAAAACCAAGGACAATTGCTTCTGTATTCAGTATCCACTTCTTAATGTGGC
TTTATATGTAAAAATAATAATGCAGTGGTTGTTTCTGTCAGGAAAATAAATCT
TACAGAACAACCTGGTGGAATTGAAGCTGCTGCGCTAGACTTGGATATTTTG
GGTAGTGAAGAAGCAATGGCAATCTTGAGTCTATTATTGTATAATTTAGTAA
AAGAAAAAATAATCGTTGGTGGTCTACTAAGAGAATGCAGCTTTTTTTGA
GTTGTCACAGAGGCTGTGTGTGCCCTACACTGACCAGGGTTTGTAACCC
TTTCATTCTGGTACAAGAGTCGGGGGTATAACTTTTATACTTGAATCTACCTA
CCAAcacatatTTTCTCAATTCCTTTTTTGTAAGGTGCTATTTCTGTATTTAAATAA
CTTT

>E2F7-2047 Mut1Mut2Mut3

TCCTATGGTGTTATTTATTTTGTTCCTGAAATGGGATTTAGTGCAAAAAcacata
LACTACAGTCTTTAACACATTTTTTTTCAGGGTATGACGACTTGAATGTTTATA
CTTTTATTCTATAATTTGCCCTGCACTTATTTTACAACCTAGTAATAATGTGGA
TAAATGTATCTACATGACACATGTCAAGACCAAATAACTGTGAATGACAC
ACCTTGCTGTAAATGAACTGTGCTAACCCTGACTGTGGGCTTGAGAACAAA
GATGAACTCTAGAACTCTAGCAGCCTAACTGCTGCTTCTCAAATAACTGTG
TGAACAGTGAGATATTACTGTTTGTCTTCTAAAAATCCTACTGTGCCCAGTTT
CCTTCACTACATGCCCTGCATTTTTTTATTAAATATTTAGCTGTAGCGCCATC
AGATATGGATGCCTTCTAACAATTGCTGTTTGTAATAAATCAGGATGGTA
GAAAGTGATTATATGGAAAATTGGAACCTGGATGAGACCTTTTCGTTGAATT
CTGAAGAGTAATGATGTGAAAATTGATACAGGGCAAGAGATGATTCTTTTG
TTTTTCTTCTACTTTCATGTCCAGAAGAGTAAGAGGGAAAATGGACATATGTT
TCATATCCAAGGGTATTCAAACCTGTAGTTAGTTGGTACCTCTGAAAAATGAG
AATGGTGAGCGCACGGGTGGTTGTTCTAGCATGAATACAATTCTGGAAAC
TGTTATGCAATTTCCCTTTTTTAAACCCACATTACTTTAGGGGTGCATTAAAGTC
GCCAACTATACTAGTTCTTTGTATTCCTAGACTTGCTGATATTACCTCTCT
CTTGTCTCTTCAGAGTAAATGGTTCCCTTCTTTCCTTCCCTACTTTCCTTCATT
CTCTCTTCCCTCCCTCCTTCTACTTCTTTTCTTCCCTCCTCTTCTCTTAA
AACTATCTTAGATGTAGAATCCTGGTGTAGGGTTTTATTTTATTTTATTTTTT
GACCCAATAAAATGTTATATGAAAGAATGAAAATATTAATTTAAGAGACTCT
GGGAGTCTGAATAAAGTAGCTTTATATTAACCTACAGGATAATATTAGCCTTAT
TACCCCAACAAGATTTTTTAAACCTTGAGGTAGGTAGCTACATTAAATAAAT
TTGCTACTTATATAAAATTTTTATCAACACTAACTTTTAAAcacatatAGTTTT
TTTTTCTTTTTTACAGTCTTCTATAGAGTTAGGTTAAAAATGTGGTTCTAAC
CATCAACAATTGCATGGTTAAATGACCCTGAACTAAAACCTGATGGGTTCCCT

ATCAAAACAAATAAAAATATACCTTTTTTCAGGTTTCAATCTGTGCAGGGTAT
 ATGCATGTTAATTCTACCATGCTTAAGAACTTCCACAAAATATTTTCATGGAG
 AGGTCTGCATTTAGACGGAAACAGAAATTGCTTTTCCCCTCACTGTTCTG
 AATGCTCTATACTTGTTTTAACATTTTTTGCTATCTTTTTTTTATTATTCTGATCAT
 GATATGACCATTTAACCTCAGAATTCATAATTCCTGAGGGGTGTTAAGAAGC
 AGTCCCATTTGGTGAGGATATTATGACTTGGTGACCATTCTTAGGAGTAGAAA
 ACCAAGGACAATTGCTTCTGTATTTCAGTATCCACTTCTTAATGTGGCTTTATA
 TGTA AAAAATAATAATGCAGTGGTTGTTTCTGTTCAGGAAAATAAATCTTACAG
 AACA ACTGGTGGAATTGAAGCTGCTGCGCTAGACTTGGATATTTTGGGTAG
 TGAAGAAGCAATGGCAATCTTGAGTCTATTATTGTATAATTTAGTAAAAGAA
 AAAAATAATCGTTGGTGGTCCCTACTAAGAGAATGCAGCTTTTTTGAGTTGTC
 ACAGAGGCTGTGTGTGCCCTACACTGACCAGGGTTTGTA AAAACCCTTTTCAT
 TCTGGTACAAGAGTCGGGGGTATAACTTTTATACTTGAATCTACCTACCAAca
 catatTTTCTCAATTCCTTTTTTGTAAGGTGCTATTTCTGTATTTAAATAACTTT

2) 将 E2F7 WT 和 MUT 的序列克隆到含有萤火虫荧光素酶基因和海参荧光素酶基因的双荧光素酶报告基因的质粒载体 pmirGLO 上, 进行测序比对, 然后摇菌提质粒。

2.2.2.2 双荧光素酶质粒和 miR-30a-5p 共转染

1) 将处于对数生长期的 293T 细胞进行消化、计数后, 24 孔板中每孔加入 1 万个细胞, 放在 37 度细胞培养箱中进行培养。

2) 培养 24 小时后, 待细胞贴壁较牢时, 进行 miRNA 和荧光素酶质粒共转染。分组如下: E2F7 WT+miR-NC、E2F7 MUT1+miR-NC、E2F7 MUT2+miR-NC、E2F7 MUT3+miR-NC、E2F7 MUT123+miR-NC、E2F7 WT+miR-30-5p、E2F7 MUT1+ miR-30-5p、E2F7 MUT2+ miR-30-5p、E2F7 MUT3+ miR-30-5p、E2F7 MUT123+ miR-30-5p。每孔加 1.25 μ l miRNA+50 μ l Opti-MEM[®], 2.5 μ l lipo2000+50 μ l Opti-MEM[®], 10 ng 质粒+50 μ l Opti-MEM[®], 0.01 μ l lipo2000+50 μ l Opti-MEM[®], 6 小时后换液。注意 293T 细胞贴壁不牢, 换液使用的 PBS 缓冲液和培养基提前 37 度预温, 加液时小心贴着侧壁加入, 尽量减少细胞损失。

2.2.2.3 双荧光素酶报告基因检测

1) 实验使用的时 Promega 的双荧光素酶报告基因检测试剂盒, 提前将试剂放在冰浴中解冻。

2) 转染 36-48 小时后的细胞弃去上清, 预温好的 PBS 缓冲液轻轻沿侧壁加入, 清洗残存的培养基。

- 3) 将上样板用超纯水和 75%的酒精清洗干净后、甩掉残存水分后放置在 37 度烘箱中烘干。准备好 2 管 50 ml 的双蒸水和 75%的酒精。
- 4) 配制细胞裂解液，每孔加入 100 μl ，摇床上裂解 15 分钟。
- 5) 用 200 μl 的移液枪轻轻吹打混匀后，每孔吸出 20 μl （注意尽量不要吸到细胞沉淀），加至上样板中。
- 6) 配制 Luciferase 荧光反应液和荧光中止液，24 个孔大约需要 2 ml。
- 7) 使用化学发光仪，开机后 boot instrument，然后打开新的文档。
- 8) 先用去离子水清洗机器 60 次，unload injector 15 次后，可见气泡吐出。
- 9) 打开上样槽，将上样板放入机器，关闭上样槽。
- 10) 选择检测区域进行设置，机器加入检测试剂，2 号进样口加入荧光素酶反应液，3 号进样口加入反应中止液，注满后检测。
- 11) 检测完成后，打开上样槽，双蒸水清洗 75 次，75%乙醇清洗 75 次，然后双蒸水再次清洗 75 次，unload injector。
- 12) 取出上样板，保存处理数据，用萤火虫荧光素酶活性值比上海肾荧光素酶活性值来表示萤火虫荧光素酶的活性。

2.2.3 RNA 反转成 cDNA

- 1) 反转录使用的是 TaKaRa 的 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒，每管加入如下体系：

表 3-1 cDNA 逆转录反应体系 1

Table 3-1 The cDNA Reverse Transcription PCR components1

试剂	使用量
5 x gDNA Eraser Buffer	2.0 μl
gDNA Eraser	1.0 μl
Total RNA	1 μg
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μl

根据 RNA 的浓度，取总量 1 μg 的 RNA 相应体积加入无酶的 200 μl EP 管中。

- 2) 将 EP 管放入 PCR 仪中，设置程序：42 度 2 分钟。
- 3) 每管加入如下体系：

表 3-2 cDNA 逆转录反应体系 2

Table 3-2 The cDNA Reverse Transcription PCR components2

试剂	使用量
PrimerScript RT Enzyme Mix I	1.0 μl
RT Primer Mix	1.0 μl
5 x PrimerScript Buffer 2 (for Real Time)	4.0 μl
RNase Free dH ₂ O	4.0 μl
步骤 1) 的反应液	10.0 μl
Total	20 μl

4) 上下颠倒混匀后微离，置于 PCR 仪上，设置程序：37 度 15 分钟，85 度 5 秒钟。

5) 每管加入 80 μl 双蒸水将反转录好的 cDNA 稀释 5 倍，放在 -20 度冰箱备用。

2.2.4 siRNA 细胞转染

1) siRNA 细胞转染，序列如下：

siRNA NC: GACAUCUAGCGCAUCGUCUdTdT

siE2F7: ACCCAGCAGCUAACCUGAAGAUGdTdT

2) 转染前一天消化细胞，铺六孔板，每孔约 10 万细胞。

3) 细胞转染前，将六孔板放在倒置显微镜下进行观察，细胞分布均匀，细胞融合度约为 30% 左右，即可进行转染。

4) siRNA 冻干粉加入 125 μl 的 DEPC 水稀释成 20 μM 的溶液，然后分装成五管，置于 -80 度保存，避免反复冻融。

5) 稀释 siRNA：将 5 μl siRNA 入到 100 μl 的 Opti-MEM[®] 中，轻轻混匀，孵育 5 分钟。

6) 稀释 Rfect 转染试剂：将 10 μl Rfect 加入到 100 μl 的 Opti-MEM[®] 中，轻轻混匀，孵育 5 分钟。

7) 将 5) 和 6) 中的试剂混在一起，轻弹管壁使其混匀，室温孵育 15 分钟。

8) 将六孔板中的培养基弃去，每孔加入 1 ml 的 PBS 缓冲液浸润孔板底部，洗去残存的培养基，之后每孔加入 800 μl 的 Opti-MEM[®] 培养基，然后将孵育好的转染混合液轻轻滴入孔板中，轻轻晃动孔板使其混匀，37 度细胞培养箱中继续培养，4-6 小时后换成不含抗生素的完全培养基。

9) 转染第二天, 细胞融合度约 70%时, 再次用相同的体系转染细胞, 4-6 小时后换液。

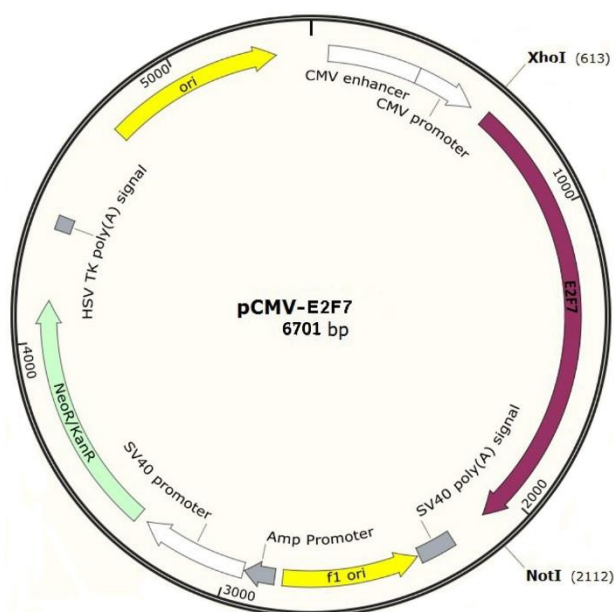
2.2.5 质粒细胞转染

1) E2F7 序列如下:

```
atggaggtaaattgtttaacactaaaagacctgatcagccccaggcagcccagactagattttgcagttgaagatggggaaa  
atgcacaaaaggaaaatatattgttgatcgatcaaggatggccccgaagactccaataaaaaatgaaccaattgattatcg  
aagcaaaaaaatttactccagaaagaaatcccattactccagttaagttgttgacagacagcaagcggaacctggacac  
ccacagctaacctgaagatgctcattagtgtgccagcccagatataagggaccgggagaagaaaaagggactattccga  
cccattgaaaacaaggacgatgcattacagattctctacagcttgatgtgtggggacagtgtgtggacgaatttgaaaa  
gcaaaggccaagcagaaaacagaaaagtttagactcctgtgccagaagttttagctcgtatccaagttatccctgtca  
actgagaaaactaccatctccctagatgaagttgtgtcagctctgtgtggaaaggagacgcacatctatgacattgtaaagt  
gctggagtcgctgcacatctggcagccgggtggctaagaatcagtatggctggcatggacggcacagcctgcaaaaacc  
ctgaggaacctccagagactaggagaggagcagaaatatgaagagcaaaggcctacctccaacagaaagagctggac  
ctgatagattataaatttgagaaacgtaaaaagatggatccagattcccaggaacaacagttactggatttcttgaaccc  
gactgtccctctcatctgcaaacagtagaaaagacaagtctctgagaattatgagccagaagttgtcatgctgttctcgtct  
ccaaaaccaagattgtcactctggatgtggctgcaaaatactgatagaagaaagccaagatgccccagaccatagtaaat  
ttaaacaagggtacgacgcctctatgacatagccaatgttctgaccagcttggtctgataaagaaagtgcattgaacaga  
agagcgaggtcgtaaaccagccttcaagtggatcgggcctgtggacttcagctcaagtgatgaagaactggatgtttct  
gcatctgtcttaccagaattgaaaagagaacatatggccagattcaagtctgtgaaaacagaagctggctcgccatggtt  
ctttaacacagttcaggcttctgagaggatccagaggaaagtgaactcagaaccgagcagcccgtacagagaagaacaa  
ggatcaggtggctactcttagaaattggaagcctggcagctgtctatagacagaaaatagaagacaattcacagggaaaa  
gcctttgccagtaagagagtggtgcctccatcaagcagcttgacacctgtgtcctttccctgtcctctgttgaccagaa  
tattgtgtaatccttagcccaccagatattttgtgtgctcagacggacctgcaggcattctccatgcagaacggctgaatg  
gacaagtggatgtctcacttgcttctgcagcctctgtgtggagagcctgaagccagcactcctgtggccagccttagt  
gtatgtgcctctgcctcactgttcatgctgtatggaagtctgcaggaggaccagcgtcagggtcagggtcagagaggga  
tgacagaagctcagaagccccagccacagtagagctgtcatctgcacccctcagctcagaagcgcctctgtgaggagagg  
aaacctcaggaggaggatgagccagccactaaaaggcaaagtaggggaatatgaagacggcccgctgtcgttgcattgc  
ccaagaaacctcagattccacagaccttgccctctccaagactatgggtaacagggcattctataccctcaaagacattca
```

tgtgaatggccaactccctgctgcagaagagatttcaggaaaggcaacagcaaactctctgtttctctgagtggggaaatc
 cttcaagaaatacatgatgttgaagccttcaaaagaaaatgaaagcaccaaagagccttcttgctacaatatctttgtgtgc
 agtctcctgcaggattaaatggtttcaatgtacttttatctggcagtcacacccccctactgtgggcccgtctcaggtcagct
 gccgtctttcagtgctccttgcatgggtctaccatctccacctctgggcccttttctgttctctattctcctgcaatgccgggccc
 gggtttcttactcttggtgctctccaaacacaggacctgtgaatttcagcttgctggccttgatcaatagcccagcttctc
 gtcggccccacagctgtggtaatccaaagtcgtccacactcccttctgcagaccctcagcttcagagtcagccctcactaa
 acctaagtccagtgatgtcaaggcacacagtgctcgtccaacaacctgagtcctccgtttacgtgggacatccagctcagct
 agtaaaattacatcagtcaccagttccagtgacccccaagagcatccaacgcacacatcgtgagacgttttcaagacaccc
 ggcagccttgagaccctgtcctgaagagaagagaaaggaaccagtcacgaaacaccagctcgggccagaggagacta
 gaaatccccagcggcggtgactaa

质粒图谱如下：



- 2) 转染前一天消化细胞，铺六孔板，每孔约 20 万细胞。
- 3) 细胞转染前，将六孔板放在倒置显微镜下进行观察，细胞分布均匀，细胞融合度约为 50-70%左右，即可进行转染。
- 4) 配制转染体系：将 2 μg 质粒和 6 μl 的 viafect 转染试剂加到 200 μl 的 Opti-MEM[®] 中，轻弹管壁使其混匀，室温静置孵育 15 分钟。
- 5) 将六孔板中的培养基弃去，每孔加入 1 ml 的 PBS 缓冲液浸润孔板底部，洗去残存的培养基，之后每孔加入 800 μl 的 Opti-MEM[®] 培养基，然后将孵育好的转染混合液轻轻滴入孔板中，轻轻晃动孔板使其混匀，37 度细胞培养箱中继续培

养，4-6 小时后换成不含抗生素的完全培养基。

2.2.6 质粒转化、质粒扩增和质粒保种

1) LB 培养基的配制:

表 3-3 LB 培养基配制

Table3-3 LB medium preparation

	LB 凝固	LB 不凝固
ddH ₂ O	100 ml	100 ml
胰蛋白胨	1 g	1 g
酵母提取物	0.5 g	0.5 g
氯化钠	1 g	1 g
琼脂粉	1.5 g	-

将上述试剂加入到干净的锥形瓶中，磁力搅拌 20 分钟，用牛皮纸封口后进行高压灭菌。

2) 将灭菌好的 LB 培养基置于紫外灭菌好的垂直层流洁净台中冷却，待到培养基温度约为 60 度即手可触摸锥形瓶身时，倒入 50 ml 离心管中，按照 1: 1000 的比例加入抗生素，混匀后迅速倒入至培养皿中分装，每皿约 10 ml，平铺皿底。

3) 将 DH5 α 感受态细胞自 -80 度冰箱中取出，放在冰上解冻。一般一次转化感受态细胞的使用量为 100 μ l。

4) 向感受态细胞中加入 10 μ l 的质粒，轻弹管壁使其混合均匀，在冰浴中静置半个小时。

5) 将盛有混合液的 EP 管放入 42 度水浴中孵育 60-90 秒，然后迅速转移至冰浴中，静置冷却 2-3 分钟。

6) 向 EP 管中加入 890 μ l 的不含抗生素的 LB 培养基，用移液器轻轻吹打混匀后放在 37 度摇床上振荡 1 小时。

7) 吸取 100 μ l 摇匀的感受态细胞和质粒液体滴到含有抗生素的固体 LB 培养基上，用酒精灯烧过的无菌弯头玻璃棒轻轻涂抹均匀，静置一段时间液体被吸收后，将其倒置在 37 度烘箱中，培养 12-16 小时。

8) 第二天将培养板取出，观察菌落形成状态。用无菌枪头挑取单个饱满、周围

无卫星灶的单克隆菌落至 EP 管中，置于 37 度摇床上振荡 1 小时，取出部分交由公司扩增提取质粒进行测序，比对是否为转化的质粒。

9) 比对测序序列正确后，将单克隆菌液加入到 20 ml LB 培养基中，加入相应的抗生素，放置于 37 度摇床上振荡 12-16 小时。

10) 第二天观察离心管中菌液的浑浊度，足够浑浊后取出 850 μ l 菌液至新的 1.5 ml EP 管中，再加入 150 μ l 的甘油，混匀后放在 -80 度冰箱中保存。

2.2.7 质粒抽提

1) 质粒抽提使用的是 Tiangen 的无内毒素质粒小提中抽试剂盒。

2) 首先将摇好的菌液离心，3000 rpm，10 分钟。

3) 弃去上清，尽量吸干净，每管加入 500 μ l 溶液 P1，Vortex 振荡后用 1 ml 移液枪使劲吹打沉淀使其成为混悬液，转移至新的 2 ml EP 管中。

4) 向 EP 管中加入 500 μ l 溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次，使菌体充分裂解。

5) 每管加入 500 μ l 溶液 P4，立即温和地上下翻转 6-8 次，使其充分混匀。此时会有白色絮状沉淀出现，然后室温静置 10 分钟，12000 rpm 室温离心 10 分钟。

6) 将上清分次加入过滤柱 CS 中，过滤柱放在收集管中，12000 rpm 室温离心 2 分钟，将滤液收集在新的 2 ml EP 管中。

7) 每管加入滤液三倍体积的异丙醇溶液，上下颠倒混匀后转移至吸附柱 CP4 中，12000 rpm 室温离心 1 分钟，弃去滤液。

8) 加 500 μ l 去蛋白液 PD 至吸附柱 CP4 中，12000 rpm 离心 1 分钟，弃去滤液。

9) 加入 600 μ l 漂洗液 PW 至吸附柱 CP4 中，12000 rpm 离心 1 分钟，弃去滤液，重复上述步骤一次。

10) 空离吸附柱，12000 rpm 离心 2 分钟，去除残存的漂洗液。

11) 将吸附柱放置在新的 1.5 ml EP 管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 200 μ l 洗脱缓冲液 TB，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟，收集质粒溶液至 EP 管中。

12) 使用 NanoDrop 2000 检测质粒的浓度和纯度，管壁标记，-20 度冰箱保存。

2.2.8 qRT-PCR 实验、蛋白免疫印迹实验、CCK-8 实验、平板细胞克隆实验、Transwell 实验、划痕实验、细胞周期实验见第一部分、第二部分方法。

2.2.9 统计方法

采用 SPSS 19.0 软件行统计学处理。所有实验都进行了三次独立重复。每组数据采用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示, 两组均值比较采用独立 t 检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 表示具差异有统计学意义。

3. 实验结果

3.1 miR-30a-5p 下游靶基因的预测筛选

众所周知, miRNAs 调控肿瘤细胞的生物学功能是通过与 mRNA 的特定序列结合, 抑制蛋白质的翻译或者调控 mRNA 降解发挥作用的。为进一步探讨 miR-30a-5p 调控胆囊癌细胞增殖、转移的分子机制, 我们进行了 miR-30a-5p 下游靶基因的预测筛选。首先在靶基因预测网站 TargetScan 上输入 miR-30a-5p, 选择人种, 筛选出 1184 个候选靶基因。之后与实验室已有的胆囊癌组织和癌旁组织的基因芯片中差异表达的 4354 个差异表达的基因取交集, 得到 380 个候选基因。然后在 PubMed 上进行文献检索, 因为 miR-30a-5p 在胆囊癌中起到抑癌的作用, 所以候选靶基因选择在肿瘤中起到促癌作用的基因, 最后筛选出 SLC7A11、ANLN、CD109、MACC1、LOX、E2F7、RRM2 等 7 个候选靶基因 (图 3-1)。然后在胆囊癌细胞系 NOZ 中过表达 miR-30a-5p, 用 qRT-PCR 检测 mRNA 水平上 7 个候选基因的变化。如图 3-2 所示, 过表达 miR-30a-5p, 7 个候选靶基因中 E2F7 表达明显下调, 且差异具有统计学上的显著性意义 ($**P < 0.01$)。因此我们选择 E2F7 作为 miR-30a-5p 的靶基因进行后续研究。

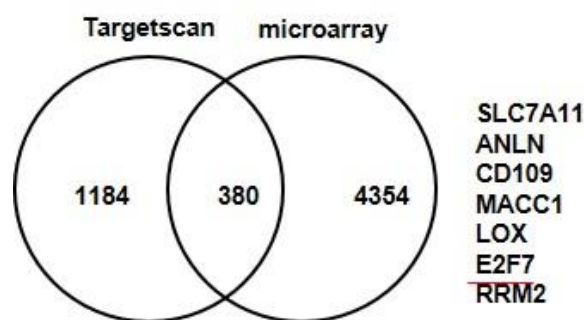


图 3-1 miR-30a-5p 靶基因网站预测和基因芯片交集的维恩图

Figure 3-1 Venn diagram of potential miR-30a-5p targets, as predicted by the TargetScan database and gene microarray

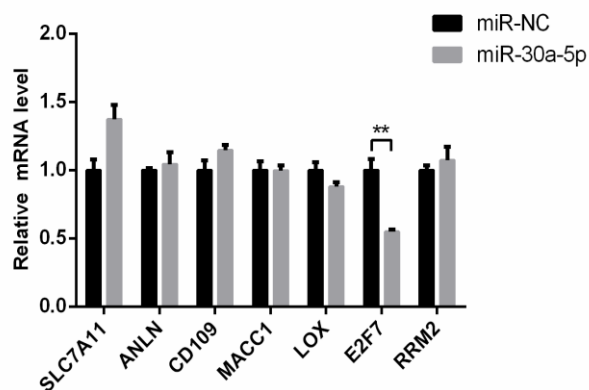


图 3-2 miR-30a-5p 过表达后候选靶基因的表达 (** $P<0.01$)

Figure 3-2 The expression of potential miR-30a-5p targets after miR-30a-5p overexpression
(** $P<0.01$)

3.2 E2F7 是胆囊癌细胞中 miR-30a-5p 的靶基因

如图3-3所示,网站预测的miR-30a-5p与E2F7的3'UTR区域可能的结合位点有三个,构建结合位点野生型和突变型的双荧光素酶报告基因质粒。在293T细胞中共转双荧光素酶质粒与miR-30a-5p,荧光素酶报告基因实验结果显示:转染E2F7 3'UTR野生型质粒后再转染miR-30a-5p的细胞荧光素酶活性显著低于miR-NC组 (** $P<0.01$),而将两者结合位点突变后,单独突变的一组荧光素酶活性仍然低于miR-NC组 (* $P<0.05$),三个结合位点全部突变的质粒转染后,miR-30a-5p的细胞荧光素酶活性与miR-NC组的无明显差异(图3-4)。说明miR-30a-5p与E2F7 3'UTR区域预测的3个结合位点都可以起到直接结合的作用,只有把3个结合位点全部突变掉后,miR-30a-5p与E2F7的直接相互作用才会被完全抑制。

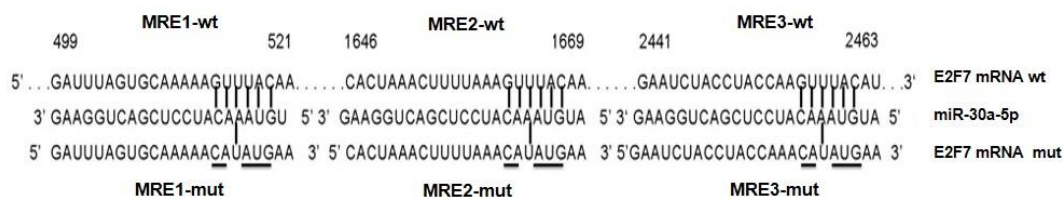


图 3-3 E2F7 的 3'UTR 区域与 miR-30a-5p 的结合位点

Figure 3-3 The 3'UTR of E2F7 mRNA contains wild-type or mutant miR-30a-5p binding sequences

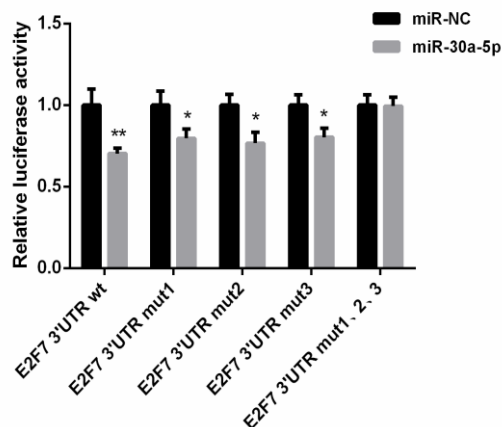


图 3-4 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-30a-5p 和 E2F7 3'UTR 区域野生型或突变型质粒共转后荧光素酶活性的变化 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 3-4 Luciferase reporter assay was performed in 293T cells co-transfected with miR-30a-5p and pGLO-E2F7 WT or pGLO-E2F7 MUT vectors (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

3.3 miR-30a-5p 对 E2F7 表达水平的影响

双荧光酶报告基因检测结果显示 miR-30a-5p 可以通过三个结合位点直接结合 E2F7, 那么后续 E2F7 的表达究竟如何变化, 我们在胆囊癌细胞系 GBC-SD 和 NOZ 中过表达和敲减 miR-30a-5p 后, 提取 RNA 和蛋白, 通过 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹实验在 mRNA 和蛋白水平上检测 E2F7 的表达。如图 3-5、3-6 所示, 过表达 miR-30a-5p 后, E2F7 在 mRNA 和蛋白水平上表达下调, 而敲减 miR-30a-5p 后, E2F7 在 mRNA 和蛋白水平上表达上调, 差异具有统计学上的显著性意义 (* $P<0.05$, *** $P<0.001$)。以上实验说明 miR-30a-5p 与 E2F7 3'UTR 上的特定序列结合后, 可以通过抑制 E2F7 蛋白质翻译和剪切 E2F7 的 mRNA 分子, 从而起到对 E2F7 的调控作用。

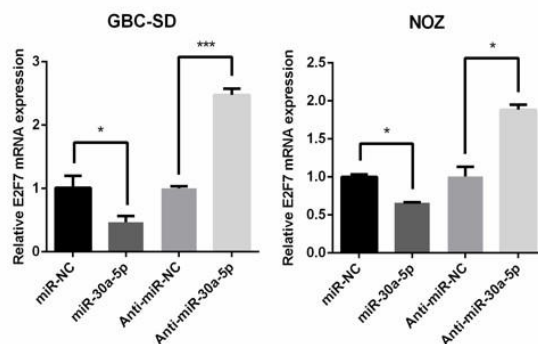


图 3-5 qRT-PCR 检测胆囊癌细胞上调和下调 miR-30a-5p 后 E2F7 的表达水平

(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 3-5 qRT-PCR analyses of E2F7 expression levels in GBC-SD and NOZ cells transfected with miR-NC and miR-30a-5p or anti-NC and anti-miR-30a-5p (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

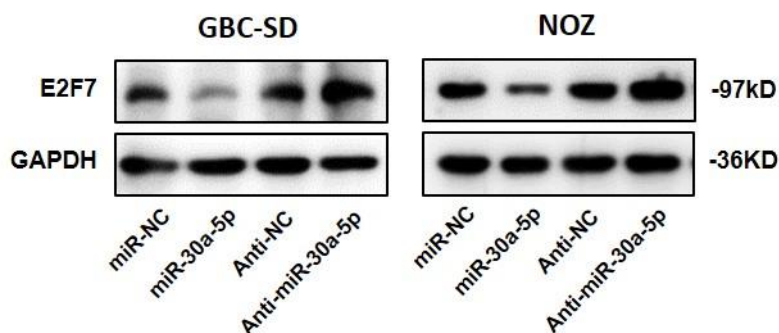


图 3-6 蛋白免疫印迹实验检测胆囊癌细胞上调和下调 miR-30a-5p 后 E2F7 的表达水平
Figure 3-6 western blot analyses of E2F7 expression levels in GBC-SD and NOZ cells transfected with miR-NC and miR-30a-5p or anti-NC and anti-miR-30a-5p

3.4 E2F7 在胆囊癌组织中的表达及与 miR-30a-5p 的相关性

前面的研究结果表明 miR-30a-5p 可以直接调控 E2F7 的表达,那么 E2F7 在胆囊癌组织中的表达水平如何,起到什么性质的作用,目前尚未见研究报道。我们首先在 42 对胆囊癌组织和癌旁组织中检测了 E2F7 的表达,如图 3-7 所示,与癌旁组织相比, E2F7 在胆囊癌组织中的表达明显上调,差异具有统计学上的显著性意义($P=0.009$)。这也与 miRNA 的负性调控机制相符合。由第一部分研究我们得知 miR-30a-5p 在胆囊癌组织中表达明显下调,而 E2F7 在胆囊癌组织中的表达明显上调,两者之间是否存在相关性呢?我们用线性回归分析两者在 42 对胆囊癌组织中表达的相关性,结果表明, miR-30a-5p 与 E2F7 两者在胆囊癌组织中表达呈负相关($P=0.0087$) (图 3-8)。

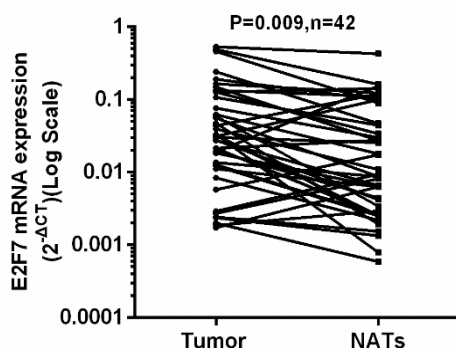


图 3-7 42 例胆囊癌和癌旁组织中 E2F7 的表达水平($P=0.009$)
Figure 3-7 E2F7 mRNA expression levels in 42 GBC tissues and matched NATs ($P=0.009$)

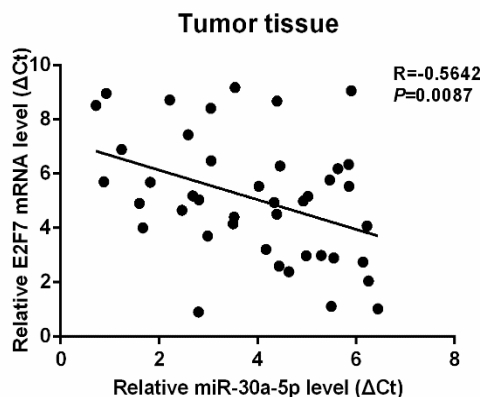


图 3-8 线性回归分析 miR-30a-5p 与 E2F7 在胆囊癌组织中的相关性($P=0.0087$)

Figure 3-8 The correlation between miR-30a-5p expression levels and E2F7 expression levels was determined by linear regression analysis ($P=0.0087$, $R=-0.5642$; Pearson's correlation coefficient)

3.5 体外实验显示 E2F7 促进胆囊癌细胞的增殖、迁移

3.5.1 E2F7 在五株胆囊癌细胞系中的表达水平

上述研究证实 E2F7 在胆囊癌组织中表达上调,与 miR-30a-5p 的表达水平呈负相关,接下来探究 E2F7 在胆囊癌细胞中的功能。首先通过 qRT-PCR 的方法检测 E2F7 在五株胆囊癌细胞中的表达水平,结果显示: E2F7 在迁移能力较弱的胆囊癌细胞系 GBC-SD、SGC-996 中表达水平较低,在迁移能力较强的 NOZ 细胞中表达水平较高,与 miR-30a-5p 在胆囊癌细胞系的表达水平刚好相反,在一定程度上反应了 miR-30a-5p 和 E2F7 呈负相关关系。与 miR-30a-5p 在胆囊癌细胞中生物学功能研究保持一致,我们选择 GBC-SD 和 NOZ 细胞进行后续研究。

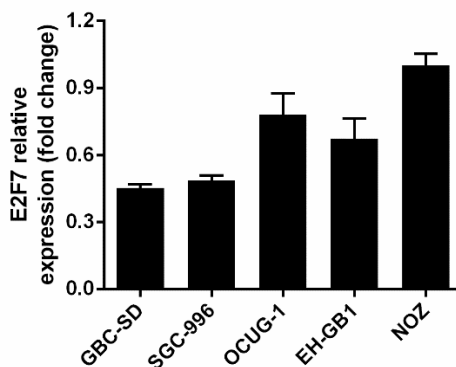


图 3-9 qRT-PCR 检测 E2F7 在五株胆囊癌细胞系中的表达

Figure 3-9 E2F7 expression levels in five GBC cell lines were analysed by qRT-PCR

3.5.2 E2F7 siRNA 与 E2F7 质粒在胆囊癌细胞系中转染效率的验证

根据 E2F7 在胆囊癌细胞系中的表达情况, 结合细胞系本身的特点, 选择 GBC-SD 和 NOZ 细胞进行后续功能学实验研究。在胆囊癌细胞系 GBC-SD 和 NOZ 中转染 E2F7 siRNA 和 E2F7 过表达质粒 48 小时后, 提取细胞 RNA, 通过 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹实验检测 E2F7 在 mRNA 水平的变化。结果显示: 转染 E2F7 siRNA 后, 细胞内 E2F7 表达明显下调, GBC-SD 细胞内 E2F7 敲减 65%, NOZ 细胞中 E2F7 敲减效率可达 70%。转染 E2F7 过表达质粒后, 细胞内 E2F7 表达明显上调, GBC-SD 细胞内 E2F7 过表达倍数达 40 倍, NOZ 细胞中 E2F7 过表达倍数可达 80 倍, 差异具有统计学上的显著性意义 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

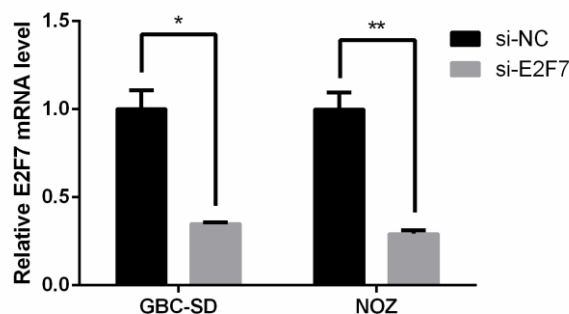


图 3-10 胆囊癌细胞中 E2F7 的敲减效率 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 3-10 E2F7 knockdown efficiency in GBC-SD and NOZ cells was confirmed by qRT-PCR (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

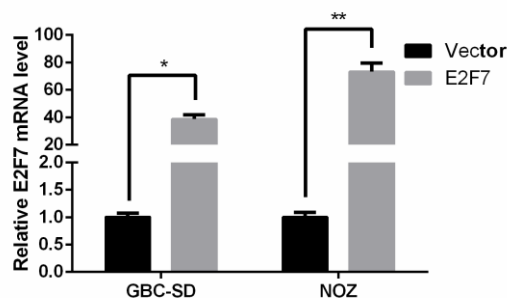


图 3-11 胆囊癌细胞中 E2F7 的过表达效率 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 3-11 E2F7 overexpression efficiency in GBC-SD and NOZ cells was confirmed by qRT-PCR (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

3.5.3 E2F7 促进胆囊癌细胞的增殖能力

使用质粒转染和 RNAi 干扰技术上调和下调胆囊癌细胞系 GBC-SD 和 NOZ

中 E2F7 的表达, CCK-8 实验检测 E2F7 对胆囊癌细胞增殖的影响。各组细胞培养条件相同, 连续五天测量细胞的吸光度值。如图 3-12 所示, E2F7 下调的胆囊癌细胞的吸光度值低于对照组, 增殖能力明显受到抑制, 而过表达 E2F7 的胆囊癌细胞的吸光度值明显高于对照组, 增殖能力明显增强, 差异具有统计学上的显著性意义 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

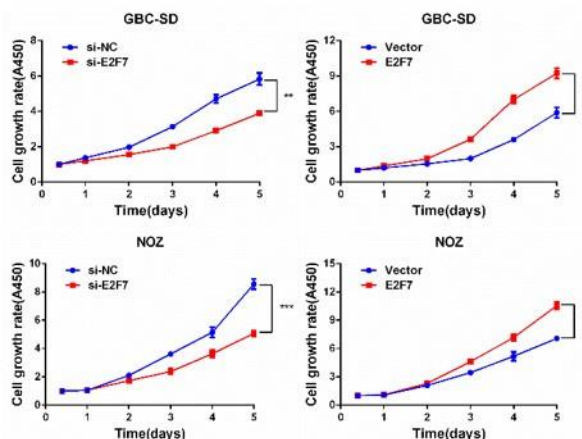


图 3-12 上调和下调 E2F7 表达后对胆囊癌细胞 GBC-SD 和 NOZ 增殖的影响 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Figure 3-12 Cell proliferation ability was assessed in GBC-SD cells and NOZ cells infected with E2F7 siRNA or negative control siRNA and E2F7 plasmid or negative control vector (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

3.5.4 E2F7 对胆囊癌细胞周期的影响

CCK-8 实验结果可知 E2F7 可促进胆囊癌细胞的增殖能力, 为进一步探究 E2F7 调控胆囊癌细胞增殖的潜在机制, 我们通过流式细胞仪检测 E2F7 对胆囊癌细胞周期的影响。将处理好的处于对数生长期的待测细胞上机检测, 结果显示下调 E2F7 表达的胆囊癌细胞处于 G0/G1 期的比例明显高于对照组的细胞 ($55.9\pm3.72\%$ vs. $74.5\pm2.37\%$; $45.6\pm3.01\%$ vs. $58.2\pm2.10\%$), 出现了 G0/G1 期阻滞(图 3-13)。

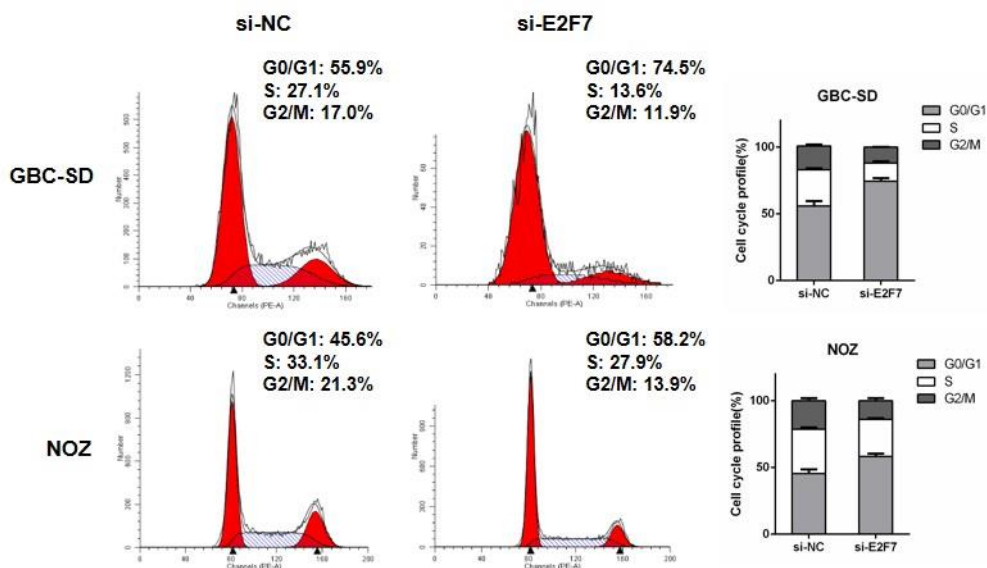


图 3-13 敲减 E2F7 的胆囊癌细胞周期分布

Figure 3-13 Representative cell cycle analysis of cells transfected with si-NC and si-E2F7

3.5.5 Transwell 实验检测 E2F7 对胆囊癌细胞的迁移的影响

为了研究 E2F7 对胆囊癌细胞迁移能力的作用，我们进行 Transwell 无胶空穿实验，如图 3-14 所示，下调 E2F7 的表达后，GBC-SD 和 NOZ 细胞穿过小室的细胞数量比对照组穿过小室的细胞数量明显减少 (408.7 ± 23.9 个/十倍镜视野 vs. 232.0 ± 22.3 个/十倍镜视野; 376.4 ± 20.5 个/十倍镜视野 vs. 214.7 ± 18.3 个/十倍镜视野); 过表达 E2F7 后，GBC-SD 和 NOZ 细胞穿过小室的细胞数量比对照组穿过小室的细胞数量明显增加 (239.2 ± 16.7 个/十倍镜视野 vs. 397.6 ± 24.7 个/十倍镜视野; 267.4 ± 18.3 个/十倍镜视野 vs. 386.4 ± 25.3 个/十倍镜视野)，差异具有统计学上的显著性意义 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

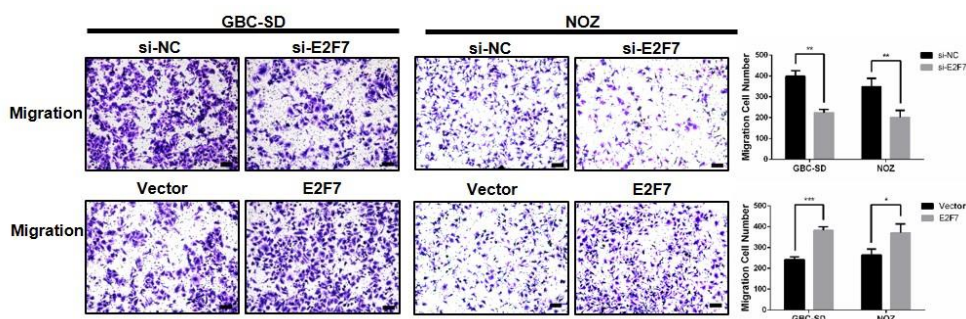
图 3-14 Transwell 实验显示 E2F7 促进胆囊癌细胞的迁移能力(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 3-14 Cell migration was assessed in GBC cells in which E2F7 was inhibited or overexpressed (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

3.5.6 E2F7 对胆囊癌细胞 EMT 的影响

前期研究结果显示 miR-30a-5p 过表达可以上调上皮相关标志物 E-cadherin, 下调间质相关标志物 Vimentin, 通过影响胆囊癌细胞 EMT 的过程抑制胆囊癌细胞的侵袭、迁移。E2F7 可以促进胆囊癌细胞的迁徙, 接下来我们检测了下调 E2F7 后 EMT 相关蛋白的变化, 来验证 E2F7 促进胆囊癌细胞迁移的作用是否是通过影响 EMT 过程实现的。在胆囊癌细胞 GBC-SD 和 NOZ 中敲减 E2F7, 48 小时后提取细胞的蛋白质, 蛋白免疫印迹实验检测 EMT 相关蛋白的变化, 结果显示敲减 E2F7 的表达后上皮相关标志物 E-cadherin 表达上调, 间质相关标志物 Vimentin 表达下调, 说明 E2F7 可以通过促进 EMT 的过程来影响胆囊癌细胞的迁移能力 (图 3-15)。

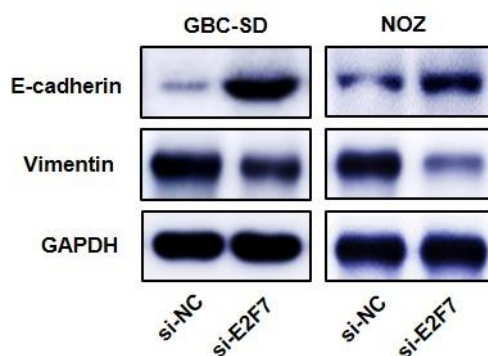


图 3-15 E2F7 敲减的胆囊癌细胞对 E-cadherin 和 Vimentin 表达水平的影响

Figure 3-15 E-cadherin and vimentin protein expression levels in the indicated cells were examined by western blotting.

3.6 miR-30a-5p 通过抑制 E2F7 的表达来调控胆囊癌细胞的增殖

前面的实验结果证实 miR-30a-5p 具有抑制胆囊癌细胞增殖、侵袭和迁移的能力, 并且 E2F7 是 miR-30a-5p 的直接下游靶基因。我们知道 miRNA 调控细胞的生物学功能是通过与 mRNA 的特定序列结合, 通过抑制蛋白质的翻译或者调控 mRNA 的表达实现的。接下来, 我们通过回复实验来观察 miR-30a-5p 是否是通过调控 E2F7 的表达来实现对胆囊癌细胞生物学功能的抑制作用。在敲减 miR-30a-5p 的基础上, 同时转染 siRNA 阴性对照和 E2F7 siRNA, 或者过表达 miR-30a-5p 的基础上, 再转染空白质粒和 E2F7 过表达质粒, CCK-8 实验观察下调 E2F7 的表达是否可以回复或者部分回复 miR-30a-5p 抑制胆囊癌细胞的作用。结果如图 3-16 所示, 相较于 Anti-miR-30a-5p+si-NC 组, 下调 E2F7 的表达可以部分回复 Anti-miR-30a-5p

促进胆囊癌细胞增殖的能力；与miR-30a-5p+vector组相比，上调E2F7的表达可以部分回复miR-30a-5p对胆囊癌细胞增殖的抑制作用，差异具有统计学上的显著性意义 (** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。为了进一步证实E2F7回复miR-30a-5p抑制胆囊癌细胞增殖能力的作用，我们进行了平板细胞克隆形成的回复实验，结果显示，与miR-30a-5p+vector组相比，在胆囊癌细胞系GBC-SD和NOZ中过表达miR-30a-5p的基础上上调E2F7表达的胆囊癌细胞集落形成率显著增加 (64.7 ± 10.7 vs. 137.7 ± 10.1 ; 164.0 ± 24.8 vs. 276.7 ± 18.1)；而相较于Anti-miR-30a-5p+si-NC组，转染miR-30a-5p inhibitor的基础上再下调E2F7表达的GBC-SD和NOZ细胞集落形成率明显减少 (150.3 ± 16.4 vs. 87.7 ± 8.1 ; 147.3 ± 13.7 vs. 81.3 ± 6.5)。差异具有统计学上的显著性意义 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

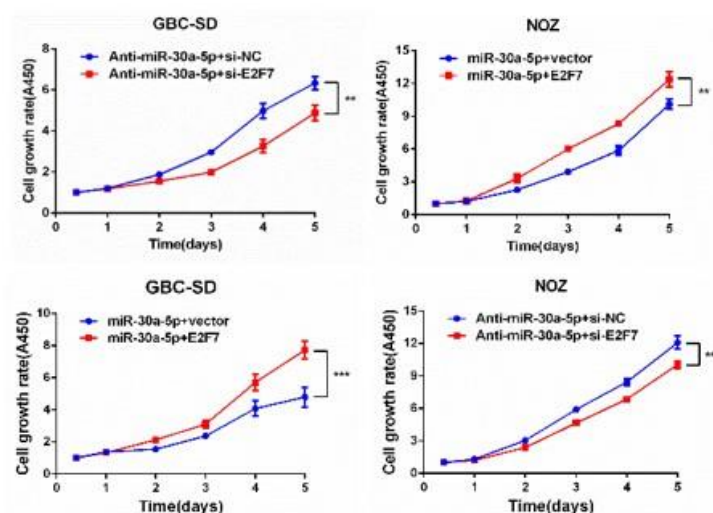


图 3-16 CCK-8 实验检测 E2F7 回复 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞增殖的抑制作用

(** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Figure 3-16 Cell viability were assayed in GBC cells transfected with miR-30a-5p and E2F7-overexpression vectors or anti-miR-30a-5p and E2F7 siRNA (** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

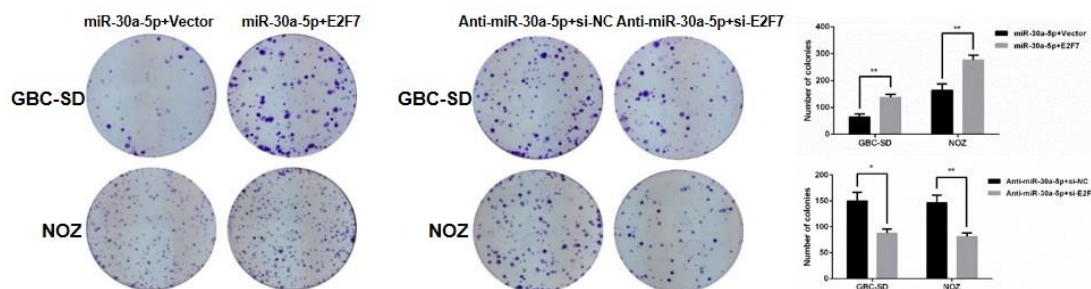


图 3-17 平板细胞克隆实验检测 E2F7 回复 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞增殖的抑制作用

(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 3-17 Colony formation was assayed in GBC cells transfected with miR-30a-5p and E2F7-overexpression vectors or anti-miR-30a-5p and E2F7 siRNA (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

3.7 miR-30a-5p 通过抑制 E2F7 的表达来调控胆囊癌细胞的迁移

为了研究 E2F7 回复实验对 miR-30a-5p 抑制胆囊癌细胞侵袭和迁移能力的影响, 我们进行 Transwell 无胶空穿和胶穿实验, 如图 3-18 所示, 迁移实验结果显示: 与 Anti-miR-30a-5p+si-NC 组相比, 在敲减 miR-30a-5p 的基础上, GBC-SD 和 NOZ 细胞转染 E2F7 siRNA 组穿过小室的细胞数量明显减少 (409.3 ± 22.0 个/十倍镜视野 vs. 269.3 ± 12.2 个/十倍镜视野; 392.0 ± 31.7 个/十倍镜视野 vs. 267.3 ± 5.0 个/十倍镜视野); 与 miR-30a-5p+vector 组相比, 在过表达 miR-30a-5p 的基础上, GBC-SD 和 NOZ 细胞转染 E2F7 过表达质粒组穿过小室的细胞数量明显增加 (285.3 ± 12.2 个/十倍镜视野 vs. 408.7 ± 23.9 个/十倍镜视野; 232.0 ± 22.3 个/十倍镜视野 vs. 430.7 ± 34.5 个/十倍镜视野), 差异具有统计学上的显著性意义 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。侵袭实验结果显示: 与 Anti-miR-30a-5p+si-NC 组相比, 在敲减 miR-30a-5p 的基础上, GBC-SD 和 NOZ 细胞转染 E2F7 siRNA 组穿过小室的细胞数量明显减少 (409.3 ± 37.2 个/十倍镜视野 vs. 249.3 ± 32.3 个/十倍镜视野; 317.3 ± 10.1 个/十倍镜视野 vs. 160.0 ± 40.0 个/十倍镜视野); 与 miR-30a-5p+vector 组相比, 在过表达 miR-30a-5p 的基础上, GBC-SD 和 NOZ 细胞转染 E2F7 过表达质粒组穿过小室的细胞数量明显增加 (198.7 ± 14.0 个/十倍镜视野 vs. 438.7 ± 25.4 个/十倍镜视野; 300.3 ± 38.6 个/十倍镜视野 vs. 452.0 ± 39.4 个/十倍镜视野)。差异具有统计学上的显著性意义 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

接下来在划痕实验中检测 E2F7 回复实验对 miR-30a-5p 抑制胆囊癌细胞迁

移能力的影响。如图 3-19 所示, 与 miR-30a-5p+vector 组相比, 在过表达 miR-30a-5p 的基础上, GBC-SD 和 NOZ 细胞转染 E2F7 过表达质粒组的迁移能力明显增强, 细胞移动的距离较长; 与 Anti-miR-30a-5p+si-NC 组相比, 在敲减 miR-30a-5p 的基础上, GBC-SD 和 NOZ 细胞转染 E2F7 siRNA 组的迁移能力明显减弱, 细胞移动的距离较短。

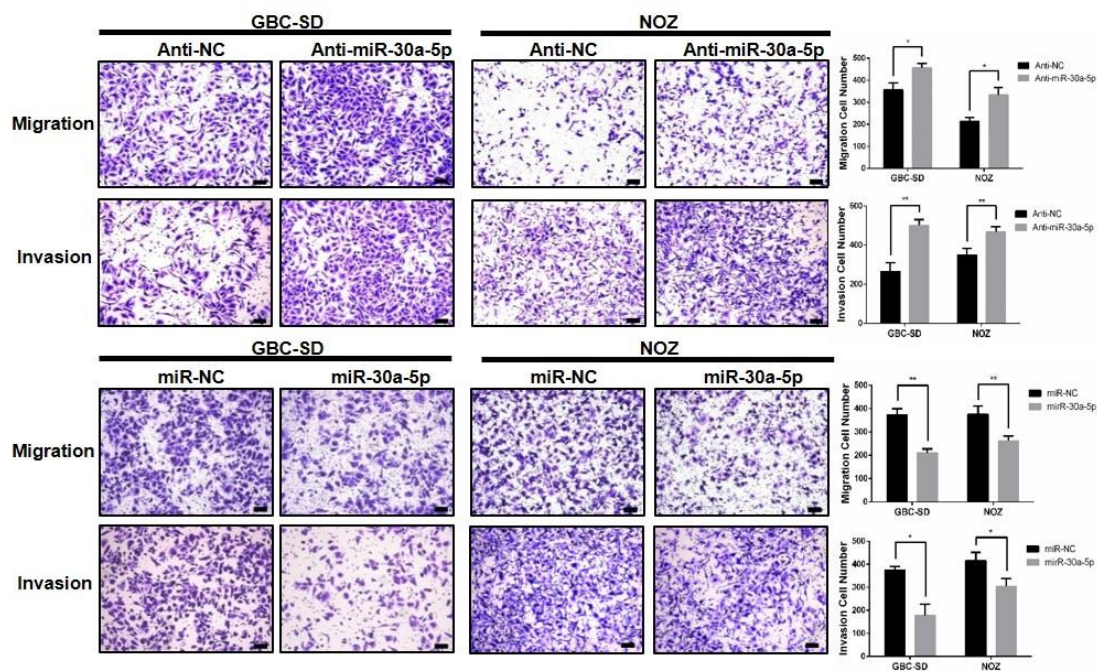


图 3-18 Transwell 实验检测 E2F7 回复 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞侵袭和迁移的抑制作用

Figure 3-18 migration and invasion ability was assayed in GBC cells transfected with miR-30a-5p and E2F7-overexpression vectors or anti-miR-30a-5p and E2F7 siRNA

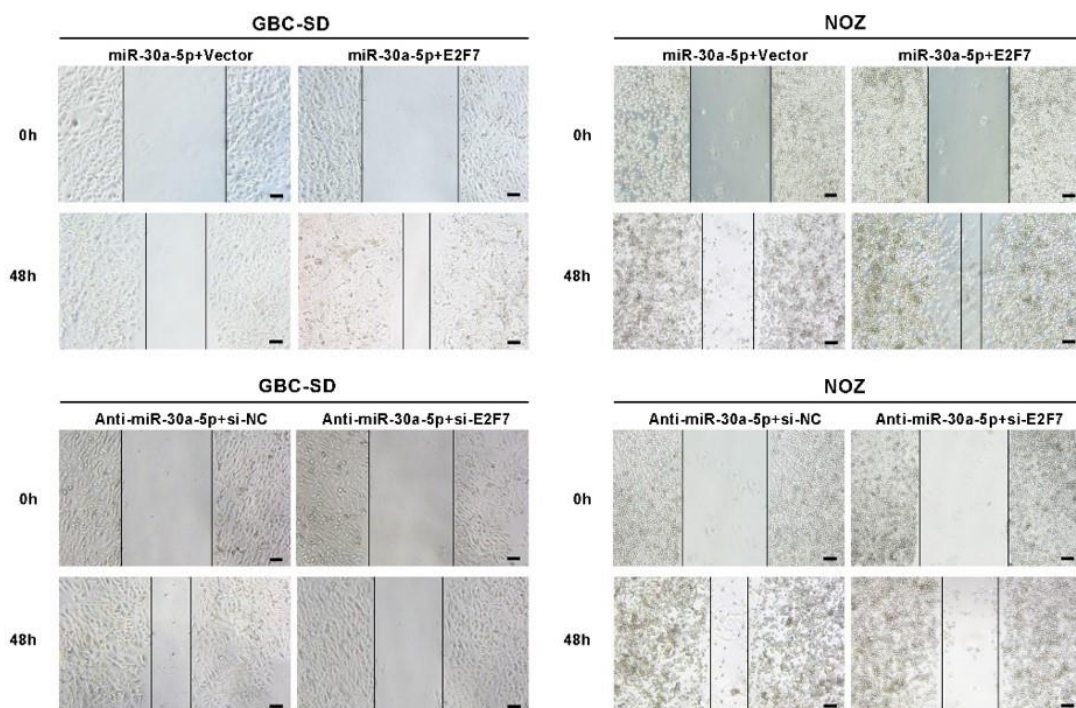


图 3-19 细胞划痕实验检测 E2F7 回复 miR-30a-5p 对胆囊癌细胞迁移的抑制作用

Figure 3-19 wound closure was assayed in GBC cells transfected with miR-30a-5p and E2F7-overexpression vectors or anti-miR-30a-5p and E2F7 siRNA

3.8 miR-30a-5p 通过抑制 E2F7 的表达调控胆囊癌细胞 EMT 的过程

前期实验结果显示 miR-30a-5p 可以抑制上皮间质转化的过程, 促进 E-cadherin 的表达, 抑制 Vimentin 的表达; 而 E2F7 促进上皮向间质转化的过程, 下调 E-cadherin 的表达, 上调 Vimentin 的表达。我们通过回复实验检测 miR-30a-5p 是否可以通过调控 E2F7 来调控 EMT 相关蛋白的表达。如图 3-20 所示, 与单独过表达 miR-30a-5p 相比, 在过表达 miR-30a-5p 的基础上, GBC-SD 和 NOZ 细胞转染 E2F7 过表达质粒后, E-cadherin 表达下调, Vimentin 表达上调; 与单独转染 miR-30a-5p inhibitor 相比, 在敲减 miR-30a-5p 的基础上, GBC-SD 和 NOZ 细胞转染 E2F7 siRNA 组后, E-cadherin 表达上调, Vimentin 表达下调; 而在敲减 miR-30a-5p 基础上再过表达 E2F7 的质粒, 可以发现与单独敲减 miR-30a-5p 相比, E-cadherin 表达下调, Vimentin 表达下调。以上结果说明 miR-30a-5p 可以抑制 E2F7 的表达来调控胆囊癌细胞的 EMT 过程。

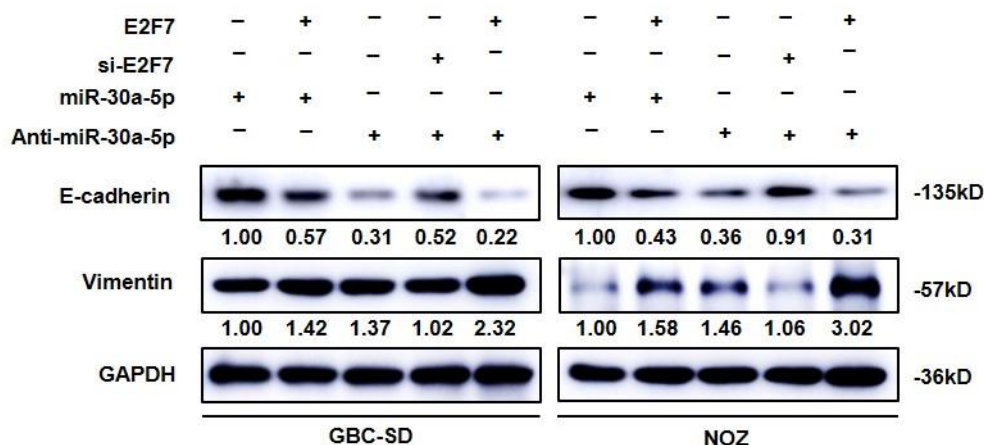


图 3-20 E2F7 回复实验检测 E-cadherin 和 vimentin 的表达变化

Figure 3-20 E-cadherin and vimentin protein expression levels in GBC cells transfected with miR-30a-5p plus E2F7 or anti-miR-30a-5p plus si-E2F7 or anti-miR-30a-5p plus E2F7

4. 讨论

miRNAs 作为一类非编码小RNA分子，参与了肿瘤的多种生物学行为，包括肿瘤血管形成、细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡和肿瘤转移等^[54-57]。miRNAs 发挥生物学作用是通过与靶基因的3'UTR区域的特定序列结合，调节转录后基因表达水平的变化实现的^[58]。目前研究报道已有接近30%的人类基因是可以被 miRNAs 调控的^[59]。结合靶基因网站预测、胆囊癌组织芯片结果和文献调研，我们筛选出7个候选靶基因，之后通过qRT-PCR方法检测过表达miR-30a-5p后候选靶基因表达水平的变化，结果显示E2F7明显表达下调，差异具有统计学上的显著性意义 (** $P < 0.01$)。胆囊癌细胞中过表达和敲减miR-30a-5p后，mRNA和蛋白水平上检测E2F7的变化，发现过表达miR-30a-5p后，E2F7表达下调，而敲减miR-30a-5p后，E2F7表达上调。然后通过双荧光素酶报告基因实验证实E2F7为miR-30a-5p的直接下游靶基因，进行后续研究。

E2F7 隶属E2F家族成员。E2F初次被发现是作为激活E2腺病毒启动子所需的细胞因子，随着哺乳动物中新成员的增加和在其他真核生物中同源基因的发现，E2F家族的转录因子数量明显增加。哺乳动物中E2F家族成员包括E2F1、E2F2、E2F3、E2F4、E2F5、E2F6、E2F7和E2F8，它们之间相互协调复杂的基因调控网络来确保细胞周期、细胞生长和细胞分化的正常运行^[60,61]。以往研究报道E2F家

族成员是调控细胞周期的关键分子，也因此可能调控人类肿瘤的发生发展^[62,63]。在很多人类肿瘤中可以观察到E2F家族成员的扩增，过表达或缺失，其发挥促癌基因或者抑癌基因的作用取决于肿瘤的特异性，但是E2F在肿瘤中的具体作用目前仍不清楚^[64-66]。典型的E2F蛋白（E2F1-6）在二聚化结构域之后紧跟着一个DNA结合域来介导与二聚化伙伴蛋白（DP）的结合。这种二聚化作用使能E2Fs以高亲和力与DNA结合，并起到转录调节因子的作用^[67]。与典型的E2F蛋白相反，非典型的成员E2F7和E2F8中存在两个串联的DNA结合域，而缺少介导RB和DP结合的序列^[68]。

与E2F1-E2F3不同，E2F7被认为是转录的抑制分子。染色质免疫共沉淀测序分析E2F7优先结合到与E2F家族成员共有位点相似的基因位点^[69]。研究报道发现E2F7在肿瘤里面表达异常，可能在肿瘤的发生发展中起到重要作用，其在皮肤鳞状细胞癌、急性髓细胞白血病、横纹肌肉瘤中表达上调，在卵巢癌中表达下调^[70-73]。E2F7和E2F1之间存在着自动反馈回路，两者既相互独立，又可以控制对方的表达和活动。E2F1可以诱导E2F7的转录和表达，E2F7可以抑制E2F1依赖性的细胞凋亡。E2F1/E2F7轴对P53抑癌基因起到类似的作用，两者的相对平衡可以调控细胞的增殖速率和对DNA损伤的反应。以往，E2F7往往被认为是细胞周期进展的负性调节因子，现在有研究表明E2F7也可在作为细胞增殖的促进调节因子发挥作用^[74-77]。

我们的研究结果表明E2F7是miR-30a-5p直接结合的下游靶基因，并且miR-30a-5p至少部分通过抑制E2F7的表达在胆囊癌细胞中发挥其肿瘤抑制作用。然而，就我们所知，目前有关调控E2F7表达的机制知之甚少，E2F7和miR-30a-5p之间的关系在胆囊癌中尚未见报道。之前的研究表明E2F7是参与细胞周期调控，细胞凋亡和细胞分化的启动子。有趣的是，在我们的研究中，我们发现E2F7在胆囊癌中起到肿瘤促进分子的作用，它在9对胆囊癌组织和癌旁组织的基因表达谱芯片中表达上调。42对胆囊癌组织和癌旁组织中qRT-PCR检测E2F7在mRNA水平的表达情况，发现E2F7在胆囊癌组织中表达水平明显高于对应的癌旁组织，差异具有统计学上的显著性意义（ $P=0.009$ ）。细胞功能学实验发现它可以促进胆囊癌细胞的增殖，侵袭和转移，其中对细胞增殖的影响主要是通过E2F7促进细胞

周期G1/S期的转化,这一实验结果与以往部分报道的E2F7抑制细胞周期的功能不一致,但与E2F7在急性髓细胞白血病中对细胞周期的作用一致^[78,71]。因此,E2F7在不同肿瘤发展中的独特作用提示E2F7的肿瘤促进或抑制作用依赖于肿瘤类型的差异。同时我们发现E2F7可以促进胆囊癌细胞的上皮间质转化过程,来促进胆囊癌细胞的侵袭和迁移。回复实验结果显示E2F7还具有拯救胆囊癌中miR-30a-5p抑制的肿瘤细胞增殖、侵袭行为的能力,miR-30a-5p可能主要通过直接结合下游靶基因E2F7的3'UTR区域,调控E2F7基因的mRNA降解和蛋白翻译过程,进而通过抑制细胞周期G1/S期的转换和抑制上皮间质转化过程及 β -catenin的核转位,来实现其调控胆囊癌细胞的增殖和侵袭、迁移能力的作用。

综上所述,我们的研究首次证明了miR-30a-5p在胆囊癌细胞体外和体内实验中可能通过直接靶向E2F7发挥抑制增殖和转移的关键作用。我们的研究结果为胆囊癌发生发展的机制提供了新的视点,并且表明miR-30a-5p可能具有作为胆囊癌的预后生物标志物的潜力。E2F7作为经典的转录因子,可以与基因启动子区域结合,调控下游基因的表达。后续实验值得进一步确定E2F7的潜在靶点,这些靶点可能在不同的肿瘤细胞中差异调节细胞的增殖和迁移。同时有必要进一步揭示E2F7在胆囊癌中发挥促癌作用的具体机制。

5. 小结

1. 结合网站预测、胆囊癌组织基因芯片和文献调研,筛选出E2F7是miR-30a-5p的候选下游靶基因,并通过双荧光素酶报告基因实验进行验证;
2. 与相应的癌旁组织相比,E2F7在胆囊癌组织中表达增高,其表达水平与miR-30a-5p呈负相关;
3. E2F7促进胆囊癌细胞的增殖、迁移能力,在胆囊癌中发挥着促癌的作用;
4. 分析回复实验证实 miR-30a-5p 可通过抑制 E2F7 的表达来抑制胆囊癌细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT 过程。

全文结论

- 1、miR-30a-5p 在 42 对胆囊癌组织中的表达明显低于对应的癌旁组织，且 miR-30a-5p 的表达水平与肿瘤大小及淋巴结转移率相关，miR-30a-5p 低表达组的胆囊癌患者的无病生存率和总生存率更差。
- 2、体内外功能学实验表明 miR-30a-5p 在胆囊癌中起到抑癌的作用，可以通过影响细胞周期抑制胆囊癌细胞的增殖能力，通过影响 EMT 过程和 β -catenin 的核转位抑制胆囊癌细胞的侵袭和迁移；
- 3、双荧光素酶实验证实 E2F7 为 miR-30a-5p 的直接下游靶基因；
- 4、E2F7 在胆囊癌中起到促癌的作用，可以通过影响细胞周期促进胆囊癌细胞的增殖能力，通过影响 EMT 过程促进胆囊癌细胞的迁移；
- 5、miR-30a-5p 可能通过抑制 E2F7 的表达来抑制胆囊癌细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT 过程。

参考文献

1. Misra S, Chaturvedi A, Misra NC, et al. Carcinoma of the gallbladder [J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4(3):167-176.
2. Piehler JM, Crichlow RW. Primary carcinoma of the gallbladder [J]. *Surg Gynecol Obstet*, 1978, 147(6):929-942.
3. Indian Council of Medical Research (ICMR). Annual report of population based cancer registries of the National Cancer Registry Programme (1993) [M]. New Delhi, ICMR Publication, 1996: 18.
4. Misra NC, Chaturvedi A, Ahmad A, et al. Epidemiology, aetiology and chemotherapy of cancer gallbladder with special reference to intrahepatic arterial infusion with mitomycin-c (MMC) and 5-fluorouracil (5 Fu) [J]. *Proceedings of the 5th International Congress on Anti-Cancer Treatment, Paris 1995*: 0-737, 162.
5. Albores-Saavedra J, Alcantra-Vazquez A, Cruz-Ortiz H, et al. The precursor lesions of invasive gallbladder carcinoma: hyperplasia, atypical hyperplasia and carcinoma in situ [J]. *Cancer*, 1980;45: 919-27.
6. Roa I, Araya JC, Villaseca M, et al. Preneoplastic lesions and gallbladder cancer: an estimate of the period required for progression [J]. *Gastroenterology*, 1996; 111: 232-36.
7. Fahim RB, McDonald JR, Richards JC, et al. Carcinoma of the gallbladder: a study of its modes of spread [J]. *Ann Surg*, 1962; 156:114-24.
8. Wang SJ, Lemieux A, Kalpathy-Cramer J, et al. Nomogram for predicting the benefit of adjuvant chemoradiotherapy for resected gallbladder cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29:4627-4632.
9. Lee RC1, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294(5543):862-864.
10. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA [J]. *Science*, 2004, 304:594-596.

11. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12: 861-874.
12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. Cell, 1993, 75:843-854.
13. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C.elegans* [J]. Cell, 1993, 75:855-862.
14. Spizzo R, Nicoloso MS, Croce CM, et al. SnapShot: microRNAs in cancer [J]. Cell, 2009, 137: 586.
15. Boehm M, Slack FJ. MicroRNA control of lifespan and metabolism [J]. Cell Cycle, 2006, 5:837-840.
16. Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs: a developing story [J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15:200-205.
17. Bartel DP . MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116:281-297.
18. Karube Y, Tanaka H, Osada H, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients [J]. Cancer Sci, 2005, 96:111-115.
19. Merritt WM, Lin YG, Han LY, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer [J]. N Engl J Med, 2008, 359:2641-2650.
20. Garzon R , Calin GA , Croce CM . MicroRNAs in cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60:167-179 .
21. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation [J]. Blood, 2006, 108:3646-3653.
22. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are micro-RNA targets [J]. Cell, 2005, 120:15-20.

23. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:12885–12890.
24. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2009, 113:6669–6680.
25. Mendell JT. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy [J]. *Cell Cycle*, 2005, 4:1179–1184.
26. Srivastava K, Srivastava A, Mittal B. Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of gallbladder cancer in North Indian population [J]. *J Hum Genet*, 2010, 55(8):495-499.
27. Shu YJ, Bao RF, Jiang L, et al. MicroRNA-29c-5p suppresses gallbladder carcinoma progression by directly targeting CPEB4 and inhibiting the MAPK pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(3):445-457.
28. Jin YP, Hu YP, Wu XS, et al. miR-143-3p targeting of ITGA6 suppresses tumour growth and angiogenesis by downregulating PLGF expression via the PI3K/AKT pathway in gallbladder carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):182.
29. Yang D, Zhan M, Chen T, et al. miR-125b-5p enhances chemotherapy sensitivity to cisplatin by down-regulating Bcl2 in gallbladder cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:43109.
30. Zhan M, Zhao X, Wang H, et al. miR-145 sensitizes gallbladder cancer to cisplatin by regulating multidrug resistance associated protein 1 [J]. *Tumour Biol* 2016, 37(8): 10553-10562.
31. Qiu Y1, Luo X, Kan T, et al. TGF- β upregulates miR-182 expression to promote gallbladder cancer metastasis by targeting CADM1 [J]. *Mol Biosyst* 2014, 10(3): 679-685.
32. Fu J, Xu X, Kang L, et al. miR-30a suppresses breast cancer cell proliferation and migration by targeting Eya2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(2): 314-319.

33. Chang CW, Yu JC, Hsieh YH, et al. MicroRNA-30a increases tight junction protein expression to suppress the epithelial-mesenchymal transition and metastasis by targeting Slug in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16462-16478.
34. Cheng CW, Wang HW, Chang CW, et al. MicroRNA-30a inhibits cell migration and invasion by downregulating vimentin expression and is a potential prognostic marker in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134(3):1081-1093.
35. Zhang N, Wang X, Huo Q, et al. MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin [J]. *Oncogene*, 2014, 33(24):3119-3128.
36. Zhong M, Bian Z, Wu Z. miR-30a suppresses cell migration and invasion through downregulation of PIK3CD in colorectal carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(2-3):209-218.
37. Liu Z, Tu K, Liu Q. Effects of microRNA-30a on migration, invasion and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17):3089-3097.
38. Kumarswamy R, Mudduluru G, Ceppi P, et al. MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snai1 and is downregulated in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(9):2044-2053.
39. Kao CJ, Martiniez A, Shi XB, et al. miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT [J]. *Oncogene*, 2014, 33(19):2495-2503.
40. Wang Z, Dai X, Chen Y, et al. MiR-30a-5p is induced by Wnt/ β -catenin pathway and promotes glioma cell invasion by repressing NCAM [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(3):374-380.
41. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, et al. Prognostic factors of patients with advanced gallbladder carcinoma following aggressive surgical resection [J]. *J Gastrointest Surg*. 2011, 15(6):1007-1016.
42. Li M, Zhang Z, Li X, et al. Whole-exome and targeted gene sequencing of gallbladder carcinoma identifies recurrent mutations in the ErbB pathway [J]. *Nat Genet*, 2014, 46: 872-876.

43. Lee SJ, Kim JE, Kim ST, et al. The Correlation Between Serum Chemokines and Clinical Outcome in Patients with Advanced Biliary Tract Cancer [J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(2):353-357.
44. Heo MH, Kim HK, Lee H, et al. The Clinical Impact of c-MET Over-Expression in Advanced Biliary Tract Cancer (BTC) [J]. *J Cancer*, 2017, 8(8):1395-1399.
45. Igarashi K, Yamashita K, Katoh H, et al. Prognostic significance of promoter DNA hypermethylation of the cysteine dioxygenase 1 (CDO1) gene in primary gallbladder cancer and gallbladder disease [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11):e0188178.
46. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer [J]. *Theranostics*, 2015, 5: 1122-1143.
47. Kong KL, Kwong DL, Fu L, et al. Characterization of a candidate tumor suppressor gene uroplakin 1A in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70:8832-8841.
48. Cheng CW, Wang HW, Chang CW, et al. MicroRNA-30a inhibits cell migration and invasion by downregulating vimentin expression and is a potential prognostic marker in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134(3):1081-1093.
49. Park YR, Kim SL, Lee MR, et al. MicroRNA-30a-5p (miR-30a) regulates cell motility and EMT by directly targeting oncogenic TM4SF1 in colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(10):1915-1927.
50. Wen XP, Ma HL, Zhao LY, et al. MiR-30a suppresses non-small cell lung cancer progression through AKT signaling pathway by targeting IGF1R [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2015, 61(2):78-85.
51. Baraniskin A, Birkenkamp-Demtroder K, Maghnouj A, et al. MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL [J]. *Carcinogenesis*. 2012, 33(4):732-739.
52. Ambros V1. microRNAs: tiny regulators with great potential [J]. *Cell*, 2001, 107(7): 823-826.

53. Ke XS, Liu CM, Liu DP, et al. MicroRNAs: key participants in gene regulatory networks [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(4):516-523.
54. Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16:R106-113.
55. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11):857-866.
56. Li L, Xu QH, Dong YH, et al. MiR-181a upregulation is associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and multidrug resistance (MDR) of ovarian cancer cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(10):2004-2010.
57. Shah MY, Calin GA. MicroRNAs as therapeutic targets in human cancers [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014, 5(4):537-548.
58. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms [J]? *Trends Cell Biol*, 2007, 17(3):118-126.
59. Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNAs in cancer [J]. *Yale J Biol Med*, 2006, 79(3-4):131-140.
60. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(8):518-528.
61. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11):785-797.
62. DeGregori J, Johnson DG. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis [J]. *Curr Mol Med*. 2006, 6(7):739-748.
63. Krek W, Livingston DM, Shirodkar S. Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members [J]. *Science*, 1993, 262(5139):1557-1560.
64. Johnson DG, DeGregori J. Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(7):731-738.

65. DeGregori J, Johnson DG. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(7):739-748.
66. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11):785-797.
67. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces [J]. *Oncogene*, 2005, 24(17):2810-2826.
68. Lammens T, Li J, Leone G, et al. Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family [J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(3):111-118.
69. Westendorp B, Mokry M, Groot Koerkamp MJ, et al. E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(8):3511-3523.
70. Endo-Munoz L, Dahler A, Teakle N, et al. E2F7 can regulate proliferation, differentiation, and apoptotic responses in human keratinocytes: implications for cutaneous squamous cell carcinoma formation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(5):1800-1808.
71. Salvatori B, Iosue I, Mangiavacchi A, et al. The microRNA-26a target E2F7 sustains cell proliferation and inhibits monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3:e413.
72. Li L, Sarver AL, Alamgir S, et al. Downregulation of microRNAs miR-1, -206 and -29 stabilizes PAX3 and CCND2 expression in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest* [J]. 2012, 92(4):571-583.
73. Reimer D, Sadr S, Wiedemair A, et al. Clinical relevance of E2F family members in ovarian cancer--an evaluation in a training set of 77 patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(1):144-151.
74. Deng Q, Wang Q, Zong WY, et al. E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2):782-791.

75. Sozzani R, Maggio C, Giordo R, et al. The E2FD/DEL2 factor is a component of a regulatory network controlling cell proliferation and development in Arabidopsis [J]. Plant Mol Biol, 2010, 72(4-5):381-395.
76. Hazar-Rethinam M, Cameron SR, Dahler AL, et al. Loss of E2F7 expression is an early event in squamous differentiation and causes derepression of the key differentiation activator Sp1 [J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(5):1077-1084.
77. Sirma H, Kumar M, Meena JK, et al. The promoter of human telomerase reverse transcriptase is activated during liver regeneration and hepatocyte proliferation. Gastroenterology [J]. 2011, 141(1):326-337.
78. Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes [J]. EMBO J, 2003, 22(23): 6289-6298.