

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620070153834

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

孤儿受体 TR3 通过 Chk2 磷酸化参与顺铂诱导的细胞凋亡抑制肠道肿瘤发生

Orphan receptor TR3 participates in cisplatin-induced apoptosis via Chk2 phosphorylation to repress intestinal tumorigenesis

姚路明

指导教师姓名: 吴乔 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 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()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 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘 要	1
ABSTRACT	2
第一章 前 言	3
第一节 TR3 的研究进展	3
1.1.1 TR3 的结构	3
1.1.1.1 转录激活区 AF-1	4
1.1.1.2 DNA 结合区 DBD	4
1.1.1.3 铰链区	5
1.1.1.4 C 端配体结合区 LBD	5
1.1.2 TR3 的表达与调控	6
1.1.2.1 TR3 在组织中的表达	6
1.1.2.2 TR3 的表达调控	7
1.1.2.3 调控 TR3 表达的机理	8
1.1.3 TR3 的功能	9
1.1.3.1 TR3 促进细胞增殖	10
1.1.3.2 TR3 参与调控细胞凋亡	10
1.1.3.2.1 转录激活活性依赖方式	11
1.1.3.2.2 非转录激活方式	12
1.1.3.3 TR3 对代谢的调控	14
1.1.3.4 TR3 的转录激活功能	15
1.1.3.5 TR3 通过相互结合调控其他蛋白功能	18
1.1.3.6 其他功能	19
1.1.4 TR3 的修饰与活性调控	20
1.1.4.1 TR3 的磷酸化修饰	20
1.1.4.2 TR3 的乙酰化修饰	24
1.1.4.3 TR3 的其他修饰	24

第二节 CHK2 的研究进展	25
1.2.1 Chk2 的发现与表达	25
1.2.2 Chk2 的结构	27
1.2.3 Chk2 的激活	28
1.2.4 Chk2 的功能	30
1.2.4.1 Chk2 的激酶活性	30
1.2.4.2 Chk2 参与细胞周期调控	32
1.2.4.3 Chk2 参与凋亡过程	33
1.2.5 Chk2 与肿瘤	35
第三节 抗肿瘤药物顺铂的研究进展	36
1.3.1 顺铂的发现和药性机理	36
1.3.2 顺铂诱导细胞凋亡的机理	38
1.3.2.1 顺铂通过 p53 相关信号通路诱导凋亡	38
1.3.2.2 顺铂通过 p73 α 相关信号通路诱导凋亡	40
1.3.2.3 顺铂通过其他方式诱导细胞凋亡	41
1.3.3 顺铂与核受体	43
1.3.4 顺铂的临床应用	44
第四节 本论文研究的目的与意义	47
第二章 材料与方 法	48
2.1 实验材料	48
2.1.1 细胞株	48
2.1.2 质粒载体及菌株	48
2.1.3 主要仪器设备	48
2.1.4 主要试剂与抗体	49
2.2 实验方法	51
2.2.1 细胞培养	51
2.2.2 稳转株构建	51
2.2.3 细胞的转染	51
2.2.3.1 磷酸钙沉淀法转染	51

2.2.3.2 转染试剂转染	51
2.2.4 质粒构建	52
2.2.4.1 TR3 点突变构建	52
2.2.4.2 pSUPER-TR3 的构建	52
2.2.4.3 Luc 报告基因构建	52
2.2.5 免疫印记	53
2.2.6 mRNA 提取及 RT-PCR	54
2.2.6.1 总 RNA 提取	54
2.2.6.2 逆转录合成 cDNA	54
2.2.6.3 RT-PCR 检测特定基因表达	54
2.2.7 免疫沉淀和免疫共沉淀	55
2.2.8 蛋白质体外表达	55
2.2.9 DAPI 染色	56
2.2.10 流式细胞仪检测细胞凋亡	56
2.2.11 荧光素酶活性测定实验	56
2.2.12 免疫荧光观察	57
2.2.13 染色质免疫共沉淀(ChIP)	57
2.2.14 DNA 亲和纯化分析 (DNA affinity purification assay, DAPA)	58
2.2.15 小鼠肠癌模型	59
2.2.16 裸鼠移植瘤实验	61
第三章 实验结果与讨论	63
3.1 顺铂诱导的 TR3 磷酸化与其蛋白水平的提高密切相关	63
3.2 顺铂激活的蛋白激酶 CHK2 与 TR3 结合诱导其磷酸化	71
3.3 磷酸化的 TR3 参与顺铂诱导的细胞凋亡	79
3.4 顺铂通过抑制 TR3 下游抗凋亡基因促进肿瘤细胞凋亡	83
3.5 TR3 在顺铂治疗直肠癌中的作用	90
3.6 讨论	98
参考文献	102

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Content

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in english)	2
Chapter 1 Introduction	3
Section 1 Researching progress of TR3	3
1.1.1 Sturcture of TR3.....	3
1.1.1.1 Transcriptional regulation region AF-1.....	4
1.1.1.2 DNA binding domain DBD	4
1.1.1.3 Dregion	5
1.1.1.4 Ligand binding domain LBD	5
1.1.2 Regulation of TR3 expression	6
1.1.2.1 Expression of TR3 in various tissues.....	6
1.1.2.2 External stimuli influences TR3 expression	7
1.1.2.3 Molecular mechenism of the regulation of TR3	8
1.1.3 Biological function of TR3	9
1.1.3.1 Cell proliferation.....	10
1.1.3.2 Cell apoptosis.....	10
1.1.3.3 Cellular metabolism.....	14
1.1.3.4 Transcription activity	15
1.1.3.5 TR3 regulates other proteins through protein-protein interaction	18
1.1.3.6 Other functions.....	19
1.1.4 Modification of TR3	20
1.1.4.1 Phosphorylation of TR3	20
1.1.4.2 Acetylation of TR3.....	24
1.1.4.3 Other types of modification	24
Section 2 Researching progress of Chk2	25
1.2.1 Identification of TR3 and its expression	25

1.2.2	Structure of Chk2	27
1.2.3	Regulation of Chk2 activity	28
1.2.4	Function of Chk2	30
1.2.4.1	Kinase activity of Chk2.....	30
1.2.4.2	Cell cycle regulation	32
1.2.4.3	apoptosis	33
1.2.5	Chk2 and tumor.....	35
Section 3	Researching progress of anti cancer drug cisplatin.....	36
1.3.1	Discovery and property of cisplatin	36
1.3.2	The mechanism of cisplatin induced apoptosis	38
1.3.2.1	p53 dependent pathway.....	38
1.3.2.2	p73 α dependent pathway.....	40
1.3.2.3	Other pathways	41
1.3.3	Cisplatin and nuclear receptor	43
1.3.4	Clinical application of cisplatin	44
Section 4	Significance of this study.....	47
Chapter 2	Materials and Methods	48
Section 1	Materials.....	48
2.1.1	Cell lines	48
2.1.2	Plasmids and bacterial strain.....	48
2.1.3	Equipments	48
2.1.4	Chemicals and reagents.....	49
Section 2	Methods	51
2.2.1	Cell culture.....	51
2.2.2	Construction of stable cell line.....	51
2.2.3	Plasmids transformation.....	51
2.2.3.1	Calcium phosphate transfection.....	51
2.2.3.2	Transfection Reagent	51
2.2.4	Construction of plasmids	52

2.2.4.1 Point mutant	52
2.2.4.2 pSUPER-TR.....	52
2.2.4.3 pLuc reporter.....	52
2.2.5 Protein preparation and Western blot	53
2.2.6 mRNA extract and RT-PCR	54
2.2.6.1 Total mRNA extraction	54
2.2.6.2 Reverse transcription PCR.....	54
2.2.6.3 RT-PCR	54
2.2.7 Immunofluorescent technique.....	55
2.2.8 GST pull down.....	55
2.2.9 DAPI staining.....	56
2.2.10 Apoptosis and cell cycle analysis	56
2.2.11 Fluorescence measurements.....	56
2.2.12 Immunofluorescent staining and microscopic observation.....	57
2.2.13 Chromatin immunoprecipitation (ChIP)	57
2.2.14 DNA affinity purification assay (DAPA)	58
2.2.15 Apc ^{min/+} mouse model	59
2.2.16 Xenograft tumor inhibition in nude mice.....	61
Chapter 3 Result and discussion	63
3.1 Cisplatin-induced TR3 expression correlates with its phosphorylation ..	63
3.2 Cisplatin-activated Chk2 interacts with and phosphorylates TR3	71
3.3 TR3 promotes cisplatin-induced apoptosis through Chk2 phosphorylation.....	79
3.4 Cisplatin represses TR3 downstream anti-apoptotic target genes	83
3.5 The role of TR3 in cisplatin-repressed colon carcinogenesis	90
3.6 Discussion.....	98
Reference	102

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

孤儿受体 TR3 是立早基因表达的产物,属于类固醇/甲状腺受体超家族成员,参与了细胞增殖、分化与凋亡等生理过程的调控。顺铂是一种化疗药物,广泛用于睾丸癌、膀胱癌、宫颈癌、肺癌、淋巴瘤等肿瘤的治疗。顺铂可通过调控细胞内凋亡相关蛋白,诱导肿瘤细胞凋亡,达到抑制肿瘤生长的目的。

本论文研究表明,顺铂通过激活 Chk2 活性,诱导其与 TR3 相互作用,使 TR3 磷酸化,从而诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肠道肿瘤的发生和发展。机理研究显示,Chk2 诱导的 TR3 T88 磷酸化可稳定 TR3 蛋白,提高其蛋白表达水平。另一方面,TR3 的磷酸化增强其 DNA 结合能力,促进 TR3 结合于 BRE 和 RNF-7 启动子的 TR3 应答元件 NBRE,进而引起 TR3 对这两个抗凋亡基因的负调控。研究还证明,顺铂诱导的细胞凋亡需要通过 TR3 的介导,细胞内抑制 TR3 表达导致顺铂引起的直肠癌细胞凋亡比例下降 27%。小鼠模型也进一步验证了 TR3 在顺铂治疗过程中的作用。在 $Apc^{min/+}$ 小鼠中,顺铂能够通过 TR3 磷酸化依赖的方式抑制肠道肿瘤,抑制率达到 70%。但 $Apc^{min/+}$ 小鼠与 TR3 基因敲除 ($TR3^{-/-}$) 小鼠杂交后,顺铂对 $Apc^{min/+}/TR3^{-/-}$ 小鼠的肿瘤生长则丧失抑制作用。相应地,顺铂对 TR3 功能正常的直肠癌细胞形成的裸鼠移植瘤具有良好的抑制作用,抑制率可达 50%。而 TR3 knock-down 的直肠癌细胞所形成的裸鼠移植瘤则表现出对顺铂的耐受性。综上所述,我们的研究发现了顺铂通过 TR3 的介导来诱导直肠癌细胞凋亡的新途径,提示 TR3 可能作为顺铂治疗直肠癌过程中的一个新靶点。

关键词: TR3; Chk2; 顺铂; 凋亡; 磷酸化

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库