

学校编码: 10384

密级

学号: 24520101153337

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

肝癌中 PcGs 的 H3K27 组蛋白甲基化调控规律及生物学意义的研究

Study on H3K27 histone methylation regulation law and biological significance of PcGs in hepatocellular carcinoma

郑琦琳

指导教师姓名: 金光辉 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2013 年 4 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

2013 年 4 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

摘要

原发性肝癌在世界范围内普遍存在,中国肝癌患者占据世界肝癌患者总数的50%,深入认识肝癌的发病机制,寻找有效的分子诊断和治疗靶点具有十分重要的意义。近几年有报道显示,多梳基因(polycomb group genes, PcGs)与肿瘤的发生和转移密切相关。PcGs的主要作用是通过组蛋白的甲基化修饰致使靶基因的表达沉默。P53是一个重要的抑癌基因,主要功能包括调控细胞周期、DNA修复、促进细胞凋亡,维持基因组的稳定性,抑制肿瘤血管生成等。原发性肝癌的发生主要包括“肝损伤-肝纤维化-肝癌”三个过程,细胞因子在这三个过程中发挥着重要作用,对细胞因子调控网络的认识有利于预防和治疗肝癌。

本研究利用免疫组织化学检测临床肝癌病理标本发现, PcGs 在肝癌中的表达量明显高于癌旁, EZH2 的阳性率达到 70%, BMI1 的阳性率达到 50%, CBX8 的阳性率为 41%。通过生存曲线分析, 本文发现 PcGs 在肝癌中的高表达与患者的术后生存时间密切相关, 在肝癌中 PcGs 阳性表达的患者其术后生存率较低, 提示 PcGs 是肝癌的预后影响因子。同时, 我们通过构建 Hep G2 细胞裸鼠荷瘤模型, 发现 shRNA 干扰 PcGs 后 Hep G2 衍生瘤明显小于对照组, 表明在肝癌中抑制 PcGs 表达能够促进肿瘤生长, PcGs 具有促癌作用。在小鼠肝脏炎症损伤模型中, 化学药物诱导小鼠肝脏损伤后, 实验组小鼠肝脏中 EZH2 的表达量与对照组比较表达量增高, 并且通过体外实验表明细胞因子能够上调 Hep G2 细胞中 EZH2 的表达量。提示, EZH2 可能作为细胞因子调控肝癌发生和发展的中心环节, 参与肝癌发生和发展的全过程。从分子水平上, 我们在 Hep G2 细胞系中进一步研究发现 PcGs 能够不依赖于 P16/INK4a 通路调节 P53 的表达量, 抑制 *EZH2*、*SUZ12*、*CBX8* 的表达, 能够上调 P53 蛋白的表达量。对于表观遗传学特性的探讨, 我们发现 PcGs 干扰后, Hep G2 细胞中 H3K27me3 的表达量明显降低, 表明 EZH2、SUZ12、BMI1、CBX8 在调控 H3K27 三甲基化修饰的过程中必不可少。同时, 本研究还发现 EZH2 与 SUZ12 在肝癌细胞系中能相互结合形成复合体, 并且彼此间相互调控。

本研究发现 PcGs 与肝癌的发生、发展及患者的不良预后密切相关。揭示了不同细胞因子能共同调节 EZH2 的表达量, 提示在肝癌中 PcGs 的表观遗传学调控

规律及靶基因网络，为进一步明确 PcGs 在肝癌中的分子生物学意义提供了理论基础。

关键词:肝癌 PcGs 细胞因子 P53 H3K27me3

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Primary liver cancer is wide spread in the world, Chinese hepatocellular carcinoma patients occupied 50% of the world's total number. Therefore understanding the pathogenesis of HCC, looking for molecular diagnosis and effective therapeutic targets is very important. Polycomb group genes (PcGs) family, recent years shown to be associated with the occurrence and metastasis of tumor. The main function of PcGs is inhibiting the expression of target genes by methylation of histone modification. P53 is an important tumor suppressor gene, it is main functions including cell cycle regulation, DNA repair, apoptosis, the maintenance of genomic stability, inhibition of tumor angiogenesis etc. The occurrence of PHC include “liver injury - liver fibrosis - liver cancer” three processes, cytokines play an important role in these three processes, and in postoperative, cell factors will also affect the tumor recurrence and metastasis, understanding the regulatory network of cytokines is conducive to the prevention and treatment of liver cancer.

In this study, we used immunohistochemical detecting the clinical HCC specimens, found that the expression of PcGs in hepatocellular carcinoma was significantly higher than that in adjacent none-tumor tissue, and the positive rate of EZH2 up to 70%, BMI1 positive rate was 50%, and the positive rate of CBX8 was 41%. Through the survival curve analysis, this study found that PcGs high expression in cancer closely associated with poor prognosis of patients. Animal experiments showed that, in nude mice tumor-burdened models established by Hep G2 which was interfered PcGs by shRNA, the derived tumor ininterference group was significantly smaller than that in control group (Luc shRNA). Show that PcGs has effect tumor promotion in HCC. In mouse liver injury models, chemical drug could upregulate the EZH2 expression in livers compared with the control groups. And vitro experiments showed that cytokines can increase the expression of EZH2 in Hep G2. Suggest EZH2 may play an important role in cytokine signaling network which regulated carcinogenesis and development in liver cancer, participated in the whole process of carcinogenesis and tumor development. At the molecular level, we further found that the regulation of P53 did not depend on P16. To probed into characteristics of epigenetics, we found that interfered with PcGs could decrease the expression of H3K27me3 in Hep G2, showed that EZH2, SUZ12, BMI1, CBX8 is essential in

methylation modification of H3K27. At the same time, we also found that EZH2 and SUZ12 can be combined to form complexes, and regulated each other in HCC.

In conclusion, this paper found that PcGs closely related to the occurrence, development of HCC and the poor prognosis. Revealed the different cytokines could regulate the expression of EZH2, prompt the epigenetic regulation in liver cancer and the network of target genes of PcGs in HCC, provides the theory basis for further clear the molecular biological function of PcGs in hepatocellular carcinoma.

Key words: hepatocellular carcinoma; PcGs; cytokines; P53; H3K27me3

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要	I
Abstract	III
第一章 绪论	1
1.1 肝癌的发展现状及其分类	1
1.2 肝癌的致病因素	2
1.3 肝纤维化与肝癌	4
1.4 肝纤维化与肝癌模型的建立	5
1.5 细胞因子与肝癌	6
1.5.1 转化生长因子 (TGF- β)	7
1.5.2 白细胞介素 6 (IL-6)	8
1.5.3 肝细胞生长因子 (HGF)	9
1.5.4 表皮生长因子 (EGF)	10
1.6 P53 与肝癌	11
1.7 组蛋白甲基化与肝癌	14
1.8 PcG 蛋白复合体	15
1.8.1 PcGs 蛋白复合体的组成	15
1.8.2 PcGs 介导的靶基因沉默机制	16
1.8.3 PcGs 与恶性肿瘤	17
1.8.4 PcGs 与肝癌	17
1.9 立项依据	17
第二章材料与方法	19
2.1 试剂及耗材	19
2.1.1 试剂	19
2.1.2 耗材	21
2.2 仪器	21
2.3 质粒与菌种	22
2.4 细胞株	22
2.5 临床肿瘤标本	23
2.6 分子生物学方法	23

2.6.1 干扰质粒构建	23
2.6.2 感受态细胞的制备与转化	27
2.6.3 质粒扩增及其碱裂解法制备	28
2.6.4 逆转录 PCR 检测基因 mRNA 表达水平	28
2.6.5 PCR	29
2.6.6 Western Blot 检测基因蛋白水平表达	29
2.7 HE 染色	30
2.7.1 HE 原理	30
2.7.2 染色	31
2.8 免疫组织化学	31
2.9 病毒包装与感染	32
2.9.1 逆转录病毒简介	32
2.9.2 病毒包装与感染	32
2.10 免疫共沉淀	33
2.11 实验动物	33
2.12 数理统计分析	34
第三章 实验结果	35
3.1 肝癌中 PcGs 表达升高, 且与患者不良预后密切相关	35
3.2 肝癌中促进 EZH2 表达量升高的因素	40
3.2.1 肝脏炎症上调肝组织中的 EZH2 蛋白水平	40
3.2.2 细胞因子上调 EZH2 蛋白水平	44
3.3 PcGs 参与肝癌的发生	47
3.3.1 PcGs 对荷瘤模型的影响	47
3.4 PcGs 在肝癌中调控 P53 的表达	48
3.5 PcGs 在肝癌细胞中的表观遗传特性	51
第四章 讨论	54
参 考 文 献	58
致 谢	69

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Current situation and classification of liver cancer	1
1.2 The pathogenic factors of liver cancer	2
1.3 Liver fibrosis and HCC	4
1.4 Liver fibrosis and HCC models	5
1.5 Cytokine and HCC	6
1.5.1 Transforming growth factor β (TGF- β)	7
1.5.2 Interleukin-6 (IL-6)	8
1.5.3 Hepatocyte growth factor (HGF)	9
1.5.4 Epidermal growth factor (EGF)	10
1.6 P53 and HCC	11
1.7 Histone methylation and cancer	14
1.8 Polycomb group genes	15
1.8.1 The composition of the PcGs	15
1.8.2 Target gene silencing by PcGs	16
1.8.3 PcGs and malignant tumor	17
1.8.4 PcGs and HCC	17
1.9 Theoretical basis	17
Chapter 2 Materials and methods	19
2.1 Reagents and consumables	19
2.1.1 Reagents	19
2.1.2 Consumables	21
2.2 Instruments	21
2.3 Plasmids and strains	22
2.4 Cell lines	22
2.5 Clinical tumor specimens	23
2.6 Molecular biology methods	23

2.6.1 Construction of shRNA plasmids	23
2.6.2 Preparation of competent cells and transformation	27
2.6.3 Plasmids amplification	28
2.6.4 Detection of gene mRNA expression by RT-PCR	28
2.6.5 PCR	29
2.6.6 Detection of gene protein expression by Western Blot	29
2.7 HE Staining	30
2.7.1 Principle of HE	30
2.7.2 Put colour on	30
2.8 Immunohistochemistry	31
2.9 Introduction of retrovirus	32
2.9.1 Introduction of retrovirus	32
2.9.2 Virus packaging and infection	32
2.10 Co-immunoprecipitation	33
2.11 Experimental animals	33
2.12 Statistical analysis	34
Chapter 3 Results	35
3.1 Increased PcGs expression in hepatocellular carcinoma, which is closely related with the prognosis	35
3.2 The factors increased EZH2 expression in HCC	40
3.2.1 Liver inflammation up-regulated the expression of EZH2 in HCC	38
3.2.2 Cytokines upregulated the expression of EZH2	44
3.3 PcGs is concerned with the occurrence of HCC	47
3.3.1 Effect of PcGs on Tumor-bearing models	47
3.4 Regulated P53 expression by PcGs in HCC	48
3.5 The epigenetic characteristics of PcGs in HCC	51
Chapter 4 Discussions	50
References	58
Acknowledgments	69

第一章 绪论

1.1 肝癌的发展现状及其分类

肝癌（liver cancer）是一种恶性程度高、进展快、预后差的恶性肿瘤，全球范围内肝癌在男性中的发病率和死亡率分别列所有肿瘤的第5位和第2位。而在女性中肝癌的发病率和死亡率分别是排在第7位和第6位。有报道显示2008年全球估计有748,300例新发肝癌病例，695,900人死于肝癌^[1]。虽然肝癌在世界范围内普遍存在，但是中国肝癌患者占据世界总数的一半以上，肝癌死亡率高于世界平均水平。从我国地理分布上看，肝癌高发区大多属温暖、潮湿的海洋性气候。沿海高于内地，沿海岛屿和内河入海口地区高于沿海其他地区，农村高于城市。我国江苏启东、广西抚绥、广东中山、福建同安等肝癌死亡率较高，死亡率均在30/100,000以上^[2]。居高不下的死亡率也使得肝癌仅次于肺癌成为死亡率第二的癌症^[3]。并且进一步调查发现，目前中国男性的肝癌发病率是女性的三倍以上，存在明显的性别差异^[4]。

肝癌一般分为：原发性肝癌和转移性肝癌^[5]。转移性肝癌比原发性肝癌较为常见，多为肺癌、胃肠道肿瘤、乳腺癌、胰腺癌和恶性黑色素瘤转移形成肝脏肿瘤。转移性肝癌在临床上常见肿瘤大、体重下降、门脉高压及消化道出血等表现。原发性肝癌则指发生于肝脏上皮的恶性肿瘤，一般包括肝细胞性肝癌（hepatocellular carcinoma）、胆管细胞癌（cholangiocarcinoma）和混合型肝癌（mixed primary carcinoma of liver）三种。原发性肝癌的发生是一个多级发展的复杂过程，大多数早期无明显临床症状，或者只有类似于肝病的一般症状，因而很难被发现，典型的临床表现常见于中晚期肝癌，因此至今对其仍然缺乏有效的治疗及相关分子机制的认识^[6]。在原发性肝癌中，组学观察显示肝细胞性肝癌占据肝癌发生率的70%至85%，临床上常表现为腹痛、腹水、黄疸和肝脏肿大等^[7]；胆管细胞癌原发灶于胆管上皮，相对少见，在泰国及其他东亚地区发生率较高，主要是由于广泛的肝吸虫感染^[8]。

1.2 肝癌的致病因素

普遍认为原发性肝癌的发生是多因素、多途径、多步骤。迄今为止原发性肝癌的病因尚未完全阐明,但是目前的研究表明主要的致病因素包括外环境致病因素(病毒、寄生虫、细菌的感染、黄曲霉毒素的摄入、肥胖以及吸烟、饮酒)、自身遗传因素及表观遗传因素。明确原发性肝癌的病因和发生机制对预防和治疗原发性肝癌具有重要意义。

目前发现的主要致病因素大致可以分为以下几种类型:

1、病毒感染:很多病毒均可导致肝脏的炎症从而诱发肝癌,如:巨细胞病毒、EB病毒、疱疹病毒等。在中国,慢性病毒性肝炎是原发性肝癌诸多致病因素中最主要病因,包括乙型肝炎病毒感染、丙型肝炎病毒感染、丁型肝炎病毒感染等。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染与肝细胞性肝癌发生之间有着比较密切的关系。流行病学调查显示,除极少数例外,慢性HBV感染区与HCC发生区域有极大的相似之处,肝癌高发地区一般也是高HBV感染的地区。HBV感染可直接致癌也可以间接致癌^[9]。直接致癌的分子机制:HBV基因整合到宿主细胞后HBV的DNA序列与宿主细胞的基因序列重新整合,使癌基因激活和抑癌基因失活,从而发生癌变;间接致癌的分子机制:慢性乙型肝炎不但会引起肝组织的坏死,释放炎症因子,从而促进肝细胞的增殖大大增加肝癌发生的概率,而且肝炎常发展为肝纤维化,引起肝细胞生长失控,促进肝癌的发生^[10]。

2、黄曲霉毒素:黄曲霉毒素种类繁多其中与肝癌有关的黄曲霉素B1(AFB1)是最常见的一种,常出现在发霉的谷物中,尤其是花生等。实验研究证实,AFB1比二甲亚硝胺诱发实验动物发生肝癌的强度高75倍^[11]。并且还有研究发现,HBV与黄曲霉素具有协同致癌的作用^[12]。

3、遗传因素:研究表明,不同遗传背景的个体暴露于同样的环境,个体致癌的情况不尽相同。这说明遗传易感性在肝癌致病因素中起到至关重要的作用。目前主要研究的遗传易感指标有三种:GST基因多态性^[13, 14]、乙醛脱氢酶2基因多态性^[15]、细胞色素P4501A1基因多态性^[16]。

4、酒精:酒精在肝癌的发生中主要起辅助作用。过量饮酒容易引起肝脏损伤引起肝硬化,最终致癌^[17]。

5、幽门螺旋杆菌感染:幽门螺旋杆菌主要通过门静脉、淋巴循环流至胆道

到达肝脏，多分布于肝细胞间的毛细胆管中，其致癌可能机制是：（1）幽门螺旋杆菌菌体及其代谢产物具有肝细胞毒性^[18]。（2）导致肝脏炎症，促使肝细胞、肝星状细胞等释放出细胞因子，从而推动细胞周期，增加内源性相关性抗原的表达，以引起肝细胞的异常增殖^[19]。

6、肝吸虫感染：肝吸虫感染是诱发胆管细胞癌的主要因素。一方面，肝吸虫的分泌物具有毒性作用，可导致肝内胆管上皮细胞增生，而长期慢性炎症的刺激会导致上皮发生癌变；另一方面，肝内虫卵形成的肉芽肿会导致肝纤维化，诱发肝硬化，继而发展成肝癌^[20]。

7、表观遗传学因素：表观遗传学（epigenetics）是研究生物体DNA序列不发生改变的情况下生物体的表型却发生变化的一门遗传学分支学科。表观遗传学调控主要包括microRNA调控，DNA甲基化修饰，组蛋白修饰等。microRNA调控：microRNA是一类长约19-25个核苷酸的单链非编码小RNA分子，由一段具有发夹结构的70-80个核苷酸长度的单链RNA前体（pri-mRNA）在类RNaseIII酶Dicer酶的剪切下而生成。有大量报道显示miR-21、miR-122和miR-221等基因簇在慢性病毒性肝炎、肝纤维化、肝癌中都起到重要作用^[21, 22]；DNA甲基化修饰：DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶（DNA methyltransferase, DNMT）的作用下，以S-腺苷甲硫氨酸（SAM）为甲基供体，对DNA序列上CpG进行甲基化修饰，从而使CpG上的二核苷酸5'端胞嘧啶转变为5'甲基胞嘧啶（5' methylcytosine, 5mC）。多种基因的启动子区和第一外显子区含CpG，而CpG相对集中的区域称之为CpG岛^[23]。在生理状态下，基因组中零散分布的CpG二核苷酸常处于甲基化状态，CpG岛处于非甲基化状态^[24]。但在肿瘤中常出现异常的DNA甲基化修饰，主要表现为基因组整体甲基化水平降低，大量癌基因启动子甲基化不充分，导致癌基因异常表达；一些抑癌基因启动子的CpG岛发生高甲基化，从而使抑癌基因失活^[25]。目前，针对于肝癌有研究表明，抑癌基因P16、RASSF1A、GSTP1、SFRP1、DLC1等启动子发生异常甲基化从而使基因失活^[26-30]；组蛋白修饰：核小体是染色体的最小单元，主要由四个核心组蛋白（H3，H4，H2A，H2B）包裹着147个碱基对形成的八聚体组成。组蛋白主要为球形结构，但其具有松散结构的N端，这一松散结构N端常发生各种修饰，目前在组蛋白上至少发现八种修饰型，包括甲基化修饰、乙酰化修饰、泛素化修饰、磷酸酸化修饰、脱氨基作用、脯氨基异构化、

核糖基化、SUMO修饰等^[31]。这些修饰形成大量的“开关”通过改变染色质的结构来调控基因的转录和翻译。目前有大量研究表明，除了存在少量的基因突变以外，在肝癌中许多基因启动子都存在不同的组蛋白修饰，导致抑癌基因沉默，癌基因的异常表达。组蛋白修饰主要是由一些酶参与的酶促反应，而有研究表明在肝癌中甲基转移酶SYMD3、乙酰基转移酶P300、苏氨酸激酶Mst1都存在异常表达^[32-34]。

1.3 肝纤维化与肝癌

肝纤维化是指肝脏纤维结缔组织的过度沉积，是纤维增生和纤维分解不平衡的结果。几乎所有慢性肝损伤的患者都发生肝纤维化，并最终导致肝硬化，甚至发展为原发性肝癌。近年来我国加强对于肝病的研究，揭示多种慢性肝病共同的病理学基础是肝纤维化，其发生机制是机体对炎症损伤的自我修复反应，就如同创伤部位形成疤痕一样，只是这种疤痕形成部位在肝脏。一直以来认为细胞外基质特别是间质胶原的沉淀是肝纤维化时的主要改变，而近年来发现，肝星状细胞（hepatic stellate cells, HSCs）是肝内胶原及其它细胞外基质的主要来源^[35]。在肝脏受损伤时，由于炎症和细胞因子的作用，处于静止状态的肝星状细胞被激活，进而分泌大量的细胞外基质，并表达 α -平滑肌肌动蛋白（alpha-smooth muscle actin, α -SMA）、IV型胶原、间质金属蛋白-2（matrix metalloproteinases-2, MMP-2）和金属蛋白酶组织抑制剂-2（tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2）等促纤维化因子，对肝纤维化的发生和发展起着重要的作用^[36]。另一方面，多种来源的间质细胞对细胞外基质的积累也起了一定的作用，其中包括肝门成纤维细胞、骨髓产生细胞和成纤维细胞。由于肝纤维化的发病机制比较复杂，涉及到多种细胞因子和不同机制，因此目前针对于肝纤维化还没有比较有效的治疗方法。但是肝纤维化患者如不接受合理的治疗又会导致肝硬化，导致门脉高压、腹水、肝性脑病甚至引发肝癌等严重并发症。并且有实验观察表明，原发性肝癌患者血清中肝纤维化指标异常人数明显高于慢性肝炎者，同时慢性肝炎中肝纤指标异常者较容易转化为原发性肝癌。表明肝纤维化指标与原发肝癌密切相关，肝纤维化的治疗对预防原发性肝癌有积极的临床意义^[37]。

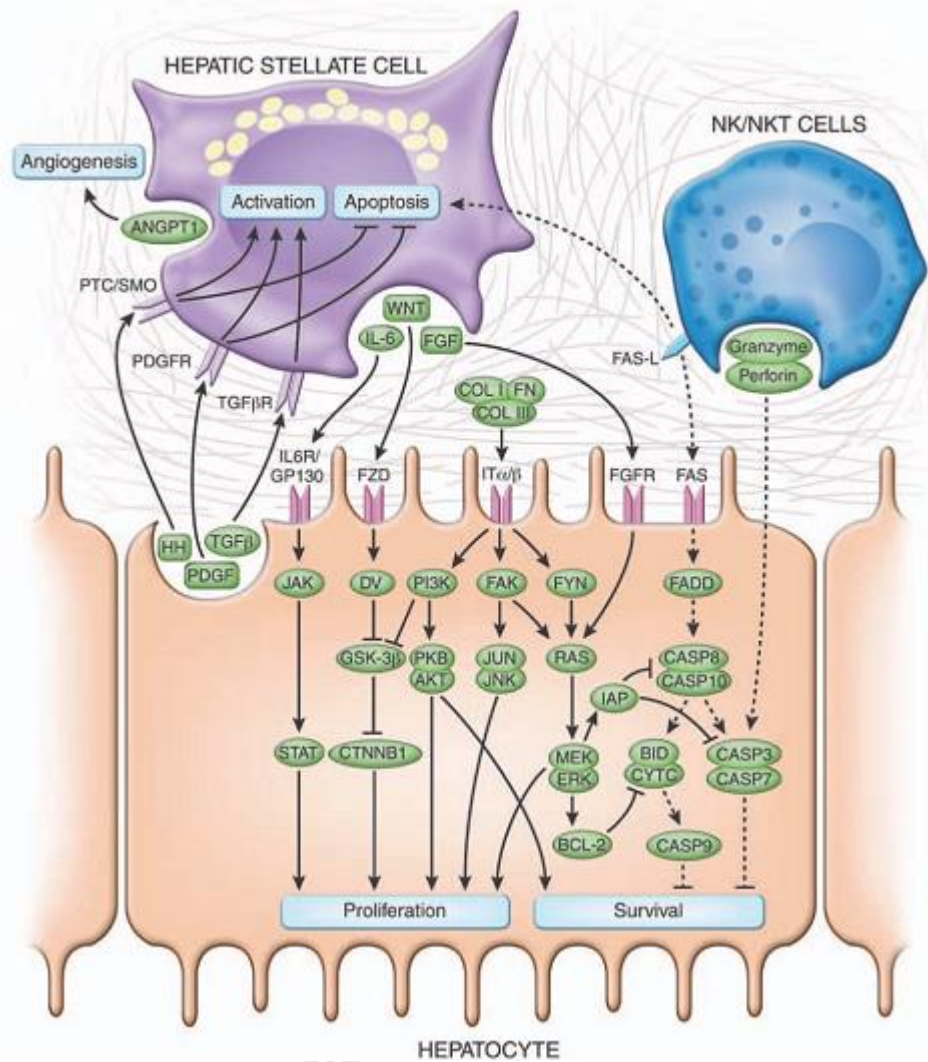


图1.1 肝纤维化中促进肝癌发生的分子信号通路^[38]。

Fig. 1.1 Pathways in liver fibrosis that promote HCC^[38].

1.4 肝纤维化与肝癌模型的建立

随着对肝癌发病机制的探讨及研究不断加深,建立合适的肝癌模型甚至各种肝病动物模型成为深入研究肝癌发生的分子生物学机制的重要手段。随着实验动物学研究的不断发展,肝癌动物模型也由最初的自发性肝癌模型,发展为现在的移植性肝癌模型、诱发性肝癌模型、转基因型肝癌模型。不同的肝癌模型都有其各自的特点,而化学诱发性肝癌模型是最能模拟人类肝癌发生的“损伤-纤维化-恶性转化”三个周期变化的肝癌模型,化学诱发方法主要包括二乙基亚硝胺、黄曲霉素B1、二甲基氨基偶氮苯、亚胺基偶氮甲苯等几种方法。二乙基亚硝胺

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