

学校编码：10384  
学号：32320141153434

分类号\_\_密级\_\_  
UDC\_\_

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

## 新的肝癌生物标志物的发现

**The discovery of new biomarkers of hepatocellular  
carcinoma**

王琳钧

指导教师姓名：李良成副教授  
专业名称：药理学  
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：  
评 阅 人：

2017年4月

## 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 2020 年 4 月 10 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

## 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(药学院洪万进/李良成)课题(组)的研究成果,获得(药学院洪万进/李良成)课题(组)经费或实验室的资助,在(药学院洪万进/李良成)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

## 目录

目录.....	1
Contents.....	4
摘要.....	7
Abstract.....	9
中英文名称术语及缩写对照.....	11
<b>第一章 前言.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 肝癌简介.....</b>	<b>13</b>
1.1.1 肝癌流行病学.....	13
1.1.2 肝癌的分类.....	13
1.1.3 肝癌早期诊断的重要性.....	14
<b>1.2 肝癌生物标志物研究现状.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 肿瘤生物标志物.....	14
1.2.2 目前的肝癌诊断生物标志物及其局限性.....	15
<b>1.3 蛋白质组学在肝癌生物标志物研究中的应用.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 外泌体简介.....</b>	<b>16</b>
1.4.1 外泌体.....	16
1.4.2 外泌体与肿瘤的关系.....	18
1.4.3 外泌体与生物标志物.....	18
<b>1.5 候选生物标志物简介.....</b>	<b>20</b>
1.5.1 CAMSAP2.....	20
1.5.2 PPP1CA.....	21
<b>1.6 本课题的意义及拟开展的工作.....</b>	<b>22</b>
<b>第二章 外泌体的纯化及其蛋白质组学的研究.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 材料与仪器.....</b>	<b>23</b>
2.1.1 细胞株.....	23

2.1.2 抗体	23
2.1.3 实验仪器	23
2.1.4 主要试剂	24
2.1.5 实验耗材	25
2.1.6 常用溶液组分	25
<b>2.2 实验方法</b>	<b>27</b>
2.2.1 细胞培养	27
2.2.2 原代肝细胞的分离纯化	28
2.2.3 PAS 糖原染色法鉴定原代肝细胞	28
2.2.4 外泌体的提取	29
2.2.5 BCA 法测定蛋白浓度	29
2.2.6 蛋白质免疫印迹法 (Western blotting)	30
2.2.7 透射电子显微镜	31
2.2.8 粒径分布	31
2.2.9 FASP 质谱前处理	32
2.2.10 ZipTip C18 柱除盐	32
2.2.11 SEIVE 非标定量分析	33
<b>2.3 实验结果与讨论</b>	<b>33</b>
2.3.1 原代肝细胞的分离纯化	33
2.3.2 外泌体的分离纯化与鉴定	34
2.3.3 外泌体蛋白组学的分析	34
<b>2.4 小结</b>	<b>37</b>
<b>第三章 目标蛋白在肝癌细胞系和肝癌病理样本中的表达</b>	<b>39</b>
<b>3.1 材料与仪器</b>	<b>39</b>
3.1.1 肝癌样本	39
3.1.2 抗体	39
3.1.3 实验仪器	39
3.1.4 主要试剂	40
3.1.5 常用溶液组分	40

<b>3.2 实验方法</b> .....	<b>40</b>
3.2.1 实时荧光定量 PCR.....	40
3.2.2 免疫印迹法测组织蛋白样品表达水平.....	43
3.2.3 免疫组化.....	43
<b>3.3 实验结果与讨论</b> .....	<b>45</b>
3.3.1 病理样本中候选标志物的 mRNA 表达水平.....	45
3.3.2 病理样本中候选标志物的蛋白表达水平.....	46
<b>3.4 小结</b> .....	<b>48</b>
<b>第四章 目标蛋白在肝癌血清样本中的检测</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1 材料与仪器</b> .....	<b>49</b>
4.1.1 肝癌样本.....	49
4.1.2 试剂和材料.....	49
<b>4.2 实验方法</b> .....	<b>49</b>
4.2.1 血清的制备.....	49
4.2.2 酶联免疫吸附测定.....	49
<b>4.3 实验结果与讨论</b> .....	<b>50</b>
4.3.1 血清样本中候选标志物的含量检测.....	50
4.3.2 候选标志物的临床分析.....	52
<b>4.4 小结</b> .....	<b>53</b>
<b>全文小结与展望</b> .....	<b>54</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>56</b>
<b>致谢</b> .....	<b>62</b>

## Contents

<b>Table of Contents in Chinese</b> .....	<b>1</b>
<b>Table of Contents</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Terms and abbreviations in English and Chinese</b> .....	<b>11</b>
<b>Chapter I Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Hepatocellular carcinoma</b> .....	<b>13</b>
1.1.1 The epidemiology of HCC .....	13
1.1.2 The classification of HCC .....	13
1.1.3 The importance of early diagnosis of HCC .....	14
<b>1.2 The current research status of HCC biomarkers</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Tumor biomarker .....	14
1.2.2 HCC biomarkers and its problems .....	15
<b>1.3 Proteomics and its application in HCC biomarkers</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 Exosome</b> .....	<b>16</b>
1.4.1 Introduction of exosome .....	16
1.4.2 The relationship between exosome and tumor .....	18
1.4.3 The relationship between exosome and biomarker .....	18
<b>1.5 Introduction of the candidate biomarkers</b> .....	<b>20</b>
1.5.1 CAMSAP2 .....	20
1.5.2 PPP1CA .....	21
<b>1.6 Research hypothesis and plan</b> .....	<b>22</b>
<b>Chapter II The purification and proteomics research of exosome</b> .....	<b>23</b>

<b>2.1 Materials and equipment</b> .....	<b>23</b>
2.1.1 Cell lines .....	23
2.1.2 Antibody.....	23
2.1.3 Equipment.....	23
2.1.4 Reagents.....	24
2.1.5 Supplies.....	25
2.1.6 Solution composition .....	25
<b>2.2 Method</b> .....	<b>27</b>
2.2.1 Cell culture.....	27
2.2.2 The purification of primary liver cell .....	28
2.2.3 PAS to characterize the primary liver cell .....	28
2.2.4 The purification of exosome .....	29
2.2.5 Concentration assessment by BCA.....	29
2.2.6 Western blotting .....	30
2.2.7 TEM.....	31
2.2.8 Partical size distribution.....	31
2.2.9 MS pretreatment by FASP .....	32
2.2.10 Desalination in ZipTip C18 column.....	32
2.2.11 Label-free quantification by SEIVE .....	33
<b>2.3 Results</b> .....	<b>33</b>
2.3.1 The purification of primary liver cell .....	33
2.3.2 The purification and characterization of exosome .....	34
2.3.3 Proteomics analysis of exosome .....	34
<b>2.4 Summary</b> .....	<b>37</b>
<b>Chapter III The expression of target protein in HCC cell lines and pathological samples</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Materials and equipment</b> .....	<b>39</b>
3.1.1 HCC samples .....	39
3.1.2 Antibody.....	39



3.1.3 Equipment .....	39
3.1.4 Reagents .....	40
3.1.5 Solution composition .....	40
<b>3.2 Method .....</b>	<b>40</b>
3.2.1 qRT-PCR .....	40
3.2.2 Western blotting measuring tissue samples .....	41
3.2.3 IHC .....	43
<b>3.3 Results .....</b>	<b>45</b>
3.3.1 The mRNA expression level of candidate markers .....	45
3.3.2 The protein expression level of candidate markers .....	46
<b>3.4 Summary .....</b>	<b>48</b>
<b>Chapter IV The expression of target protein in HCC serum samples</b>	
.....	<b>49</b>
<b>4.1 Materials .....</b>	<b>49</b>
4.1.1 HCC samples .....	49
4.1.2 Reagents and equipment .....	49
<b>4.2 Method .....</b>	<b>49</b>
4.2.1 The preparation of serum .....	49
4.2.2 ELISA .....	49
<b>4.3 Results .....</b>	<b>50</b>
4.3.1 The expression level of candidate biomarkers in serum samples .....	50
4.3.2 The clinical analysis of candidate biomarkers .....	52
<b>4.4 Summary .....</b>	<b>53</b>
<b>Summary and prospect .....</b>	<b>54</b>
<b>References .....</b>	<b>56</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>62</b>

## 摘要

肝癌，尤其是肝细胞型肝癌是一种常见的恶性肿瘤，发现晚且死亡率高，因此及时发现、尽早治疗具有重要的临床意义。而生物标志物可作为早期临床诊断的工具，可显著提高患者的生存率。当前临床常用的肝细胞型肝癌的血清早期诊断标志物主要有甲胎蛋白（AFP）和甲胎蛋白异质体（AFP-L3）等，但这些检测指标的灵敏度和特异性均有待提高。而外泌体是一种与肿瘤的发生、发展密切相关的分泌型囊泡。已有报道显示，许多肿瘤中均可分泌包含特异的、可做潜在生物标志物的外泌体，因此，利用外泌体寻找生物标志物是目前研究的热点。

本课题从肿瘤细胞分泌的外泌体（exosome）的蛋白质组学入手，期望通过临床样本的筛查，找到在肝癌病人血清中特异性高表达的生物标志物，以便开发肝细胞型肝癌的早期诊断试剂盒。

本课题的研究成果分为以下三个部分：

第一部分：成功从肝细胞型肝癌病人的新鲜组织中分离肿瘤组织及非肿瘤组织的原代细胞。收集这些原代细胞的培养上清液，分别运用差速离心法分离纯化外泌体。外泌体的鉴定结果显示，我们得到了形态完整，粒径分布正常的外泌体。运用 FASP 法处理所得的外泌体，并对其进行蛋白质组学分析。结果显示，我们提取的囊泡含有外泌体标志物，进一步证明其具备外泌体特征。与非肝癌组织外泌体相比，我们还找到在肿瘤外泌体中显著高表达的一组蛋白。

第二部分：在非肿瘤组织和肿瘤组织中，运用 RT-qPCR 法对蛋白质组学的结果进行初筛，选出了两个在非肿瘤组织和肿瘤组织中 mRNA 表达水平具有差异的基因——PPP1CA 和 CAMSAP2。而后，运用蛋白质免疫印迹法和免疫组化法验证，发现与非肿瘤组织相比，PPP1CA 在肿瘤组织中的蛋白表达水平显著升高。

第三部分：运用 ELISA 法检测了 PPP1CA 在肝癌患者和正常人的血清中的含量，发现 PPP1CA 在肝癌患者血清中含量显著升高。统计得出 PPP1CA 的检出率高达 90.59%，且对比了传统肝癌标志物的检出情况，显示 PPP1CA 在诊断肝癌的灵敏度和特异性方面具有明显的优势。

综上所述，本课题成功构建了一个以外泌体为手段的肝癌生物标志物研究系统，同时收集整理了一定量的肝癌临床样本，基于该系统和样本的统计分析，我们取得以下主要结果：1) 找到了在肝癌组织样本中高表达的基因，为进行更为

深入的生物学功能研究奠定了基础；2) 筛选出了在肝癌患者血清样本中高表达的蛋白，分析得出其具有重要的临床意义，可作为肝癌临床诊断试剂盒开发的候选生物标志物。本项研究证明，利用外泌体研究系统并结合临床数据分析，可作为新型生物标志物和药物作用靶点发现的有效途径。

**关键词：**肝癌；外泌体；生物标志物；PPP1CA

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC), which has been often in late stage when diagnosed, is a common malignant tumor with a high mortality rate. Early detection and treatment of HCC could significantly increasing survival rate, so it's very important to develop clinical biomarkers for early clinical diagnosis. Nowadays, widely used clinical early diagnostic biomarkers for HCC are mainly alpha fetoprotein (AFP) and alpha fetoprotein protein varuants (AFP-L3), which are waiting for improving the sensitivity and specificity. And exosome, which is closely related to the development of tumor, is a kind of secretory vesicles. It has been reported that exosome can be used as a sources for potential biomarker indentification in many tumors.

In this project, we aimed at isolation exosome from primary hepatocyte and HCC cells and performing proteomics analysis and combining with the clinical data to identify the highly expressed protein, by compare exosome isolated from hepatocyte and HCC cells, as potential biomarker candidate for development of early diagnostic kit. And therefore, the research of current project is divided into the following four parts:

Part I : We successfully cultured primary hepatocyte from tumor tissue and non-tumor tissue of HCC patients. We collected supernatant from these primary cell culture and purified the exosomes using differential centrifugation. We then performed proteomic analysis by applying FASP and the LC-MS/MS. And found a group of forty-five genes are highly expressed in exosome isolated from HCC primary cells compared to non-tumor one.

Part II : We tested three out of forty-five genes by RT-qPCR from HCC and non-tumor tissues, and found that mRNA leveles of PPP1CA and CAMSAP2 are highly elevated in HCC tissue compared to non-tumor tissues. Then, we validated PPP1CA protein level is also highly expressed in the tumor tissue compared to non-tumor tissue by Western blotting and immunohistochemical.

Part III: We tested PPP1CA protein levels in the serum from HCC patients and

normal people by ELISA, and found that PPP1CA has significantly high expression in the serum from HCC patients compared to normal serum. We also compared the specificity and sensitivity of PPP1CA and AFP or AFP-L3 in detection of HCC, and found that PPP1CA, which relevance ratio was 90.59%, showed more clinical advantages than AFP or AFP-L3, which were the golden biomarkers for detection of HCC from patient's serum.

Our current project successfully built an investigating system by combining exosome proteomics and clinical samples information analysis for HCC biomarker research and drug target candidate identification. Based on the system, as an example, we identified a highly expressed gene, *PPP1CA*, in HCC tissues compared to non-tumor tissues. We also found that PPP1CA levels were highly elevated in serum samples of HCC patients compared to normal serum and PPP1CA had advantage in terms of specificity and sensitivity in diagnosis of HCC from patient serum compared to AFP or AFP-L3, golden biomarkers for clinical HCC diagnosis.

In brief, we developed an investigating system by combining exosome proteomics and clinical samples information analysis for HCC biomarker candidate identification, and found that PPP1CA would be as a potential biomarker for detection of HCC from patient serum.

**Key words:** HCC; Exosome; Biomarker; PPP1CA

## 中英文名称术语及缩写对照

英文缩写	英文全称	中文名称
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞型肝癌
MVB	Multivesicular Body	多囊体
TEX	Tumor-derived exosome	肿瘤细胞来源的外泌体
TEM	Transmission electron microscopy	透射电子显微镜
DLS	Dynamic light scattering	动态光散射
PDI	Polydispersity Index	多分散系数
nm	Nanometer	纳米
WB	Western blotting	蛋白质免疫印迹
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide-gel-electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
ECL	Enhanced Chemiluminescence	化学发光增强液
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
BCA	Bicinchoninic Acid	聚氰基丙烯酸正丁酯
OD	Optical density	吸光度
qRT-PCR	Real-time Quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦炭酸二乙酯
BSA	Bovine Serum Albumin	胎牛血清白蛋白
TBST	Tris-buffered saline Tween 20	吐温 20 三羟基甲基氨基甲烷缓冲盐水
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液

英文缩写	英文全称	中文名称
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FASP	Filter Aided Sample Preparation	超滤管酶解
LC-MS/MS	Liquid chromatograph-mass spectrometer/Mass	液相色谱-光谱串联质谱
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
IAA	Iodoacetamide	碘乙酰胺
ACN	Acetonitrile	乙腈
FA	Formic acid	甲酸
IHC	Immunohistochemistry	免疫组化
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3-磷酸甘油醛脱氢酶
PPP1CA	$\alpha$ catalytic subunit of protein phosphatase-1	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 $\alpha$ 催化亚基
CAMSAP2	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2	钙调血影蛋白 2
CS	Citroyl Synthetase	柠檬酸合成酶
AFP	Alpha fetoprotein	甲胎蛋白
AFP-L3	lectin-bound Alpha fetoprotein	甲胎蛋白异质体

## 第一章 前言

### 1.1 肝癌简介

#### 1.1.1 肝癌流行病学

目前肝癌是全球范围内死亡率排名第三的癌症<sup>[1]</sup>。在 2008 年世界卫生组织的调查显示,世界范围内约有 748000 例新确诊为肝癌的病例,同时期约有 695000 例死亡病例。这一数据不仅表明了肝癌极高的死亡率,更重要的是暴露了目前医疗手段的局限性以及早期诊断方面存在的严重不足<sup>[2]</sup>。

报道显示,肝癌的主要致病因素有病毒感染和不良的生活习惯所致的肝病。诱发肝癌的病毒感染主要包括甲型肝炎(HAV)、乙型肝炎(HBV)和丙型肝炎(HCV)病毒感染,其中最常见、影响最广的是 HBV<sup>[3]</sup>。而诱发肝癌的不良生活习惯所致的肝病主要包括酒精性肝炎、非酒精性脂肪肝、糖尿病和肥胖等<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.2 肝癌的分类

在过去数十年间,根据“巴塞罗那分期”(Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC)标准,即依据对肿瘤大小和结节数量的成像来定义,可将肝癌分为最早期、中期、晚期和终末期肝癌<sup>[5]</sup>。而依据细胞类型不同可将肝癌分为原发性肝癌、肝血管肉瘤、胆管囊腺癌、肝母细胞癌等。原发性肝癌又可以分为胆管细胞癌、肝细胞型肝癌(HCC)以及肝细胞癌和胆管细胞癌混合型 3 种类型。其中最为常见的 HCC,占原发性肝癌 90%以上。按肉眼可见的形态不同,HCC 可分为以下 5 类:弥漫型、块状型、巨块型、结节型和小癌型。依据分化程度不同,临床上将 HCC 分为以下 4 级: I 级:癌细胞高分化、II 级:癌细胞中度分化、III 级:癌细胞分化较差、IV 级:癌细胞分化最差。其中 I 级癌细胞类似正常肝细胞,呈细梁型排列,此分级的癌组织较易经手术切除; II 级癌细胞在梁索型的形态基础上出现假腺管型结构,切除率明显降低且术后短期内复发的机率很高; III 级癌组织的手术切缘见癌浸润,不能行根治性切除术; IV 级癌细胞形状极不规则,排列松散,癌组织内呈现血管癌栓或卫星灶,往往伴有肝内、外转移。与慢性乙肝高发相关,中国是 HCC 发病率最高的国家,因此 HCC 将是本研究重点关注的肝癌类型。

肝脏主要由上皮细胞(肝实质细胞、胆管上皮细胞)和间质细胞(肝窦内皮细胞、枯否细胞、隐窝细胞、星状细胞、神经细胞、间皮细胞、血管平滑肌细胞等)所构成<sup>[6]</sup>,其中最具有病理代表意义的依然是肝实质细胞。获取原代肝实质



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