

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620110153943

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

Sorafenib 通过下调乳腺癌扩增因子 1

(AIB1) 蛋白表达促进肝细胞癌细胞凋亡

**Sorafenib promotes Hepatocellular carcinoma cells
apoptosis by downregulating AIB1 protein expression**

李 明

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: 2014 年 04 月

论文答辩时间: 2014 年 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 05 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

摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言	5
1.1 肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）	5
1.1.1 肝细胞癌的流行病学特征.....	5
1.1.1.1 肝细胞癌发生的地域分布.....	5
1.1.1.2 肝细胞癌在不同性别中的发病率.....	5
1.1.1.3 肝细胞癌在不同种族之间的发病率.....	6
1.1.2 肝细胞癌的发生.....	6
1.1.2.1 肝细胞癌主要的致病因子.....	7
1.1.2.1.1 乙型肝炎病毒（HBV）.....	7
1.1.2.1.2 丙型肝炎病毒（HCV）.....	7
1.1.2.1.3 黄曲霉毒素（aflatoxins）.....	8
1.1.2.2 肝细胞癌发生的分子机制.....	8
1.1.2.2.1 促癌基因异常激活.....	8
1.1.2.2.2 抑癌因子的沉默.....	9
1.1.2.2.3 生长因子及其受体.....	10
1.2.索拉菲尼（Sorafenib）	11
1.2.1 Sorafenib 在肝细胞癌患者中的临床三期试验	11
1.2.2 Sorafenib 的抗肿瘤效应和作用的分子机制.....	13
1.2.2.1 Sorafenib 抑制肿瘤生长和肿瘤血管的发生	13
1.2.2.2 Sorafenib 促进肿瘤细胞的凋亡	15
1.2.3 肝细胞癌中 Sorafenib 治疗拮抗的作用机制.....	16
1.2.3.1 PI3K/Akt 在 Sorafenib 拮抗中的作用	17
1.2.3.2 肿瘤缺氧的微环境在 Sorafenib 拮抗中的作用	17
1.2.3.3 JAK-STAT 信号通路在 Sorafenib 拮抗中的作用	17
1.3.乳腺癌扩增因子 1（amplified in breast cancer 1, AIB1）.....	18

1.3.1 AIB1 的发现.....	18
1.3.2 AIB1 的分子结构与功能.....	19
1.3.3 AIB1 基因表达.....	22
1.3.4 AIB1 生物学功能.....	22
1.3.4.1 AIB1 在生物体生长中的作用.....	22
1.3.4.2 AIB1 在雌性生殖中的作用.....	23
1.3.4.3 AIB1 在天然免疫中的作用.....	24
1.3.4.4 AIB1 在能量代谢中的作用.....	24
1.3.4.5 AIB1 在肝癌发生发展中的作用.....	24
1.3.4.5.1 AIB1 在肝癌中的表达.....	25
1.3.4.5.2 AIB1 在肝癌细胞增殖中的作用.....	25
1.3.4.5.3 AIB1 在肝癌细胞侵袭中的作用.....	26
1.3.4.5.4 AIB1 在肝癌细胞化学拮抗中的作用.....	27
1.3.4.5.5 小结.....	27
1.4. 立题背景.....	28
第二章 材料和方法.....	30
2.1 材料.....	30
2.1.1 菌株, 细胞与小鼠.....	30
2.1.1.1 菌株.....	30
2.1.1.2 细胞.....	30
2.1.1.3 小鼠.....	30
2.1.2 主要试剂.....	30
2.1.3 主要仪器.....	32
2.2 方法.....	33
2.2.1 基因克隆相关实验.....	33
2.2.1.1 大肠杆菌感受态细胞 (Competent cell) 的制备.....	33
2.2.1.2 DNA 转化 (transformation)	33
2.2.1.3 质粒的提取.....	34
2.2.1.4 质粒或 DNA 片段的胶回收.....	35

2.2.2 RNA 提取, RNA 逆转录 PCR 和 Real-time PCR.....	36
2.2.2.1 RNA 的提取	36
2.2.2.2 RNA 逆转录 PCR	37
2.2.2.3 Real-time PCR	37
2.2.3 Western Blot.....	38
2.2.3.1 蛋白样品制备.....	38
2.2.3.2 蛋白质浓度测定 (BCA 法)	39
2.2.3.3 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及免疫杂交.....	39
2.2.4 细胞培养.....	40
2.2.4.1 相关溶液配置:	40
2.2.4.2 细胞培养及传代.....	41
2.2.4.3 细胞冻存.....	42
2.2.4.4 细胞复苏.....	42
2.2.5 细胞转染和稳定细胞系的建立.....	43
2.2.5.1 质粒转染.....	43
2.2.5.2 小干扰 RNA 转染	43
2.2.5.3 稳定细胞系的建立.....	44
2.2.6 MTT 方法测定药物对细胞的毒性	45
2.2.7 细胞死亡的测定.....	45
2.2.8 Tunel 方法检测细胞凋亡	46
2.2.9 细胞活性氧 (ROS) 检测.....	46
2.2.10 多聚核糖体 mRNA 模式分析 (Polysome profile analysis)	47
2.2.10.1 试剂准备:	47
2.2.10.2 实验流程.....	47
2.2.11 裸鼠成瘤模型.....	48
第三章 结果与分析	49
3.1 在肝细胞癌细胞系中, Sorafenib 下调 AIB1 蛋白表达	49
3.2 在肝细胞细胞系中, Sorafenib 抑制 AIB1 蛋白质的翻译	51
3.3 Sorafenib 可能通过抑制 eIF4E 和 mTOR/p70S6K/RP-S6 信号通路下调	

AIB1 蛋白质的合成	55
3.4 在肝细胞癌细胞系中过表达 AIB1 显著减少 Sorafenib 所诱导的细胞凋亡	59
3.5 在肝细胞癌细胞中下调 AIB1 显著促进 Sorafenib 所诱导的细胞凋亡 ..	62
3.6 AIB1 通过减少 Sorafenib 所诱导的活性氧水平抑制肝细胞癌细胞的死亡	65
3.7 p-AKT, Bcl-2 以及 Mcl-1 信号通路在 AIB1 调节的 Sorafenib 诱导细胞凋亡中的作用	70
3.8 在肝细胞癌的裸鼠成瘤模型中, 下调 AIB1 促进 Sorafenib 的抗肿瘤效应	72
第四章 讨论	75
参考文献	78
图表索引	95
缩略语及中英文对照	97
致谢.....	100

CONTENTS

Abstract(In Chinese)	1
Abstract(In English)	3
CHAPTER 1 Introduction	5
1.1.Hepatocellular carcinoma, HCC	5
1.1.1 Epidemiology of HCC	5
1. 1.1.1 Region distribution in HCC incident	5
1. 1.1.2 Sex distribution in HCC incident.....	5
1. 1.1.3 Race distribution in HCC incident.....	6
1.1.2 Hepatocarcinogenesis	6
1. 1.2.1 The main causative agents of HCC.....	7
1.1.2.1.1 HBV	7
1.1.2.1.2 HCV	7
1.1.2.1.3 Aflatoxins.....	8
1. 1.2.2 Molecular mechanism of hepatocarcinogenesis	8
1.1.2.2.1 Activation of oncogene	8
1.1.2.2.2 Inactivation of tumor suppressors.....	9
1.1.2.2.3 Growth factors and their receptors.....	10
1.2.Sorafenib	11
1.2.1 Phase III clinical trial of Sorafenib	11
1.2.2 Antitumor effects of Sorafenib.....	13
1. 2.2.1 Sorafenib suppresses tumor growth and angiogenesis.....	13
1. 2.2.2 Sorafenib promotes tumor cells apoptosis	15
1.2.3 Mechanism of resistance to Sorafenib in HCC.....	16
1. 2.3.1 PI3K/Akt signal pathway and Sorafenib resistance.....	17
1. 2.3.2 Hypoxic microenvironment and Sorafenib resistance	17
1. 2.3.3 JAK-STAT signal pathway and Sorafenib resistance	17
1.3.Amplified in breast cancer 1, AIB1	18

1.3.1 Discover of AIB1	18
1.3.2 Structure of AIB1 protein.....	19
1.3.3 Expression of AIB1	22
1.3.4 Biology function of AIB1	22
1. 3.4.1 The role of in growth	22
1. 3.4.2 The role of in female reproduction	23
1. 3.4.3 The role of innate immune respond	24
1. 3.4.4 The role of energy metabolism	24
1. 3.4.5 The role of AIB1 in HCC progress	24
1.3.4.5.1 AIB1 expression of HCC	25
1.3.4.5.2 The role of AIB1 in HCC cells proliferation	25
1.3.4.5.3 The role of in HCC cells invasion.....	26
1.3.4.5.4 The role of AIB1 in chemoresistance.....	27
1.3.4.5.5 Summary	27
1.4.Backgroud and significance of this thesis	28
CHAPTER 2 Materials and Methods	30
2.1 Material.....	30
2.1.1 Strain, cell and mouse	30
2.1.1.1 Strain.....	30
2.1.1.2 Cell.....	30
2.1.1.3 Mouse.....	30
2.1.2 Reagent	30
2.1.3 Equipment	32
2.2 Method	33
2.2.1 Gene Colone.....	33
2.2.1.1 Preparation of competent cell	33
2.2.1.2 DNA transformation.....	33
2.2.1.3 Preparation of plasmid	34
2.2.1.4 Recovery of plasmid or DNA	35

2.2.2 Isolation of RNA, Reverse transcription, real time PCR	36
2.2.2.1 Isolation of RNA	36
2.2.2.2 Reverse transcription	37
2.2.2.3 Real-time PCR	37
2.2.3 Western Blot.....	38
2.2.3.1 Preparation of protein sample	38
2.2.3.2 Quantitation of protein.....	39
2.2.3.3 SDS-PAGE.....	39
2.2.4 Cell culture.....	40
2.2.4.1 Preparation of solution.....	40
2.2.4.2 Cell passage	41
2.2.4.3 Cell freeze	42
2.2.4.4 Cell Recovery.....	42
2.2.5 Transfection and establishment of stable cell line	43
2.2.5.1 Plasmid transfection.....	43
2.2.5.2 SiRNA transfection.....	43
2.2.5.3 Establishment of stable cell line	44
2.2.6 MTT assay	45
2.2.7 Measurement of cell death	45
2.2.8 Tunel	46
2.2.9 Measurement of ROS.....	46
2.2.10 Polysome profile analysis	47
2.2.10.1 Preparation of reagent	47
2.2.10.2 Protocol of polysome profile analysis.....	47
2.2.11 Xenograft tumor in nude mice	48
CHAPTER 3 Result and Analysis	49
3.1 Sorafenib downregulates AIB1 protein expression in HCC cells	49
3.2 Sorafenib suppresses translation of AIB1 protein	51
3.3 Sorafenib downregulates AIB1 protein synthesis through eIF4E and	

mTOR/p70S6K/RP-S6 signal pathway in HCC cells.....	55
3.4 Overexpression of AIB1 significantly decreases Sorafenib induced cell apoptosis in HCC cells.....	59
3.5 Downregulation of AIB1 significantly increases Sorafenib induced cell apoptosis in HCC cells.....	62
3.6 AIB1 inhibits Sorafenib induced cell death by decreasing production of ROS.....	65
3.7 The role of p-AKT,Bcl-2 and Mcl-1 in Sorafenib induced cell apoptosis in HCC cells.....	70
3.8 Downregulation of AIB1 promotes antitumor effects of Sorafenib in nude mice.....	72
CHAPTER 4 Discussion.....	75
REFERENCES.....	78
LIST OF FIGURES.....	95
ABBREVIATIONS.....	97
ACKNOWLEDGEMENTS.....	100

摘要

Sorafenib 是一种口服的多激酶抑制剂，它给临床上治疗晚期肝细胞癌领域带来了主要的突破性进展。然而在肝细胞癌中，Sorafenib 发挥其抗肿瘤效应的分子机制并不是十分清楚。在肝细胞癌组织中 AIB1 被发现频繁的高表达，并且过表达的 AIB1 可以促进肝细胞癌的发展进程。在这里，我们研究调查了在肝细胞癌中 Sorafenib 对 AIB1 蛋白表达的影响以及调控的分子机制；与此同时我们也研究了 AIB1 在 Sorafenib 发挥抗肿瘤效应中所介导的作用。

我们的研究表明在肝细胞癌细胞系中 Sorafenib 可以剂量和时间依赖式的抑制 AIB1 蛋白的表达。进一步研究结果显示，Sorafenib 并不能减少 AIB1 mRNA 表达水平，也不能加速 AIB1 蛋白的降解，但却可以显著的抑制 AIB1 蛋白质的翻译过程。与此同时我们的研究也表明 Sorafenib 对 AIB1 蛋白质翻译的抑制至少部分是通过其对 eIF4E 和 mTOR/p70S6K/RP-S6 信号通路抑制来实现的。在肝细胞癌细胞中过表达 AIB1 可以显著减少 Sorafenib 所诱导的细胞凋亡；而下调 AIB1 则可以促进 Sorafenib 所诱导的细胞凋亡。这说明 Sorafenib 诱导的 AIB1 蛋白下调可能参与到 Sorafenib 的促凋亡作用中。另外，我们的研究同时表明 AIB1 可以通过影响 Sorafenib 所诱导的活性氧产生进而对 Sorafenib 的促凋亡作用进行调控。在裸鼠成瘤模型中研究表明，在肝细胞癌肿瘤组织中 Sorafenib 仍然可以显著抑制 AIB1 蛋白表达，并且下调 AIB1 可以显著的增加肿瘤对 Sorafenib 的敏感性。

总之，我们的研究表明在肝细胞癌中 AIB1 是 Sorafenib 发挥抗肿瘤作用的下游介导者。我们的工作将为临床上肝细胞癌的个体化治疗和药物合并治疗提供重要的理论依据。

关键词：索拉菲尼；乳腺癌扩增因子 1；肝细胞癌，

Abstract

Sorafenib is an oral multi-kinase inhibitor and represents a major breakthrough in the therapy of advanced hepatocellular carcinoma. However, the mechanisms of Sorafenib mediated-antitumor effects in HCC have not been fully elucidated. AIB1 is frequently overexpressed in human HCC tissues and promotes hepatocellular carcinoma progression. In our study, we investigate the effect of Sorafenib on expression of AIB1 protein and the mechanisms of Sorafenib regulated AIB1 expression. In addition, we also focus on that the role of AIB1 in Sorafenib-mediated antitumor effects.

We found that Sorafenib downregulated AIB1 protein expression in a dose and time dependent manner in HCC cells. Further analysis indicated that Sorafenib did not either decrease AIB1 mRNA level or promote the degradation of AIB1 protein, but Sorafenib inhibited translation of AIB1 protein through inhibiting eIF4E and mTOR/p70S6K/RP-S6. Overexpression of AIB1 substantially diminished Sorafenib-induced cell apoptosis. In contrast, downregulation of AIB1 significantly promoted Sorafenib-induced cell apoptosis. These results demonstrate that Sorafenib induced AIB1 downregulation contributes to pro-apoptotic effects of Sorafenib. In addition, our results suggested that AIB1 mediated Sorafenib-induced cell death at least in part through effecting ROS level in HCC cells. In xenograft tumors, Sorafenib could significantly down-regulate AIB1 protein expression and downregulation of AIB1 enhanced sensitivity of tumor to Sorafenib in vivo

Taken together, our study suggests that AIB1 is a downstream mediator of Sorafenib' antitumor effects and provide theory for the application of individual and combinational drug treatment in future HCC therapy.

Key Words: Sorafenib; AIB1; HCC

第一章 前言

1.1 肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）

肝细胞癌患者总数在全世界各种癌症患者中排在第六位，但在癌症相关的死亡中，由肝细胞癌所导致的死亡人数却高居世界第三位^[1-3]，这从一个侧面反映了肝细胞癌较高的死亡率和目前在临床诊断治疗中存在的困难性。

1.1.1 肝细胞癌的流行病学特征

1.1.1.1 肝细胞癌发生的地域分布

在世界范围内，肝细胞癌的发生率并不是均匀存在的，它的发生明显存在地域性特征。世界上绝大多数肝细胞癌（大于 80%）发生在撒哈拉沙漠以南的非洲地区和东亚地区。中国肝细胞癌的携带人数占全世界肝细胞癌病例总数的 50% 以上。另外塞内加尔，冈比亚，韩国等国家也属于肝细胞癌的高发区^[1, 4]。尽管肝细胞癌在发达地区和国家中的发病率显著低于发展中国家和地区，但在美国，西欧和日本等发达国家和地区中，肝细胞癌的发病率正在逐年上升。在美国，肝细胞癌已经成为增长最快的肿瘤相关的死亡因素^[4]。

1.1.1.2 肝细胞癌在不同性别中的发病率

在世界范围内，肝细胞癌在男性中的发病率远高于女性，其发病比率一般平均为 2:1 至 4:1。一般认为造成肝细胞癌在男性中高发生率的原因可能是男性更容易暴露在肝细胞癌的危险因子之中，例如，男性更容易感染乙型肝炎病毒（HBV）和丙型肝炎病毒（HCV）；更多的摄入酒精；更多的吸烟；对铁离子更多的储藏。然而相关报道表明血清中高水平的睾酮含量与肝细胞癌的发生率呈正相关性^[5-6]。一项利用端粒酶敲除的小鼠研究发现，雄性小鼠肝细胞癌发生的危险性显著高于雌性小鼠^[7]。这表明雄性动物所产生的雄激素可能促进肝细胞癌的发生。实际上，最近利用雄激素受体敲除鼠的研究表明，雄激素的缺失延迟了由二乙基亚硝（DEN）所诱导的肝细胞癌的发生^[8]，进一步说明了雄激素可能存在

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫