

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620141152582

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

**IDH1 R132Q 突变引起脂代谢紊乱的  
机制**

**Mechanism underlying lipid metabolism disorder  
caused by IDH1 R132Q mutation**

赵清雯

指导教师姓名: 李勤喜 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 6 月

答辩委员会主席: 王洪睿 教授

评阅人:

2017 年 5 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门

大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（李勤喜）课题（组）的研究成果，获得（李勤喜）课题（组）经费或实验室的资助，在（李勤喜教授）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：赵清雯

2017年5月21日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

( ) 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

( ) 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目录

目录.....	I
Content.....	V
摘要.....	IX
Abstract.....	XI
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 IDH1 简介 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 IDH 突变的发现 .....	1
1.1.2 IDH 的功能 .....	1
1.1.3 IDH 突变与肿瘤的关系 .....	2
<b>1.2 PTEN 简介 .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 PTEN 结构.....	4
1.2.2 PTEN 的功能.....	5
1.2.3 PTEN 在蛋白水平的调控.....	5
1.2.4 PTEN 在转录水平的调控.....	7
1.2.5 PTEN 受 mirco RNA 的调控.....	8
<b>1.3 PI3K/Akt 信号通路与 PTEN 的关系 .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Akt 和 SREBP 的关系.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 SREBP 与脂肪代谢 .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 立题背景.....</b>	<b>14</b>
<b>第二章 材料与方法 .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 质粒载体.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 PcDNA 3.3 载体.....	15
2.1.2 PBoBi CS 2.0 载体 .....	15
2.1.3 PLKO.1 载体 .....	16
2.1.4 PGEX 4T-1 载体 .....	17
<b>2.2 克隆.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 感受态的制备.....	17

2.2.2 PCR 反应.....	18
2.2.3 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA, 鉴定片段大小.....	19
2.2.4 DNA 片段回收.....	19
2.2.5 DNA 连接.....	20
2.2.6 DNA 转化.....	21
2.2.7 少量提取质粒.....	21
2.2.8 中等规模提取质粒.....	21
2.2.9 大量提取质粒 (CsCl 密度梯度离心) .....	22
<b>2.3 细胞培养与细胞转染.....</b>	<b>23</b>
2.3.1 细胞培养.....	23
2.3.2 磷酸钙转染.....	24
2.3.3 病毒包装与感染.....	24
<b>2.4 蛋白质相关实验.....</b>	<b>25</b>
2.4.1 免疫共沉淀.....	25
2.4.2 样品制备与 Western blot.....	26
<b>2.5 油红染色.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6 实时定量荧光 PCR.....</b>	<b>27</b>
2.6.1 RNA 样品的抽提.....	28
2.6.2 RNA 的纯度检测及浓度测定.....	28
2.6.3 mRNA 逆转录.....	28
2.6.4 Real-time PCR 样品制备与上机.....	29
<b>2.7 NMR 测定 2-HG 含量.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8 GC-MS 测定 2-HG 含量.....</b>	<b>30</b>
<b>2.9 GC-MS 测定脂肪酸.....</b>	<b>30</b>
2.9.1 细胞脂肪酸测定.....	30
2.9.2 细胞脂肪酸测定.....	31
<b>2.10 小鼠肝内脂肪酸测定.....</b>	<b>31</b>
<b>2.11 小鼠基因型鉴定.....</b>	<b>31</b>
<b>2.12 实验仪器.....</b>	<b>32</b>
<b>2.13 试验数据处理.....</b>	<b>33</b>



<b>第三章 结果与讨论 .....</b>	<b>35</b>
3.1 IDH1 R132Q 突变型小鼠基因型鉴定 .....	35
3.2 IDH1 R132Q 突变型小鼠中脂肪组织减少 .....	36
3.3 IDH R132Q 突变体小鼠肝脏中 Akt 在 Ser473 位点磷酸化水平下调明显 .....	37
3.4 Akt 上游 PTEN 的蛋白水平明显上调 .....	37
3.5 PTEN 蛋白上调不受 IDH1 的直接作用 .....	38
3.6 PTEN 的蛋白上调是由 D-2HG 引起从而下调 Akt 的磷酸化 .....	39
3.7 PTEN 在 mRNA 水平被调控 .....	42
3.8 D-2HG 通过调控 miR-32 来调控 PTEN 的 mRNA 水平 .....	44
3.9 IDH1 R132Q 突变体小鼠肝脏中脂肪酸、甘油三酯含量明显减少 .....	45
3.10 SREBP-1c 蛋白水平在 IDH1 突变体小鼠肝脏中明显下调 .....	46
3.11 Akt1 调控 SREBP-1c 的蛋白水平 .....	46
3.12 SREBP-1c 下游的靶基因转录水平下调 .....	48
3.13 HT1080 细胞敲低 IDH1 之后，相关的脂肪酸被上调 .....	48
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>51</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>53</b>
<b>致谢.....</b>	<b>61</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Content

<b>Content</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract (in Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract (in English)</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 IDH1 overview</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Discovery of IDH1 mutation .....	1
1.1.2 Functions of IDH .....	1
1.1.3 Correlations between IDH mutation and tumors.....	2
<b>1.2 PTEN overview</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 PTEN structure.....	4
1.2.2 Functions of PTEN .....	5
1.2.3 Regulation of PTEN at protein level.....	5
1.2.4 Transcriptional regulation of PTEN.....	7
1.2.5 PTEN is regulated by mircoRNA .....	8
<b>1.3 Correlations between PI3K/Akt signaling pathway and PTEN</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Correlations between Akt and SREBP</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5 SREBP and lipid metabolism</b> .....	<b>13</b>
<b>1.6 Research background</b> .....	<b>13</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Plsmids</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 PcDNA 3.3 vector .....	15
2.1.2 PBoBi CS 2.0 vector .....	15
2.1.3 PLKO.1 vector .....	16
2.1.4 PGEX 4T-1 vector .....	16
<b>2.2 Cloning</b> .....	<b>17</b>
2.2.1 Preparation of Turbo .....	17
2.2.2 PCR reaction .....	18
2.2.3 DNA agarose gel electrophoresis to separate and identify size of DNA fragments.....	19
2.2.4 DNA fragments purification .....	19
2.2.5 DNA ligation.....	20

2.2.6 DNA transformation .....	20
2.2.7 A little amount of plasmid extraction .....	21
2.2.8 A medium amount of plasmid extraction.....	21
2.2.9 A large amount of plasmid extraction (CsCl density gradient centrifugation).....	22
<b>2.3 Cell culture and transfection.....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Cell culture.....	23
2.3.2 Transfection with calcium phosphate .....	24
2.3.3 Virus packaging and transfection.....	24
<b>2.4 Protein experiments .....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Co-immunoprecipitation .....	24
2.4.2 Preparation of samples and western blot .....	25
<b>2.5 Oil-red staining.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6 Real-time PCR.....</b>	<b>27</b>
2.6.1 RNA samples extraction .....	27
2.6.2 Detection of RNA purification and concentration .....	28
2.6.3 Reverse transcription of mRNA.....	28
2.6.4 Sample preparation of Real-time PCR and software setting .....	28
<b>2.7 Detection of 2-HG with NMR .....</b>	<b>29</b>
<b>2.8 Detection of 2-HG with GC-MS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.9 Fatty acids measurement with GC-MS.....</b>	<b>30</b>
2.9.1 Fatty acids measurement in cells .....	30
2.9.2 Fatty acids measurement in mice's livers .....	30
<b>2.10 Triglyceride measurement in mice's livers .....</b>	<b>30</b>
<b>2.11 Genotyping of mice .....</b>	<b>31</b>
<b>2.12 Experimental apparatus.....</b>	<b>31</b>
<b>2.13 Data processing .....</b>	<b>32</b>
<b>Chapter 3 Results and discussion .....</b>	<b>33</b>
3.1 Genotyping of IDH1R132Q mutant mice .....	33
3.2 Lipid tissues are decreased in IDH1R132Q mutant mice .....	34
3.3 Akt phosphorylation at Ser473 is shaply decreased in IDH R132Q mutant mice liver than wiltype's .....	35
3.4 PTEN, upstream protein of Akt, is significantly increased at protein level	

---

.....	35
<b>3.5 PTEN protein upregulation is not influenced by IDH1 itself.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6 PTEN protein is increased by D-2HG and negatively regulates Akt phosphorylation.....</b>	<b>36</b>
<b>3.7 PTEN is regulated at transcriptional level .....</b>	<b>38</b>
<b>3.8 D-2HG regulates transcription of PTEN by miR-32 .....</b>	<b>40</b>
<b>3.9 Contents of fatty acids and triglyceride are sharply decreased in IDH1mutant mice.....</b>	<b>41</b>
<b>3.10 SREBP-1 protein level is decend in IDH1 R132Q mutant mice livers..</b>	<b>42</b>
<b>3.11 Akt regulates SREBP-1 at protein level .....</b>	<b>42</b>
<b>3.12 SREBP-1 downstream target genes'mRNA level are decreased.....</b>	<b>44</b>
<b>3.13 Relevant fatty acids are decreased when we knock down IDH1 in HT1080 cell.....</b>	<b>45</b>
<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>47</b>
<b>References bibliography.....</b>	<b>49</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>55</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

目前在神经胶质瘤、软骨肉瘤以及急性髓性白血病等肿瘤中发现了异柠檬酸脱氢酶 1 (isocitrate dehydrogenase 1, IDH1) R132 的各种突变(R132H/Q/C)。野生型 IDH1 蛋白能催化异柠檬酸(isocitrate)氧化脱羧生成 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -KG), 同时将  $\text{NADP}^+$  转化为  $\text{NADPH}$ 。而这些突变体则获得了另外一种新的酶活, 即催化 $\alpha$ -KG 生成一种肿瘤代谢物—D-2-羟基戊二酸(D-2-hydroxyglutarate, D-2HG)。截止目前, 大多数研究主要集中在 D-2HG 引起肿瘤发生的机理方面。研究表明该小分子与 $\alpha$ -KG 结构相似, 所以会竞争性抑制许多以 $\alpha$ -KG 为底物的单加氧酶的活性, 比如 TET 家族 DNA 去甲基化酶被抑制会引起 DNA 超甲基化, 改变细胞分化、细胞存活、细胞增殖, 最终导致肿瘤发生。然而, 目前尚不清楚 IDH1 突变是否会引起脂代谢的紊乱。

为了揭示 IDH1 突变在脂代谢中的作用, 我们构建了在肝脏特异性敲入 IDH1 R132Q 突变体的小鼠。我们发现该突变体小鼠不仅脂肪组织减少, 而且脂肪酸、甘油三酯含量降低。Western blot 检测发现突变体小鼠肝脏中 Akt Ser473 的磷酸化水平显著下调, 且其上游分子 PTEN 的蛋白水平也明显上调; 用可透膜的 TFMB-D-2HG 处理细胞, 也能引起 PTEN 上调, 说明 IDH1 R132Q 突变体是通过产生 D-2HG 上调 PTEN 蛋白。进一步研究发现 D-2HG 能下调 miR-32, 而后者则能下调 PTEN 的 mRNA 水平。之前有研究报道 Akt 可以磷酸化 SREBP-1c 并上调其蛋白水平, 由于 SREBP-1c 是调控脂肪酸合成代谢的最主要的转录因子, 因此, 我们研究了突变体小鼠肝脏中 SREBP-1c 的水平及激活情况。我们发现突变体小鼠肝脏中 SREBP-1c 的蛋白水平明显下调, 且在 IDH1 突变的细胞中过表达 Akt 可以上调 SREBP-1c; 相应地, 突变体小鼠肝脏中 SREBP-1c 下游的靶基因 *Fas*, *Acy*, *Accl*, *Scd1*, *Dgat2* 的转录水平普遍下调。

综上所述, 我们研究了 IDH1 R132Q 突变体对脂代谢的影响, 发现该突变体产生的 D-2HG 能通过 miR-32-PTEN-Akt-SREBP-1c 信号通路抑制脂肪酸的合成代谢。初步揭示了 IDH1 突变体引起脂代谢紊乱的机理, 为进一步研究携带 IDH1 突变体的病人出现的代谢紊乱提供了理论依据。

关键词: IDH1 R132Q; 2-HG; Akt ; 脂肪代谢

厦门大学博硕士学位论文摘要库



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

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库