

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520110154131

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

MEN1 基因在肝细胞癌中的
生物学功能及表观遗传学特性研究

The biological function and epigenetic
mechanism of *MEN1* in hepatocellular carcinogenesis

徐 斌

指导教师姓名: 金光辉 教授

华先欣 教授

专 业 名 称: 生 理 学

论文提交日期: 2014 年 04 月

论文答辩时间: 2014 年 05 月

学位授予日期: 2014 年 06 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 05 月

摘 要

肝癌是我国发病率和致死率居第二位的恶性肿瘤。肝细胞癌（HCC）是肝癌的主要发病形式，约占肝癌的 83%。肝细胞癌发展迅速、易转移，是目前治疗最困难、预后最差的恶性肿瘤之一。然而，目前我们仍然缺乏对肝细胞癌发生过程中关键分子及其调控网络的认识。因此，深入鉴定和阐明肝细胞癌发病进程中关键分子及其调控网络，将为肝细胞癌的临床诊断和治疗提供有效的分子靶点。*MEN1* 基因是多发性内分泌肿瘤 1 型（MEN1）综合症的关键致病基因，其编码的蛋白 *menin* 可以与大量的转录因子相互作用，在不同的组织中发挥不同的生物学功能。目前关于 *menin* 在肝细胞癌中的生物学功能及其分子调控网络并不清楚。

本研究检测了 89 例临床肝细胞癌病人肿瘤组织和癌旁组织中 *menin* 的表达情况，相关性分析发现，*menin* 的高表达与病人的不良预后密切相关；ChIP-on-chip 鉴定了 *menin* 及其调控的正性组蛋白修饰在肝细胞癌基因组上的分布规律，筛选了其调控的下游靶基因网络；分子机制研究显示 *menin*-MLL 甲基转移酶复合物可以通过 H3K4me3 修饰促进癌基因 *Yap1* 的转录表达；DEN 和 CC14 等化学药物诱导建立的小鼠原发性肝细胞癌及肝脏炎症模型研究发现，*Men1* 杂合缺失能明显抑制原发性肝癌的发生及肝脏的局部炎症反应；上述两种小鼠疾病模型中 *menin* 对 *Yap1* 的表观遗传学调控机制依然存在，而且在肝脏的炎性微环境中 *menin*-*Yap1* 通路与炎症因子 IL-6 之间形成正反馈调控通路；临床肝癌标本及相应的临床资料分析发现，HCC 中 *Yap1* 的高表达与 *menin* 的高表达呈显著正相关，且与术后存活率、甲胎蛋白含量等恶性指标密切相关；根据 *menin* 的晶体结构信息设计并合成了靶向 *menin* 与 MLL 相互作用位点的小分子抑制剂 MMI，初步证明其治疗 HCC 的药理学有效性。

我们的研究结果揭示了 *menin* 在肝细胞癌中关键的促癌功能，筛选和鉴定了 *menin* 的下游靶基因网络，证明了 HCC 中 *menin*-MLL 复合物通过 H3K4me3 修饰调控 *Yap1* 转录的崭新表观遗传学机制，为临床肝细胞癌的诊断和治疗提供了潜在的分子标志物和靶点。

关键词：肝细胞癌； *menin*； H3K4me3； *Yap1*

Abstract

Liver cancer is the second most prevalent cancer, and the second most frequent cause of cancer-related death in China. 83% of liver cancer is hepatocellular carcinoma(HCC). HCC is one of the most malignant cancer, with fast proliferation and poor prognosis. However, the mechanism of HCC is not clear. Therefore, advanced understanding of the key regulators and their regulating networks will be very helpful to clinical diagnosis and also provide the therapeutic targets for HCC. *MEN1* is responsible for the inherited tumor syndrome-multiple endocrine neoplasia type 1(MEN1). Menin, the product of *MEN1*, interacts with many transcription factors, plays different roles in a variety of tissues. Up till now, the functional significance and regulating networks of menin in HCC remains obscure.

Through measuring the expression of menin in 89 patients' primary HCCs and the adjacent tissues, we find that menin overexpression in HCC is correlated with poor prognosis; Using ChIP-on-chip screens we show the distribution patterns of menin and its positive histone modifications on genome of HCC, and select the downstream regulated network; The subsequent mechanism research reveal that menin-MLL histone methyltransferase(HMTase) complex promote proto-oncogene *Yap1* transcription through H3K4me3 modification; Heterozygous ablation of *Men1* reduces DEN induced liver carcinogenesis and represses the activation of the inflammation pathway; There is a positive feedback loop between menin-Yap1 axis and IL-6 in CCl4 induced liver inflammatory microenvironment; Furthermore, the regulation between menin and Yap1 takes place in the above mice disease models; Clinical results present *Yap1* is epigenetically regulated by menin and correlated with poor prognosis in human HCC; According to the crystal structure of human menin, we design and get a small inhibitor-MMI, which could inhibit HCC cell lines proliferation by disrupting the menin-MLL complex.

Our findings reveal that menin plays an important epigenetic role in promoting liver tumorigenesis. Menin up-regulates *Yap1* transcription through H3K4me3 Modi-

-fication in HCC. Which support the notion that H3K4me3 regulated by menin-MLL complex is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma.

Keywords: Hepatocellular carcinoma(HCC); menin; H3K4me3; Yap1

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
第一章 前言.....	1
1. 肝细胞癌.....	1
1.1 肝细胞癌的流行病学.....	1
1.2 肝细胞癌的发病机理与分子机制研究.....	2
1.2.1 肝细胞癌的发病机理.....	2
1.2.2 HBV 感染和肝细胞癌的分子机制.....	3
1.2.3 化学致癌物和肝细胞癌的分子机制.....	4
1.2.4 肝细胞癌中原癌基因、抑癌基因的改变.....	4
1.2.5 肝细胞癌中基因组的不稳定性.....	5
1.2.6 活性氧自由基（ROS）和肝细胞癌.....	5
1.2.7 肝细胞癌中近些年鉴定的关键调控因子.....	5
1.3 肝癌的临床治疗.....	6
2. 肝细胞癌的表现遗传学.....	8
2.1 DNA 甲基化与肝细胞癌.....	8
2.2 MicroRNAs 与肝细胞癌.....	9
2.3 组蛋白甲基化修饰与肝细胞癌.....	9
3. <i>MEN1</i> 的生物学功能.....	11
3.1 <i>MEN1</i> 是内分泌系统中关键的抑癌基因.....	11
3.2 Menin 在白血病发生过程中的促癌作用.....	13
3.3 Menin 的晶体结构及小分子抑制剂研究.....	15
4. 立项依据.....	17
第二章 材料与方法.....	18
1. 肝细胞癌临床病例.....	18
2. 细胞培养及来源.....	18
3. 试验动物.....	18

4. 免疫组化 (IHC) 及 HE 染色	19
5. 小鼠皮下荷瘤模型	20
6. 小鼠胚胎试验	20
7. DEN 及 CCl ₄ 诱导小鼠肝脏疾病模型	20
8. 小鼠肝脏原代枯否细胞分离	21
9. SiRNA 合成与转染	21
10. 细胞克隆形成活性 (CFA) 检测	22
11. 质粒构建及逆转录病毒包装、感染	22
12. 染色质免疫共沉淀 (ChIP)	23
13. 染色质免疫共沉淀芯片 (ChIP-on-chip)	25
14. 实时荧光定量逆转录 PCR (qRT-PCR)	25
15. Western blot	27
16. 细胞免疫荧光	28
17. 酶联免疫吸附反应 (ELISA)	28
18. 试剂信息表	30
19. 抗体表	31
20. 引物表	32
21. 统计分析	33
第三章 实验结果	34
第一部分 Menin 促进肝细胞癌的恶性表型	34
1. Menin 在肝细胞癌中高表达并与不良预后相关	34
2. Menin 促进肝细胞癌的增值	37
第二部分 Menin 促进肝细胞癌恶性表型的分子机制研究	38
1. ChIP-on-chip 检测 menin 在基因组上的分布并筛选靶基因	38
2. Menin-MLL 复合物促进癌基因 <i>Yap1</i> 的转录并增强其生物学功能 ..	40
3. 胚胎发育过程中 menin 对 <i>Yap1</i> 的调控	45
第三部分 Menin 促进肝细胞癌恶性表型的动物模型研究	46
1. <i>Men1</i> 杂合缺失降低 DEN 诱导的小鼠原发性肝细胞癌的发生	46
1.1 <i>Men1</i> 杂合缺失降低 DEN 诱导雌性小鼠原发性肝细胞癌的发生	46
1.2 <i>Men1</i> 杂合缺失在雄性小鼠中比雌性更容易代偿	48
1.3 小鼠原发性肝细胞癌中 menin 通过 H3K4me3	

修饰促进 <i>Yap1</i> 的转录表达	49
2. Menin-Yap1 通路参与 CCl4 诱导的小鼠肝脏炎症反应	50
2.1 CCl4 诱导的小鼠肝脏炎性微环境中 menin-MLL 复合物及 <i>Yap1</i> 被激活	50
2.2 小鼠肝脏炎性微环境中 menin 通过 H3K4me3 修饰促进 <i>Yap1</i> 的转录表达	51
2.3 Menin-Yap1 通路与 IL-6 之间形成正反馈调控	52
第四部分 肝细胞癌临床病例中, menin 与 Yap1 的相关性及调控关系 ...	54
1. <i>Yap1</i> 在肝细胞癌中高表达并与不良预后及 menin 的高表达相关 ..	54
2. 临床肝细胞癌中 menin 通过 H3K4me3 修饰促进 <i>Yap1</i> 的转录表达	57
第五部分 肝细胞癌临床病例 MEN1 测序分析	57
第六部分 Menin-MLL 靶向小分子抑制剂的研究	59
1. 靶向 menin 与 MLL 相互作用位点小分子抑制剂的筛选与合成 ...	59
2. 小分子抑制剂 MMI 抑制肝癌细胞系的增殖	60
第四章 讨论	61
1. Menin-MLL 甲基转移酶复合物在 HCC 中的生物学功能	61
2. Menin 对 <i>Yap1</i> 的转录调控及其临床意义	62
3. Menin 与肝细胞癌中的性别差异	63
参考文献	64
致 谢	71
主要科研成果	72

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	11
Chapter 1 Introduction	1
1. Hepatocellular carcinoma(HCC)	1
1.1 HCC epidemiology	1
1.2 HCC pathogenesis and molecular pathogenesis	2
1.2.1 HCC pathogenesis	2
1.2.2 HBV infection and HCC molecular pathogenesis	3
1.2.3 Chemical carcinogen and HCC molecular pathogenesis	4
1.2.4 Change of oncogene and anti-oncogene in HCC	4
1.2.5 Genomic instability in HCC	5
1.2.6 Reactive oxygen species(ROS) and HCC	5
1.2.7 Recently identified key regulators in HCC	5
1.3 HCC treatment	6
2. HCC epigenetics	8
2.1 DNA methylation and HCC	8
2.2 MicroRNAs and HCC	9
2.3 Histone methylation and HCC	9
3. Biological functions of <i>MEN1</i>	11
3.1 <i>MEN1</i> is a tumor suppressor in endocrine system	11
3.2 Tumor promoting function of menin in leukaemia	13
3.3 The crystal structure and inhibitors of menin	15
4. Establishment	17
Chapter 2 Materials and methods	18
1. Human HCC samples	18
2. Cell culture and source	18
3. Animals	18

4. IHC and HE staining	19
5. Tumor xenografts	20
6. Mice embryo experiment	20
7. DEN and CCl4 induced mice liver disease models.....	20
8. Primary kupffer cell isolation	21
9. SiRNA synthesis and transfection	21
10. Colony forming activity(CFA) detection.....	22
11. Plasmid construction and retroviruses system.....	22
12. ChIP assays	23
13. ChIP-on-chip.....	25
14. Realtime quantitative reverse transcription PCR	25
15. Western blot	27
16. Cell immunofluorescent staining.....	28
17. ELISA	28
18. Reagents	30
19. Antibodies	31
20. Primers	32
21. Statistical analysis.....	33
Chapter 3 Results.....	34
Part I . Menin promotes HCC malignant phenotypes.....	34
1. Menin is up-regulated in HCC and correlated with poor prognosis. . . .	34
2. Menin promotes HCC cell lines proliferation.....	37
Part II . Molecular machnism of menin in HCC.....	38
1. Genomic distribution of menin by ChIP-on-chip	38
2. The essential role of the Menin–MLL complex in <i>Yap1</i> transcription and function	40
3. The regulation between menin and Yap1 during embryo development .	45
Part III . Mice disease models of menin in HCC	46
1. Heterozygous <i>Men1</i> ablation reduces DEN induced HCC in mice	46
1. 1 Heterozygous <i>Men1</i> ablation reduces DEN induced HCC in female mice.....	46

1. 2	Heterozygous <i>Men1</i> ablation is easily compensated in male mice	48
1. 3	Menin promotes <i>Yap1</i> transcription through H3K4me3 in DEN induced HCC.....	49
2.	Menin-Yap1 axis responds to CCl4 induced liver inflammation	50
2. 1	Menin-Yap1 axis is activated in CCl4 induced liver inflammation	50
2. 2	Menin promotes <i>Yap1</i> transcription through H3K4me3 in CCl4 induced liver inflammation	51
2. 3	The positive feedback loop between menin-Yap1 axis and IL-6. . .	52
Part IV.	<i>Yap1</i> is epigenetically regulated by menin and correlated with poor prognosis in human HCC.....	54
1.	<i>Yap1</i> is up-regulated in HCC and correlated with poor prognosis	54
2.	Menin promotes <i>Yap1</i> transcription through H3K4me3 in human HCC	57
Part V.	<i>MEN1</i> sequencing in human HCC.....	57
Part VI.	Inhibitors to menin-MLL complex in HCC.....	59
1.	Selecting and synthesis of inhibitors to menin-MLL complex	59
2.	MMI inhibits HCC cell lines proliferation	60
Chapter 4	Discussion	61
1.	The important functions of menin-MLL complex in HCC	61
2.	Menin promotes <i>Yap1</i> transcription and its clinical significance	62
3.	Menin and gender difference of HCC	63
References.	64
Acknowledgments	71
Publications	72

第一章 前言

1. 肝细胞癌

1.1 肝细胞癌的流行病学

肝脏肿瘤有多种形式，包括肝细胞癌（Hepatocellular Carcinoma, HCC）、胆管癌、肝毒细胞瘤、胆管囊腺癌、血管肉瘤和上皮样血管内皮瘤，其中肝细胞癌占到 83%，是最常见的肝脏肿瘤。在世界范围内，肝细胞癌是发病率居第 6 位，致死率居第 3 位的恶性肿瘤。在中国每年新发肝细胞癌患者约三十六万，居恶性肿瘤的第 2 位。70-90%的肝细胞癌患者同时发生各种慢性肝脏疾病。肝细胞癌在地理分布上明显不均衡，预示着不同区域导致肝细胞癌发生的主要因素不同（图 1）。

	Age-adjusted incidence (x100 000; [men/women])	Risk factors			
		Hepatitis C virus	Hepatitis B virus	Alcohol	Others
Europe	..	60-70%	10-15%	20%	10%
Western	7.2/2.1
Southern	9.8/3.2
Northern	3.8/1.6
North America	6.8/2.2	50-60%	20%	20%	>10%
Asia and Africa	..	20%	70%	10%	<10%
Eastern Asia	35.5/12.6
Southern Asia	13.9/5.1
Central Africa	18.9/9.6

Data taken from references 1 and 5.

Table 1: Age-adjusted incidence and risk factors for hepatocellular carcinoma worldwide, by geographical area

图 1 世界范围内 HCC 的发病率及相应的危险因素^[1]

在东南亚及撒哈拉以南的非洲地区 70%的肝细胞癌的发病与乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）感染及黄曲霉素的摄入有关。而在北美洲、欧洲和日本，主要的发病因素是丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）感染，同时酒精的过多摄入也起到了促进作用。肝细胞癌多发生于男性，男性发病率与女性发病

率的平均比值为 2:1 至 4:1^[2]。与其他癌症类似,肝细胞癌的发生可能是多个致病因素参与的复杂过程,并包括各因素之间的相互作用。病毒感染与其它致病因素具有协同作用,例如:非酒精性脂肪性肝病。糖尿病也是诱发肝细胞癌发生的一个独立的危险因素。HIV 的感染会加速 HBV 或 HCV 感染者肝脏疾病的进程。研究还表明抽烟可以促进 HCC 的发生,而咖啡却能降低 HCC 的发生^[1, 2]。

HCC 发生的主要因素是慢性 HBV 感染,70%的 HCC 患者发生慢性 HBV 感染。虽然 HBV 和肝细胞癌之间的关系很复杂,并涉及其他致病因素,但两者间的病因学联系已经明确。慢性 HBV 感染者的肝细胞癌的发病率是正常人的 100 倍,慢性 HBV 感染合并肝硬化将使肝细胞癌的发病率更高。新生儿和婴幼儿阶段感染 HBV,成为携带者,其后发生肝细胞癌的危险性最大,这与该年龄段机体免疫系统不成熟有关。这种危险随着年龄的增加而降低。少儿阶段感染成为携带者危险性下降到 40%。成年人感染 HBV 成为携带者危险性下降到 10%。肝细胞癌的家庭聚集性常与 HBV 的垂直传播有关^[3]。研究发现可以通过接种疫苗的方式降低与 HBV 相关的肝细胞癌的发生。中国的台湾地区通过对 6 到 9 岁的儿童进行 HBV 计划免疫,使肝细胞癌的发生从 1974-1984 年的 0.52/100000 降低到 1984-1986 年的 0.13/100000^[4]。如果慢性 HBV 感染病人的血液中 HBV 复制水平很高,抗病毒药物如干扰素 (IFN) 可以有效地清除病毒,并延缓肝脏疾病的进程,甚至可能降低肝细胞癌的发生^[5]。

HCV 是目前西方国家发生肝细胞癌的最主要原因。HCV 诱导性肝癌的发生与慢性肝炎和肝硬化的持续进展密切相关^[6]。预防 HCV 感染的最有效途径是防止输血过程中 HCV 的传播^[7]。大部分但非所有的关于利用干扰素治疗来抑制慢性 HCV 相关性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的研究证实:干扰素在降低肝癌发病风险,或至少在延缓肿瘤发生上作用虽小,却很有意义。当出现肝硬化时,干扰素治疗就不能发挥延缓肝细胞癌发生的作用^[8, 9]。

1.2 肝细胞癌的发病机理与分子机制研究

1.2.1 肝细胞癌的发病机理

肝细胞癌的发生需要多种因素的参与,在发生过程中各因素之间又产生复杂的相互作用,同时肝癌的发生又分多个阶段进行,对其中的某些阶段,已确认其有特异性的遗传学及表观遗传学改变,包括基因差异表达。如图 2 所示是肝细胞

癌发生的组织病理学进程和分子事件的示意图。HBV、HCV、酒精和黄曲霉素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1) 等肝细胞癌危险因素诱导肝细胞损伤, 损伤后的肝脏内发生肝细胞代偿性增生与坏死的循环, 该循环持续进行导致肝脏慢性炎症。肝脏慢性炎症环境促进各种细胞因子及炎症因子的分泌, 伴随着肝脏星状细胞和枯否细胞 (Kuffer Cell, KC) 的激活, 慢性炎症发展为肝纤维化和肝硬化, 此时肝脏上产生许多被胶原蛋白包裹的不正常小结节。接下来, 这些不正常的结节发展为增生性结节, 由于此时基因组的不稳定性, 导致发育异常性结节的产生, 基因组的突变导致某些原癌基因、抑癌基因表达激活或抑制, 最终肝细胞癌发生^[10]。

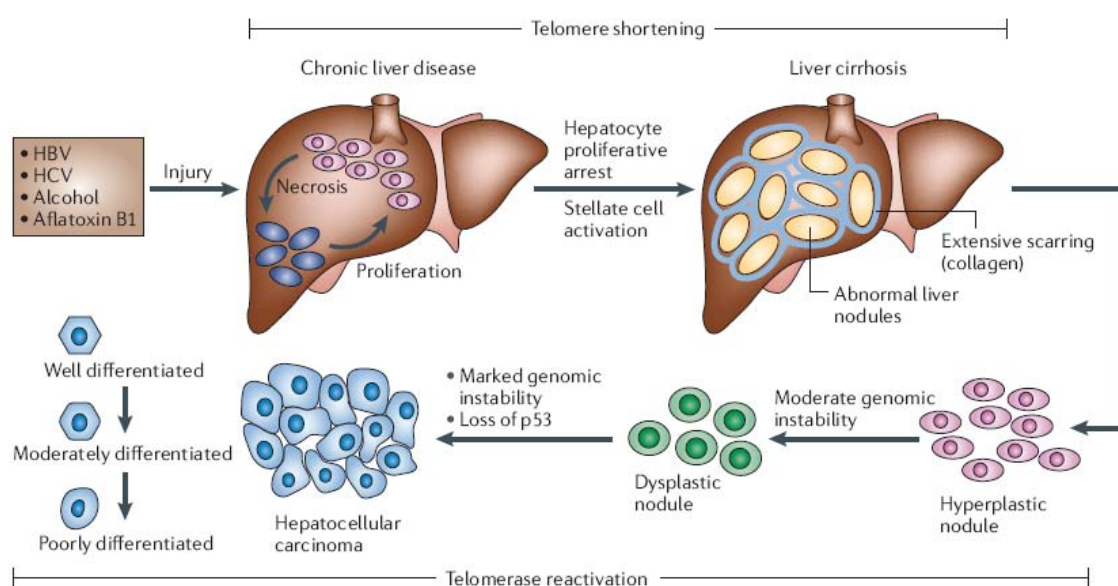


图 2 HCC 的组织病理学进程及分子事件模式图^[10]

1.2.2 HBV 感染和肝细胞癌的分子机制

大约 70% 的肝细胞癌都发现有 HBV DNA, 并且往往以病毒 DNA 的整合形式存在。人们认为整合形式的 HBV DNA 可能在肝细胞癌的发病机制中起重要作用, 但整合的 DNA 中经常找不到病毒的全部序列, 而且被感染的组织中也不含有复制状态的病毒 DNA。在宿主 DNA 中, 其整合部位是随机的, 但仍呈现出一定程度的部位倾向, 整合似乎往往出现在重复序列中。尽管肝细胞癌 DNA 的遗传学改变意味着病毒基因组是引起插入突变的一个因素, 但是在病毒插入导致了特定位点的细胞基因中断这一点上尚未达成共识^[3]。

HBV 的 *HBx* 基因, 其编码蛋白 HBX 可以与肿瘤抑制因子 p53 相互作用并

使之失活，从而干扰重要的 DNA 损伤修复过程，其所致的基因不稳定状态可能在肝细胞癌的发展中起一定作用。截短形式的 HBV 编码包膜蛋白的基因 preS2/S 可以使 NF- κ B 和 AP1 等转录因子进行反式启动。反式启动的靶基因包括原癌基因 *c-myc* 和 *c-fos* 以及炎症相关细胞因子 *IL-6*。这些原癌基因或者关键细胞基因的启动可能是肝细胞癌中细胞转化和癌症发生的基础^[3]。

1.2.3 化学致癌物和肝细胞癌的分子机制

黄曲霉素 B1 是肝细胞癌发生的另一个主要危险因素。对霉菌流行地区的肝细胞癌的 *p53* 基因的突变分析发现，密码子 249 有很高的突变率（50%）。这显然是 AFB1 和 DNA 相互作用所特异的。在非 AFB1 相关的病例中，*p53* 基因的不同位置有不同的突变。另有报道表明，HBV 相关的肝细胞癌很少有 *p53* 突变，这可能意味着此时 *p53* 的失活主要是因为与 HBX 形成复合物所致^[11]。

研究表明在肝细胞癌的发生过程中，药物代谢相关基因的表达上调，多重耐药基因的表达被增强。谷胱甘肽-S-转移酶 π (GST π)， γ -谷氨酰转移酶 (γ -GT) 以及鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 都可以在肝细胞癌发生过程中被诱导产生。这显然是肝癌发展过程中的程序性级联反应事件，并且可能可以用来解释肝细胞癌的耐药本质^[12]。

1.2.4 肝细胞癌中原癌基因、抑癌基因的改变

肝脏的慢性炎症可诱导多种生长因子、细胞因子、应激蛋白、激素等的表达，他们直接或间接地促进肿瘤前体细胞的克隆增殖。其中包括：肝细胞生长因子 (HGF)、表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 α/β (TGF α/β)、胰岛素、胰高血糖素、白介素 1 (IL-1)、白介素 6 (IL-6) 等。肝细胞癌中检测到的表达增强的原癌基因包括 *c-fos*、*c-jun*、*c-myc*、*c-met*、*c-H-ras* 及 *MAGE-1*，晚期肝细胞癌患者中 11-13%检测到位于染色体 11q13 上的 *Cyclin D1* 基因的扩增和过度表达^[13]。相反，*Rb*、*p53* 等肿瘤抑制基因表达受到抑制。还有研究发现，PML-RAR- α 蛋白可在转基因鼠中诱导肿瘤性损伤，表明融合基因可能在肝细胞增殖失调及肝细胞癌的发生中起作用。Ras 家族基因的突变在很多啮齿类动物的肝细胞癌中被检测到，但在人类的肝细胞癌中却很少发现，并且他们的作用也不明确^[15, 16]。

1.2.5 肝细胞癌中基因组的不稳定性

肝细胞癌中基因组的不稳定性往往导致肿瘤细胞遗传学的改变, 这些改变包括原癌基因的启动、抑癌基因的失活和端粒酶活性的重新启动。对驱动肿瘤发展的特异性遗传学改变的确认, 使我们可以更好地了解肿瘤的进展过程, 并且为临床尽早的检测和预后提供有用的生物标记。对染色体进行多态性标记, 分析染色体杂合性缺失 (LOH) 的等位基因分型技术是目前使用最广泛的方法。研究者已通过这种方法定位到肝细胞癌染色体经常缺失的部位: 4q、8p、11q、13q、16q 和 17p。新近发展起来的比较基因组杂交分析 (CGH), 将肿瘤组织和正常组织的 DNA 差异性标记, 与正常细胞中期染色体进行杂交, 通过比较两种标记的荧光强度来检测染色体的缺失和扩增。应用 CGH 检测到的肝细胞癌中染色体缺失的区域与上述等位基因分型得到的结果很好地重合, 这意味着这些区域抑癌基因的失活可能导致肝细胞癌的发生。同时利用 CGH 检测到了 1q、6p、8q、17q 和 20q 在肝细胞癌中经常发生扩增, 表明这些区域可能存在原癌基因^[1]。

1.2.6 活性氧自由基 (ROS) 和肝细胞癌

肝炎病毒感染、致癌物、毒素、乙醇的肝细胞癌的诸多诱因, 其分别有着不同的细胞靶向和作用方式。然而这些诱因的一个共同特征就是活性氧自由基 (ROS) 的形成, ROS 相关的信号在肝细胞癌的发生中起到重要的作用。在慢性肝炎和肝细胞癌患者的肝内发现高水平 ROS^[17]。ROS 有高度的活性并直接破坏许多重要的细胞组分, 包括 DNA、脂类和蛋白质。许多肝细胞癌中发现 ROS 诱导的脂过氧化^[18]。AP1、FOS、JUN、STAT 及 PI3K 等都是受肝细胞癌等人类肿瘤相关的氧化应激启动的信号级联反应^[19]。He 等的研究发现肝细胞中 IKK β /NF κ B 通过抑制氧化应激诱导的 STAT3 通路的活化, 在肝细胞癌发生的早期和晚期都发挥了抑癌的作用^[20]。

1.2.7 肝细胞癌中近些年鉴定的关键调控因子

最近几年关于 HCC 分子机制的研究向我们揭示了一些肝细胞癌发生过程中关键的调控因子。肝细胞核因子 α (HNF α) 与几个 microRNAs(miRNA) 形成正反馈通路共同促进肝细胞癌的发生^[21]。Bard-Chapeau 等通过肝脏特异性敲除转基因小鼠及 DEN 诱导原发性肝细胞癌模型, 证明 Ptpn11 基因 (编码蛋白 Shp2) 是肝细胞癌中典型的抑癌基因^[22]。Naugler 等 2007 年的研究指出, 男性和女性肝

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