

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：21720091152169

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

乙肝病毒 X 蛋白提高 AIB1 蛋白的稳定性并
与其协同促进人类肝细胞癌的侵袭

Hepatitis B virus X protein stabilizes AIB1 protein and
cooperates with it to promote human hepatocellular
carcinoma cell invasiveness

刘永宏

指导教师姓名：俞春东教授

专 业 名 称：细胞生物学

论文提交日期：2012 年 4 月

论文答辩时间：2012 年 6 月

学位授予日期：2012 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2012 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()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	I
ABSTRACT	II
第一章 前言	1
1.1 SRC/p160 家族概述	1
1.1.1 SRC/p160 家族成员的发现	1
1.1.2 SRC/p160 家族成员的结构特征	1
1.1.3 SRC/p160 家族成员的功能机制	2
1.1.4 AIB1 的基因定位和表达	4
1.1.5 AIB1 的翻译后修饰	4
1.1.5.1 AIB1 的磷酸化	4
1.1.5.2 AIB1 的泛素化	5
1.1.6 AIB1 转基因和基因敲除小鼠模型	5
1.1.7 AIB1 与癌症	6
1.1.7.1 AIB1 与乳腺癌	6
1.1.7.2 AIB1 与前列腺癌	6
1.1.7.3 AIB1 与其他癌症	6
1.2 HBx 概述	7
1.2.1 HBV 的结构特征	8
1.2.2 HBx 的胞内定位	9
1.2.3 HBx 的功能机制	9
1.2.3.1 HBx 的反式激活功能	9
1.2.3.2 HBx 与细胞凋亡	10
1.2.4 HBx 转基因小鼠模型	11
1.3 肝癌概述	11
1.3.1 原发性肝癌	11
1.3.2 转移性肝癌	12
1.3.3 其它类型肝癌	12

1.4 立题背景	12
第二章 材料与方法	14
2.1 实验材料	14
2.1.1 菌株	14
2.1.2 细胞株	14
2.1.3 组织样品	14
2.1.4 质粒	14
2.1.5 试剂	15
2.1.6 仪器设备	17
2.2 实验方法	18
2.2.1 DNA 相关实验方法	18
2.2.1.1 大肠杆菌感受态制备	18
2.2.1.2 DNA 转化	19
2.2.1.3 质粒小提 (碱裂解法)	19
2.2.1.4 质粒中提 (Qiagen-tip 100)	19
2.2.2 RNA 相关实验方法	20
2.2.2.1 总 RNA 提取 (以 6 孔板为例)	20
2.2.2.2 RNA 反转录成 cDNA	20
2.2.2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)	21
2.2.2.4 所用引物	22
2.2.3 蛋白质相关实验方法	22
2.2.3.1 总蛋白提取	22
2.2.3.2 总蛋白浓度测定 (BCA 法, 参照试剂盒说明书)	22
2.2.3.3 蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳以及 Western blotting 分析	23
2.2.4 细胞相关实验方法	23
2.2.4.1 细胞培养及传代 (以 100 mm 板为例)	23
2.2.4.2 细胞瞬时转染 (Lipotamine 2000)	23
2.2.4.3 细胞瞬时转染 (PEI)	24
2.2.4.4 细胞稳定转染	24

2.2.5 其他实验方法	24
2.2.5.1 蛋白质半衰期检测 (以 6 孔板为例)	24
2.2.5.2 蛋白质免疫共沉淀 (Co-IP) (以 100 mm 板为例)	24
2.2.5.3 泛素化实验 (以 100 mm 板为例)	25
2.2.5.4 染色质免疫共沉淀 (ChIP, 以 10 mm 板为例)	25
2.2.5.5 细胞荧光素酶报告基因检测	26
2.2.5.6 明胶酶谱分析 (Zymography)	26
2.2.5.7 细胞侵袭实验 (Transwell invasion assay)	27
2.2.6 溶液配方	27
第三章 结果与分析	30
3.1 实验结果	30
3.1.1 AIB1 蛋白和 HBx 蛋白在人类肝癌组织中共同过表达	30
3.1.2 HBx 通过延长 AIB1 蛋白的半衰期上调 AIB1 的蛋白水平	31
3.1.3 HBx 抑制 AIB1 蛋白的泛素化	32
3.1.4 HBx 抑制 Fbw7 α 介导的 AIB1 蛋白的泛素化降解	33
3.1.5 HBx 抑制 Fbw7 α 和 AIB1 的 S/T 结构域之间的相互作用	35
3.1.6 HBx 抑制 Fbw7 α 介导的 AIB1 的泛素化降解不依赖于 Akt/GSK3 β 信号通路	36
3.1.7 HBx 与 AIB1 协同提升 MMP-9 的启动子活性	37
3.1.8 HBx 与 AIB1 通过协同提高 MMP-9 的表达促进肝癌细胞的侵袭	39
3.1.9 结论	41
3.2 讨论	43
[参考文献]	46
致谢	57

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

Abstract (In Chinese)	I
Abstract (In English)	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 SRC/p160 family	1
1.1.1 Discover of SRC/p160 family	1
1.1.2 Structure of SRC/p160 family	1
1.1.3 Functional mechanism of SRC/p160 family	2
1.1.4 Location and expression of AIB1	4
1.1.5 Posttranslational modification of AIB1	4
1.1.5.1 Phosphorylation of AIB1	4
1.1.5.2 Ubiquitination of AIB1	5
1.1.6 AIB1 transgenic and knock-out mice	5
1.1.7 AIB1 and cancers	6
1.1.7.1 AIB1 and breast cancer	6
1.1.7.2 AIB1 and prostate cancer	6
1.1.7.3 AIB1 and other cancers	6
1.2 HBx	7
1.2.1 Structure of HBV	8
1.2.2 Location of HBx	9
1.2.3 Functional mechanism of HBx	9
1.2.3.1 Transactivities of HBx	9
1.2.3.2 HBx and apoptosis	10
1.2.4 HBx transgenic mice	11
1.3 Hepatocellular carcinoma	11
1.3.1 Primary hepatic carcinoma	11

1.3.2 Metastatic hepatic carcinoma	12
1.3.3 other hepatic carcinomas	12
1.4 Background and significance of this thesis	12
Chapter 2 Materials and methods	14
2.1 Materials	14
2.1.1 Strains	14
2.1.2 Cell lines	14
2.1.3 Human tissues	14
2.1.4 Plasmids	14
2.1.5 Reagents	15
2.1.6 Equipments	17
2.2 Methods	18
2.2.1 DNA experiments	18
2.2.1.1 Preparation of competent cell	18
2.2.1.2 Transformation	17
2.2.1.3 DNA isolation (small amount)	19
2.2.1.4 DNA isolation (middle amount)	19
2.2.2 RNA experiments	20
2.2.2.1 RNA isolation	20
2.2.2.2 Reverse transcription	20
2.2.2.3 Real-time PCR	21
2.2.2.4 Primers	22
2.2.3 Protein experiments	22
2.2.3.1 Protein extraction	22
2.2.3.2 Measurement of protein concentration	22
2.2.3.3 SDS-PAGE Western blotting	23
2.2.4 Cell experiments	23
2.2.4.1 Cell culture and generation	23
2.2.4.2 Cell transient transfection (Lipotamine 2000)	23
2.2.4.3 Cell transient transfection (PEI)	24

2.2.4.4 Cell stable transfection	24
2.2.5 Other experiments	24
2.2.5.1 Protein stability experiments	24
2.2.5.2 Co-IP assay	24
2.2.5.3 Ubiquitination assay	25
2.2.5.4 ChIP assay	25
2.2.5.5 Luciferase reporter assay	26
2.2.5.6 Zymography assay	26
2.2.5.7 Transwell invasion assay	27
2.2.6 Solutions	27
Chapter 3 Results and discussion	30
3.1 Results	30
3.1.1 AIB1 protein and HBx protein are frequently co-overexpression in human HCC tissues	30
3.1.2 HBx increases AIB1 protein level through extending the half-life of AIB1 protein	31
3.1.3 HBx inhibits the ubiquitination of AIB1 protein	32
3.1.4 HBx inhibits Fbw7 α -mediated ubiquitination and degradation of AIB1	33
3.1.5 HBx inhibits the interaction between Fbw7 α and the S/T domain of AIB1	35
3.1.6 HBx inhibits Fbw7 α -mediated ubiquitination and degradation of AIB1 independent of Akt/GSK3 β signaling pathway	36
3.1.7 HBx cooperates with AIB1 to enhance the promoter activity of MMP-9	37
3.1.8 HBx cooperates with AIB1 to promote HCC cell invasiveness through enhancing MMP-9 expression	39
3.1.9 Conclusion	41
3.2 Discussion	43

References 46

Acknowledgement 57

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)的持续感染与人类肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发展密切相关。乙肝病毒X蛋白(Hepatitis B virus X protein, HBx)在肝癌的发展过程中发挥着重要作用。我们最近研究发现乳腺癌扩增性抗原1(amplified in breast cancer 1, AIB1)在68%的人类肝癌组织中过表达,并且通过提高肝癌细胞的增殖和侵袭能力来促进肝癌的发展。因为HBx和AIB1都在肝癌的发展过程中起重要作用,我们的研究目标是确定HBx和AIB1是否能够协同促进肝癌的发展。在此,我们发现与HBx阴性肝癌组织相比,HBx阳性肝癌组织中AIB1的蛋白水平较高。在肝癌组织中,HBx的相对蛋白水平和AIB1的相对蛋白水平呈现正相关。在不影响AIB1的mRNA水平的情况下,HBx可通过延长AIB1蛋白的半衰期来提高AIB1的蛋白水平。在机理方面,HBx通过与AIB1的结合来阻止E3泛素连接酶Fbw7 α (F-box and WD repeat domain containing 7 α , Fbw7 α)和AIB1的结合,进而抑制Fbw7 α 对AIB1的泛素化降解。此外,HBx和AIB1能够被募集到MMP-9基因的启动子上协同促进MMP-9的启动子活性,进而增强MMP-9在HepG2细胞中的表达,最终促进肝癌细胞的侵袭能力。我们的研究表明HBx能够提高AIB1蛋白的稳定性并与AIB1协同促进肝癌细胞的侵袭,说明HBx和AIB1之间的联系在乙肝病毒相关的肝癌的发展过程中起着重要作用。

关键词: HBx; AIB1/SRC-3; 肝细胞癌

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