

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 32720131150568

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**miR-133b 调控蛋白磷酸酶 2A-B55δ 亚基
影响肝细胞癌化疗敏感性的机制研究**

**Protein phosphatase 2A-B55δ enhances chemotherapy
sensitivity of human hepatocellular carcinoma
under the regulation of microRNA-133b**

庄群瑛

指导教师姓名: 林忠宁 教授

林育纯 副教授

专 业 名 称: 卫生毒理学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 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（厦门大学公共卫生学院卫生毒理学林忠宁教授）课题（组）的研究成果，获得（林忠宁教授）课题（组）经费或实验室的资助，在（厦门大学分子疫苗学和分子诊断学国家重点）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）：

庄群瑛

2016年5月24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）： 庄群瑛

2016年5月24日

摘 要

目的: 原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国公共卫生关注的热点问题之一, 寻找增强 HCC 化疗敏感性的有效干预靶点具有重要意义。蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatase 2A, PP2A)是重要的肿瘤抑制因子; *PPP2R2D* 基因编码的 PP2A-B55 δ 亚基参与细胞周期有丝分裂调控。我们前期研究验证了 *PPP2R2D* 基因 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'UTR)的+15G>C 多态性位点受微小 RNA-133b(microRNA-133b, miR-133b)靶向调控, 本研究旨在探讨 miR-133b 调控 PP2A-B55 δ 影响 HCC 化疗药物诱导的细胞周期及抗肿瘤敏感性的分子机制, 为 HCC 肿瘤化学预防提供科学依据。

方法: 采用生物信息学方法分析人群 HCC 组织中 *PPP2R2D* 基因表达水平, 预测 miR-133b 与靶基因结合的最小自由能。选择 HCC 化疗药物顺铂(cisplatin, cDDP)为药物干预模型、人肝癌 HepG2 细胞为细胞模型开展体内外试验研究; 构建 *PPP2R2D* 基因敲低和高表达稳定 HepG2 细胞株, 以及 *PPP2R2D*-3'UTR+15G>C 多态性调控表达稳定 HepG2 细胞株; 采用 miR-133b 的模拟物和抑制物建立 miR-133b 高表达或低表达模型。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测目的基因 mRNA 水平, 免疫印迹、免疫荧光、免疫组化实验检测蛋白表达水平, 丝氨酸/苏氨酸磷酸酶检测试剂盒测定 PP2A 酶活性, 流式细胞术分析细胞周期时相分布, Transwell 实验分析细胞迁移能力, 克隆形成实验评价细胞自我更新能力, Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒测定细胞凋亡, 噻唑蓝颜色反应法检测细胞增殖能力, 裸鼠移植瘤实验分析体内肿瘤形成及其抑制作用, 双荧光素酶报告基因检测基因转录调控活性。

结果: (1) HCC 肿瘤组织和 HCC 细胞株的 *PPP2R2D* 表达水平相比非肿瘤组织和正常肝细胞均较低($P<0.05$)。 (2) cDDP 诱导 HepG2 细胞增殖抑制, 克隆形成面积减少, 细胞周期 G1 期比例增高、G2/M 期比例降低($P<0.01$)。 (3) cDDP 诱导 HepG2 细胞 PP2A 酶活性增高, *PPP2R2D* mRNA 和 B55 δ 蛋白表达增高

*本课题受国家自然科学基金(81172705, 81573181, 81402648, 81472997)、973 计划前期研究专项(2014CB560710)、国家自然科学基金重点项目(81130052)、福建省自然科学基金项目(2014J01372, 2014Y2004, 2015J01344)、厦门大学山海基金项目(2013SH007)资助。

($P < 0.01$)。 (4) 体外试验, 相比对照细胞, *PPP2R2D* 基因敲低表达细胞中 PP2A 酶活性降低, 细胞周期因子依赖激酶 1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 表达增高, cDDP 诱导的 G1 期阻滞、迁移抑制、克隆形成减少、凋亡增加和增殖抑制得以部分恢复($P < 0.01$); 相比对照细胞, *PPP2R2D* 基因高表达细胞中 PP2A 酶活性增高, CDK1 表达降低, cDDP 诱导的 G1 期阻滞、迁移抑制、克隆形成减少、凋亡增加和增殖抑制更加显著($P < 0.01$)。 体内试验, 相比对照, B55 δ 高表达移植瘤生长受 cDDP 抑制更加显著($P < 0.01$)。 (5) 相比正常肝细胞, HCC 细胞中 miR-133b 表达水平相对较高($P < 0.01$); miR-133b 靶向 *PPP2R2D* 基因, 二者表达水平呈负相关($P < 0.01$); cDDP 诱导 miR-133b 表达降低, 提高 *PPP2R2D*-3'UTR 的转录调控活性($P < 0.01$); 增加 miR-133b 表达后, *PPP2R2D* mRNA 和 B55 δ 蛋白表达均降低, cDDP 诱导的 G1 期阻滞得以部分恢复($P < 0.01$); 降低 miR-133b 表达后, *PPP2R2D* mRNA 和 B55 δ 蛋白表达均升高, cDDP 诱导的 G1 期阻滞更加显著($P < 0.01$); (6) cDDP 诱导不同基因型 HCC 细胞 *PPP2R2D* mRNA 表达水平不同($P < 0.01$); 相比 *PPP2R2D*-3'UTR+15CC 基因型细胞, cDDP 诱导 *PPP2R2D*-3'UTR+15GG 基因型细胞 PP2A 酶活性增高、G1 期阻滞、迁移抑制、克隆形成减少、凋亡增加和增殖抑制均更为显著($P < 0.01$)。

结论: PP2A-B55 δ 是增强 HCC 化疗敏感性的潜在分子靶点, miR-133b 通过靶向 *PPP2R2D* 参与细胞周期调控, *PPP2R2D*-3'UTR+15G>C 多态性与 HCC 化疗敏感性差异有关, 本研究为人群 HCC 肿瘤化学预防和靶向性干预研究提供实验依据。

关键词: 蛋白磷酸酶 2A-B55 δ 亚基 肝细胞癌 化疗敏感性 miR-133b 单核苷酸多态性

Abstract

Objective: Hepatocellular carcinoma (HCC) remains a major public health problem in China. The identification of effective targets for enhancing HCC chemosensitivity is of great significance. Protein phosphatase 2A (PP2A) is an important tumor suppressor. PP2A-B55 δ subunit, encoded by the *PPP2R2D* gene, play a critical role in the regulation of cell cycle and mitosis. Our previous studies revealed that the polymorphism of +15G>C in the 3'-untranslated region (3'UTR) of *PPP2R2D* gene involved in the regulatory mechanism of microRNA-133b (miR-133b). In this study, we investigated the role of PP2A-B55 δ and related mechanisms affecting chemotherapy sensitivity of HCC under the regulation of miR-133, so as to provide a scientific basis for the prevention of HCC.

Methods: Bioinformatics analyses were used to analyze *PPP2R2D* expression levels in HCC cohorts and calculated the predicted free energies of the binding between miRNAs and their targets. Cisplatin (cDDP) was selected as a representative chemotherapeutic drug of HCC and HepG2 cells were chosen as a sensitive model for *in vitro* and *in vivo* studies. The stable *PPP2R2D*-knockdown and -overexpression HepG2 cell lines, and stable *PPP2R2D*-3'UTR+15G>C polymorphism-regulatory HepG2 cell lines were established. miR-133b mimic or inhibitor was used to establish miR-133b-overexpression or -suppression model. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to measure mRNA levels. Western blotting, immunofluorescence and immunohistochemistry assays were used to determine protein levels. A serine/threonine phosphatase assay system was used for measuring PP2A activities. Flow cytometry was used to analyze cell cycle distribution. Transwell assay was used to evaluate cell migratory ability. Cell colony formation assay was used to evaluate cell self-renewal capacity. The Annexin V-FITC apoptosis detection kit was used for apoptosis assay. The tetrazolium-based colorimetric test was used to determine cell proliferation. Xenograft studies in nude mice were performed to analyze tumor formation or suppression *in vivo*. Dual luciferase reporter assay system was used to analyze luciferase activities.

Results: (1) *PPP2R2D* expression was down-regulated in both HCC tumors

and HCC cell lines ($P<0.05$). (2) cDDP inhibited cell proliferation, decreased colony formation areas, induced G1 phase arrest in HepG2 ($P<0.01$). (3) Treatment with cDDP increased PP2A activities, *PPP2R2D* mRNA and B55 δ protein levels ($P<0.01$). (4) Knockdown of B55 δ decreased PP2A activity, increased the expression of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), partially reversed cell cycle arrest, migration inhibition, colony formation reduction, apoptosis increasement and proliferation inhibition ($P<0.01$). Artificially increasing the expression of B55 δ increased PP2A activity, counteracted CDK1 activation, modulated transitions of the cell cycle, and increased the suppressive effect of cDDP on cell migration, colony formation, apoptosis, and proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo* ($P<0.01$). (5) The expression level of miR-133b was significantly up-regulated in HCC cell lines ($P<0.01$). miR-133b was found to target *PPP2R2D*. The expression of miR-133b was negatively correlated with *PPP2R2D* and B55 δ *in vitro* and *in vivo* ($P<0.01$). cDDP decreased the expression of miR-133b and increased the luciferase activity of the reporter construct bearing the *PPP2R2D*-3'UTR ($P<0.01$). miR-133 mimic suppressed the levels of *PPP2R2D* mRNA and B55 δ protein, and rescued G1 phase arrest induced by cDDP; miR-133 inhibitor enhanced the expression of *PPP2R2D* and B55 δ , and accelerated G1 phase arrest induced by cDDP ($P<0.01$). (6) cDDP increased *PPP2R2D* mRNA levels in varying degrees in HCC cells with various genotypes ($P<0.01$). The PP2A activity increasement, G1 phase arrest, migration inhibition, colony formation reduction, apoptosis increasement and proliferation inhibition induced by cDDP in cells containing *PPP2R2D*-3'UTR+15GG genotype were much more significant than those in cells containing *PPP2R2D*-3'UTR+15CC genotype ($P<0.01$).

Conclusions: PP2A-B55 δ might be a potential target for increasing the sensitivity of HCC to chemotherapy. miR-133b participates in cell cycle regulation by targeting *PPP2R2D*. The polymorphism of *PPP2R2D*-3'UTR+15G>C is associated with different sensitivity of HCC chemotherapy. Our study provides experimental evidence for the chemoprevention and targeted intervention of HCC.

Keywords: protein phosphatase 2A-B55 δ subunit; hepatocellular carcinoma; chemotherapy sensitivity; miR-133b; single nucleotide polymorphisms.

英文缩略语词汇表

Abbreviations and Acronyms

英文缩写	英文全称	中文名称
133in	miR-133b inhibitor	miR-133b 抑制物
133mi	miR-133b mimic	miR-133b 模拟物
2R2Dc	PPP2R2D coding sequence	PPP2R2D 编码序列
3'UTR	3'-untranslated region	3'-非翻译区
B55δ	B55δ subunit	B55δ 亚基
Bax	Bcl-2-associated X protein	Bcl-2 相关 X 蛋白
Bcl-2	B-cell lymphoma 2-related protein	B 细胞淋巴瘤 2 相关蛋白
BDP	carboplatin	卡铂
cDDP	cisplatin	顺铂
CDK1	cyclin-dependent kinase 1	细胞周期依赖性激酶 1
DAPI	4, 6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
GEO	Gene Expression Omnibus	基因表达数据库
HCC	hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
IC ₅₀	half-inhibition concentration	半数抑制浓度
IHC	immunohistochemistry	免疫组化
inNC	miRNA inhibitor negative control	miRNA 抑制物阴性对照
L-OHP	oxaliplatin	奥沙利铂
mfe	minimum free energy	最小自由能
miNC	miRNA mimic negative control	miRNA 模拟物阴性对照
miRNAs	microRNAs	微小 RNA
miR-133b	microRNA-133b	微小 RNA-133b

英文缩略语词汇表

英文缩写	英文全称	中文名称
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide	噻唑蓝
oncomiR	oncogenic miRNAs	致癌 miRNAs
OD	optical density	光密度
pBabe	plasmid pBabe-puro	抗嘌呤霉素 pBabe 质粒
p-CDK1	phosphorylated cyclin dependent kinase 1	磷酸化 CDK1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	增殖细胞核抗原
pGL3c	pGL3-control luciferase reporter vector	pGL3-对照荧光素酶报告基因载体
PI	propidium iodide	碘化丙啶
<i>PPP2R2D</i>	gene encoding PP2A-B55δ	PP2A-B55δ编码基因
PP2A	protein phosphatase 2A	蛋白磷酸酶 2A
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链反应
shGFP	shRNA targeting green fluorescent protein	靶向绿色荧光蛋白 shRNA
shRNA	short hairpin RNA	短发夹 RNA
sh2R2D	shRNA targeting <i>PPP2R2D</i> mRNA sequence	靶向 <i>PPP2R2D</i> 的 shRNA
SNPs	single nucleotide polymorphisms	单核苷酸多态性
WB	western blotting	免疫印迹

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
英文缩略语词汇表	V
第一章 前 言	1
1.1 肝细胞癌	1
1.2 铂类化疗药物	1
1.3 蛋白磷酸酶 2A	2
1.4 微小 RNA	3
1.5 基因多态性	4
1.6 研究目的和意义	5
第二章 材料与方 法	7
2.1 研究材料	7
2.2 检测指标和方法	13
2.3 统计学方法	37
第三章 结 果	38
3.1 HCC 肿瘤组织和 HCC 细胞株中 <i>PPP2R2D</i> 表达呈低水平	38
3.2 cDDP 诱导 HepG2 细胞抗肿瘤敏感性与细胞周期改变	40
3.3 cDDP 诱导 HepG2 细胞中 PP2A-B55δ 表达增高	47
3.4 <i>PPP2R2D</i> 表达调控影响 cDDP 诱导 HepG2 细胞周期/化疗敏感性改变	49
3.5 miR-133b 调控 <i>PPP2R2D</i> 参与 cDDP 诱导 HepG2 细胞周期变化	69
3.6 <i>PPP2R2D</i> -3'UTR+15G>C 多态性影响 cDDP 诱导细胞化疗敏感性改变	77
第四章 讨 论	87
4.1 PP2A-B55δ 是增强 HCC 化疗敏感性的潜在分子靶点	87
4.2 PP2A-B55δ 通过细胞周期动态平衡影响 HCC 化疗敏感性	88

目 录

4.3 miR-133b 靶向 <i>PPP2R2D</i> 参与细胞周期调控影响 HCC 化疗敏感性	93
4.4 <i>PPP2R2D</i> -3'UTR+15G>C 多态性与 HCC 化疗敏感性有关.....	96
第五章 总结与展望.....	98
5.1 结论.....	98
5.2 展望.....	99
参考文献.....	101
综 述.....	112
附 录.....	116
致 谢.....	118

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Abbreviations and Acronyms	V
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Hepatocellular carcinoma	1
1.2 Platinum-based chemotherapeutic drugs.....	1
1.3 Protein phosphatase 2A	2
1.4 microRNA	3
1.5 Gene polymorphism	4
1.6 Purpose and significance.....	5
Chapter 2 Materials and methods	7
2.1 Materials.....	7
2.2 Indicators and methods for detection	13
2.3 Statistics.....	37
Chapter 3 Results.....	38
3.1 <i>PPP2R2D</i> expression is down-regulated in HCC tumors and HCC cell lines	38
3.2 cDDP induces anti-cancer susceptibility and cell cycle alteration in HepG2 cells	40
3.3 The expression of B55 δ in HepG2 cells is increased by cDDP	47
3.4 <i>PPP2R2D</i> expression influences cell cycle/chemosensitivity alteration induced by cDDP in HepG2 cells.....	49
3.5 miR-133b regulates <i>PPP2R2D</i> and participates in cell cycle alteration induced by cDDP in HepG2 cells.....	69
3.6 The polymorphism of <i>PPP2R2D</i> -3'UTR+15G>C influences chemosensi-	

tivity alteration induced by cDDP.....	77
Chapter 4 Discussion.....	87
4.1 PP2A-B55 δ is a potential target for increasing the sensitivity of HCC to chemotherapy.....	87
4.2 PP2A-B55 δ influences chemotherapy sensitivity of HCC by regulating dynamic transitions in cell cycle.....	88
4.3 miR-133b participates in cell cycle regulation and influences chemotherapy sensitivity by targeting <i>PPP2R2D</i>	93
4.4 The polymorphism of <i>PPP2R2D</i> -3'UTR+15G>C is associated with chemotherapy sensitivity of HCC	96
Chapter 5 Conclusion and prospect.....	98
5.1 Conclusion.....	98
5.2 Prospect	99
Reference.....	101
Review	112
Appendix	116
Acknowledgement.....	118

第一章 前言

1.1 肝细胞癌

原发性肝癌是人类常见的消化系统恶性肿瘤。国际癌症研究机构(IARC) 2012 年发布的全球肿瘤流行病学统计数据^[1]显示, 全球新发肿瘤病例排位中, 肝癌在女性中列第九位、在男性中列第五位^[2]。肝癌是高致死性肿瘤, 居全球肿瘤死因第二位^[2]; 在男性癌症死因排位中, 肝癌在发达国家中列第六位、在较不发达国家中列第二位^[3]。2012 年, 全球新发肝癌病例为 782,500 例, 死亡病例达 745,500 例, 其中一半的病例发生在中国^[3]。

原发性肝癌主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝血管肉瘤、肝内胆管癌和肝母细胞瘤, 其中, 70%~90%的原发性肝癌为 HCC。HCC 的发生受多种危险因素影响, 包括肝炎病毒感染、黄曲霉毒素 B1 暴露、酗酒、非酒精性脂肪肝、胆汁性肝硬化以及基因缺陷等^[4, 5]。其中, 肝炎病毒感染是全球 HCC 的主要危险因素^[6]。在丙型肝炎病毒(HCV)感染长期流行的国家中, 例如日本、埃及, HCV 感染是 HCC 的主要危险因素; 而在亚洲东部地区和撒哈拉以南非洲地区, HCC 患者具有较高慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染率^[7, 8]。在全球, 有超过一半的 HCC 病例由 HBV 感染引起^[9]。我国约有 9300 万人感染 HBV, 是 HCC 的高发地区之一^[10, 11]。由于 HCC 发病隐匿, 早期诊断困难, 大部分患者确诊时已经进入晚期阶段, 病死率极高^[12]。HCC 发病率高、致死率高, 严重威胁我国人民的健康和生命, 给全社会带来了沉重的疾病负担和巨大的经济损失。因此, 如何有效预防控制人群中 HCC 的发生发展是我国公共卫生关注的热点问题之一。

1.2 铂类化疗药物

金属铂类配合物是临床上适用于多种癌症治疗的抗肿瘤药^[13], 其主要作用机制是进入细胞核与 DNA 分子形成铂-DNA 化合物, 导致 DNA 结构改变, 阻碍 DNA 复制转录, 引起细胞周期阻滞并导致细胞凋亡^[14]。顺铂(cisplatin, cDDP)、卡铂(carboplatin, BDP)、奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)分别是第一、二、三代铂

类化疗药物^[15]。cDDP 是临床常用的抗肿瘤药，有较强的广谱抗癌作用，广泛应用于呼吸、消化、泌尿生殖系统癌症的标准化治疗，是实体肿瘤的有效化疗药^[14]，也是晚期 HCC 患者治疗的关键药物^[16]。cDDP 进入肿瘤细胞后，首先水解为双羟双氨铂，并与 DNA 发生交联，从而抑制 DNA 复制。BDP 的抗癌谱与 cDDP 相近，但毒性较小^[17]；L-OHP 对多种肿瘤细胞均有抑制作用，在 cDDP 耐药的卵巢癌治疗中，具有较好的疗效^[18]。

在肿瘤化疗过程中，铂类化疗药物通常会激活细胞内一些信号通路，引起细胞耐药，使药物化疗敏感性降低。肿瘤耐药的机制较为复杂，目前研究发现铂类药物的耐药机制主要有诱导谷胱甘肽(GSH)及 γ -谷氨酰转移酶(GGT)升高、多药耐药蛋白表达增高、金属硫蛋白表达增高以及相关信号通路的改变等^[19-25]。研究表明，GSH 能与铂类药物结合，促进其降解，减少其积蓄，将过氧化物和自由基等细胞毒性代谢产物转变成毒性较低的醇类等物质；GSH 能阻止铂类与 DNA 形成具有毒性的复合物，加强修复损伤的 DNA，降低药物抗肿瘤毒性效应的发挥，从而调控肿瘤耐药^[20]。GGT 可增加细胞内 GSH 水平，降低药物毒性，在肿瘤细胞耐药中发挥显著作用^[26]。铂类药物还可以诱导耐药相关蛋白升高，细胞质中药物因此无法由核孔进入核内，由运输囊泡胞吐到胞外^[27]。此外，如诱导金属硫蛋白升高引起的解毒作用^[28]、激活 JNK/p38 MAPK 信号通路、Akt 信号通路而抑制细胞凋亡等，也是铂类药物耐药的分子机制^[29, 30]。铂类药物的耐药限制了其临床应用，造成肿瘤患者的药物治疗敏感性降低，因此，提高并维持化疗敏感性将有助于减少耐药、提高疗效，探求化疗敏感性相关分子机制将为铂类药物临床应用提供理论基础。

化学治疗是临床上晚期 HCC 治疗的主要手段之一。然而，不同患者的化疗敏感性差异较大。化疗敏感性贯穿肿瘤治疗的全过程，加强关于 HCC 化疗敏感性相关分子机制研究，对于寻找 HCC 诊断治疗的有效靶点、促进和提高 HCC 患者的早期诊断和疗效具有重要意义，同时，也能为肝癌的个体化医疗提供理论依据。

1.3 蛋白磷酸酶 2A

蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatase 2A, PP2A)是真核细胞内广泛表达的丝

氨酸/苏氨酸磷酸酶家族成员，通过对细胞内不同信号转导途径关键调控蛋白的可逆性去磷酸化，参与包括细胞代谢、细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡及致癌转化等许多生物进程的调控^[31]。研究表明，PP2A 能够调控 c-Myc、Rb、p53、MDM2 等蛋白或酶活性，通过去磷酸化信号通路中的底物分子，改变细胞周期中特异的磷酸化事件，从而参与细胞增殖和转归，发挥抗肿瘤作用^[32-35]。研究发现在胚胎或成人细胞中，包括祖细胞/干细胞，后期促进复合物/细胞周期体的辅因子 Cdc20 是有丝分裂后期启动所必需的。Cdc20 缺失细胞可以通过 CDK1 和长城激酶(Gwl)的失活退出有丝分裂，而有丝分裂的退出依赖于 PP2A^[36]。因而，PP2A 作为细胞有丝分裂的调控因子，被认为是靶向有丝分裂的抗肿瘤敏感性靶点。

PP2A 是由不同亚基组成的结构复合体，其中，二聚体形式被认为是核心酶，包括催化 C 亚基(PP2A-C)和支架 A 亚基(PP2A-A)；三聚体形式是活跃的全酶复合物，由 C、A 亚基和不同的调节 B 亚基(PP2A-Bs)组成^[37]。其中，PP2A-Bs 亚基是 PP2A 的主要调控因子，它控制 PP2A 的活性和与底物结合的特异性，并将全酶靶向到特异的细胞区室内，决定了 PP2A 在空间和时间上的功能发挥^[38]。PP2A-Bs 亚基有 B、B'、B''、B''' 四个亚家族，分别由不同的基因编码各亚家族中的不同异构体。B(B55/PR55)家族有 α 、 β 、 γ 、 δ 四种异构体，其中 B55 δ 由 *PPP2R2D* 基因编码，与细胞有丝分裂周期进入和退出的调控有关^[39]。Mochida 等将非洲爪蟾卵提取物的 B55 δ 耗竭，促进进入有丝分裂并抵抗其退出；相反地，外源加入纯化的 B55 δ 复合物，通过 Wee1 依赖的细胞周期因子依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1)磷酸化，可延缓和阻断 CDK1 活化，剂量依赖性地减慢有丝分裂的进入^[40]。研究表明，PP2A-B55 δ 通过与 CDK1 相互作用，调控细胞周期的进程^[41]。肿瘤细胞存在异常细胞周期调控，PP2A-B55 δ 与 CDK1 之间的相互作用对细胞周期动态平衡的影响是否参与铂类化疗药物诱导细胞周期阻滞及其抗肿瘤敏感性仍有待明确，对 *PPP2R2D* 的基因调控是否能够增加 HCC 化疗敏感性尚需探究。

1.4 微小 RNA

微小 RNA(microRNAs, miRNAs)是由 19-25nt 构成的小分子非编码 RNA，

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.