

学校编码：10384
学号：32320141153417

分类号 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**Mdp1 在胃癌发生发展中的
分子机制研究**

**The molecular mechanism of Mdp1 in the development and
progression of gastric cancer**

朱健波

指导教师姓名：吕忠显教授

专 业 名 称：药物化学

论文提交日期：2017 年 月

论文答辩时间：2017 年 月

学位授予日期：2017 年 月

答辩委员会主席： _____

评阅人： _____

2017 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

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

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

声明人(签名):
年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

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

本学位论文属于：

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

2. 不保密，适用上述授权。

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

声明人（签名）：

年 月 日

目录

Contents	1
摘要	1
Abstract	3
第一章 前言	5
1.1 胃癌	5
1.1.1 胃癌现状	5
1.1.2 胃癌分类	7
1.1.3 胃癌复发/转移	10
1.2 胃癌生物标记物和靶向治疗	13
1.2.1 胃癌预后和预测生物标记物	13
1.2.2 胃癌中新兴的和不可靶向的预后生物标志物	16
1.3 Mdp1 简介	17
1.3.1 Mdp1 的来源	17
1.3.2 Mdp1 的结构和分类	18
1.3.3 Mdp1 的生物活性研究	19
1.3.4 Mdp1 在蛋白糖化过程中的作用	21
1.4 本文研究内容及意义	23
第二章 材料与amp;方法	25
2.1 实验材料	25
2.1.1 主要细胞株	25
2.1.2 菌种及质粒	25
2.1.3 主要试剂	25
2.1.4 主要仪器	27
2.1.5 主要溶液及配制	28
2.2 实验方法	32
2.2.1 胃癌细胞培养	32
2.2.2 蛋白体外提取纯化及蛋白浓度的测定	32
2.2.3 蛋白的纯度和活性检测	33
2.2.4 Mdp1 抑制剂和激动剂的高通量药物筛选模型	34
2.2.5 MTT 法检测 Mdp1 对胃癌细胞增殖影响（生长曲线）	35
2.2.6 平板细胞克隆形成试验	35
2.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡	36
2.2.8 TUNEL 试剂盒检测细胞和组织凋亡	36
2.2.9 Western Blot 实验	37
2.2.10 细胞衰老 β -Galactosidase 染色实验	38
第三章 结果与分析	40
3.1 Mdp1 的功能研究	40
3.1.1 Mdp1 对胃癌细胞增殖的影响	40

3.1.2 Mdp1 促进胃癌细胞衰老	41
3.1.3 Mdp1 能够促进胃癌细胞凋亡	43
3.2 Mdp1 细胞内作用机制研究	45
3.2.1 Mdp1 是一种蛋白酪氨酸磷酸酶	45
3.2.2 Mdp1 通过抑制 JNK 信号通路激活调控细胞的增殖和凋亡	46
3.3 Mdp1 的抑制剂和激动剂的高通量筛选	47
3.3.1 人重组 Mdp1 蛋白体外活性检测	47
3.3.2 Mdp1 蛋白酶高通量药物筛选	48
第四章 讨论与展望	50
第五章 结论	54
参考文献	55
致 谢	62

Contents

ABSTRACT(Chinese)	1
ABSTRACT	3
Chapter I Introduction	5
1.1 Gastric cancer	5
1.1.1 Current situation of gastric cancer	5
1.1.2 Classification of gastric cancer	7
1.1.3 Gastric cancer recurrence/ metastasis	11
1.2 Gastric cancer biomarkers and targeted therapy	15
1.2.1 Prognosis and prediction of gastric cancer biomarkers	15
1.2.2 Emerging and nontargeted prognostic biomarkers in GC	18
1.3 Brief introduction of Mdp1	18
1.3.1 The source of Mdp1	18
1.3.2 The structure and function of Mdp1	19
1.3.3 Study on Bioactivity of Mdp1	21
1.3.4 The Role of Mdp1 in Protein Sugaration	22
1.4 Significance of the research	25
Chapter II Methods and Materials	27
2.1 Experimental material	27
2.2 Experimental methods	34
Chapter III Results and Analysis	42
3.1 Research on the Function of Mdp1	42
3.1.1 The Effect of Mdp1 on Proliferation of Gastric Cancer Cells	42
3.1.2 Mdp1 can promote gastric cancer cells senescence	43
3.1.3 Mdp1 can accelerate the apoptosis of gastric cancer cells	45
3.2 Study on intracellular mechanism of Mdp1	47
3.2.1 Mdp1 is a protein tyrosine phosphatase	47
3.2.2 Mdp1 inhibits JNK signaling pathway activation	48
3.3 Construction of High Throughput Drug Screening Model	49
3.3.1 Activity assay of human recombinant protein Mdp1	49

3.3.2 The Screening of Mdp1 Inhibitors.....	50
Charpter IV Discussion and Prospect.....	52
Charpter V Conclusions.....	54
References.....	55
Acknowledgement.....	62

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一，研究导致胃癌发生发展和复发的关键因素及调控机制，提供诊断预后标记物和治疗胃癌的新靶点具有非常重要的意义。

我们研究的基因 *mdp1* (magnesium-dependent phosphatase 1)，是本实验室在扫描胃癌(III期)SDFS (Short disease-free survival) / LDFS (Long disease-free survival) 的病例样本的 DNA 甲基化谱中，发现的具有高度差异性的基因。*mdp1* 在 SDFS 样本中高度甲基化而在 LDFS 样本中甲基化不明显。

实验室前期已经完成对 DNA 甲基化芯片结果的验证。我们利用免疫组化检测胃癌III期患者在 SDFS 和 LDFS 病例组织样本各 33 例中 Mdp1 的表达，结果显示 Mdp1 在 SDFS 组病例中低表达，而在 LDFS 组病例中高表达，与芯片数据吻合。这提示我们在早期复发样本 (SDFS) 中 Mdp1 的 DNA 甲基化有可能发生在启动子区域而使其基因沉默，降低其蛋白表达。这也表明 *mdp1* 高甲基化可能是一个不良预后的信号。

为了进一步探究 Mdp1 在胃癌发生发展中的作用，我们构建过表达和敲降 Mdp1 细胞系，研究 Mdp1 在胃癌中的功能和机制。细胞生长曲线和克隆形成实验表明，当过表达 Mdp1 时，能抑制胃癌细胞增殖；相反，当敲除 Mdp1 时，促进细胞增殖。通过 β -Gal 染色、TUNEL、流式细胞仪法等试验方法检测结果显示，过表达 Mdp1 能促进细胞衰老，加速细胞凋亡。而敲除 Mdp1 对胃癌细胞衰老凋亡影响不明显。结合流式细胞周期和免疫组化的结果 (前期工作)，我们推测，*mdp1* 可能是一个抑癌基因，能够抑制细胞增殖，促进细胞衰老和凋亡。正常情况下 Mdp1 是高表达，在某些致癌因子的诱导下，导致 DNA 甲基化而沉默，进而促使胃癌发生发展和复发恶化。

在此推测的基础上，我们对 Mdp1 蛋白在胃癌中作用机制进行了初步的研究。首先，体外磷酸酶检测结果显示，Mdp1 蛋白是一种蛋白酪氨酸磷酸酶。我们用泛磷酸化酪氨酸抗体连接用 Mdp1 处理后 PVDF 膜，Western-blot 结果显示，Mdp1 能够去除大部分磷酸化酪氨酸蛋白中的磷酸基团。另外，我们检测

了大部分影响增殖和凋亡的信号通路，发现 Mdp1 能够明显抑制 JNK 和 Stat3 的磷酸化，我们推测，Mdp1 作为一种蛋白酪氨酸磷酸酶，在 JNK 和 STAT3 信号通路中发挥负反馈调节的作用。目前还没有明显的证据说明 Mdp1 是直接和 p-JNK 和 p-STAT3 结合发挥作用还是通过中间底物影响 JNK 和 STAT3 的磷酸化。

关键词：胃癌；Mdp1；抑癌基因；JNK 信号通路

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Gastric cancer (GC) is one of the most frequently diagnosed cancers in the world scope. Therefore, the study of the key factors and regulatory mechanism that lead to GC recurrence has very important scientific significance, which can provide new targets for diagnosis and treatment of GC.

This article had selected one of recurrence related genes---magnesium-dependent phosphatase 1 (*mdp1*) by scanning DNA methylation spectrum which was from SDFS /LDFS gastric cancer recurrence clinical tissue samples.

We have used methylation sequencing PCR, immunohistochemistry to verify chip data . Then we used IHC to detect the expression of Mdp1 in 33 cases of early and late GC recurrence tissue samples respectively and the result displayed that most of the early recurrence tissues had lower expression but higher expression in the late recurrence tissues. This once again indicated that the expression of Mdp1 was likely to be affected by DNA methylation. This suggests that *mdp1* hypermethylation may be a poor prognostic factor.

We studied the function and mechanism of Mdp1 in gastric cancer, using overexpression and knockdown of Mdp1 cell lines. Cell growth curve showed that higher expression of Mdp1 could inhibit GC cell proliferation, the opposite is also true. The results of β -Gal staining, TUNEL and flow cytometry showed that overexpression of Mdp1 could promote cell senescence apoptosis. The knockout Mdp1 cell lines had no obvious effect on senescence and apoptosis of gastric cancer cells. Combined with the results of flow cytometry and immunohistochemistry, we supposed that Mdp1 may act as a tumor suppressor. Mdp1 in the Cells is highly expressed under normal circumstances, and gene *mdp1* promoter methylation and silence induced by some carcinogenic factors promote the development and recurrence of gastric cancer .

On the basis of this phenotype, We have a preliminary study on the mechanism of Mdp1 in gastric cancer. First, the phosphatase assay result showed that the Mdp1 was a protein tyrosine phosphatase. Cell lysate was separated by SDS-PAGE and blotted to a PVDF membrane and cut into strips. After blocking, the strips were incubated with the indicated Mdp1 solutions. After the strips had been washed,

residual phosphotyrosine containing bands were visualized by antiphosphotyrosine antibody western blot.

In addition, we detected most of the signaling pathways that affect proliferation and apoptosis, and found that Mdp1 significantly inhibited the phosphorylation of JNK and Stat3. We hypothesized that Mdp1 may be a negative feedback regulator in JNK and STAT3 signaling pathways. However, there is no clear evidence that Mdp1 is directly associated with p-JNK and p-STAT3 or through the intermediate substrate affect JNK and STAT3 phosphorylation.

Key words: Gastric cancer ; Mdp1; tumor suppressor; JNK pathways

第一章 前言

1.1 胃癌

1.1.1 胃癌现状

胃癌（GC）具有高发病率和死亡率，是目前全球重要的公共卫生问题。胃癌是最常见的五种恶性肿瘤之一，它是全球第三大致命癌症。每年，近一百万新的 GC 病例被诊断出，并且超过 70 万人死于这种疾病，约占全球癌症死亡的 10% 左右^[1]。胃癌的高死亡率与其发病早期缺乏显著症状，缺乏有效的筛查方案以及大部分发展中国家的不健全癌症卫生保健有关。结果导致许多胃癌病例在晚期诊断并且预后较差。

我国是胃癌高发的国家，其发病率和死亡率在恶性肿瘤中均位于前列，且新发胃癌患者呈年轻化趋势^[2]。据最新 2015 年的调查统计数据显示，在中国胃癌发病和死亡率远远高于全球平均水平，中国每年新增胃癌病例约 68~70 万，约占全球总量的三分之二左右。在国内所有肿瘤病例中，胃癌是除肺癌以外的第二高发的恶性肿瘤，即使在女性患者中也排在乳腺癌和肺癌后为第三高发的恶性肿瘤^[3]。胃癌在男性和女性中都有发生，但是在男性中的发病率和死亡率大约为女性的 2 倍。虽然胃癌的发病率和胃癌相关死亡率近年来有所下降，但是它仍然是全球癌症死亡的第三大原因。我国目前的胃癌防治现状主要是“一高三低”，即发病的死亡率高、早期的诊断率低、手术根治率低、五年生存率低。因此，胃癌对我国居民的生命健康构成了严重威胁。

胃癌的发生是复杂病理过程和多种因素共同作用的结果。有许多遗传和环境因素在胃癌发病中起作用，包括宿主的遗传特征，感染因子（如幽门螺杆菌和 EB 病毒）和饮食习惯（高盐食物、亚硝酸盐、吸烟、纤维摄入量低以及水果和蔬菜的饮食量少）等^[3]。遗传因素如基因、性别、遗传扩散胃癌（E-cadherin/CDH1 基因突变）、遗传非息肉结直肠癌（Lynch 综合症）以及家族性腺瘤息肉病在胃癌发生发展中也起着至关重要的作用^[4]。

近年来，对致病因子幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*）慢性感染的研究

越来越多。*H.pylori* 能感染世界上近 50%的人口，已被归类为 I 型致癌物。其相关致病因子细胞毒素相关蛋白 CagA 与胃炎、胃癌等胃疾病密切相关，它通过 *H.pylori* 进入宿主细胞质，感染宿主细胞，引起细胞分裂和增殖。被 CagA 阳性菌株感染的患者，胃癌发病率非常高^[5]。据统计，如果避免接触那些可干扰的致病因子，可以减少 60%的癌症死亡，在中国可以避免的胃癌癌症死亡的最大因素是幽门螺旋杆菌的慢性感染，可以占到癌症死亡的 29%^[2]。因此，建立健全的医疗检测体系和改善饮食习惯对胃癌预防及早期发现及时治疗至关重要。

抛开胃癌传统的治疗方法如手术、放疗、化疗以及有针对性的治疗，胃癌患者整体的五年存活率很低。仅有少部分早期诊断的病灶局限于黏膜和黏膜下层的局部肿瘤，采用手术治疗的 5 年生存率可以达到 70-90%^[6]。然而，侵袭黏膜下层的胃癌会使淋巴结转移的风险增加并且患者存活率降低，相应地，没有任何进一步治疗的根治性胃切除术的 5 年生存率为 10-30%^[7]。同样地，Dittmar.Y 等人的研究统计结果显示，从 1995 年到 2011 年观察的 923 例胃癌患者中，有 748 位患者接受了胃癌手术切除，手术后患者生存期为 5 年和 10 年的分别占 36%和 29%^[8]。与单独手术相比，辅助放化疗（CRT）^[9]、围手术期化疗^[10]和辅助化疗^{[11][12]}等策略改善了部分局部晚期胃癌病例的总生存期（OS）。

自 5-氟尿嘧啶/亚叶酸钙(5-FU/LV)联合放疗的 III 期研究（Intergroup-0116）公布以来，辅助 CRT 已被认为是美国 FDA 的标准治疗^[9]。在 III 期 MAGIC 试验中，证明了表柔比星/顺铂/ 5-FU（ECF）方案对围手术期化疗益处，这种策略还有其他的潜在益处：肿瘤缩小从而增加了根治性切除的可能性；消除微转移而改善患者症状和存活；确保肿瘤对化疗的敏感性^[10]。在由 GASTRIC（全球高级/辅助胃肿瘤研究国际协作）组织进行的 Meta 分析中，使用手术后化疗要比单独手术的中位存活期(OS)有显著性的益处（分别为 7.8 年和 4.9 年）^{[11][12]}。

这些新的治疗方案虽然都能给胃癌患者的存活带来一定的好处，但未能从根本上解决问题，现实是胃癌的形势依然严峻，胃癌发生发展的机制依然不清楚。我们要做的工作就是去探索胃癌发生的分子机制，发现新的肿瘤标记物，提供更好的治疗靶点，为胃癌患者存活提供更多的益处。

1.1.2 胃癌分类

传统的胃癌病理分型主要依据组织学大体形态和细胞生物学特性进行分型，包括 Borrmann 分型、WHO 分型和 Lauren 分型。

Borrmann 分型：息肉型，局限溃疡型，浸润溃疡型，弥漫浸润型。Borrmann 分型主要是根据肿瘤在黏膜面的形态特征和在胃壁内的浸润方式进行分类，将胃癌分为四型。I 型 (息肉型，结节型)，肿瘤向胃腔内生长，隆起明显，基底较宽，境界清楚。II 型 (局限溃疡型)，溃疡较深，边缘隆起，肿瘤较局限，周围浸润不明显，切面界限较清楚。III 型 (浸润溃疡型)，溃疡底盘较大，边缘不清楚，周围及深部浸润明显，切面界限不清，是最常见的类型，约占 50 %。IV 型 (弥漫浸润型)，癌组织在胃壁内弥漫浸润性生长，浸润部胃壁增厚变硬，皱襞消失，粘膜变平，有时伴浅溃疡，称“革囊胃”。Borrmann 分型是胃癌经典的分型方法，既能反映胃癌的生物学行为，又简洁实用，在国际上广泛采用^[13]。

WHO 分型：乳头状腺癌，管状腺癌，黏液腺癌，印戒细胞癌，鳞腺癌，鳞状细胞癌，小细胞癌和未分化癌。1990 年 WHO 对胃癌组织分型进行修改，新的标准将胃癌分为上皮性肿瘤和类癌两类，上皮性肿瘤包括腺癌 (乳头状腺癌、管状腺癌、低分化腺癌、黏液腺癌、印戒细胞癌)、鳞腺癌、未分化癌和不能分类的癌。当两种类型组织并存时，根据占优势的组织的分型，同时注明次要组织类型。对腺癌按其分化程度 (分化程度最低的部分)分为高分化型、中分化型和低分化腺癌。胃癌的分化程度与其恶性程度及预后具有密切的相关性，高分化的胃癌细胞，其分化较好，恶性程度较低，预后效果也较好；低分化的胃癌，其恶性程度则相对较高，极易复发和转移，预后也较差；未分化的胃癌，其恶性程度极高，预后也最差，低 (未) 分化的胃癌一般属于中晚期患者，临床上比较难治疗^{[14],[15]}。

Lauren 分型：肠道型，弥漫型，混合型。该分型不仅反映肿瘤的生物学行为，而且体现其病因、发病机制和流行特征。肠道型胃癌属于分化型胃癌，该类型的胃癌常常与肝脏转移有关。肠型胃癌病程较长，发病率较高，多见于老年、男性，预后较好，常被认为继发于慢性萎缩性胃炎。是经过胃炎、萎缩性胃炎、胃息肉、胃粘膜异型增生、肠上皮化生和不典型增生等一系列慢性病变

产生的，通常形成腺体结构。瘤细胞呈柱状或立方形，可见刷状缘、炎症细胞浸润和肠上皮化生，结构类似肠癌，以膨胀式生长。1992年 Correa 提出肠型胃癌的 Correa 级联反应模式，正常胃部组织被幽门螺杆菌感染后经过微小黏膜病变发展为胃炎，萎缩性胃炎，肠上皮化生，最终异型增生导致肠型胃癌的发生。其病理过程如图 1-1 显示^[16]。而弥漫型胃癌通常分化较差，这种胃癌并没有腺体萎缩等一系列渐变过程，缺乏细胞连接，一般不形成腺管。它是由一些在微腺体上的粘附性差的或者非粘附性的细胞侵入胃壁形成，与肠型胃癌比，弥漫型胃癌受环境影响较小，多见于年轻女性，易出现淋巴结转移和腹膜转移，预后较差^[17]。近来研究表明，部分弥漫型胃癌有家族聚集和遗传性，家族性胃癌很少位于胃窦部且常在正常腺体内出现印戒细胞，家系连锁研究发现 CDH1 基因胚系突变是其发病原因，携带 CDH1 胚系突变者终生发生胃癌的概率男性 80%、女性是 70%^{[18],[19]}。混合型胃癌在同一患者体内会同时存在上述两种类型的胃癌，恶性程度较高。

据统计，近 70%的胃癌患者为肠道型胃癌，并且在高发生率的地区更易在老年男性患者中检测到，弥漫型胃癌则更容易发生在年轻个体中，尤其是年轻女性更多见，混合型胃癌患者所占比例则较低。该分型的优点是可以利用胃镜下活检组织对胃癌分型，指导手术治疗^[14]。与手术切除标本分型相比，胃镜活检组织肠型胃癌和弥漫型胃癌诊断准确率分别为 74%~87%、74%~75%，特异性分别为 90%、82%^[20]。

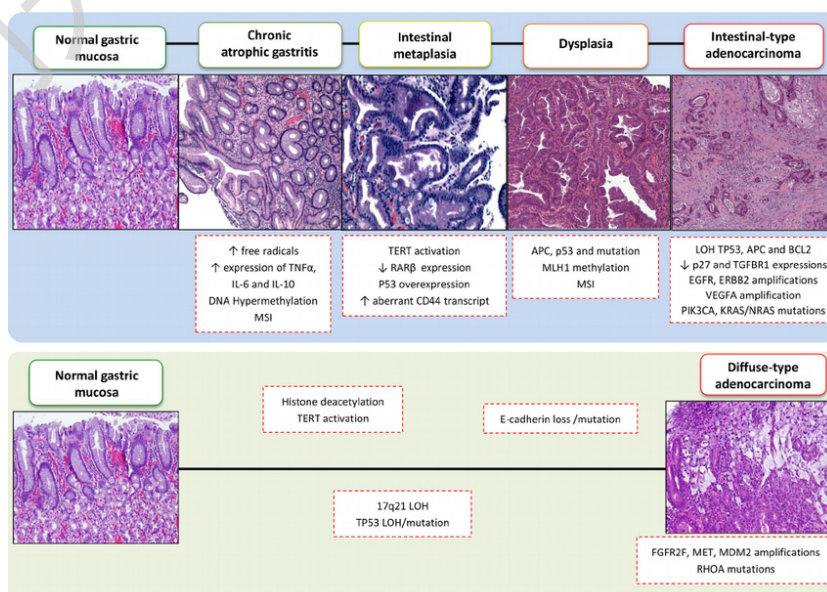


图 1-1 胃癌 Correa 级联发生的顺序形态，遗传和表观遗传改变

Fig.1-1 Sequential morphologic, genetic and epigenetic alterations in multistep gastric carcinogenesis.

摘自：

在 Lauren 分型的基础上，2014 年发表在 Nature 上的一篇文章明确提出了新的胃癌分子分型，这项研究工作是癌症基因组图谱(TCGA)计划的一部分。该研究的样本来自于世界各地医院从未接受过放疗或化疗的 295 名患者的新鲜冰冻组织样本及血液样本，利用 6 种技术平台：1)array-based somatic copy number analysis; 2) whole-exome sequencing; 3) array-based DNA methylation profiling; 4)messenger RNA sequencing; 5)microRNA (miRNA) sequencing; 6)reverse-phase protein array(RPPA)。此研究通过对数据进行分析，提出将其分为四个亚型^[21]，分别为：EB 病毒感染型(EBV)，微卫星不稳定型 (MSI)，SCNVs 高的染色体不稳定型(CIN)，以及基因组稳定型(GS)。图 1-2，这个示意图列出了胃癌的四种分子亚型的一些显著特征以及胃的不同区域的肿瘤中分子亚型的分布图。

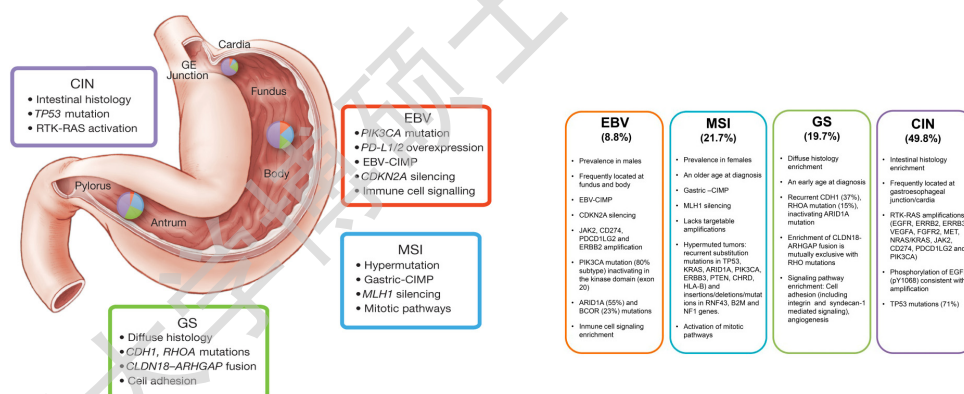


图 1-2 胃癌亚型的主要特征

Fig1-2 The main features of classification of gastric cancer

摘自：Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):202-9.

依靠最新的分子生物学技术，研究者也找到了 Correa 级联各个阶段的分子水平的变化机制，胃癌发生的最初步骤的特征是遗传不稳定性、端粒酶活化、TP53 丢失/突变，以及通过 CpG 岛甲基化使肿瘤抑制基因和 microRNAs 失活^[22]。肠化生的特征是 TERT 激活，视黄酸受体 β (RAR β) 表达的丧失，TP53 过表达和 CD44 转录异常^[23]。在弥漫型胃癌中观察到的主要分子变化包括微卫

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

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

厦门大学博硕士论文摘要库