

中文摘要

EGR1/MGMT 对 H1299-p53-R273H 细胞发生 EMT 的影响及其机制研究

研究背景

肺癌的发病率在许多国家都呈明显增高趋势，死亡率约占癌症死亡总数的 18.0%。最近越来越多的研究表明上皮细胞-间充质转化（EMT）在增强肺癌细胞的侵袭和转移方面起关键作用。在肺癌进展领域，突变型 p53 作为一个重要的转录因子，可以引发侵袭性支气管上皮细胞的 EMT。有研究表明 p53-R273H 突变下调 KLF6 和 E-cadherin，从而促进细胞迁移和肿瘤转移。在胰腺导管腺癌细胞中，观察到 p53-R273H 突变体与 SQSTM1/p62 相互作用，以 p62 依赖的方式促进癌症细胞迁移和侵袭。早期生长反应因子-1（EGR1）参与细胞增殖、分化和凋亡的调节，与肿瘤的发生和发展密切相关。O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶（MGMT）的阳性表达与肺癌的发生发展相关。有研究表明 p53 与 EGR1 以及 MGMT 的表达存在相关性，但具体机制尚未阐明。p53 尤其是其突变体是否可以通过调控 EGR1 或 MGMT 影响肺癌细胞的 EMT 进程，影响辐射对肺癌细胞的损伤作用，其内在机制也有待进一步探究。

研究目的

通过在 p53 基因缺失的 H1299 细胞中构建稳定表达 p53-R273H 的细胞模型，观察 p53-R273H 突变对 H1299 细胞迁移、侵袭能力和 EMT 表型的影响；观察稳定表达 p53-R273H 的 H1299 细胞中 EGR1 和 MGMT 的变化及 p53-R273H 与 EGR1 和 MGMT 的调控关系，探讨 H1299-p53-R273H 中 EGR1/MGMT 对 EMT 的影响及作用机制。

研究方法

1. 采用慢病毒质粒转染方法，构建 H1299-p53-Vector、H1299-p53-WT、H1299-p53-R273H 细胞模型。
2. 采用划痕实验，观察 H1299-p53-R273H 迁移能力变化；观察 H1299-p53-R273H 敲低 EGR1 后迁移能力变化；观察 H1299-p53-R273H 在 6 Gy

照射后迁移能力变化；观察 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后敲低 EGR1 后迁移能力变化。

3. 采用 Transwell 实验，观察 H1299-p53-R273H 侵袭能力变化；观察 H1299-p53-R273H 敲低 EGR1 后侵袭能力变化；观察 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后侵袭能力变化；观察 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后敲低 EGR1 后侵袭能力变化。

4. 采用瞬时转染实验，在 H1299-p53-R273H 瞬转 siEGR1；H1299-p53-R273H 细胞在 6 Gy 照射后瞬转 siEGR1。

5. 采用 qPCR 实验，检测转染 p53 质粒后 EGR1 和 MGMT 的 mRNA 表达水平；检测 H1299-p53-R273H 瞬转 siEGR1 后，EGR1 的 mRNA 表达水平；检测 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后 EGR1 的 mRNA 表达水平；检测 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后敲低 EGR1 后 EGR1 的 mRNA 表达水平。

6. 采用 Western Blot 实验，检测转染不同 p53 质粒后 p53、EGR1 和 MGMT 的蛋白表达水平；检测 H1299-p53-R273H 敲低 EGR1 后，EGR1 及 EMT 相关基因的蛋白表达水平；检测 H1299-p53-R273H 使用 MGMT 抑制剂后，MGMT 及 EMT 相关基因的蛋白表达水平；检测 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后 EGR1 的蛋白表达水平；检测 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后敲低 EGR1 及 EMT 相关基因的蛋白表达水平。

7. 采用免疫荧光实验，检测转染不同 p53 质粒后 EMT 相关基因的蛋白表达变化；检测 H1299-p53-R273H 敲低 EGR1 后 EMT 相关基因的蛋白表达变化；检测 H1299-p53-R273H 抑制 MGMT 后 EMT 相关基因的蛋白表达变化；检测 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后 EMT 相关基因的蛋白表达变化；检测 H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射后敲低 EGR1 后 EMT 相关基因的蛋白表达变化。

8. 采用 CHIP-qPCR 实验，检测 p53-R273H 与 EGR1 或 MGMT 启动子区域结合情况。

研究结果

1. p53-R273H 对 H1299 细胞的细胞表型的影响

利用慢病毒转染法构建 H1299-p53-R273H 细胞模型，结果显示转染成功的细胞发出绿色荧光；Western Blot 实验结果显示，相较于 p53-Vector 组，p53-R273H

组 p53 蛋白表达升高 ($P<0.001$)；细胞划痕实验和 Transwell 实验结果显示，处理 48 h 后相较于 p53-Vector 组，p53-R273H 组细胞迁移、侵袭能力更强；Western Blot 结果显示，相较于 p53-Vector 组，p53-R273H 组中 N-cadherin、Vimentin、Snail 表达升高，E-cadherin 表达降低 ($P<0.05$)；免疫荧光染色结果显示 EMT 相关蛋白有类似结果。

2. p53-R273H 对 H1299 细胞 EGR1/MGMT 表达的影响

Western Blot 和 qPCR 实验结果显示，相较于 p53-Vector 组，在 H1299-p53-R273H 中 EGR1 蛋白表达最高 ($P<0.001$)，mRNA 表达最高 ($P<0.01$)；Western Blot 结果显示，相较于 p53-Vector 组，在 H1299-p53-R273H 中 MGMT 蛋白表达最高 ($P<0.01$)。

3. 敲低 EGR1 后对 H1299-p53-R273H 迁移、侵袭和 EMT 的影响

qPCR 和 Western Blot 结果显示，与 p53-R273H-NC 组相比，p53-R273H-siEGR1 组的 EGR1 mRNA 和蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)，EGR1 细胞敲低模型建立成功；划痕实验和 Transwell 实验结果显示，与 p53-R273H-NC 组相比，p53-R273H-siEGR1 组的细胞迁移、侵袭能力无明显变化；Western Blot 结果显示，相较于 p53-R273H-NC 组，p53-R273H-siEGR1 组中 N-cadherin、Vimentin、Snail 表达降低，E-cadherin 表达升高 ($P<0.05$)；免疫荧光染色结果显示 EMT 相关蛋白有类似结果。

4. 在 H1299-p53-R273H 中抑制 MGMT 对 EMT 的影响

Western Blot 结果显示，随着 MGMT 抑制剂 Lomeguartrib 浓度增加，MGMT 蛋白表达逐渐降低；相较于 H1299-p53-R273H 组，抑制剂为 1 μ M 和 10 μ M 组中 N-cadherin、Vimentin、Snail 表达降低，E-cadherin 表达升高 ($P<0.05$)。

5. X 射线照射促进 H1299-p53-R273H 迁移、侵袭和 EMT

划痕实验和 Transwell 实验显示，H1299-p53-R273H 在 6 Gy 照射条件下，处理 48 h 后照射组比非照射组迁移、侵袭能力增强；Western Blot 结果显示，相较于非照射组，照射组中 N-cadherin、Vimentin、Snail 表达升高，E-cadherin 表达降低；免疫荧光结果显示 EMT 相关蛋白有类似结果；在实验过程中同时检测了 H1299-p53-R273H 细胞经过 6 Gy 照射后，与非照射组相比，EGR1 mRNA 表达升高 ($P<0.001$)，蛋白表达升高 ($P<0.01$)。

6. X 射线照射后敲低 EGR1 对 H1299-p53-R273H 迁移、侵袭和 EMT 的影响

6 Gy 照射后在 H1299-p53-R273H 中转染 siEGR1, qPCR 和 Western Blot 结果显示, 与 p53-R273H-NC 组相比, p53-R273H-siEGR1 组的 EGR1 基因 mRNA 和蛋白表达水平降低, 表明 EGR1 细胞敲低模型建立成功; 划痕实验和 Transwell 实验结果显示, 与 p53-R273H-NC 组相比, p53-R273H-siEGR1 组的细胞迁移、侵袭能力无明显变化; Western Blot 结果显示, 相较于 p53-R273H-NC 组, p53-R273H-siEGR1 组中 N-cadherin、Vimentin、Snail 表达降低, E-cadherin 表达升高; 免疫荧光结果显示, EMT 相关蛋白有类似结果。

7. p53-R273H 对 EGR1/MGMT 的靶向调控作用

CHIP-qPCR 实验结果显示, 与 p53-Vector 组相比, p53-R273H 组与 EGR1 启动子区域有结合 ($P<0.05$); 与 p53-Vector 组相比, p53-R273H 组与 MGMT 启动子区域的结合较多 ($P<0.05$)。

研究结论

1. p53-R273H 提高 H1299 细胞的迁移和侵袭能力。
2. p53-R273H 可以通过与 EGR1 或 MGMT 的启动子区域结合, 从而促进 H1299 细胞的 EMT 进程, 增加细胞的迁移和侵袭能力。
3. X 射线照射可以通过影响 EGR1 促进 H1299-p53-R273H 细胞的 EMT 进程, 增加细胞的迁移和侵袭能力。

关键词:

肺癌, p53-R273H, 上皮细胞-间充质转化, EGR1, MGMT

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
LUAD	Lung adenocarcinoma	肺腺癌
NSCLC	Non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
LUSC	Lung squamous cell carcinoma	肺鳞状细胞癌
EMT	Emergency medical technician	上皮细胞-间充质转化
EGR1	Early growth responsive gene-1	早期生长反应因子-1
DNA	Deoxyribo nucleic acid	脱氧核糖核酸
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链式反 应
WB	Western blot	蛋白免疫印迹
NC	negative control	阴性对照
CHIP	chromatin immunoprecipitation	染色质免疫沉淀
Gy	Gray	戈瑞
FBS	Fatal bovine serum	胎牛血清
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲溶液
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	高糖细胞培养基

目 录

第 1 章 绪 论	1
1.1 肺癌的概述	1
1.1.1 肺癌的临床表现	1
1.1.2 肺癌的治疗	1
1.1.3 肺癌的预后	2
1.2 EMT 和肿瘤	3
1.2.1 EMT 的概述	3
1.2.2 EMT 在癌症中的作用	4
1.3 p53 与肿瘤	4
1.3.1 p53 的概述	4
1.3.2 突变型 p53 在癌症中的作用	5
1.4 EGR1 与肿瘤	6
1.4.1 EGR1 的概述	6
1.4.2 EGR1 在癌症中的作用	6
1.5 MGMT 与肿瘤	7
1.6 立题依据	8
第 2 章 材料与方法	10
2.1 主要实验材料与器材	10
2.2 试剂配制	14
2.3 细胞培养	15

2.4	构建稳定转染 p53 细胞模型	17
2.5	构建瞬时转染 siEGR1 细胞模型	21
2.6	划痕实验	21
2.7	Transwell 实验	22
2.8	转录水平检测	22
2.9	Western Blot (蛋白印迹)	25
2.10	免疫荧光实验 (Immunofluorescence, IF)	27
2.11	CHIP-qPCR 实验	28
2.12	统计学分析	34
第 3 章	实验结果	35
3.1	p53-R273H 对 H1299 细胞表型的影响	35
3.1.1	构建 H1299-p53-R273H 细胞模型	35
3.1.2	H1299-p53-R273H 细胞迁移和侵袭能力的变化	36
3.1.3	H1299-p53-R273H 细胞中 EMT 相关蛋白表达的变化	36
3.2	p53-R273H 对 H1299 细胞 EGR1/MGMT 表达的影响	38
3.2.1	H1299-p53-R273H 中 EGR1 表达变化	38
3.2.2	H1299-p53-R273H 中 MGMT 表达变化	38
3.3	敲低 EGR1 后对 H1299-p53-R273H 迁移、侵袭和 EMT 的影响	39
3.3.1	H1299-p53-R273H 敲低 EGR1 验证	39
3.3.2	敲低 EGR1 后减弱 H1299-p53-R273H 迁移和侵袭能力	39

3.3.3	敲低 EGR1 后抑制 H1299-p53-R273H 的 EMT 相关蛋白表达.....	40
3.4	在 H1299-p53-R273H 中抑制 MGMT 对 EMT 的影响.....	41
3.5	X 射线照射促进 H1299-p53-R273H 迁移、侵袭和 EMT	42
3.5.1	X 射线照射提高 H1299-p53-R273H 迁移和侵袭能力 .	42
3.5.2	X 射线照射促进 H1299-p53-R273H 的 EMT 进程.....	43
3.5.3	X 射线照射提高 H1299-p53-R273H 的 EGR1 表达	44
3.6	X 射线照射后敲低 EGR1 对 H1299-p53-R273H 迁移、侵袭和 EMT 的影响.....	45
3.6.1	X 射线照射后在 H1299-p53-R273H 中敲低 EGR1 验证	45
3.6.2	X 射线照射后敲低 EGR1 后 H1299-p53-R273H 迁移和侵袭能力减弱.....	46
3.6.3	X 射线照射后敲低 EGR1 阻止 H1299-p53-R273H 的 EMT 进程.....	46
3.7	p53-R273H 对 EGR1/MGMT 的靶向调控作用.....	48
3.7.1	p53-R273H 对 EGR1 的靶向调控作用.....	48
3.7.2	p53-R273H 对 MGMT 的靶向调控作用.....	49
第 4 章	讨 论.....	51
4.1	p53-R273H 突变对肿瘤的影响.....	51
4.1.1	p53-R273H 突变与肿瘤细胞的迁移侵袭.....	51
4.1.2	p53 突变体与 EMT.....	52

4.2 EGR1 在肿瘤发生中的作用	53
4.2.1 EGR1 与肿瘤细胞的迁移侵袭	53
4.2.2 EGR1 基因与 EMT 的关系	54
4.3 MGMT 与肿瘤	54
4.4 EMT 表达调控机制	55
第 5 章 结 论	58
5.1 结论	58
5.2 创新性	58
5.3 局限性与展望	58
参考文献	59
作者简介及在学期间所取得的科研成果	72
致 谢	73

第1章 绪论

1.1 肺癌的概述

肺癌是一种起源于支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤，其发病率在许多国家都呈明显增高的趋势，死亡率约占癌症死亡总数的 18.0%^[1,2]。从病理学分型来看，肺癌主要分为非小细胞肺癌（NSCLC）和小细胞肺癌（SCLC）两大类。其中，SCLC 是大多由吸烟引发，占据了所有原发性肺癌的 15-20%。NSCLC 则进一步细分为肺腺癌（LUAD）、肺鳞状细胞癌（LUSC）、大细胞癌（LCLC）和支气管类癌等多种亚型，这些亚型约占肺癌总诊断的 80-85%^[3]。在 NSCLC 中，肺腺癌是最常见的亚型，同时也是最常见的原发性肺肿瘤，其次则是鳞状细胞癌^[4]。

1.1.1 肺癌的临床表现

肺癌的临床表现呈现多样化，其特异性受到肿瘤大小、位置、发展阶段以及邻近器官侵犯或远处转移的影响。刺激性干咳是最常见的症状，通常伴随咳痰。当肿瘤导致支气管狭窄时，咳嗽可能恶化并呈现金属音。咳痰中偶尔可见血丝或血块，这主要是由于肿瘤表面血管破裂所致。当肿瘤侵犯胸壁或胸膜时，可能导致持续性的钝痛或刺痛。随着肿瘤的发展，支气管阻塞、肺不张或胸腔积液可能会引发呼吸困难^[5]。此外，部分肺癌患者可能出现原因不明的发热，这可能与肿瘤坏死引起的吸收热或肿瘤释放的炎性介质有关。在肺癌的晚期阶段，由于肿瘤消耗和患者食欲的下降，可能会出现明显的体重减轻和恶病质。根据肿瘤的位置和转移情况，患者还可能表现出其他症状，如声音嘶哑（由于喉返神经受压）、上腔静脉综合征（由上腔静脉受压导致）和吞咽困难（食管受压）等^[6]。

1.1.2 肺癌的治疗

早期且病灶小的非小细胞肺癌患者通常可以通过手术治疗获得较好的治疗效果，但对于中晚期非小细胞肺癌患者且病灶大的老年患者，手术治疗通常不是首选，而是采用化学药物治疗、放射疗法、靶向药物治疗、介入治疗、微波消融治疗、干细胞移植治疗和免疫治疗等多种手段^[6-8]。据报道，高达 77% 的肺癌患者在癌症的某个阶段需要接受放射治疗。与常规放疗相比，立体定向消融放射治

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/388042123112006141>