学校代码：10285

学 号：20135232119



万方数据

硕士学位论文

（专业学位）



|  |  |
| --- | --- |
| BNIP3 在胰腺癌中的表达及调控凋亡的 | |
|  | 作用和机制 |
| Effect and mechanism of BNIP3 regulating apoptosis | |
| in pancreatic cancer | |
| 研 究 Th 姓 名 | 张旭 |
| 指导教师姓名 | 李德春 |
| 专 业 名 称 | 外科学（普外科） |
| 研 究 方 向 | 胰腺疾病的基础和临床 |
| 所 在 院 部 | 苏州大学附属第一医院 |
| 论文提交日期 | 2016 年 5 月 |

万方数据

万方数据

BNIP3 在胰腺癌中的表达及调控凋亡的作用和机制中文摘要

**目的**：Bcl-2/腺病毒E1B19kDa结合蛋白3（BNIP3）是Bcl-2蛋白家族BH3-only亚家族的非典型成员，尽管研究表明BNIP3作为缺氧诱导因子的靶基因在多种疾病过程中承担着重要的角色，比如心肌缺血，细胞自噬，细胞凋亡，但是关于BNIP3功能不同的研究往往得出相互矛盾的结果。本实验旨在探讨BNIP3在胰腺癌组织标本中的表达及其临床意义，研究BNIP3在胰腺癌细胞株中的表达及其调控胰腺癌细胞凋亡的作用和机制。

**方法**：(1)利用免疫荧光（IF）及免疫组织化学法（IHC）检测 BNIP3 在 70 对胰腺癌组织和相应癌旁组织中的定位及表达，并分析 BNIP3 的表达与临床病理因素、其他凋亡相关蛋白及肿瘤凋亡及增殖的关系；(2)利用逆转录聚合酶联反应（RT-PCR） 和 Western blot 检测 BNIP3 在胰腺癌细胞株 PANC-1, BxPc-3, CaPan-1, SW1990、CFPAC-1、Patu- 8988 中的表达情况，分别用 siRNA-BNIP3 转染胰腺癌细胞株靶向沉默 BNIP3 的表达，用 BNIP3 全基因质粒载体转染胰腺癌细胞株上调其表达，利用RT-PCR 和 Western blot 确认 RNAi 靶向沉默及质粒过表达 BNIP3 的效果；（3）沉默

BNIP3 及上调其表达后，利用细胞凋亡检测、线粒体膜电位检测，细胞活性氧检测， Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达，研究 BNIP3 调控胰腺癌细胞凋亡的作用及机制；（4）利用甲基化 PCR 检测 6 株胰腺癌细胞的甲基化状态，去甲基化药物处理细胞，分析 BNIP3 甲基化和其表达的相关性；（5）利用 CHIP 实验分析 BNIP3 甲基化对缺氧诱导因子和其启动子区结合的影响。

**结果：**(1)BNIP3 在胰腺癌组织中的阳性率明显低于癌旁组织，且两者的差异有统计学意义（χ2=19.457，*P*<0.001），两者阳性表达率分别为 35.7%和 72.9%；BNIP3 的表达与临床病理因素的分析结果显示，BNIP3 的低表达与肿瘤大小、肿瘤分期及淋巴结转移密切相关，差异有统计学意义(*P*<0.05)，而与性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤分级无明显相关，差异无统计学意义(*P*>0.05)。胰腺癌组织中 BNIP3 的表达和促凋亡蛋白表达 Bax 正相关，和抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达负相关，其低表达与肿瘤细胞增殖活

I

跃、凋亡减少有关；（2）RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示，常氧条件下 BNIP3 的 mRNA 和蛋白水平在六株胰腺癌细胞株中除一株低表达外，其余的 5 株均表达沉默，且缺氧条件培养并未诱导其表达。(3)通过上调及下调 BNIP3 表达发现 BNIP3 可以调控线粒体途径相关凋亡蛋白的表达，和诱导细胞活性氧的产生、线粒体膜电位的下降及细胞凋亡。（4）甲基化 PCR 检测证实 BNIP3 启动子区的高甲基化和其在胰腺癌中的低表达密切相关，BNIP3 启动子区的甲基化影响了缺氧诱导因子 HIF-1α 和其启动子区缺氧反应元件的结合。

**结论**：BNIP3在胰腺癌组织中低表达，BNIP3的低表达与肿瘤大小、肿瘤分期、淋巴结转移密切相关。在体外实验中BNIP3启动子区的高甲基化抑制了HIF-1α 和

BNIP3的结合并使其表达沉默，进而为胰腺癌细胞逃避BNIP3诱导的线粒体途径促进细胞凋亡作用提供了条件。由实验结果可以推断，恢复胰腺癌中BNIP3的表达则可以增强肿瘤细胞对缺氧诱导凋亡的敏感性，有望成为潜在的治疗靶点。

**关键词**：BNIP3； 甲基化； 胰腺癌； 凋亡

作者：张旭

指导教师：李德春教授

II

**Effect and mechanism of BNIP3 regulating apoptosis in pancreatic cancer**

**Abstract**

**Objective:** Hypoxia plays an important role in tumorigenesis and tumor cells take advantage of responses to survival through hypoxia-inducible genes. Bcl-2 nineteen-kilodalton interacting protein 3 (BNIP3) was found to be involved in various cellular processes and considered as a key regulator of hypoxia-induced cell apoptosis. However, the function of BNIP3 in pancreatic cancer has not yet been fully elucidated.

**Methods:** (1) Immunohistochemistry was used to assess the expression of BNIP3 in 70 pairs of pancreatic cancer tissues and adjacent pancreatic tissues, and its correlation with clinicopathological features of pancreatic cancer was also analyzed, (2) investigated the expression of BNIP3 and HIF-1α in six pancreatic cancer cell lines under normoxic and hypoxic condition by western blot. (3) Then we observed the change of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (∆Ψm) and apoptosis associated proteins after regulating the expression of BNIP3 in pancreatic cancer cells. (4) Finally, we investigated the relationship of methylation and the expression of BNIP3, as well as whether methylation could suppress the binding capacity of HIF-1αto BNIP3 promoter by ChIP assay.

**Results:** (1) BNIP3 positive rate of pancreatic cancer was 35.7% and 72.9% in adjacent tissues(*P* <0.05), the positive rate of BNIP3 in tumor tissues was lower than in nontumorous tissues. The analysis of correlation between BNIP3 expression and clinicopathologic factors of pancreatic carcinoma shows that BNIP3 expression was strongly correlated with tumor size, clinical stage, lymph node metastasis(*P* <0.05), but did not show association with gender, age and tumor location, differentiation, vascular invasion at a statistically level(*P*> 0.05). (2) In contrast to HIF-1αexpression, we found that hypoxia treatment had no effect to enhance the expression of BNIP3 in pancreatic cancer cells. Our results indicated that reintroduction of BNIP3 by transfection into pancreatic cancer cells caused loss of∆Ψm, increased ROS production and finally irreversible cell apoptosis. The opposite effect was shown in silencing of BNIP3 by RNAi. (3) Then we confirmed that absence of BNIP3 in pancreatic cancer cells was related to the methylation of the gene, and demethylation by Aza-dC restored BNIP3 expression and

III

Sensitized pancreatic cancer cells to BNIP3-induced cell apoptosis. (4) Finally, the ChIP assay showed methylation suppressed HIF-1α binding to BNIP3 promoter.

**Conclusion:** Our findings indicated that BNIP3 acted as a pro-apoptotic protein in pancreatic cancer cells that might induce cell apoptosis through a mitochondrial pathway. Loss of BNIP3 expression was associated with methylation of HRE site impacted HIF-1αbinding to BNIP3 promoter. These observations implied that BNIP3 reactivation might be a potential target in therapeutic applications for pancreatic cancer.

**Key words:** BNIP3; Pancreatic carcinoma; Apoptosis

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Written | by | Xu Zhang |
| Supervised | by | DeChun Li |

IV

目 录

**[Abstract](#_Toc686856913)** 6

[前言](#_Toc686856914) 8

[参考文献](#_Toc686856915) 8

[第一部分 BNIP3在胰腺癌中的的表达及临床意义](#_Toc686856916) 9

[结 论](#_Toc686856917) 17

[参考文献](#_Toc686856918) 18

[第二部分 人胰腺癌细胞中BNIP3调控凋亡的作用及机制](#_Toc686856919) 18

[结 论](#_Toc686856920) 28

[参考文献](#_Toc686856921) 28

[总结：](#_Toc686856922) 32

[参考文献](#_Toc686856923) 32

前言

胰腺癌是一种恶性程度高，临床表现隐匿，确诊时往往已处于晚期，对治疗不敏感，预后差、致死率高的消化系统恶性肿瘤[1]。在世界范围内，胰腺癌的发病率为1-10/10万人，发达国家和地区的胰腺癌发病率高于欠发达地区[2]。据世界范围内统计，胰腺癌死亡率占男性恶性肿瘤死亡率的第八位，占女性恶性肿瘤死亡率的第九位。

2014年最新统计数据显示，美国胰腺癌新发估计病例数，男性居第10位，女性居第9位，占恶性肿瘤死亡率的第4位[3]。据《2013年中国肿瘤登记年报》统计，胰腺癌位居我国男性恶性肿瘤发病率的第8位，人群恶性肿瘤死亡率的第7位，全球范围内均呈快速上升趋势。目前手术切除是可能根治胰腺癌的唯一方法，而对原发肿瘤和涉及的局部血管情况包括腹腔动脉，肠系膜上动静脉，门静脉和肝动脉关系的评估对决定手术的可切除性至关重要[4]。然而，由于目前尚缺乏早期诊断手段，70％～80％患者确诊时已经出现局部侵犯及远处转移而失去手术时机[5]，只有约15-20%的患者最终可以接受外科手术治疗，而这些接受手术的患者仍然有很多检测出切缘显微阳性[6]。尽管近年来对胰腺癌的研究在基础和临床方面均取得了一定进展，但是临床实践中发现胰腺癌治疗在过去10年中并未有明显的提高，预后依然严峻。对于已经确诊胰腺癌的患者其中位生存年龄小于6个月，5年生存率不足5%[7]。随着癌基因、抑癌基因、细胞因子研究的深入及分子生物学研究手段的进步，基因检测及靶向治疗已向传统的肿瘤诊断、治疗方法提出挑战并日益体现出巨大的应用前景。寻找胰腺癌新的基因治疗靶点已成为近些年的研究热点。

随着肿瘤分子生物学研究的不断深入，人们越来越认识到细胞凋亡紊乱在肿瘤发生、发展过程中的重要作用。细胞凋亡即程序性的细胞死亡，是由细胞控制的有序的死亡。细胞凋亡减少可引起肿瘤的发生，细胞逃避凋亡而促进肿瘤细胞的恶化及演进

[8]. 细胞凋亡不仅在肿瘤发生和发展中有重要意义，而且亦是肿瘤治疗的基础，放化疗和生物治疗都主要是通过诱导凋亡来治疗肿瘤[9]。细胞凋亡是由多基因严格控制的精细而复杂的过程。这些基因在种属之间非常保守，如Bcl-2家族，caspase家族、癌基因如C-myc、抑癌基因P53等。BNIP3（Bcl-2/腺病毒E1B19kDa结合蛋白3）属于Bcl-2家族蛋白中的BH3-only亚家族，具有BH3结构域和TM跨膜结构区，其结构、细

1

胞内定位、对细胞生存的调控与BH3-only亚家族的其他蛋白不尽相同。BNIP3主要分布于内质网(ER)和线粒体，其在细胞内的位置决定细胞死亡的方式[10]。BNIP3可通过BH3结构域与抗凋亡蛋白形成异二聚体，抑制后者的抗凋亡功能，从而介导细胞死亡；C末端TM区也具有同源二聚化，是发挥线粒体定位和细胞凋亡所必需的[11]。

BNIP3的BH3结构域还可与抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-xl形成异二聚体，变构激活促凋亡蛋白Bax和Bak，从而发挥促凋亡作用[12]。除细胞凋亡外，BNIP3还可以诱导细胞自噬。在实体肿瘤中普遍存在缺氧现象，缺氧条件下，促凋亡因子和抗凋亡因子之间存在错综复杂的平衡，细胞不断调节以适应环境变化，以致于在反复缺氧后可能形成缺氧抵抗而使肿瘤更具侵袭性，并对治疗的敏感度下降，反而刺激了肿瘤的增殖。缺氧可促进正常组织和肿瘤组织中BNIP3的表达，诱导细胞凋亡，这已在来源于人上皮细胞、癌细胞、巨噬细胞、内皮细胞中得到证实。缺氧诱导因子HIF-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是缺氧时诱导BNIP3表达的主要调节者，正常氧浓度下，HIF-1被降解，反之在低氧条件下稳定表达[13]。缺氧对BNIP3的调节主要发生在转录水平，BNIP3启动子区域包含两个缺氧反应元件（hypoxia-responsive element, HRE）, HIF-1在缺氧条件下可与HRE2紧密结合，刺激BNIP3的表达[14]。胰腺癌和其他实性恶性肿瘤一样，由于肿瘤的快速细胞生长和异常血管结构导致的缺氧微环境伴随着肿瘤的发生发展。

本实验以BNIP3基因的表达调控和胰腺癌缺氧诱导凋亡的关系为切入点，探讨BNIP3在胰腺癌组织标本中的表达及其临床意义，并通过si-RNA沉默、构建质粒载体转染上调BNIP3的表达，在体外实验中进一步研究BNIP3表达对胰腺癌细胞缺氧诱导凋亡的影响，及通过DNA甲基化相关实验研究BNIP3的调控对表达和胰腺癌的影响，为建立以BNIP3为靶点的基因治疗提供理论和实验依据。

参考文献

[1]. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N: Pancreatic adenocarcinoma. *The New England journal of medicine* 2014, 371(11): 1039-1049.

[2]. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011, 61(2): 69-90.

[3]. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 2014, 64(1): 9-29.

[4]. Vauthey JN, Dixon E: AHPBA/SSO/SSAT Consensus Conference on Resectable and

2

Borderline Resectable Pancreatic Cancer: rationale and overview of the conference.

*Annals of surgical oncology* 2009, 16(7):1725-1726.

[5]. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST: Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Gastroenterology* 2008, 134(4): 981-987.

[6]. Konstantinidis IT, Warshaw AL, Allen JN, Blaszkowsky LS, Castillo CF, Deshpande V, Hong TS, Kwak EL, Lauwers GY, Ryan DP, Wargo JA, Lillemoe KD, Ferrone CR: Pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumorsWhatisa" true" R0resection. *Ann Surg* 2013, 257(4): 731-736.

[7]. Mo W, Xu X, Xu L, Wang F, Ke A, Wang X, Guo C: Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell. *Pancreatology* 2011, 11(6): 601-609.

[8]. Lowe SW, Lin AW: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000, 21(3): 485-495.

[9]. Nicholson DW, Thornberry NA: Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 2003, 299(5604): 214-215.

[10]. Zhang L, Li L, Liu H, Borowitz JL, Isom GE: BNIP3 mediates cell death by different pathways following localization to endoplasmic reticulum and mitochondrion. *FASEB J* 2009, 23(10): 3405-3414.

[11]. Quinsay MN, Lee Y, Rikka S, Sayen MR, Molkentin JD, Gottlieb RA, Gustafsson AB: BNIP3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2010, 48(6): 1146-1156.

[12]. Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB: BNIP3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *The Biochemical journal* 2007, 405(3): 407-415.

[13]. 胡珊珊, 张洪典, 陈传贵: BNIP3、HIF-1在食管鳞癌中的表达及其临床病理意义[J]． 中国肿瘤临床, 2013, 40(9): 517- 520．

[14]. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC: Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell* 2010, 40(2): 294-309.

3

# 第一部分 BNIP3在胰腺癌中的的表达及临床意义

胰腺癌是一种发病隐匿，进展迅速，治疗效果及预后极差的消化道恶性肿瘤，由于胰腺癌对化疗、放疗几乎不敏感，并且缺乏合适的靶向治疗目标[1]，根治性手术切除可能是唯一有效治愈的治疗方法，但超过80%的患者在确诊时已处于进展期而无法手术切除，只有15-20%的患者最终可以接受根治术且仍有高局部复发率及远处转移率。尽管近年来对胰腺癌的研究在基础和临床方面均取得进展，但是临床实践中发现胰腺癌治疗在过去10年中并未有明显的提高，预后依然严峻，确诊胰腺癌的患者其中位生存期仍小于6个月，5年生存率仍小于5%[2-4]。因此对胰腺癌发生、发展相关基因尤其是凋亡相关基因的研究有助于为胰腺癌的发病机制的明确及靶向治疗的发展提供帮助。

BNIP3隶属于Bcl-2蛋白超家族的BH3-only亚家族，可与腺病毒转录基因E1B编码的蛋白或Bcl-2蛋白结合[5]。BNIP3可通过BH3结构与抗凋亡蛋白形成异二聚体后发挥促细胞凋亡功能，同时其TM区也具有同源二聚化、线粒体锚定和促细胞凋亡等作用。

TM区位于膜内，具亲水性，其上有一个跨膜脂质双分子通道，可容离子通过。TM缺失会阻止缺氧诱导的细胞死亡[6]。BNIP3基因在缺氧条件下可诱导细胞发生程序性死亡，即细胞凋亡[7, 8]。

本部分实验通过免疫荧光及免疫组化方法检测BNIP3在胰腺癌组织标本中的定位表达情况，分析其表达与临床病理因素的关系。此外，用免疫组化方法检测Ki-67和凋亡相关蛋白在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达水平，TUNEL法检测胰腺癌组织及癌旁组织的凋亡细胞阳性率，并分析BNIP3的表达与Ki-67和凋亡相关蛋白和细胞凋亡之间的相关性。

材料

## 一、 临床资料：

收集2012年1月-2014年12月苏州大学附属第一医院手术切除的胰腺癌标本70

例。其中男42例，女28例，年龄分布在38-73岁，中位年龄62岁。肿瘤组织学分级按WHO2000标准分为高分化、中分化、低分化，临床分期按AJCC2010标准分为

4

I期、II期。取相邻远离肿瘤的癌旁组织作为对照。所有患者术前均未接受任何化、放疗和免疫治疗。无菌条件下切取标本后一部分置于10%中性福尔马林中保存，用于免疫组化，免疫荧光及TUNEL检测。

## 二、 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 鼠抗人BNIP3一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人Bcl-2一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人Bax一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人Cleaved Caspase-3一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人Cleaved Caspase-9一抗 | 英国Abcam公司 |
| 辣根过氧化物酶标记ft羊抗兔IgG抗体 | 碧云天生物技术研究所 |
| 辣根过氧化物酶标记ft羊抗小鼠IgG抗体 | 碧云天生物技术研究所 |
| TUNEL法原位细胞凋亡检测试剂盒 | 武汉博士德生物工程有限 |
| 免疫组化SP试剂盒 | 福建迈新生物公司 |

## 三、 主要仪器

|  |  |
| --- | --- |
| RM2145切片机 | Leica公司 |
| HI1210展片机 | Leica公司 |
| HI1220烤片机 | Leica公司 |
| 离心机 | 德国Eppendorf公司 |
| 倒置相差显微镜 | 日本OLYMPUS公司 |

## 四、 主要溶液的配制

### 1 、10%中性福尔马林（pH=7.0）：40％甲醛水溶液100ml, NaH2PO4 3.5g, Na2HPO4

6.5 g,加dH2O至1000ml。

### 2、 1×PBS缓冲液：氯化钠8.0g，磷酸二氢钾0.24g，磷酸氢二钠1.44g，加ddH2O

800ml，调节PH=7.4，加ddH2O定容至1000ml，高压灭菌后4℃保存。

3、考马斯亮蓝R-250染液：甲醇：水(1: 1, V/V) 900ml，冰乙酸l00ml，混合后加入考马斯亮蓝R-250 1.25g，4℃保存，用前过滤。

5

方法

**一、免疫组织化学**

1、石蜡标本切成4µm厚的切片，将标本进行常规脱蜡、水化，蒸馏水洗5min，重复3次。

2、3% H202孵育10min，以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗5min，重复3次。

3、抗原修复：PBS液浸泡5min，加入抗原修复工作液，置微波炉内95℃3min，停火2min，再高火加热30s，室温自然冷却20分钟。PBS洗5min，重复3次。

4、正常ft羊血清工作液室温封闭，室温孵育20min。

5、弃去血清，滴加一抗工作液，阴性对照加PBS缓冲液，冰箱内4℃过夜。

6、PBS冲洗5min，重复3次。加入二抗工作液，室温孵育2h，PBS冲洗5min，重复3次。

7、加入过氧化物酶标记链霉卵白素工作液室温孵育30min，PBS冲洗5min，重复

### 3 次。

8、DAB显色，反应5min，自来水浸泡终止反应。苏木素复染30s，反蓝15min。脱水透明，中性树脂封片。

9、阳性结果判定标准：用光学显微镜观察免疫组化切片，进行半定量评估，在高倍镜下(400X)对每张切片随机选择5个视野。BNIP3等的阳性判定标准：对每张切片阳性细胞的阳性强度按无着色、弱染色、中到强度染色分别打0、1、2分，着色阳性面积按<10％，10-50％，> 50％分别打0、1、2分，然后根据两项打分乘积判断其结果，分数> 1分为阳性。Ki-67的阳性判定标准：在至少1000个肿瘤细胞中> 15％的细胞着色，并且能看见清楚的染色细胞核定义为阳性。

**二、组织免疫荧光**

1、石蜡切片经脱蜡、梯度酒精脱水后进行抗原修复，然后用0.01 M PBS冲洗

5min×3次；

2、滴加10%正常ft羊血清37℃封闭45min；

3、吸去多余液体，加入含抗BNIP3的一抗（1: 100）湿盒中，37℃孵育1h后置于4℃冰箱中过夜；

6

4、0.01 M PBS冲洗5min×3次；（至下一步开始要适度避光操作，防止荧光淬灭。）

5、在黑暗条件下加入二抗（1: 200）湿盒中，37℃温育避光45 min；

6、在黑暗条件下吸弃二抗液体，加入DAPI染液（DNA染色剂2.5μg/ml），室温作用20min；

7、在黑暗条件下用0.01M PBS冲洗5min×6次；

8、在黑暗条件下防荧光淬灭剂封片，荧光显微镜下观察，用合适波段激发，照相保存实验结果

**三、TUNEL法原位细胞凋亡检测**

#### 1. 样品处理

组织：有条件时应及时固定。常规4%多聚甲醛/0.01M PBS(pH7.0-7.6)或10%中性缓冲福尔马林固定4小时以上，石蜡包埋。切片常规脱蜡入水（脱蜡务必干净）。

#### 2. 新鲜配制3%双氧水，室温处理10分钟。蒸馏水洗涤2分钟×3次。

#### 3. 标本片加0.01M TBS 1:200新鲜稀释Proteinase K 37℃消化1-15分钟,0.01M

TBS洗2分钟×3次。

#### 4. 标本片加标记缓冲液(Labeling Buffer) 20μι/片,以保持切片湿润。按每张切片取

TdT和DIG-d-UTP各1μι，加入18μι标记缓冲液中，混匀。甩去切片上多余液体后加标记液，20μι/片。置样品于湿盒中，37℃标记2小时。

#### 5. 0.01M TBS 洗2分钟×3次。

#### 6. 加封闭液50μι/片，室温30分钟，甩掉封闭液，不洗。

#### 7. 用抗体稀释液1：100稀释生物素化抗地高辛抗体：(取1ml抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体10μι0，混匀后50μι/片加至标本片上。置样品于湿盒中，37℃反应

30分钟。0.01M TBS洗2分钟×3次。

#### 8. 用抗体稀释液1：100稀释SABC：取1ml 抗体稀释液加SABC 10μι，混匀后50μι/

片加至切片。37℃反应30分钟。0.01M TBS洗5分钟×4次。

9. DAB显色：取1ml蒸馏水，分别加入DAB试剂盒中A，B，C试剂各一滴，混匀后加至标本片上，显色10-30分钟左右。水洗。

#### 10. 苏木素轻度复染。0.01M TBS洗，蒸馏水洗。脱水，透明，封片。显微镜观察。

7

结果判定：

细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞，即凋亡的细胞。**四、统计学分析**

应用SPSS19．0统计软件分析，连续变量采用Mann-Whitney U检验，分类变量采用

χ2检验或Fisher确切概率法，相关性分析采用Spearman分析法，*P*<0.05为有统计学意义。

结果

**一、BNIP3在胰腺癌组织中的表达**

所有标本经HE染色确认组织的病理性质，免疫组化及免疫荧光结果显示，BNIP3表达阳性染色主要定位于细胞胞浆内，少数可定位于细胞核，染色多呈棕黄色或棕褐色。BNIP3在胰腺癌组织中25例阳性表达，45例阴性表达，阳性率为35.7%; BNIP3在相应癌旁组织中阳性表达51例，阴性表达19例，阳性率为72.9%. BNIP3在胰腺癌组织中的阳性率明显低于癌旁组织，且两者的差异有统计学意义（χ2=19.457，

*P*<0.001）(见图1、表1)。



图1 BNIP3在胰腺癌组织中的表达（IHC，IF，×200 ）

8

表 1 BNIP3在胰腺癌组织及癌旁组织的蛋白表达

| 组别 | 例数 | 阳性例数 | 阴性例数 | χ2 | P |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 胰腺癌组织 | 70 | 45 | 25 | 19.457 | <0.001 |
| 癌旁组织 | 70 | 51 | 19 |

**二、BNIP3表达与胰腺癌临床病理因素的关系**

将胰腺癌组织中BNIP3的表达与患者的临床病理因素进行统计分析，结果显示：

BNIP3 的低表达与肿瘤大小、肿瘤分期及淋巴结转移密切相关，差异有统计学意义

（*P*<0.05），而与性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤分级无明显相关，差异无统计学意义（*P*> 0.05）

（见表2）。

表 2 胰腺癌中BNIP3的表达与临床病理因素的关系

| 指标 | 例数 | BNIP3 表达 | | χ2 | P 值 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 阴性 | 阳性 |  |  |
| 性别  男女  年龄（岁）  ≤65  ＞65 肿瘤部位  胰 头 胰 体 尾 肿瘤大小  ≤2cm  ＞2cm 分化程度高 分 化 中 分 化 低 分 化 病理分期  Ⅰ Ⅱ  淋巴结转移有  无 | 42  28  41  29  52  18  27  43  8  17  45  25  45  38  32 | 28  17  26  19  35  10  9  36  5  11  29  10  35  29  16 | 14  11  15  10  17  8  18  7  3  6  16  15  10  9  16 | 0.259  3.434  0.804  18.341  0.013  9.990  5.240 | 0.611  0.064  0.370  0.001\*  0.994  0.002\*  0.022\* |

9

**三、胰腺癌组织中BNIP3与增殖、凋亡的关系**

70 例胰腺癌组织中通过免疫组化检测Ki67 的表达，计算阳性表达率，通过

TUNEL检测凋亡细胞，计算凋亡细胞阳性率。如图2所示，BNIP3阴性组的凋亡细胞阳性率低于BNIP3阳性组，差异有统计学意义(*P*<0.01)；BNIP3阴性组的Ki67细胞阳性率高于BNIP3阳性组，差异有统计学意义（*P*<0.01）。提示胰腺癌组织中BNIP3低表达与肿瘤细胞增殖活跃、凋亡减少有关。



图2 胰腺癌组织中BNIP3与增殖、凋亡的关系**四、胰腺癌患者BNIP3与凋亡相关蛋白的关系**

70例胰腺癌组织中通过免疫组化检测凋亡相关蛋白Caspase 3, Caspase 9, Bcl-2和Bax的表达（图3），其表达阳性染色主要定位于细胞胞浆内，染色多呈棕黄色或棕褐色。Caspase 3的阳性率为32.9%(23/70), Caspsase 9的阳性率为27.1%(19/70)，Bcl-2的阳性率为62.9%(44/70)，Bax的阳性率为42.9%(30/70)。BNIP3阴性组中Bcl-2的表达明显高于BNIP3阳性组（χ2=15.860, *P*<0.001），BNIP3阴性组中Bax的表达明显低于BNIP3阳性组（χ2=10.039, *P*=0.002），两组中Caspase 3和Caspase 9的表达均无统计学差异（χ2=1.383, *P*=0.240;χ2=1.003, *P*=0.317）。

10



图3 胰腺癌组织中BNIP3与凋亡相关蛋白的关系

表3 胰腺癌组织中BNIP3与凋亡相关蛋白表达相关性

| BNIP3 expression | | | r | P value |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Positive (n) | Negative (n) |
| Caspase 3 positive (n) | 6 | 17 | 0.141 | 0.246 |
| Caspase 3 negative (n) | 19 | 28 |  |  |
| Caspase 9 positive (n) | 5 | 14 | 0.120 | 0.324 |
| Caspase 9 negative (n) | 20 | 31 |  |  |
| Bcl-2 positive (n) | 8 | 36 | -0.476 | 0.001 |
| Bcl-2 negative (n) | 17 | 9 |  |  |
| Bax positive (n) | 17 | 30 | 0.379 | 0.001 |
| Bax negative (n) | 8 | 15 |  |  |

11

讨 论

人的BNIP3(Bcl-2/adenocarcinoma E1B19KD interacting protein 3)基因是Bcl-2家族中BH3-only亚家族的成员，具有BH3结构域和TM跨膜区，属于促凋亡蛋白，其在死亡信号转导途径中有重要作用。基因全长1535bp，位于10号染色体10q26.3，编码194个氨基酸，分子量约为21.5kD。它可以形成同源二聚体或与Bcl-2，Bcl-xl形成异源二聚体，在体内外检测到的BNIP3为30kD的单体和60kD的二聚体，定位于线粒体外膜、内质网膜、核膜。正常生理条件下，人类多种正常组织中均有BNIP3的表达，但表达量很低，仅能从人脑细胞和骨骼肌细胞中检测到BNIP3的表达[5]，但也有部分细胞不表达BNIP3，如神经元细胞；而在缺氧条件下，BNIP3的表达上调。研究证实，正常脑组织细胞中BNIP3的表达定位于细胞核；在外界压力如缺氧的诱导下，BNIP3的表达则由核转位至胞质。在多种细胞中，BNIP3表达之后，绝大多数存在于胞液或松散地结合在线粒体外膜上，当凋亡信号被激活时，BNIP3从胞液转移到线粒体外膜引起线粒体功能障碍，最终引起细胞死亡。

本研究中，我们检测了70例胰腺癌患者的肿瘤组织与癌旁组织的BNIP3表达，结果显示BNIP3在胰腺癌组织中低表达，并与肿瘤大小，临床分期和淋巴结转移相关。胰腺癌中BNIP3的表达和促凋亡蛋白Bax的表达正相关，和抑凋亡蛋白Bcl-2的表达负相关，和caspase3, 9的表达无明显相关性。有资料显示，Bax和Bak是BNIP3介导的线粒体功能紊乱的下游效应因子。BNIP3的BH3结构域可与抗凋亡分子Bcl-2和Bcl-xl形成异二聚体，异二聚体就会促进Bax和Bak结合在线粒体外膜形成四聚体通道，后者又促进线粒体释放细胞色素C[9-11]。

Ki-67 是细胞增殖相关的核蛋白，在增殖细胞的所有活跃细胞周期都表达。

TUNEL检测可以分析胰腺肿瘤组织的凋亡率，我们的研究结果表明，胰腺癌肿瘤组织中BNIP3的低表达与Ki-67表达相关，BNIP3阴性组的凋亡细胞阳性率低于BNIP3阳性组，差异有统计学意义(*P*<0.01)；BNIP3阴性组的Ki67细胞阳性率高于BNIP3阳性组，差异有统计学意义（*P*<0.01）。提示胰腺癌组织中BNIP3低表达与肿瘤细胞增殖活跃、凋亡减少有关。

在一般情况下，缺氧导致组织细胞的增殖减少和凋亡增加，然而，恶性肿瘤细胞在缺氧环境下却能异常增殖[12]，胰腺恶性肿瘤组织中BNIP3表达较低，使肿瘤细胞

12

避免了在缺氧条件下BNIP3介导的细胞凋亡[13, 14]，我们可以推测以BNIP3作为潜在的治疗靶目标，通过恢复BNIP3的表达，进而恢复恶性肿瘤细胞缺氧诱导细胞凋亡的敏感性从而抑制胰腺癌细胞增殖。

综上所述，我们的研究表明BNIP3在胰腺癌的发生发展中起着重要的作用，与代表凋亡及增殖的临床病理因素密切相关。我们在后续的细胞实验中，通过si-RNA干扰及构建质粒过表达载体转染技术分别下调和上调BNIP3的表达，进一步研究BNIP3在胰腺癌中调节肿瘤细胞凋亡的作用，及BNIP3在胰腺癌中低表达的调控机制研究。

结 论

1. BNIP3在胰腺癌组织中低表达，并与肿瘤大小、肿瘤分期、淋巴结转移密切相关。

2. 胰腺癌组织中BNIP3低表达与肿瘤细胞增殖活跃、凋亡减少有关。

3. 胰腺癌中BNIP3的表达和促凋亡蛋白Bax的表达正相关，和抑凋亡蛋白Bcl-2

的表达负相关。

参考文献

[1]. Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians* 2013, 63(1): 11-30.

[2]. Kaur G, Saif MW: Translational research in pancreatic adenocarcinoma. *JOP: Journal of the pancreas* 2014, 15(2): 121-123.

[3]. Mahalingam D, Giles F: Challenges in developing targeted therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Expert opinion on therapeutic targets* 2008, 12(11): 1389-1401.

[4]. Hartwig W, Werner J, Jager D, Debus J, Buchler MW: Improvement of surgical results for pancreatic cancer. *The lancet oncology* 2013, 14: e476-485.

[5]. Burton TR, Henson ES, Baijal P, Eisenstat DD, Gibson SB: The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. *International journal of cancer* 2006, 118(7): 1660-1669.

*[6].* Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH: BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X-L and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J*

13

*Biol Chem* 2000, 275:1439-1448.

[7]. Komar G, Kauhanen S, Liukko K, Seppanen M, Kajander S, Ovaska J, Nuutila P, Minn H: Decreased blood flow with increased metabolic activity: a novel sign of pancreatic tumor aggressiveness. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, 15: 5511-5517.

[8]. Vasagiri N, Kutala VK: Structure, function, and epigenetic regulation of BNIP3: a pathophysiological relevance. *Molecular biology reports* 2014, 41: 7705-7714.

[9]. Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Bailes M, Ens K, Kirshenbaum LA, Gibson SB: BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene* 2003, 22: 4734-4744.

[10]. Mazure NM, Pouyssegur J: Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy* 2009, 5: 868-869.

[11]. Kammouni W, Wong K, Ma G, Firestein GS, Gibson SB, El-Gabalawy HS: Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3. *Arthritis and rheumatism* 2007, [4] 56: 2854-2863.

[12]. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sowter HM, Sivridis E, Gibson S, Gatter KC, Harris AL: BNIP3 expression is linked with hypoxia-regulated protein expression and with poor prognosis in non-small cell lung cancer\. *Clinical Cancer Research* 2004, 10: 5566-5571.

[13]. Okami J, Simeone DM, Logsdon CD: Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. *Cancer research* 2004, 64: 5338-5346.

[14]. Guo K, Searfoss G, Krolikowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, Yu KT, Jaye M, Ivashchenko Y: Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell death and differentiation* 2001, 8: 367-376.

14

# 第二部分 人胰腺癌细胞中BNIP3调控凋亡的作用及机制

在实体肿瘤的发生发展过程中普遍存在着缺氧微环境，而缺氧常导致绝大多数活体细胞死亡，耐受缺氧的能力在肿瘤的发展过程中起着重要的作用。大量的研究表明，

BNIP3作为缺氧诱导因子HIF-1的靶基因，在缺氧条件下通过HIF-1诱导其表达。缺氧诱导的BNIP3表达通过HIF-1与BNIP3的启动子区HIF-1结合位点来实现。文献报道，BNIP3在人类乳腺癌、肺癌和宫颈癌中高表达，但在胃癌、结直肠癌、造血系统肿瘤中却表达沉默。且相关研究证实BNIP3表达沉默可导致肿瘤细胞耐受缺氧，并对放疗和化疗产生抵抗。本实验第一部分研究发现胰腺癌组织中BNIP3蛋白表达水平均低于相应癌旁组织，BNIP3的表达与肿瘤大小、肿瘤分期、淋巴结转移密切相关，这些结果提示BNIP3的低表达可能在胰腺癌的发生发展过程中有着重要的作用。

为进一步确定BNIP3在胰腺癌细胞中的作用及其低表达与缺氧环境和缺氧诱导因子HIF-1的关系，本部分实验利用RT-PCR和Western blot印迹法检测BNIP3在不同胰腺癌细胞株中表达情况，利用siRNA和质粒技术分别转染BNIP3高表达和低表达细胞株，并对转染后的细胞株进行BNIP3 mRNA和蛋白表达、细胞凋亡、线粒体膜电位、活性氧ROS、TUNEL、甲基化状态、CHIP、BNIP3与其他凋亡相关蛋白（Bcl-2、

AIF、Bax、Caspase3、Caspase9）表达相关性的检测，研究BNIP3在胰腺癌细胞中的表达及在细胞凋亡方面发挥的作用。

材 料

## 一、 细胞及培养基

|  |  |
| --- | --- |
| 人胰腺癌细胞株PANC-1 | 中科院上海细胞研究所 |
| 人胰腺癌细胞株Capan-1 | 中科院上海细胞研究所 |
| 人胰腺癌细胞株Patu8988 | 中科院上海细胞研究所 |
| 人胰腺癌细胞株SW1990 | 中科院上海细胞研究所 |
| 人胰腺癌细胞株BxPC3 | 中科院上海细胞研究所 |

15

|  |  |
| --- | --- |
| 人胰腺癌细胞株CFPANC-1 | 中科院上海细胞研究所 |
| 高糖DMEM培养基 | 美国Gibco公司 |
| RPM1640无糖培养基 | 美国Gibco公司 |
| 胎牛血清 | 美国Gibco公司 |

## 二、 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 胰蛋白酶(Trypsin） | Hyclone公司 |
| RNA裂解液Trizol | 美国Invitrogen公司 |
| 反转录试剂盒 | 美国Thermo公司 |
| PCR引物 | 美国Invitrogen公司 |
| PCR 2×Master Mix 扩增试剂盒 | 美国Promega公司 |
| 西班牙琼脂糖 | 华美生物工程公司 |
| Gelred核酸染料 | 美国biotium公司 |
| RIPA蛋白裂解液 | 碧云天生物技术研究所 |
| BCA蛋白浓度测定试剂盒 | 碧云天生物技术研究所 |
| 预染蛋白Marker | 美国Thermo公司 |
| 鼠抗人BNIP3一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人AIF一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人Bcl-2一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人Bax一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人HIF-1α一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人Cleaved Caspase-3一抗 | 英国Abcam公司 |
| 兔抗人Cleaved Caspase-9一抗 | 英国Abcam公司 |
| 鼠抗人GAPDH一抗 | 碧云天生物技术研究所 |
| 5-Aza-2’-deoxycytidine | 英国Abcam公司 |
| 辣根过氧化物酶标记ft羊抗兔IgG抗体 | 碧云天生物技术研究所 |
| 辣根过氧化物酶标记ft羊抗小鼠IgG抗体 | 碧云天生物技术研究所 |
| PVDF膜 | 美国Millipore公司 |
| 显影液、定影液及ECL发光剂 | 碧云天生物技术研究所 |
| 脂质体(LipofectamineTM 2000) | 美国Invitrogen公司 |

16

|  |  |
| --- | --- |
| siRNA-BNIP3(SLC2A1-RNAi) | 上海吉玛制药技术有限公司 |
| 人BNIP3质粒载体pEX-2 | 上海吉玛制药技术有限公 |
| 线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1） | 碧云天生物技术有限公司 |
| 活性氧检测试剂盒 | 碧云天生物技术有限公司 |
| 细胞周期与凋亡检测试剂盒 | 碧云天生物技术有限公司 |
| TUNEL法原位细胞凋亡检测试剂盒 | 武汉博士德生物工程有限 |

## 三、 主要仪器

|  |  |
| --- | --- |
| Air Tech 超净工作台 | 苏州净化设备厂 |
| CO2培养箱 | 美国Thermo公司 |
| 流式细胞仪 | 美国Beckman公司 |
| 离心机 | 德国Eppendorf公司 |
| 倒置相差显微镜 | 日本OLYMPUS公司 |
| 恒温水浴锅 | 北京长风仪器有限公司 |
| 酶标仪 | 美国Bio-TEK公司 |
| 水平电泳槽 | BIO-RAD公司 |
| 蛋白凝胶电泳装置 | BIO-RAD公司 |
| 低温超速离心机 | 美国Thermo公司 |
| CRC-15R放射性核素活度计 | 美国Capintec公司 |
| SN-695B型放免γ测量仪 | 上海核所日环光电仪器公司 |

## 四、 主要溶液的配制

1、1×PBS缓冲液：NaCl8.0g，Na2HPO41.44g，KH2PO40.24g，加ddH2O 800ml溶解，调节PH=7.4，加ddH2O定容至1000ml，高压灭菌后4℃保存。

### 2 、5×SDS上样缓冲液：0.25M Tris-HCl(PH=6.8)，100μg/mlβ-疏基乙醇，10% SDS，

0.5%溴酚蓝，50%甘油，混匀后4℃保存，临用前加入0.5MDTT。

### 3 、转移缓冲液：甲醇200ml，甘氨酸2.9g，Tris 5.8g，SDS 0.37g，加ddH2O至1000ml，

### 4 ℃保存。

4、30%丙烯酰胺溶液：N'-亚甲双丙烯酰胺1g，丙烯酰胺29g，溶于60mlddH2O中，

37℃助溶，加ddH2O至100ml，滤器除菌，调PH<7.0，棕色瓶中室温保存。

17

### 5 、5×Tris -甘氨酸电泳缓冲液：10% SDS 50m1，甘氨酸94g，Tris 15.1g，加ddH2O

800 ml，调pH值=8.3，加ddH2O至1000ml，4℃保存，用前以ddH2O5倍稀释。

### 6 、1.5M Tris-HCl溶液(pH=8.8)：Tris 36.34g，溶于150ml ddH2O，以浓HCl调

PH=8.8，加ddH2O定容到200ml，室温保存。

### 7 、10% SDS：SDS 10.0g溶于90mlddH2O中，68℃助溶，冷却后以浓HCl调PH值

=7.2，加ddH2O定容到100ml，室温保存。

8、考马斯亮蓝R-250染液：甲醇：水(1: 1, V/V) 900ml，冰乙酸l00ml，混合后加入考马斯亮蓝R-250 1.25g，4℃保存，用前过滤。

9、1.0M Tris-HCl溶液(pH=6.7): Tris 24.22g，溶于150ml ddH2O，以浓盐酸调

PH=6.7，加ddH2O定容到200ml，室温保存。

10、10×Tris缓冲液（TBS）：Tris24.2g，氯化钠80g，加ddH2O 800 ml，调值=8.0，补ddH2O至1000ml，灭菌后室温保存。

11、封闭液：5g脱脂奶粉溶于100ml 1×TBS -T中，4℃保存。

12、1×TBST溶液：Tris 1.21g，氯化钠5.84g, 800ml水用盐酸调节pH=7.5，加水定容至1000ml，加入0.1% Tween-20.

方 法

## 一、 细胞培养和分组

人胰腺癌细胞株均生长于高糖DMEM培养基中，内含10%胎牛血清、100U/ml的青霉素和链霉素，置于5％C02、饱和湿度、37℃条件下培养，细胞呈贴壁生长。按

RNAi沉默和质粒载体过表达时的处理因素将细胞分为干扰空白对照组（control组）、干扰阴性对照组（Si-scramble组）和干扰实验组（si-BNIP3组）以及过表达空白对照组（control组）、过表达阴性对照组（Vector组）、过表达实验组（OE-BNIP3组）。

1、细胞的复苏从液氮中取出细胞冻存管，置于37℃水浴箱中，不停摇动至完全融化。用移液管将细胞悬液转移入离心管中，加入5ml DMEM新鲜培养液，1000rpm离心5min后去上清。加入含10%胎牛血清的DMEM培养基5ml，接种进细胞培养瓶中，

5％C02、饱和湿度、37℃条件下，培养箱内静置培养，一周更换培养基2-3次。

2、细胞的传代细胞融合度达90%以上时，进行细胞的传代，弃去细胞培养基后，用PBS洗涤细胞两次，加入约lml，含0.25％Trypsin-EDTA的消化液，置于恒温培

18

养箱中消化1min左右，倒置显微镜下观察，当细胞收缩变圆时，加入含胎牛血清的新鲜培养基终止消化反应，吹打成单细胞悬液，转移至无菌离心管中，1000rpm离心3min后，弃上清液，加入新鲜培养基，再以1: 3的比例接种至新的培养瓶中，继续培养。

3、细胞冻存取对数生长期的细胞，进行细胞冻存，弃去细胞培养基后，用PBS洗涤细胞两次，加入约lml，含0.25％Trypsin-EDTA的消化液，置于恒温培养箱中消化1min左右，倒置显微镜下观察，当细胞收缩变圆时，加入含胎牛血清的新鲜培养基终止消化，1000rpm离心5min，弃上清，加入1.5ml预先配制的冻存液（含10％DMSO的新鲜培养液），吹打成单细胞悬液，加入细胞冻存管、标记，再将冻存管置于4℃冰箱2h，再移至-40℃低温冰箱中12h，然后移入液氮罐中长期保存。

## 二、 **RT-PCR**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 基因 | 上游引物（F） | 下游引物（R） |
| BNIP3  (454bp  ) | 5'-CCAGCCAAAGTGACAAGACA-3' | 5'-GGTCCAGCCCTACAGATTAG C-3' |
| GAPD H  (496bp  ) | 5'-CAAGGTCATCCATGAACAACTT TG-3' | 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA G-3' |

### 1、 PCR引物

### 2、 RNA提取

①当培养细胞融合度达到95%时，弃细胞培养基，消化细胞，转移至1.5ml EP管中，离心后弃上清液，加入lml Trizol，枪头反复吹打至匀浆状，室温下放置5min。

②向以上得到的匀浆中加入200µl氯仿，在振荡器上充分震荡混匀30s，室温静置三分钟，随后经4℃、12000rpm条件下离心15min。

③离心后，样品分三层：有机相的底层，含DNA和蛋白质的中间层，含RNA的无色水相上层。

④吸取上清液约500µl至另一个干净的l.5ml EP管中，加入500µl异丙醇，在振荡器上震荡混匀30s，室温下静置10min。

⑤4℃、12000rpm条件下离心15min，RNA沉淀在EP管底。小心吸弃上清液，注意不要吸弃RNA沉淀。

19

⑥在含有RNA沉淀的EP管中加入1m1 75％乙醇，震荡混匀30s，4℃、12000rpm

条件下离心5min，用移液器小心吸弃上清液，注意不要吸弃沉淀。

⑦加入1ml无水乙醇，震荡混匀30s，4℃、12000rpm条件下离心5min，用移液器小心吸弃上清液，注意不要吸弃沉淀。

⑧室温放置2min后立即加入30µl DEPC水，-80℃保存备用。

### 3、 RNA浓度及纯度的测定

取2µl溶解于DEPC水的RNA液，稀释30倍，紫外分光光度仪测定RNA的浓度、

A260和A280吸光值，RNA样本的A260/A280值在1.8-2.0之间，表明提取的RNA纯度良好。

### 4、 逆转录

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 |
| RNA 样品 | 2µl |
| Oligo dT | 1µl |
| 无核酸酶的高纯水总体积 | 9µl 12µl |

按照Thermo公司的RevertAid™第一链cDNA Synthesis试剂盒说明书步骤合成第一链cDNA。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 |
| 5X Reaction Buffer | 4µl |
| RiboLock™ RNA 酶抑制剂 | 1µl |
| 10 mM dNTP Mix | 2µl |
| RevertAid™ M-MuLV 逆转录酶总体积 | 1µl 20µl |

将模板和引物的混合液轻轻混匀，短暂离心，65°C孵育5min，冰上冷却，离心，再置于冰上冷却。将下列组分按照顺序加入。

轻轻混匀，离心，42°C孵育60min，70°C加热5 min终止反应。

### 5、 PCR扩增

①以逆转录合成的cDNA为模板进行PCR扩增。

20

②PCR扩增体系(20µl)：按照PCR 2×MasterMix试剂盒的说明书操作

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 |
| 2×PCR Buffer | 10µl |
| RNase-free H20 | 6µl |
| 上游引物 | 1µl |
| 下游引物 | 1µl |
| 模板 cDNA  总体积 | 2µl 20µl |

③PCR反应条件：95℃10min变性；95℃30s，60℃30s，72℃30s，共35个循环；

72℃7min延伸。

### 6、 琼脂糖凝胶电泳

①称取2g琼脂糖加入100ml TAE中充分溶解，微波炉加热至沸腾。

②降温至约50℃，加入5µl GelRed 。

③洗干净水平电泳板，灌胶，30min后聚合。

④向电泳槽中加入TAE，至没过胶面，拔梳子。

⑤向加样孔中加入样品和加样缓冲液总计10µl 。

⑥100v电压下电泳40min，凝胶自动成像仪下照相。

⑦使用Quantity One软件分析实验结果，扫描目的基因条带和内参GAPDH条带灰度值，计算相对量，目的基因相对表达量=目的基因条带灰度值/GAPDH条带灰度值。

试验重复3次，数据以*X*±S表示。**三、Western Blot**

### 1、 蛋白质的提取

取胰腺癌细胞，用PBS清洗干净，按1×10 6个细胞加50µl蛋白裂解液的比例加入裂解液，反复吹打均匀，冰上静置30min（每十分钟超声细胞破碎仪低温超声裂解细胞），低温高速离心(4℃,13000 rpm, 10min)，取上清。用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白质浓度，调节各管蛋白质浓度一致，然后按照上清体积：5×loading buffer体积=4: 1的比例，加入loading buffer，混匀后，99℃金属浴10min，使蛋白质充分变性，-80℃冻存待用。

### 2、 灌胶

21

配置10% SDS聚丙烯酰胺分离胶后灌胶，加2mm的无水乙醇，前后震动胶板使胶水平，室温静置30min左右；配置4%浓缩胶，去除无水乙醇，滤纸吸净残留液体灌浓缩胶，立即插入梳子，室温静置30min，使胶完全凝固，将凝胶按要求安放在充满电泳液的电泳槽中，轻轻拔掉梳子。

### 3、 上样、电泳

计算含50μg蛋白的溶液体积即为上样量，加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品。调节电压为110V，电泳至溴酚兰刚跑出即可终止电泳，进行转膜。

### 4、 转膜

用甲醇将PVDF膜浸透1 min，用转膜液浸透海绵垫、滤纸，将胶从电泳槽中取出，去浓缩胶，将分离胶卸下，按照阴极-海绵-滤纸-分离胶-PVDF膜-滤纸-海绵-阳极的顺序排列，放到电转槽中，90V转膜75min。

### 5、 封闭

将膜从电转槽中取出，浸入5％脱脂奶粉的TBST封闭液中，室温下，在摇床上封闭2h。

### 6、 免疫反应（一抗、二抗孵育）

按说明书建议比例分别配制BNIP3、AIF、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9、HIF-1α、GAPDH一抗稀释液，将膜分别放入一抗稀释液中，4℃冰箱中过夜孵育。次日，摇床上TBST清洗PVDF膜10 min，重复3次，按1: 2000比例配制二抗稀释液，室温条件下，摇床上孵育1h。

### 7、 化学发光、显影、定影

二抗孵育后，摇床上TBST清洗PVDF膜10 min，重复3次，将膜置于保鲜膜上，A、

B发光液按1: 1比例混合后，滴加至PVDF膜上进行显影，滤纸将膜表面残余的显色液吸净，暗室中进行曝光、显影及定影。BIO-RAD凝胶电泳图像分析仪进行采图，Quantity One软件分析实验结果。

## 四、 **siRNA**干扰实验

### 1、 siRNA的制备

22

siRNA-BNIP3和Negative control由上海吉玛公司合成，序列如下：siRNA-BNIP3

( 5'-CCCAAGGAGUUCCUCUUUATT-3' )、Negative control

(5'-UUCUUCGAACGUGUCACGUTT-3')。

### 2、 细胞培养

根据RT-PCR和Western blot检测胰腺癌细胞株中BNIP3的表达情况，选取BNIP3

高表达株继续培养，培养条件及方法同前。

### 3、 siRNA转染

以LipofectamineTM2000为载体，阴性对照组为LipofectamineTM 2000与siRNA-NC

（5µl：5µl）转染胰腺癌细胞，实验组Lipofectam-ineTM2000与siRNA-BNIP3（5µl：5µl）转染胰腺癌细胞，另设一空白对照组。步骤如下：

①转染前一天，将5×10 5个胰腺癌细胞接种于6孔培养板中，每孔加入2ml无抗生素的培养基，使转染时的细胞密度能够达到80%；

②取5µl/孔LipofectamineTM2000, 用200µl的Opti-MEM I Reduced Serum Medium

稀释。轻轻混合后在室温下孵育5min；

③分别取5µl的siRNA-NC和siRNA-BNIP3，用200µl Opti -MEM I Reduced Serum

Medium稀释，轻轻混合均匀；

④稀释的LipofectamineTM2000经过5min的孵育后，与稀释siRNA轻轻混合，室温静置20min，以形成siRNA-LipofectamineTM2000混合物；

⑤将siRNA-LipofectamineTM2000混合液加入含有细胞及培养液的6孔板中，轻轻摇晃混合均匀；

⑥在37℃的培养箱中培养，4h后将培养基换为含血清的完全培基；**五、细胞筛选**

### 1、 确定最优筛选浓度

嘌呤霉素筛选BNIP3表达量高的胰腺癌细胞，按0.5μg/ml浓度梯度设置0.5μg/ml

至5μg/ml10个实验组及1个空白对照组，每组设置2个复孔。

①取对数生长期的待转染细胞，融合度在80%左右，用新鲜无抗无血清的培养基制成1.5×10 5个/ml的细胞悬液。

23

②向96孔培养板中加细胞悬液，每孔100微升（使每孔细胞数在1.5×104个），然后向每孔加新鲜无抗无血清的培养基适量，培养箱中静置培养过夜。

③第二天用设置好的浓度为0，0.5，1,1.5,2,2.5,3,3.5,4,4.5,5μg/ml的新鲜无抗无血清培养基溶液替换各孔中的旧的培养基。

④每日检查细胞活力，根据细胞活力，每隔一天更换含嘌呤霉素的新鲜无抗无血清培养基溶液一次。

⑤在第五天杀死所有细胞浓度为最优嘌呤霉素筛选浓度。

### 2、 转然后细胞筛选及阳性率检测

①胰腺癌细胞转然后24小时，换用含最优浓度嘌呤霉素培养基。

②每隔一天换用新鲜含嘌呤霉素的无抗生素无血清培养基，以替换含大量死细胞的培养基。直到抗性群落能被识别出，及每天细胞数减少不明显。

③待抗性细胞长满以后，可以移至普通细胞培养室内培养。分别提取转染组、阴性对照组、空白对照组细胞的RNA，进行RT-PCR检测mRNA水平的干扰效率，RT-PCR的具体步骤同前。提取各组细胞的蛋白质，利用Western blot检测蛋白质水平的干扰效率，Western blot的具体步骤同前。

## 六、 质粒克隆载体过表达实验

### 1、 人BNIP3质粒克隆载体的构建

人BNIP3（基因长度660bp）质粒克隆载体pEX-2及对照质粒空载体由上海吉玛公司合成，克隆位点EcoRI/BamHI，质粒抗性Kanamycin。

### 2、 细胞培养

根据RT-PCR和Western blot检测胰腺癌细胞株中BNIP3的表达情况，选取BNIP3

低表达株继续培养，培养条件及方法同前。

### 3、 质粒过表达载体转染

以LipofectamineTM2000为载体，阴性对照组为LipofectamineTM 2000与空载体质粒

（10µl: 4µg）转染胰腺癌细胞，实验组Lipofectam-ineTM2000与OE-BNIP3（10µl：4µg）转染胰腺癌细胞，另设一空白对照组。步骤如下：

①转染前一天，将5×10 5个胰腺癌细胞接种于6孔培养板中，每孔加入2ml无抗生素的培养基，使转染时的细胞密度能够达到80%；

24

②取10µl/孔LipofectamineTM2000, 用200µl的Opti-MEM I Reduced Serum Medium

稀释。轻轻混合后在室温下孵育5min；

③分别取4µg的对照空质粒和OE-BNIP3，用200µl Opti-MEM I Reduced Serum Medium稀释，轻轻混合均匀；

④稀释的LipofectamineTM2000经过5min的孵育后，与稀释质粒载体轻轻混合，室温静置20min，以形成siRNA-LipofectamineTM2000混合物；

⑤将质粒-LipofectamineTM2000混合液加入含有细胞及培养液的6孔板中，轻轻摇晃混合均匀；

⑥在37℃的培养箱中培养，6h后将培养基换为含血清的完全培基；**七、线粒体膜电位检测**

按si-RNA干扰分RNAi-BNIP3、RNAi-NC、control三组，按人BNIP3过表达分OE-BNIP3、Vector、control三组共六组分别种植于六孔板中行转染实验后，用胰酶分别消化细胞，重悬于0.5ml细胞培养液中，细胞培养液中可以含血清和酚红。加入0.5ml JC-1染色工作液，颠倒数次混匀。细胞培养箱中37℃孵育20分钟。在孵育期间，按照每1ml JC-1染色缓冲液(5X)加入4ml蒸馏水的比例，配制适量的JC-1染色缓冲液(1X)，并放置于冰浴。37℃孵育结束后，600g 4℃离心3-4分钟，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。用JC-1染色缓冲液(1X)洗涤2次：加入1ml JC-1染色缓冲液(1X)重悬细胞，600g 4℃离心3-4分钟，沉淀细胞，弃上清。再加入1ml JC-1染色缓冲液(1X)重悬细胞，600g 4℃离心3-4分钟，沉淀细胞，弃上清。再用适量JC-1染色缓冲液(1X)重悬后，用流式细胞仪分析。

## 八、 活性氧检测

首先按照1: 1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，使终浓度为10微摩尔/升。按

si-RNA干扰分RNAi-BNIP3、RNAi-NC、control三组，按人BNIP3过表达分OE-BNIP3、

Vector、control三组共六组分别种植于六孔板中行转染实验后，用胰酶分别消化细胞，细胞收集后悬浮于稀释好的DCFH-DA中，细胞浓度为一百万至二千万/毫升，37℃细胞培养箱内孵育20分钟。每隔3-5分钟颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。将细胞收集重悬于PBS缓冲液中用流式细胞仪分析。

25

## 九、 细胞凋亡检测（**Annexin V-PI**法）

按si-RNA干扰分RNAi-BNIP3、RNAi-NC、control三组，按人BNIP3过表达分OE-BNIP3、Vector、control三组共六组分别种植于六孔板中行转染实验后，用胰酶分别消化细胞，细胞收集后悬浮于PBS缓冲液并计数。注意：PBS重悬不能省略，PBS重悬的过程同时也起到了洗涤细胞的作用，可以保证后续Annexin V-FITC的结合。取5-10万重悬的细胞，1000g离心5分钟，弃上清，加入195μl Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。加入5μl Annexin V-FITC，轻轻混匀。加入10μl碘化丙啶染色液，轻轻混匀。室温(20-25℃)避光孵育10-20分钟，随后置于冰浴中。可以使用铝箔进行避光。孵育过程中可以重悬细胞2-3次以改善染色效果。随即进行流式细胞仪检测，Annexin V-FITC为绿色荧光，碘化丙啶(PI)为红色荧光。

## 十、 **TUNEL**法原位细胞凋亡检测

玻片预先用多聚赖氨酸或APES进行处理。按si-RNA干扰分RNAi-BNIP3、RNAi-NC、control三组，按人BNIP3过表达分OE-BNIP3、Vector、control三组共六组分别种植于玻片上行转染实验后及时固定。用4%多聚甲醛/0.01M PBS(pH7.0-7.6)室温下固定30—60 分钟。0.01M PBS 洗2 分钟×2 次。蒸馏水洗涤2 分钟×2 次。新鲜配制3%双氧水，室温处理10分钟。蒸馏水洗涤2分钟×3次。标本片加标记缓冲液(Labeling Buffer) 20μι/片，以保持切片湿润。按每张切片取TdT和DIG-d-UTP各1μι，加入18μι标记缓冲液中，混匀。甩去切片上多余液体后加标记液，20μι/片。置样品于湿盒中，37℃标记2小时。0.01M TBS洗2分钟×3 次。加封闭液50μι/片，室温30分钟，甩掉封闭液，不洗。用抗体稀释液1: 100稀释生物素化抗地高辛抗体：（取1ml抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体10μι0，混匀后50μι/片加至标本片上。置样品于湿盒中，37℃反应30分钟。0.01M TBS洗2分钟×3次。用抗体稀释液1: 100稀释SABC：取1ml抗体稀释液加SABC 10μι，混匀后50μι/片加至切片。37℃反应30分钟。0.01M

TBS 洗5 分钟×4 次。DAB 显色：取1ml 蒸馏水，分别加入DAB 试剂盒中A，B，

C试剂各一滴，混匀后加至标本片上，显色10-30分钟左右。水洗。苏木素轻度复染。0.01M TBS 洗，蒸馏水洗。脱水，透明，封片。显微镜观察。**结果判定：**细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞，即凋亡的细胞。

26

## 十一、 去甲基化药物实验（**5-Aza-2**’**-deoxycytidine**）

首先将5-Aza-2'-deoxycytidine通过涡旋溶解于水中浓度为50mM作为工作液，在6孔板中接种胰腺癌细胞培养，在培养基中加入5-Aza-2’工作液，使培养基中5-Aza-2’终浓度分别为0.1,0.5,1.0µM，共培养72小时后收集细胞进行western blot检测BNIP3的表达情况，未添加药物的正常培养细胞作为对照组。

## 十二、 统计学分析

应用SPSS19.0统计软件分析，计量结果采用±标准差（*X*±S），组间比较采用单因素方差分析；*P*<0.05为有统计学意义。

结 果

## 一、 **BNIP3**在胰腺癌细胞中的表达

RT-PCR和Western blot检测结果显示（fig1A），BNIP3在细胞株PANC-1, BxPc-3, CaPan-1, SW1990 and CFPAC-1中常氧及缺氧环境培养均低表达，在细胞株Patu8988中常氧和缺氧环境下相似程度弱表达。另外我们发现，缺氧环境处理对胰腺癌细胞株中BNIP3的表达无促进作用(P> 0.05)。为了进一步研究BNIP3在胰腺癌细胞凋亡中扮演的作用，我们分别用si-RNA转染技术干扰细胞株Patu8988中的BNIP3表达，用搭载人

BNIP3基因的质粒转染BNIP3呈低表达的CaPan-1细胞株来上调其表达。如图fig1B所示，通过Western blot检测结果显示转染质粒BNIP3后CaPan-1细胞株中BNIP3的表达明显增加，而si-RNA干扰后的Patu8988细胞株中的BNIP3表达明显下降(P<0.05)。

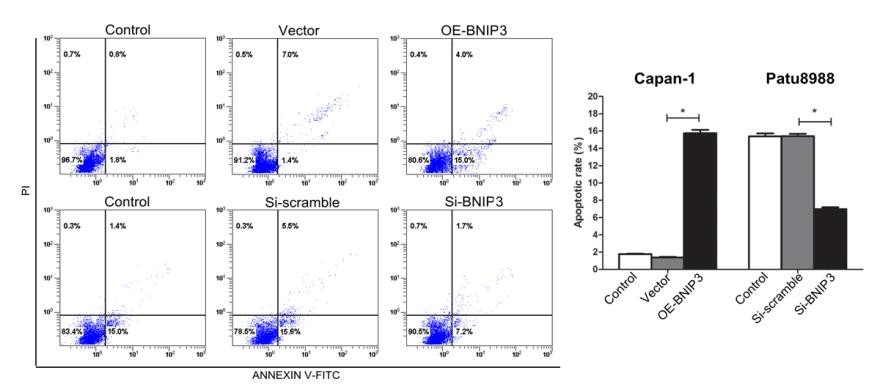


图1 BNIP3在胰腺癌细胞中的表达情况

27

（A: 常氧及缺氧条件下BNIP3在胰腺癌细胞株PANC-1, Patu8988, BxPc-3, CaPan-1, SW1990 and CFPAC-1中mRNA及蛋白表达情况。B: si-RNA干扰及质粒过表达转染后BNIP3在CaPan-1和Patu8988中的表达情况。）

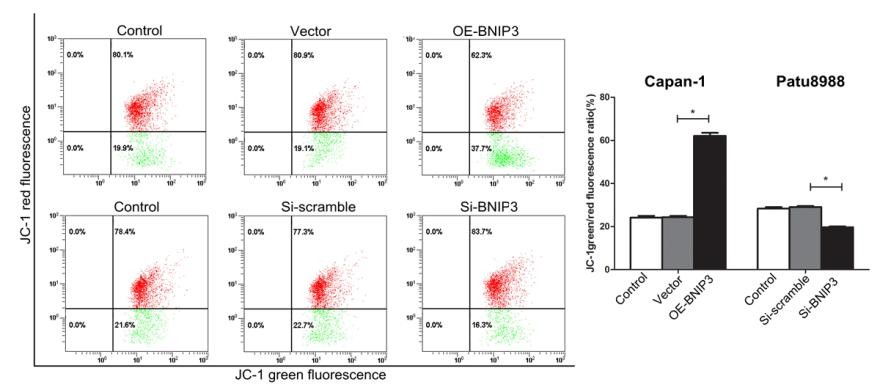
## 二、 **BNIP3**在体外胰腺癌细胞中通过线粒体途径诱导细胞凋亡



A

为了进一步研究BNIP3的功能，我们用流式细胞分析仪检测BNIP3干扰和过表达细胞实验的对照组及实验组的细胞凋亡、线粒体膜电位、活性氧。如图fig2A所示，过表达BNIP3的CaPan-1实验组细胞的早期凋亡率(15.73±0.40%)比转染空载体组的CaPan-1细胞早期凋亡率(1.37±0.06%)明显增加(P<0.05)。通过si-RNA干扰BNIP3表达的Patu8988细胞的早期凋亡率（6.97±0.21%）相比阴性转染的Patu8988细胞的早期凋亡率明显下降（15.40±0.26%, P<0.05）。线粒体膜电位∆Ψm的转变用双荧光染料JC-1所染细胞的绿/红荧光比值的变化来分析（fig2B）。BNIP3过表达实验组细胞的线粒体膜电位比空载体实验组细胞明显下降（P<0.05），相反，si-RNA干扰组的∆Ψm相比阴性干扰组的细胞线粒体膜电位增大（P<0.05）。相似的，图fig2C所示，BNIP3过表达实验组细胞的活性氧ROS产生量相比阴性转染组明显增多（P<0.05），而BNIP3干扰组的活性氧产生量相比阴性转染组则减少（P<0.05）。这些实验结果证实，BNIP3可以增加细胞活性氧的产生，促使线粒体膜电位的下降及促进细胞的凋亡率。而这些也表明BNIP3在胰腺癌细胞株中是通过线粒体途径来促进细胞凋亡的。

28



B

C

图2 BNIP3在胰腺癌细胞中凋亡凋亡的作用

（A：细胞凋亡检测；B：线粒体膜电位MMP检测；C：细胞活性氧ROS检测）**三、改变BNIP3表达对胰腺癌细胞中凋亡相关蛋白表达的影响**

为了进一步证实BNIP3诱导凋亡的机制，我们利用western blot来检测上下调

BNIP3 前后一些凋亡相关蛋白的表达情况。如图fig3 所示，通过质粒载体转染使

BNIP3表达上调后，AIF和Bax的表达分别上调(P<0.05, respectively)，而Bcl-2的表达则下调（P<0.05）。相比之下，通过si-RNA转染干扰下调BNIP3的表达之后获得了与上述相反的结果。而caspase3和9的活性状态的表达在BNIP3的表达改变后未检测到明显的改变（P> 0.05, respectively）。上述实验结果证实BNIP3通过活化AIF和Bax及抑制Bcl-2的表达来诱导细胞凋亡。BNIP3介导非依赖caspase凋亡途径的线粒体凋亡信号通路。

29



图3 BNIP3在胰腺癌细胞中对凋亡相关蛋白表达的作用

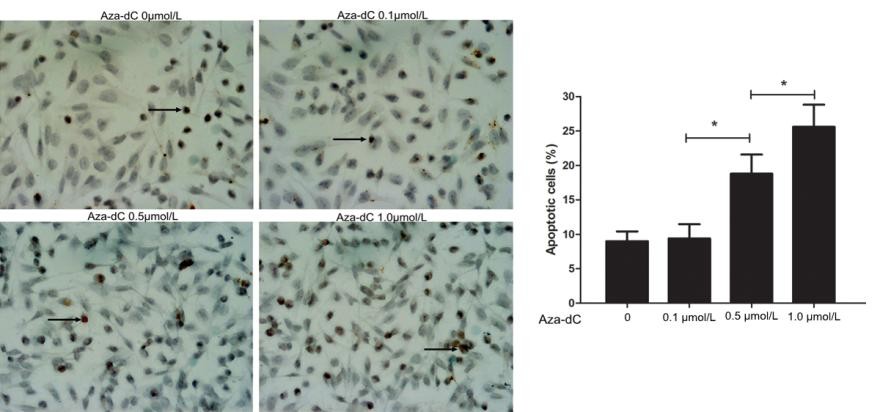
## 四、 **BNIP3**甲基化状态调控其在胰腺癌细胞中的表达

为了确认DNA甲基化和BNIP3表达沉默的关系，甲基化PCR用来检测六株胰腺癌细胞株中BNIP3的甲基化状态（图4A）。五株BNIP3未表达的胰腺癌细胞检测出同步的高甲基化状态，而BNIP3唯一低水平表达的Patu8988细胞株则检测出部分甲基化

（26%）。下一步，我们检测了用甲基化抑制剂Aza-dC处理后的胰腺癌细胞的BNIP3表达情况（图4B）。本来BNIP3表达沉默的Capan-1细胞在用去甲基化药物处理后BNIP3恢复了表达且表达量呈药物剂量依赖型(P<0.05)。而Patu8988细胞经去甲基化药物处理后BNIP3的表达却未发生明显的改变（P>0.05）。进一步行凋亡细胞检测分析

（TUNEL）结果发现细胞凋亡的凋亡率明显增加(P<0.05)和去甲基化药物Aza-dC导致的BNIP3表达的恢复密切相关。实验结果证明胰腺癌细胞BNIP3的表达沉默和其基因的甲基化相关。去甲基化处理不仅可以恢复BNIP3的表达还可以使细胞恢复对BNIP3诱导凋亡的敏感性。

30



C

图4 胰腺癌细胞株BNIP3甲基化PCR检测及去甲基化药物实验

（A：六株胰腺癌细胞株BNIP3甲基化PCR检测；B：不同浓度去甲基化药物5-Aza处理胰腺癌细胞后Western Blot检测BNIP3表达；C：TUNEL法原位检测不同浓度去甲基化药物5-Aza处理后胰腺癌细胞的凋亡率）

## 五、 甲基化抑制**HIF-1**α和**BNIP3**启动子区结合的能力

我们检测并对比了在常氧及缺氧环境下胰腺癌细胞株中HIF-1α和BNIP3的表达。结果显示在缺氧条件下孵育HIF-1α在六株胰腺癌细胞中的表达明显增加(P<0.05)，而与之相对的缺氧条件下BNIP3的表达仍几乎难以检测到，仅Patu8988细胞株BNIP3呈

31

低水平的表达。以前的研究证实缺氧条件下HIF-1α可以通过结合BNIP3的启动子区来诱导BNIP3的表达。但是这一现象我们在胰腺癌中并没有直接检测到。通过分析BNIP3的启动子区基因序列，我们发现存在大量的CpG点。另外BNIP3基因启动子区的-206bp包含一个缺氧反应元件HRE，而早前研究报道证实HRE是转录因子所必须的[1]。为了验证胰腺癌细胞中HIF-1α无法诱导BNIP3的表达和HRE甲基化的相关性，我们对经去甲基化药物Aza-dC处理后的Capan-1细胞进行ChiP实验分析发现，经过Aza-dC处理后的细胞HIF-1α和BNIP3启动子区结合相比未药物处理组细胞明显增加（图6A）。这一结果证明甲基化抑制了胰腺癌细胞中HIF-1α和BNIP3启动子区HRE元件的结合，进而导致胰腺癌BNIP3表达沉默而HIF-1α表达正常。



图4 BNIP3启动子区甲基化对HIF-1α调控BNIP3的影响

（A：缺氧及常氧条件下六株胰腺癌细胞株BNIP3和HIF-1α表达Western Blot检测；B：BNIP3启动子区甲基化位点结构图；C：去甲基化药物处理和正常情况下HIF-1α和BNIP3启动子结合CHIP实验）

讨 论

许多证据表明缺氧微环境作为一种重要的不利因素存在于绝大多数胰腺癌中。细胞通过缺氧诱导相关基因来适应缺氧环境，涉及血管生成，葡萄糖转运，无氧酵解途径等。在我们此次实验研究中检测的6株胰腺癌细胞株中5株细胞BNIP3无论在常

32

氧还是缺氧环境均表达沉默。我们的结果表明在通过转染使BNIP3的表达升高之后，胰腺癌细胞表现出活性氧增加，线粒体膜电位下降，最终导致细胞凋亡增加。而通过si-RNA干扰BNIP3的表达之后则观察到与上述完全相反的结果。因此，我们初步得出在胰腺癌中BNIP3通过作用于线粒体途径来诱导凋亡的结论。

BNIP3隶属于Bcl-2蛋白家族BH-3-only亚家族，可以和Bcl-2和Bcl-xl等抑制凋亡蛋白相结合。BNIP3被认为是一种典型的缺氧诱导基因。但是BNIP3在细胞进程中的作用目前仍颇具争议。过去研究发现BNIP3可以诱导细胞坏死、细胞自噬和细胞凋亡[2]。而截然相反的是一些研究证实BNIP3可以促进细胞生存[3]。BNIP3在不同类型肿瘤的发生发展过程中可能扮演着矛盾的角色[4]。早前的研究和我们此次的实验表明BNIP3在许多胰腺癌细胞株中表达缺失[5]。我们的实验表明，外缘性增加的BNIP3表达可引起活性氧增加，线粒体膜电位下降最后导致不可逆转的细胞凋亡。BNIP3表达沉默可以保护细胞免受线粒体损伤及细胞凋亡。表明在胰腺癌中BNIP3通过线粒体途径诱导凋亡，而其诱导凋亡的精确机制尚不明确。研究发现BNIP3诱导细胞死亡并非完全依赖于它的BH3结构域。TM结构域介导了线粒体膜通透性转运孔mPTP开放和活性氧的产生[6]。但是BNIP3介导的细胞凋亡不完全只依赖其TM结构域[7-9]。

和BNIP3相互作用的蛋白在其介导的线粒体凋亡途径中起着至关重要的作用。研究表明BNIP3通过活化Bax/Bak来促进线粒体膜的通透性[10]。其他研究表明BNIP3介导的线粒体水肿并非完全依赖于亲环素D和细胞色素C[11]。存在于线粒体膜间的促凋亡蛋白AIF在线粒体功能中起着重要的作用。AIF表达增加可以促使细胞对凋亡更敏感，反之AIF表达沉默则保护细胞免于凋亡[12]。在我们的当前研究中发现BNIP3可活化AIF、Bax及抑制Bcl-2的表达，而对caspase相关蛋白的表达无明显影响。表明在胰腺癌细胞中BNIP3通过调节AIF、Bax及Bcl-2的表达来诱导非依赖caspase途径的细胞凋亡。

包括DNA甲基化，组蛋白去乙酰化，转录因子等在内的许多因素可以抑制BNIP3的表达[13-16]。在许多肿瘤肝细胞癌[17]、结直肠癌[18]、胃癌[19]包括胰腺癌中均证实存在BNIP3启动子高甲基化的现象。我们的结果发现DNA甲基化水平和BNIP3的表达缺失密切相关。利用去甲基化药物Aza-dC处理细胞不仅可以恢复BNIP3的表达还可以使胰腺癌细胞恢复对BNIP3诱导细胞凋亡的敏感性。

33

HIF-1α 作为缺氧微环境下活化的至关重要的调节因子。早先报道证实通过和

BNIP3启动区上的缺氧反应元件HRE的结合，HIF-1α可以在缺氧条件下诱导BNIP3的表达。HIF-1α和BNIP3均被检测到在缺氧区域高表达。我们实验数据表明当胰腺癌细胞在缺氧环境下培养时，HIF-1α表达量较常氧条件下明显增加而BNIP3的表达依然难以明显检测。这说明在胰腺癌细胞中HIF-1α活化BNIP3的过程被破坏。然后，在胰腺癌中HIF-1α无法诱导BNIP3表达的具体机制尚未明确。通过对BNIP3启动子区域的基因测序，我们发现包含缺氧反应元件HRE的BNIP3启动子区富含甲基化的

CpG岛。我们进一步的CHIP实验证明当用去甲基化药物Aza-dC处理细胞后可以观察到HIF-1α和BNIP3启动子区结合增加。这表明BNIP3包括HRE的启动子区的高甲基化抑制了HIF-1α和BNIP3的结合，进而导致了胰腺癌BNIP3的低表达。

结 论

BNIP3在胰腺癌细胞株PANC-1, BxPc-3, CaPan-1, SW1990 and CFPAC-1中无论常氧和缺氧环境均低表达，转染上调BNIP3的表达，可以明显增加细胞活性氧的产生，致使线粒体膜电位下降导致线粒体功能紊乱，最终诱导细胞进入不可逆凋亡。

BNIP3在胰腺癌细胞株中低表达是由于其启动子区甲基化影响了HIF-1α和其启动子区的结合，进而使细胞逃避了缺氧诱导的细胞凋亡。

参考文献

[1]. Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Bailes M, Ens K, Kirshenbaum LA, Gibson SB: BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene* 2003, 22: 4734-4744.

[2]. Zhang J, Ney PA: Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell death and differentiation* 2009, 16: 939-946.

[3]. Cosse JP, Rommelaere G, Ninane N, Arnould T, Michiels C: BNIP3 protects HepG2 cells against etoposide-induced cell death under hypoxia by an autophagy-independent pathway. *Biochemical pharmacology* 2010, 80: 1160-1169.

[4]. Burton TR, Gibson SB: The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPping at the heels of cell death. *Cell death and differentiation* 2009, 16: 515-523.

[5]. Abe T, Toyota M, Suzuki H, Murai M, Akino K, Ueno M, Nojima M, Yawata A, Miyakawa H, Suga T, et al: Upregulation of BNIP3 by 5-aza-2'-deoxycytidine

34

Sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia-mediated cell death. *Journal of gastroenterology* 2005, 40:504-510.

[6]. Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH: BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular and cellular biology* 2000, 20: 5454-5468.

[7]. Yasuda M, Theodorakis P, Subramanian T, Chinnadurai G: Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *J Biol Chem* 1998, 273: 12415-12421.

[8]. Chen G, Ray R, Dubik D, Shi LF, Cizeau J, Bleackley RC, Saxena S, Gietz RD, Greenberg AH: The E1B 19K Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med* 1997, 186: 1975-1983.

[9]. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA: Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99: 12825-12830.

[10]. Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB: BNIP3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *The Biochemical journal* 2007, 405: 407-415.

[11]. Quinsay MN, Lee Y, Rikka S, Sayen MR, Molkentin JD, Gottlieb RA, Gustafsson AB: BNIP3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2010, 48: 1146-1156.

[12]. Qi Y, Tian X, Liu J, Han Y, Graham AM, Simon MC, Penninger JM, Carmeliet P, Li S: BNIP3 and AIF cooperate to induce apoptosis and cavitation during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* 2012, 198: 103-114.

[13]. An HJ, Lee H, Paik SG: Silencing of BNIP3 results from promoter methylation by DNA methyltransferase 1 induced by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecules and cells* 2011, 31: 579-583.

[14]. Divyya S, Naushad SM, Murthy PV, Reddy Ch R, Kutala VK: GCPII modulates oxidative stress and prostate cancer susceptibility through changes in methylation of RASSF1, BNIP3, GSTP1 and Ec-SOD. *Molecular biology reports* 2013, 40: 5541-5550.

[15]. Naushad SM, Prayaga A, Digumarti RR, Gottumukkala SR, Kutala VK: Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP3) expression is

35

Epigenetically regulated by one-carbon metabolism in invasive duct cell carcinoma of breast. *Molecular and cellular biochemistry* 2012, 361:189-195.

[16]. Lakshmi SV, Naushad SM, Reddy CA, Saumya K, Rao DS, Kotamraju S, Kutala VK: Oxidative stress in coronary artery disease: epigenetic perspective. *Molecular and cellular biochemistry* 2013, 374: 203-211.

[17]. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, Schroeder I, Factor VM, Thorgeirsson SS: Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2007, 117: 2713-2722.

[18]. Liu F, Liu Q, Yang D, Bollag WB, Robertson K, Wu P, Liu K: Verticillin A overcomes apoptosis resistance in human colon carcinoma through DNA methylation-dependent upregulation of BNIP3. *Cancer research* 2011, 71: 6807-6816.

[19]. Lee SH, Jeong EG, Yoo NJ: Mutational and expressional analysis of BNIP3, a pro-apoptotic Bcl-2 member, in gastric carcinomas. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2007, 115: 1274-1280.

36

全文结论

1. BNIP3在胰腺癌组织中低表达, BNIP3的低表达和肿瘤大小、肿瘤分期、淋巴结转移、肿瘤细胞增殖活跃、凋亡减少密切相关.

2. BNIP3通过调控Bcl-2、Bax等的表达诱导非caspase依赖性的线粒体途径的细胞凋亡.

3.体外胰腺癌细胞BNIP3启动子区的甲基化抑制了HIF-1α和其启动子区的结合, 进而导致BNIP3的低表达.

本实验初步揭示BNIP3在胰腺癌中诱导细胞凋亡的作用机制, 并研究了甲基化为代表的表观遗传学调控BNIP3表达对其功能的影响, 进一步揭示了胰腺癌缺氧耐受, 逃避凋亡的机制, 为以BNIP3为靶点的基因治疗提供了相关实验依据.

37

综述

**BNIP3调控凋亡的研究进展**

张旭（综述）李德春（校审）

**【摘要】**Bcl-2/腺病毒E1B19kDa结合蛋白3（BNIP3）是Bcl-2蛋白家族BH3-only亚家族的非典型成员, 在不同的细胞类型和环境条件下它参与着广泛的细胞进程, 同时也表明它在多种疾病过程中承担着重要的角色, 比如心肌缺血, 细胞自噬, 细胞凋亡. 尽管BNIP3促细胞自噬和细胞死亡的作用在不同的研究中得以印证, 但是最近的研究发现它在这些细胞进程中扮演了相反的角色. 不同的实验研究表明, BNIP3的表观遗传学调节在疾病的发生发展过程中起着保护细胞的作用. 在此, 结合最近的研究我们更关注BNIP3的结构功能以及其调节细胞凋亡和细胞自噬的机制和相关基因的表观遗传学调节涉及多种疾病进程的机制.

关键字: BNIP3 细胞自噬； 细胞凋亡

Bcl-2/腺病毒E1B19kDa结合蛋白3（BNIP3）是一种反常的BH3-only亚家族的成员, 可以和抑制细胞凋亡的蛋白质如BCL-2, BCL-xl,腺病毒E1B-19K&EBV-BHRF等相互作用[1]. 于1994 年首次在酵母双杂交的筛选蛋白中发现可以和腺病毒

E1B19kDa结合, 人类基因命名委员会曾将其命名为NIP3[2]. BNIP3基因定位于人类10号染色体10q26.3. BNIP3和包括癌症和心血管疾病在内的许多疾病的发病机制都密切相关.

**BNIP3的结构**

BNIP3表达蛋白由194个氨基酸组成, 预测分子量为21.5kDa. 其在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法中可观察到一个约30kDa的单体和一个约60kDa的二聚体[3]. BNIP3的结构主要包含以下四个功能结构域: ①PEST结构域: 是BNIP3蛋白降解的靶位点, 可被胞质内的蛋白酶迅速降解, 从而调节细胞内BNIP3蛋白的含量. ②BH3结构域: 紧邻PEST结构域, 可与抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl—XL等)形成异二聚体. ③氨基端结构域(NH2结构域): 此结构域与TM结构域在形成二聚体促进细胞凋亡中起着重要作用. ④C-末端跨膜区(TM): 是BNIP3行使其促凋亡功能的最重要的结构域.

N-末端区域

BNIP3的PEST序列到N终端确定了它的特点, 序列两侧有组氨酸, 精氨酸, 氨

38

基酸残基. 研究发现BNIP3和经受高度逆转、通过蛋白酶体降解的蛋白质相关. 而且, BNIP3具有一个高度保守存在的16氨基酸和BH3相似的长度区域. 根据以往报道, 包含一个完整的半胱氨酸残基, 形成同型二聚体之间的二硫化合物连接键, 使得这个化合物更加稳定. 这些半胱氨酸残基被投射到细胞液上, 使得他们易受到氧气的影响.

BH3结构域

作为BNIP3和其他Bcl-2(BH3)家族蛋白相似的结构, 位于110-118位氨基酸.

BH3结构域是Bcl-2 蛋白家族研究最广泛的结构. 通过突变分析和结构域置换研究

[7], 发现BNIP3只包含一个功能性BH3结构域[8]. BNIP3及其同系物属于一个独立衍生的单源分支[9], 和其他BH3-only蛋白如Bid/Bik有着本质区别, BH3结构域对于BNIP3及其同系物的功能来说不是必须的, 它们可以直接导致线粒体膜电位的变化[10].

C-末端结构域

BNIP3有一个以羧基为末端横跨膜的区域（氨基酸164-184）, C-末端结构域可以把BNIP3转运到线粒体内发挥其促凋亡作用[1,2,8]. BNIP3通过跨膜结构域被固定在线粒体的外膜上. TM结构域的GXXXG基序在和其他膜蛋白二聚化过程中起着十分关键的作用[11]. BNIP3的TM结构域可以助其在膜及表面活性成分上形成一种极稳定的二聚体结构[12], 而敲除TM结构域则无法形成稳定二聚体. 由于它具有独特稳定二聚体的特性, 常常作为模型来研究跨膜α螺旋和完整膜蛋白之间横向联系性[12-14].

对于GXXXG基序的存在, 一个AXXXG甘氨酸链(丙氨酸176,甘氨酸180,甘氨酸184) [15]串联2个残基和极性侧链（丝氨酸172和组氨酸173）的静电关联被认为在稳定二聚体中十分重要[13,14]. 这一观点被Sulistijo ES在2006年做的突变分析研究所支持[14]. 其研究表明丝氨酸172的氧分子侧键对二聚化作用是必须的, 两个极性残基丝氨酸172、组氨酸173 组成的单体间侧面氢键链接导致了二聚体的稳定性

[14]. 结构分析研究表明二聚体在位置176-184的相互联系十分紧密, 在两单体间螺

旋联系最紧密的是甘氨酸180位[14]. 进一步的结构特性研究表明, 在膜中部的大量氢键链接了组氨酸和丝氨酸节点. 沿着膜全长存在的亲水性轨道, 该节点的亲水性致使离子可能通过这种二聚体传导, 揭示了BNIP3独自在膜上承担离子传输结构功能

39

的机制. 这种TM结构域的特性可以帮助阐明BNIP3的功能, 特别是诱导缺氧酸中毒引起的细胞死亡的机制[16].

**BNIP3的功能**

研究发现BNIP3涉及多种细胞功能及各种不同的细胞途径. BNIP3的精确机制和功能尚未具体阐明, 而且关于其功能的不同研究仍然存在相互矛盾的结果. 关于

BNIP3的功能, 一方面在某些研究中被阐述为促凋亡蛋白质, 其他研究却认为BNIP3无法独立引起细胞死亡. 一些研究者确定了BNIP3在由缺氧引起的细胞自噬中的作用. BNIP3的活化作用被发现影响多种病理生理学功能, 包括神经性疾病, 心肌缺血引起的细胞死亡.

早前研究证实缺氧诱导因子HIF-1α过表达可以诱导BNIP3的表达[17]. BNIP3的启动子区含有一个缺氧诱导因子反应元件HRE也为BNIP3作为HIF-1α的下游靶基因提供了证据[18]. 进一步研究证明, BNIP3在pVHL(HIF-1α表达抑制因子）表达沉默的细胞株里被过表达, pVHL表达阳性的细胞株则BNIP3表达沉默[19]. 这些数据和其他一些相关研究都表明, BNIP3是一个缺氧诱导表达基因.

尽管定位于线粒体膜的BH3结构域是Bcl-2家族蛋白质的特点, 但是BNIP3 的

BH3结构域通过线粒体膜通透性改变诱导凋亡的机制和Bcl-2家族蛋白BH3-only亚家族其他成员的并不同[20]. 研究证明, BH3-only蛋白促进线粒体外膜通透性增加是通过Bax/Bak的活化作用[21,22]. 双敲除Bax/Bak的小鼠成纤维细胞可以抑制BNIP3介导的Ca黄素释放进一步证明Bax/Bak对于BNIP3诱导线粒体内膜通透性增加是必要的. 关于Bax/Bak(DKOMEF)的研究表明, 阻止介导钙黄素释放bax/bak对BNIP3线粒体渗透作用有十分重要的意义. 研究发现, 在试管内离体的心脏细胞线粒体

Bax/Bak活化引起线粒体肿胀和细胞色素c的释放. 并且进一步研究表明, 线粒体膜透化作用是通过bax/bak的活化通路而不是通过mPTP的开放. 这些发现同样被BNIP3介导线粒体肿胀对环孢菌素A不敏感和不依赖亲环素D的研究结果所证实. 环孢菌素A是一种线粒体通透性转运孔的抑制剂, 而亲环素D是一种mPTP的基本组件[20].

BNIP3破坏线粒体内外膜完整性的能力表明BNIP3通过一种不同于其他BH3-only蛋白如tBid的机制发挥功能. BNIP3介导线粒体膜透化作用和线粒体肿胀以及细胞色素c的释放相关, 而tBid的存在并不能导致线粒体肿胀.

其他一些研究报道BNIP3通过mPTP[6,23,24]开放和Bax/Bak活化作用来介导线

40

粒体功能紊乱障碍[25]. 这些研究表明, 缺少Bax/Bak表达的细胞对BNIP3介导的细胞死亡敏感性下降, 且BNIP3可以促使线粒体释放细胞色素C[25, 26]. 进一步研究表明, 2VADfmk（一种半胱天冬酶抑制剂）可以在新生心肌细胞中抑制BNIP3诱导的细胞死亡[24]. BNIP3过表达被发现可以引起线粒体的破碎/裂变而在沉默BNIP3表达的人宫颈癌HeLa细胞中线粒体的破坏被抑制[27]. 进一步研究表明, PEG可以阻止BNIP3诱导释放细胞色素c, 证实BNIP3诱导的线粒体肿胀是一种线粒体蛋白质和细胞色素融合产物OPA1的分解和释放引起的. BNIP3和OPA1相关性分析表明抑制核聚变可以促进线粒体裂变.

BNIP3引起细胞死亡同时具有以mPTP开放为代表的细胞坏死和以Bax/Bak活化为前奏的细胞凋亡两者的特征. 和BH3单一蛋白比如Bim, Bid等不同, 这些蛋白的

BH3结构域存在对于它们所引起细胞凋亡是必须的, 而研究发现BNIP3介导细胞死亡不完全依赖于BH3结构域. BNIP3依靠其C-末端跨膜结构域来定位于线粒体[1]. 鉴于BNIP3和线粒体的结合对诱导线粒体紊乱和细胞死亡至关重要, 研究发现BNIP3跨膜结构域的变异抑制了BNIP3诱导细胞死亡. BNIP3的TM结构域对其促进细胞死亡和BNIP3特定的线粒体靶向作用十分重要[1]. 研究发现, 这种BNIP3促凋亡活动在破坏TM区域后表现为非功能性. 进一步印证了BNIP3的跨膜结构域TM对于促进细胞凋亡、线粒体定位和BNIP3二聚化起着十分重要作用, 但是也有研究发现

BNIP3的促凋亡作用并非完全依赖TM结构域. BNIP3依靠其BH3结构域和TM结构域同时可以诱导细胞坏死和凋亡的特征和其他BH3-only家族蛋白截然相反.

细胞死亡的具体机制以及BNIP3和细胞坏死的相关性分析在不同的研究中常得出矛盾的结果, 目前仍然有待进一步明确. 研究发现, BNIP3诱导细胞死亡和线粒体膜的透化作用, 线粒体功能紊乱, mPTP开放以及活性氧ROS的产生相关[6]. 一项研究发现在淋巴细胞中凋亡诱导因子CD47和BNIP3协同作用, 表明在不同的细胞类型中BNIP3介导的细胞凋亡可能依赖于其他不同的调控因子[28]. 研究表明, 在没有压力条件上调BNIP3表达的情况下BNIP3在T细胞死亡过程中依然发挥着作用. 亦有研究神经酰胺依赖的BNIP3转录表达上调在乳腺癌细胞株中发现通过抑制脂肪酸合成酶导致细胞的死亡[29].

Macleod关于胎儿肝细胞的研究表明, BNIP3的表达激活在转录因子pRb沉默的情况下没有诱导细胞凋亡样细胞死亡而是积极地促进了细胞生存[30,31]. 进一步研究

41

确定, 缺氧诱导BNIP3过表达时转录因子pRb导致了细胞的存活和细胞自噬. 他们也同时确定pRb/E2F直接抑制BNIP3的转录表达. 在常氧条件下BNIP3启动子区和

E2F4结合而在缺氧条件下则被E2F1转录调控因子pRb的表达取代, 导致了BNIP3启动子区的活性下降. 这表明BNIP3和pRb之间的一个功能性协同作用使得BNIP3表达减少. 进一步研究表明, E2F1诱导BNIP3的转录表达并抑制细胞凋亡是和BNIP3启动子区结合的直接结果[32].

多形性腺瘤基因样蛋白PLAGL2, 一个锌指样结构缺氧应答转录因子, 在成纤维细胞和神经母细胞瘤的体外研究发现, PLAGL2表达可以诱导BNIP3的表达和细胞的死亡. 这一作用在BNIP3启动子区缺乏HRE时仍然可以表达, 表明PLAGL2可以独立活化BNIP3[33]. 关于HEK293细胞的研究表明BNIP3表达可以被FOXO3激活, 而在缺乏养分的细胞中FOXO3表达耗尽后BNIP3表达亦下降, 表明了FOXO3活化BNIP3的作用[34]. 因此可以明确和HIF-1α类似, BNIP3可以直接被转录因子如F2F1, PLAGL, FOX03激活, 从而导致细胞凋亡和细胞自噬.

研究还发现, 在大鼠心室肌细胞中NF-κB的P65亚基和BNIP3启动子结合抑制了转录表达表明NF-κB依赖的BNIP3转录调控机制[35]. 进一步研究确定, NF-κB可以阻止E2F1和BNIP3启动子区的捆绑结合[36]. 在对成熟的巨噬细胞中加入亚致死剂量的炭疽毒素处理时, 可以导致BNIP3的mRNA表达的不稳定性, 揭示了BNIP3可被转译后修饰[37].

正常情况下, BNIP3的过表达被认为对于细胞的生存能力是几乎没有影响的, 同时也发现BNIP3的过度表达推迟了细胞的死亡. 据报道, BNIP3在一些细胞株中仅基础性表达, 在正常环境下大多数细胞株的BNIP3表达仍然处于抑制状态. 这表明, 在正常情况下, BNIP3 的表达保持了一个不活跃状态以及通过翻译后修饰来调节.

Graham的研究发现缺氧条件后的再氧化导致了BNIP3的磷酸化, 而磷酸化BNIP3

的水平升高和细胞死亡相关[38].

研究发现, 在不表达Apa-1, caspase3, caspase9的小鼠胚胎纤维母细胞中, BNIP3依然可以诱导细胞死亡, 说明BNIP3诱导细胞死亡并不依赖于caspase半胱天冬酶[6]. 相反的, 研究发现在缺血再灌注时内源性的BNIP3引起了caspase依赖性的细胞凋亡

[39]. 和Bim, Bid等其他促进细胞凋亡的蛋白质相似, BNIP3也可以诱导Bax/Bak

的结构活性进而导致线粒体的透化作用和细胞色素C的释放[25].

42

在实性肿瘤内部的缺氧环境导致的低氧化作用或许会导致恶性肿瘤细胞增加侵袭性和生血管潜能. 在低氧条件下也发现肿瘤细胞的高度基因不稳定性, 增加了细胞的突变率[40]. 在实验和临床数据中均可观察到肿瘤耐受缺氧所获得的转移能力增加和产生放化疗抵抗进而导致肿瘤复发之间存在着正相关性[41].

原位杂交研究表明, BNIP3在人类乳腺癌坏死周围区域比在其他正常组织中更高表达[19]. 缺氧诱导相关因子如VEGF, bFGF, PDGF和BNIP3的表达之间存在相关性[42]. 进一步研究表明在上皮细胞中生长因子如EGF, IGF可以抑制BNIP3的促凋亡活性[43]. 在一定类型的肺癌组织中也发现了BNIP3表达位于细胞核内. 研究发现BNIP3核内迁移所导致的表达下降或者功能失活或许在肿瘤发展过程中是一个迟发必不可少的阶段. BNIP3的核内迁移或许给恶性肿瘤逃避凋亡获得生存优势带来可能[44]. 相反, 在早期的癌前病变阶段, BNIP3的正调节是肿瘤低氧环境的结果, 肿瘤的发展过程导致了慢性的肿瘤坏死.

在胰腺腺癌和胰腺癌细胞株中BNIP3的表达由于其启动子区的超甲基化而受抑制[45]. BNIP3的表达沉默和启动子区的CpG岛的甲基化相关, 用去甲基化药物5-azaytidine处理后不仅可以恢复缺氧诱导BNIP3表达, 还可以逆转细胞对缺氧诱导细胞死亡的耐受能力[46]. 进一步研究也发现组蛋白去乙酰化和BNIP3的沉默相关. 联合应用组蛋白去乙酰化抑制剂曲古抑菌素A(TSA）和甲基化抑制剂5-AZA比单独应用5-AZA更能恢复BNIP3的表达[47]. BNIP3的活动也可被转录后修饰所调节

[48].

早前的研究表明, 正常的细胞株和恶性肿瘤细胞株在低氧条件下均可通过HIF-1α和HIF-2α启动细胞自噬过程[49]. BNIP3作为HIF靶向基因所含有的非典型BH3结构域, 可以和自噬基因Beclin1-Bcl2和Beclin1-Bcl-x1复合物竞争, 导致自噬基因Beclin1的释放而引起了细胞自噬[49,50].

早前的研究表明, BNIP3的过度表达不足以引起细胞凋亡, 也明确了BNIP3在低氧诱导细胞自噬时所起到的作用[31]. 诱导细胞自噬或许是BNIP3的基本作用. 鉴于在低氧细胞中, 敲除BNIP3基因减少了ATP的细胞水平和BNIP3所介导的细胞自噬是一致的, 进而参与调控细胞内的能量平衡. 因为在成人心肌细胞中存在极高浓度的线粒体且BNIP3可以调控线粒体功能, 研究已经证明BNIP3和心衰竭的病理学机制相关. 和心力衰竭相关的研究证明了BNIP3和心衰之间的相关性, 在通过显性下

43

调BNIP3的表达后心肌细胞的死亡明显下降[24]. 进一步将外源性BNIP3转入心脏表达后不仅明显提高了心功能并减少了缺血再灌注损伤的风险. Kubli的研究证明,

BNIP3的同源二聚化和活化在缺血再灌注损伤过程中或许扮演了一个氧化还原传感器的角色[5]. 最近的研究揭示当BNIP3表达被抑制时会导致心功能不全以及功能不全线粒体的积累表明了BNIP3 的双重作用. 当新生心肌细胞经受缺氧环境时会使

BNIP3 的表达增加. Kirshenbaum 团队对新生心肌细胞的研究表明NF-κB 在抑制

BNIP3的表达上起了一个关键的作用. 所有这些研究表明由BNIP3引起的心肌细胞死亡或许是由于其介导的细胞自噬或细胞自我凋亡, BNIP3或许是一种治疗心肌疾病的潜在靶点.

在类风湿性关节炎中的研究发现当BNIP3的促细胞凋亡能力被抑制时会导致关节滑膜的增生[51]. 研究还发现BNIP3的表达集中在缺血区域的神经元细胞[52]. 进一步研究发现BNIP3在中风及老年痴呆症的神经元细胞死亡过程中发挥着作用[53].

BNIP3的功能和炭疽坏死毒素引起的巨噬细胞坏死密切相关[37]. 最近对小鼠黑色素瘤细胞的研究发现了BNIP3 促生存及通过重塑肌动蛋白细胞骨架来促肿瘤的作用

[54].

**表观遗传学调控**

启动子区域甲基化调控转录过程导致了基因表达的沉默或表达异常, 这和包括细胞分裂、细胞死亡在内的细胞功能异常密切相关, 因此基因的甲基化水平成为决定细胞命运至关重要的因素[55,56]. 研究发现许多基因存在表观遗传调控并且和众多细胞病理生理功能密切相关. 鉴于我们和前人的研究表明许多参与凋亡通路的基因的

DNA甲基化状态干扰了其功能表达[55,57], 我们的研究最后关注了BNIP3的表观遗传学调节. BNIP3的DNA甲基化导致其表观遗传学调控源于BNIP3启动子区域存在着CpG岛. 进一步研究表明, BNIP3启动子区域异常甲基化或H3的5VCPG区域的组蛋白去乙酰化会抑制BNIP3的表达[58]. 通过对人肝细胞癌BNIP3启动子CpG岛的全基因组分析数据表明, 甲基化导致的BNIP3 选择性失活和患者的预后差相关

[59].

和在乳腺癌, 卵巢癌, 颈部鳞状细胞癌发现的BNIP3的高表达相反, 在其他几种恶性肿瘤比如结肠直肠癌, 胃癌细胞, 胰腺癌和造血系统恶性肿瘤中并没有检测到

BNIP3表达[60,61]. 研究发现, 在原发性结直肠癌中BNIP3甲基化比率达到了60%,

44

而在明显转移的肿瘤甲基化率达到了70%. 在结肠癌细胞株中也发现了存在BNIP3

启动子甲基化. 在胰腺癌和胰腺癌细胞株中发现BNIP3 启动子的高甲基化导致了

BNIP3表达的失活. 启动子超甲基化和如S100A4转录调控因子的上调对BNIP3转录表达的沉默很重要. 进一步研究证实BNIP3的高甲基化存在于恶性肿瘤细胞中, 而在相邻的正常细胞缺检测不到, 这也揭示了BNIP3或许在各种类型的恶性肿瘤发展过程中扮演了很重要的角色.

在对12株造血系统恶性肿瘤细胞株中检测到5株存在BNIP3启动子区的异常甲基化状态导致的BNIP3表达缺失. 用甲基化抑制剂5-AZA处理细胞可以恢复BNIP3的表达也印证了BNIP3的表观遗传调控[62]. 通过对83例原发性血液系统肿瘤分析发现15%的急性淋巴细胞白血病, 17%的急性髓细胞白血病, 21%的多发性骨髓瘤中发现存在甲基化, 提示BNIP3表达沉默在癌症发展过程中具有组织特异性. 以上数据表明了BNIP3在不同细胞类型中具有着不同作用, 它可以引起不同种类的细胞死亡和其他如促进癌细胞存活及耐受缺氧的能力. 其他介导缺氧诱导凋亡相关的基因不存在甲基化也引起了研究注意.

DNA甲基转移酶类DNMTs调控着DNA甲基化, 在人体中发挥调控甲基化作用的是甲基转移酶1DNMT1[63,64]. 当用DNMT1抑制剂5-AZA处理细胞时可以恢复

BNIP3的表达, 表明BNIP3启动子区域甲基化和其表达缺失相关. 当DNMT1的表达被抑制时可以检测到BNIP3的表达, 进一步证明DNMT1在BNIP3启动子甲基化所起到的作用[65]. 尽管甲基化引起的BNIP3沉默表达可以影响肿瘤的治疗和预后, 但是其确切的机制有待被进一步阐明. 一些研究尝试明确BNIP3的调控机制以及和疾病相关其他基因之间的联系[66-68].

最近一项研究发现在谷氨酸羧肽酶单倍型的前列腺癌患者中BNIP3表达被表观遗传调节增加[66]. 对这些肿瘤标本进一步检测发现存在BNIP3的低甲基化状态. 一碳代谢异常相关基因调控了BNIP3的表达[67]. 在对一碳代谢途径变异基因的分析发现丝氨酸羧甲基转移酶（cSHMT) C1402T的变异引起的叶酸代谢改变造成了BNIP3的表达减少. C1402T 的变异和BNIP3 表达调控成反比, 而蛋氨酸合酶还原酶

(MTRR) A66G和蛋氨酸合酶(MTR) A2756G和BNIP3调控正相关. 进一步研究表明

BNIP3 的表达和氧化应激标记物比如血浆同型半胱氨酸和四氢叶酸还原酶

(MTHFR) C677T变异体存在正相关表达[69]. 这些数据进一步印证了Kubi关于BNIP3

45

作为一个氧化还原感受器发生抑制抗氧化剂相关作用的研究[5]. 另一研究表明随着体重指数BMI的提升伴有BNIP3低甲基化状态的增加, BMI和BNIP3甲基化状态的负相关关系可以认为是一个乳腺癌的潜在危险因素[70].

另有研究发现在正常生理条件下人类动脉内皮细胞HAECS并不表达BNIP3, 但当用AZA和TSA处理后可以检测到BNIP3的表达, 表明DNA甲基化和组蛋白去乙酰化的作用调控了BNIP3的表达[68]. 进一步研究发现, 当由于高胆固醇血症引起的氧化应激增加时伴有BNIP3的表达水平增加. 源于S-腺苷甲硫氨酸SAM与S-腺苷同型半胱氨酸SAH的比值（SAM/SAH）的改变影响了BNIP3启动子CpG岛的甲基化状态或者源于同型半胱氨酸活化BNIP3的64位半胱氨酸残基导致产生活性氧ROS引发的自氧化作用和随后的BNIP3的同源二聚化[67]. 此外, 在冠状动脉疾病患者中检测到BNIP3的高表达和BNIP3的低甲基化相关. 已经明确BNIP3和心脏功能异常相关, 不同的研究已经表明氧化应激在BNIP3表观遗传调控中的作用. 进一步研究明确了BNIP3的表观遗传学调控和各种疾病的生理病理学机制密切相关性.

总结：

最新的研究明确了多种调控因子可以影响BNIP3 的功能, 表观遗传学调控在

BNIP3表达及和其他相关基因的调控过程中起着关键的作用. 总之, 基于这些证据, 对BNIP3功能更综合全面的认识还需要在体内外不同细胞类型及环境下进行更详尽的研究. 进一步研究可以探索BNIP3作为治疗应用新靶点的可能性.

参考文献

[1]. Yasuda M, Theodorakis P, Subramanian T, Chinnadurai G: Adenovirus E1B-19 K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *J Biol Chem* 1998, 273: 12415–12421

[2]. Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B et al: Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 1994, 79: 341–351

[3]. Chen G, Ray R, Dubik D, Shi L, Cizeau J, Bleackley RC et al: The E1B19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med* 1997, 186: 1975–1983

[4]. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M: Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 1986*,* 234: 364–36846

[5]. Kubli DA, Quinsay MN, Lee Y, Gustafsson AB: BNIP3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, 295: H2025–H2031

[6]. Vande VC, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH: BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Bio*l 2000, 20: 5454–5468

[7]. Yasuda M, Han JW, Dionne CA, Boyd JM, Chinnadurai G: BNIP3alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Res* 1999, 59(3): 533–537

[8]. Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenberg A: Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 1999, 274(1): 7–10

[9]. Aouacheria A, Brunet F, Gouy M: Phylogenomics of lifeor-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evo*l 2005, 2(12): 2395–2416*10.* Shimizu S, Tsujimoto Y: Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci*

*[US] A* 2000, 97(2): 577–582

[11]. Russ WP, Engelman DM: The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix–helix association. *J Mol Biol* 2000, 296: 911–919

[12]. Sulistijo ES, Jaszewski TM, MacKenzie KR: Sequencespecific dimerization of the transmembrane domain of the '‘BH3-only'’protein BNIP3 in membranes and detergent. *J Biol Chem* 2003, 78: 51950–51956

[13]. Metcal DG, Law PB, DeGrado WF: Mutagenesis data in the automated prediction of transmembrane helix dimers. *Proteins* 2007, 67: 375–384

[14]. Sulistijo ES, MacKenzie KR: Sequence dependence of BNIP3 transmembrane domain dimerization implicates sidechain hydrogen bonding and a tandem GxxxG motif in specific helix–helix interactions. *J Mol Biol 2006,* 364: 974–990

[15]. Kim S, Jeon TJ, Oberai A, Yang D, Schmidt JJ, Bowie JU: Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 02: 14278–1428347

[16]. Bocharov EV, Pustovalova YE, Pavlov KV, Volynsky PE, Goncharuk MV, Ermolyuk YS, Karpunin DV, Schulga AA, Kirpichnikov MP, Efremov RG, Maslennikov IV, Arseniev AS: Unique dimeric structure of BNIP3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J Biol Chem* 2007, 282(22): 16256–16266

[17]. Guo K, Searfoss G, Krolikowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K et al: Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ* 2001, 8: 367–376

[18]. Bruick RK: Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 9082–9087

[19]. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL: HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001, 61: 6669–667320. Quinsay Melissa N, Lee Y, Shivaji Rikka M, Sayen R, Molkentin Jeffery D, Gottlieb Roberta A, Gustafsson A˚B: BNIP3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *J Mol Cell Cardio*l

[20] 10, 48(6): 1146–1156

[21]. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB: BH3-only proteins that bind prosurvival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001, 15(12): 1481–1486

[22]. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ et al: Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001, 292(5517): 727–730

[23]. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA: Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 12825–12830

[24]. Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA: Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxiamediated cell death of ventricular myocytes. *Circ Res* 2002, 91: 226–231

[25]. Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB: BNIP3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem J* 2007, 405: 407–415

[26]. Quinsay MN, Lee Y, Rikka S, Sayen MR, Molkentin JD, Gottlieb RA, Gustafsson AB:

48

BNIP3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2010, 48:1146–1156

[27]. Landes T, Emorine LJ, Courilleau D, Rojo M, Belenguer P, Arnaune-Pelloquin L: The BH3-only BNIP3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Rep* 2010, 11: 459–465

[28]. Lamy L, Ticchioni M, Rouquette-Jazdanian AK, Samson M, Deckert M, Greenberg AH et al: CD47 and the 19 kDa interacting protein-3 (BNIP3) in T cell apoptosis. *J Biol Chem* 2003, 278: 23915–23921

[29]. Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SK, Hirota S, Hosobe S et al: Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006, 66: 5934–5940

*[30].* Macleod K, Hu Y, Jacks T: Loss of Rb activates both p53-dependent and -independent cell death pathways in the developing mouse nervous system. *EMBO J* 1996, 15: 6178–6188 *Mol Biol Rep*

[31]. Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF: BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* 2007, 27: 6229–6242

[32]. Yurkova N, Shaw J, Blackie K, Weidman D, Jayas R, Flynn B et al: The cell cycle factor E2F-1 activates BNIP3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes. *Circ Res* 2008, 102: 472–479

[33]. Mizutani A, Furukawa T, Adachi Y, Ikehara S, Taketani S: A zinc-finger protein, PLAGL2, induces the expression of a proapoptotic protein Nip3, leading to cellular apoptosis. *J Biol Chem* 2002, 277: 15851–15858

[34]. Mammucari C, Schiaffino S, Sandri M: Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* 2008, 4: 524–526

[35]. Shaw J, Zhang T, Rzeszutek M, Yurkova N, Baetz D, Davie JR, Kirshenbaum LA: Transcriptional silencing of the death gene BNIP3 by cooperative action of NF-kappaB and histone deacetylase 1 in ventricular myocytes. *Circ Res* 2006, 99: 1347–1354

[36]. Shaw J, Yurkova N, Zhang T, Gang H, Aguilar F, Weidman D et al: Antagonism of E2F-1 regulated BNIP3 transcription by NF-kappaB is essential for basal cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105: 20734–2073949

[37]. Ha SD, Ng D, Lamothe J, Valvano MA, Han J, Kim SO: Mitochondrial proteins BNIP3 and BNIP3L are involved in anthrax lethal toxin-induced macrophage cell death. *J Biol Chem* 2002, 282: 26275–26283

[38]. Graham RM, Thompson JW, Wei J, Bishopric NH, Webster KA: Regulation of BNIP3 death pathways by calcium, phosphorylation, and hypoxia-reoxygenation. *Antioxid Redox Signal* 2007, 9: 1309–1316

[39]. Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA et al: Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves BNIP3 and autophagy. *Cell Death Differ* 2007, 14: 146–157

[40]. Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM: Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 1996, 56: 5754–5757

[41]. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Gibson Spencer B: BNIP3 subfamily BH3-only proteins—mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* 2008, 27(Suppl 1): S114–S127

[42]. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sowter HM, Sivridis E, Gibson S, Gatter KC et al: BNIP3 expression is linked with hypoxia-regulated protein expression and with poor prognosis in nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 5566–5571

[43]. Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Bailes M, Ens K et al: BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene* 2003, 22: 4734–4744

[44]. Erkan M, Kleeff J, Esposito I, Giese T, Ketterer K, Buchler MW et al: Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene* 2005, 24: 4421–4432

[45]. Okami J, Simeone DM, Logsdon CD: Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2004, 64: 5338–5346

[46]. Abe T, Toyota M, Suzuki H, Murai M, Akino K, Ueno M et al: Upregulation of BNIP3 by 5-aza-20-deoxycytidine sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia mediated cell death. *J Gastroenterol* 2005, 40: 504–510

[47]. Murai M, Toyota M, Suzuki H, Satoh A, Sasaki Y, Akino K et al: Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 1021–102750

[48]. Manka D, Millhorn DE: A potential molecular link between aerobic glycolysis and cancer. *Cell Cycle* 2006, 5: 343–344

[49]. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouysse´gur J, Mazure NM: Hypoxia-induced Autophagy is mediated through HIF-induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3-domains. *Mol Cell Biol* 2009, 29: 2570–2581

[50]. Mazure Nathalie M, Pouysse´gur J: Atypical BH3 -domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy* 2009, 5(6): 868–869

*[51].* Kammouni W, Wong K, Ma G, Firestein GS, Gibson SB, ElGabalawy HS: Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3. *ArthritisRheum* 2007, 56: 2854–2863

[52]. Schmidt-Kastner R, Aguirre-Chen C, Kietzmann T, Saul I, Busto R, Ginsberg MD: Nuclear localization of the hypoxiaregulated pro-apoptotic protein BNIP3 after global brain ischemia in the rat hippocampus. *Brain Res* 2004, 1001: 133–142

[53]. Zhang Z, Yang X, Zhang S, Ma X, Kong J: BNIP3 upregulation and EndoG translocation in delayed neuronal death in stroke and in hypoxia. *Stroke* 2007, 38: 1606–1613

[54]. Maes H, Van Eygen S, Krysko DV, Vandenabeele P, Nys K, Rillaerts K, Garg AD, Verfaillie T, Agostinis P: BNIP3 supports melanoma cell migration and vasculogenic mimicry by orchestrating the actin cytoskeleton. *Cell Death Dis* 2014, 13(5): e1127

[55]. Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002, 3: 415–428

[56]. Kondo Y, Issa JP (2004) Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev 2004,* 23: 29–39

[57]. Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R: Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug Resist Updat* 2004, 7: 267–278

[58]. Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K et al: Chemical genomic screening for methylation- silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-20-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci* 2006, 97: 64–71

[59]. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA et al: Mechanistic and

51

Prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2007, 117:2713–2722

[60]. Ray R, Chen G, Vande Velde C et al: BNIP3heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3(BH) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem* 2000, 275: 1439–1448

[61]. Sowter HM, Ferguson M, Pym C et al: Expression of the cell death gene BNIP3 and NIX in ductal carcinoma in situ of the breast; correlation of BNIP3 levels with necrosis and grade. *J Pathol 2003,* 201: 573–580

[62]. Murai M, Toyota M, Satoh A, Suzuki H, Akino K, Mita H et al: Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours. *Br J Cancer* 2005, 92: 1165–1172

[63]. Wade PA (2001): Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays* 2001, 23: 1131–1137

[64]. Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R et al: Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 2001, 27: 31–39

[65]. An HJ, Lee H, Paik SG: Silencing of BNIP3 results from promoter methylation by DNA methyltransferase 1 induced by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cells* 2011, 31(6): 579–583

[66]. Divyya S, Naushad SM, Murthy PV, Reddy ChR, Kutala VK: GCPII modulates oxidative stress and prostate cancer susceptibility through changes in methylation of RASSF1, BNIP3, GSTP1 and Ec-SOD. *Mol Biol Rep* 2013, 40(10): 5541–5550

*[67].* Naushad SM, Prayaga A, Digumarti RR, Gottumukkala SR, Kutala VK: Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP3) expression is epigenetically regulated by onecarbon metabolism in invasive duct cell carcinoma of breast. *Mol Cell Biochem* 2012, 361(1–2): 189–195 *Mol Biol Rep*

[68]. Lakshmi SV, Naushad SM, Reddy CA, Saumya K, Rao DS, Kotamraju S, Kutala VK: Oxidative stress in coronary artery disease: epigenetic perspective. *Mol Cell Biochem* 2013, 374(1–2): 203–211

[69]. Reddy CA, Somepalli V, Golakoti T, Kanugula AK, Karnewar S, Rajendiran K, Vasagiri N, Prabhakar S, Kuppusamy P, Kotamraju S, Kutala VK: Mitochondrial-targeted curcuminoids: a strategy to enhance bioavailability and

52

Anticancer efficacy of curcumin. *PLoS One* 2014, 9(3):e89351

[70]. Naushad SM, Hussain T, Al-Attas OS, Prayaga AA, Digumarti RR, Gottumukkala SR, Kutala VK: Molecular insights into the association of obesity with breast cancer risk: relevance to xenobiotic metabolism and CpG island methylation of tumorsuppressor genes. *Mol Cell Biochem* 2014, 392(1–2): 273–280

53

缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文名称** | **中文名称** |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| FBS | Fatal bovine serun | 胎牛血清 |
| HE | Hematoxylin-eosin staining | 苏木精-伊红染色法 |
| IHC | immunohistochemistry | 免疫组织化学 |
| IF | immunofluorescence | 免疫荧光 |
| Ki-67 | Nuclear associated antigen Ki-67 | 细胞增殖核抗原 Ki-67 |
| mRNA | Messenger RiboNucleic Acid | 信使核糖核酸 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链反应 |
| RT- PCR | Reverse transcription-polymerase chain | 逆转录聚合酶链反应 |
| PBS | Phosphate buffer saline | 磷酸缓冲液 |
| TNF-α | Tumor necrosis factor-α | 肿瘤坏死因子-α |
| HIF-1α | Hypoxia induce factor-1α | 缺氧诱导因子-1α |
| AIF | Apoptosis inducing factor | 细胞凋亡诱导因子 |
| ATP | Adenosine triphosphate | 腺嘌呤核苷三磷酸 |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma-2 | B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2 |
| HRE | Hypoxia responsive element | 缺氧反应元件 |
| PI | Propidium iodide | 碘化丙啶 |
| PC | Pancreatic carcinoma | 胰腺癌 |
| mPTP | Mitochondrial permeability transition pore | 线粒体通透性转运孔 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧自由基 |
| MMP | Mitochondrial membrane potential | 线粒体膜电位 |
| RNA | RiboNucleic Acid | 核糖核酸 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| SPSS | Statistical package for social science | 社会科学统计学软件 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | 血管内皮生长因子 |

54

攻读学位期间公开发表的论文

1. **Xu Zhang\***, Jian Yang**\***, Ye Li\*, et al. Loss of BNIP3 expression protects against cell apoptosis via mitochondrial pathway in pancreatic cancer cells. BMC cancer, under review.

2. Jian Yang**\***, **Xu Zhang\***, Yi Zhang\*, et al. HIF-2αpromotes Epithelial-mesenchymal transition through regulating Twist2 binding to the promoter of E-cadherin in pancreatic cancer. J EXP CLIN CANC RES, (2016) 35:26

55

致谢

时光荏苒, 光阴似箭, 三年的研究生生涯已接近尾声, 回首三年, 百感交集, 有过太多珍贵美好的回忆, 此刻心中充盈最多的仍是感激. 硕士研究生阶段的学习是我人生中的一个重要阶段, 意味着我人生中新的起点的开始. 借此毕业论文完成之际, 我要向在我研究生期间所有给予我指导、帮助和关心的各位老师、同学、朋友及家人表示最衷心的感谢!

首先, 我由衷感谢我的恩师李德春教授对我生活和学业上无微不至的关心和帮助, 李老师医术精湛、医德高尚、待人和善、治学严谨、学识渊博, 在我三年的硕士学习期间, 李老师不仅传授我知识, 科研思维和临床技能, 在他那高尚品格、仁心医术的耳濡目染、言传身教下还让我懂得了做人、为医的准则, 这些必将成为我今后人生道路上的最宝贵财富并一直激励、鞭策着我让我受益终身. 饮其流者思其源, 学有成时念师恩, 在此谨祝恩师身体健康, 幸福如意!

特别感谢周健老师从实验的选题、实验方案的设计、结果分析到论文的撰写, 对于我实验方面的无私指导和帮助, 周老师求精严谨、慧心巧思、谦逊务实, 在我整个实验课题期间无不倾注了大量的心血, 尤其是在我遇到困难、一筹莫展时对我的睿智提点、慷慨帮助和细心指导, 像一盏明灯照亮了我前进的方向.

感谢苏州大学附属第一医院普外科汪良、张子祥、朱东明、赵华、周健、周进、董晓强、张海涛、滕宝群、何宋兵等主任, 张逸、杨勇、陈彦、赵鑫、张立峰、王运良、李烨、易彬、顾闻等老师, 以及全体护理老师给予我生活以及工作中的细心照顾, 我的每一点成长和进步都离不开你们的言传身教.

感谢与我朝夕相处的同学和朋友: 杨健、陆凯、王林、郭凤宝、孙晗、刘义杰、任冠宇、马帅对我临床学习及实验的帮助, 感谢你们给予我的友谊、支持和帮助, 你们的存在让我在研究生期间充满了开心与快乐, 祝你们在未来的工作中事业有成!特别感谢父母和家人对我学业的支持, 祝愿他们身体康健, 幸福美满!

再次向所有关心和帮助过我的人们致以最诚挚的谢意!

张旭

2016年4月于苏州大学本部

56