

学校编码: 10384

分类号____密级____

学 号: 21620121152346

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

c-Src 通过激活 HK2 促进肿瘤细胞的增殖

c-Src promotes tumor cell proliferation by activating HK2

王随利

指导教师姓名: 李勤喜 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 04 月

论文答辩时间: 2015 年 05 月

学位授予日期: 2015 年 06 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 06

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

摘要

大多数肿瘤细胞即使在氧气充足的情况下依然主要靠糖酵解方式提供能量，这就是著名的 Warburg 效应，它是肿瘤代谢的一个重要特征。己糖激酶（hexokinase, HK）是糖酵解过程中的第一个限速酶。在哺乳动物体内，HK 主要有四种亚型，即 HK1、HK2、HK3 和 HK4，其中 HK2 与肿瘤的关系最为密切。目前研究表明 Warburg 效应的发生与原癌基因（如 *Ras*, *c-Myc*, *HIF-1 α* ）的过度激活和抑癌基因(如 *p53*)的失活密切相关。*c-Src* 是哺乳动物中最早发现的原癌基因，其蛋白是一种非受体酪氨酸蛋白激酶，*c-Src* 蛋白通过多种信号通路调节细胞的粘着与运动、增殖与存活、血管生成及胞内运输等生理过程，其高表达或过度激活与多种恶性肿瘤的发生密切相关。然而 *c-Src* 是否与 Warburg 效应的产生有关？带着这个疑问我们开展了一系列实验。

首先我们克隆了一批与糖代谢有关的关键酶，通过免疫共沉淀筛选了这些酶与 *c-Src* 的相互作用，结果发现 HK2 和 *c-Src* 有很强的相互作用；体外的 GST-pulldown 实验证明两者能够直接相互作用。进一步研究发现 *c-Src* 可以磷酸化 HK2 的 Tyr686 位点，并且该位点被磷酸化后能显著激活 HK2 的酶活，并增强了肿瘤细胞摄入葡萄糖的能力。最后我们还发现 *c-Src* 通过激活 HK2 增强了 Warburg 效应，进而促进肿瘤细胞增殖及裸鼠移植瘤的生长。由于 HK2 在肿瘤细胞中高表达，因此抑制其酶活可能通过影响 Warburg 效应从而减缓肿瘤细胞的增殖。我们的研究结果提示通过抑制 HK2 的上游激酶 *c-Src* 的活性或二者的相互作用可以削弱肿瘤的糖代谢，同时也为基于 *c-Src* 的小分子抑制剂的研究提供了理论依据。

关键字：HK2；*c-Src*；糖酵解； Warburg effect

Abstract

Most types of tumor cells mainly depend on glycolysis for energy production even in the case of sufficient oxygen, a phenomenon known as Warburg effect which has been considered as one of hallmarks of tumor metabolism. Hexokinase (HK), the first rate-limiting enzyme in glycolysis, consists of four isoforms HK1, HK2, HK3 and HK4 in mammals. It has been shown that overexpression of HK2 is closely correlated with tumorigenesis. Recently, increasing evidences suggest that excessive activation of oncogenes (such as *Ras*, *c-myc* and *HIF-1 α*) and/or inactivation of tumor suppressor genes (such as *p53*) give rise to Warburg effect. *c-Src* is the firstly identified oncogene in mamalian cell. c-Src protein which functions as a non-receptor tyrosine kinase participates in the regulation of a variety of signaling transduction pathways involved in cell adhesion and movement, proliferation and survival, angiogenesis and intracellular transportation. It has been also considered that overexpression or constitutively activation of c-Src shows strong correlation with the incidence of various cancers. However, whether c-Src is involved in the promotion of Warburg effect is still unknown.

To address this question, we firstly created a series of plasmids that express enzymes involved in glucose metabolism. We then examined the interaction of these enzymes with c-Src by performing co-immunoprecipitation assays and found that HK2 could strongly interact with c-Src. This interaction was also confirmed by *in vitro* GST-pulldown assays. Further more, we found that c-Src could phosphorylate HK2 at tyrosine 686 and consequently stimulate its enzyme activity, which in turn enhanced the ability of tumor cell for glucose uptake and eventually promoted the proliferation of cancer cell and the growth of xenograft tumors. Our results suggest that it may be a choice for tumor therapy to attenuate Warburg effect by inhibiting kinase activity of c-Src toward HK2 or interfere its interaction with HK2.

Key words: HK2; c-Src; glycolysis; Warburg effect

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
目录.....	III
Table of contents.....	VI
第一章 前言.....	1
1.1 HK2 的研究进展.....	1
1.1.1 己糖激酶概况.....	1
1.1.2 HK2 和肿瘤.....	2
1.1.3 HK2 表达及活性调控机制.....	4
1.1.4 HK2 和细胞凋亡.....	5
1.2 c-Src.....	8
1.2.1 c-Src 和 v-Src.....	8
1.2.2 c-Src 蛋白结构及激活机制.....	10
1.2.3 c-Src 参与的信号通路.....	11
1.2.4 c-Src 与肿瘤.....	14
1.2.5 c-Src 与代谢的关系.....	15
1.3 立题背景.....	16
第二章 材料与方法.....	17
2.1 实验材料和仪器.....	17
2.2 DNA 相关实验方法.....	17
2.2.1 质粒载体.....	17
2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	21
2.2.3 DNA 转化.....	22
2.2.4 质粒 DNA 的提取.....	22
2.2.5 克隆方法及策略.....	25

2.2.6 质粒的定点突变.....	27
2.2.7 RNA 干扰质粒的构建.....	28
2.3 细胞培养及转染.....	28
2.3.1 细胞培养.....	28
2.3.2 瞬时转染.....	29
2.3.3 慢病毒包装与感染.....	29
2.4 蛋白质相关实验.....	30
2.4.1 免疫共沉淀.....	30
2.4.2 SDS-PAGE 电泳及 western blotting 分析.....	31
2.4.3 融合蛋白的表达与纯化.....	32
2.4.3 GST-pulldown 实验.....	32
2.4.4 体外激酶实验.....	33
2.5 Glucose uptake 实验.....	33
2.6 细胞计数.....	34
2.7 HK2 酶活的测定.....	34
2.8 异体移植瘤实验.....	35
第三章 结果与讨论.....	36
3.1 结果.....	36
3.1.1 HK2 和 c-Src 有直接的相互作用.....	36
3.1.2 HK2 和 c-Src 相互作用区域的鉴定.....	38
3.1.3 c-Src 活性影响其与 HK2 的相互作用.....	40
3.1.4 c-Src 直接磷酸化 HK2 且磷酸化强度受其活性影响.....	41
3.1.5 c-Src 磷酸化 HK2 的 Tyr686 位点.....	43
3.1.6 SFK 的其他成员也可以磷酸化 HK2.....	43
3.1.7 Tyr686 位点的磷酸化是维持 HK2 酶活所必需的.....	44
3.1.8 HK2 Tyr686 位点磷酸化促进了葡萄糖的摄入.....	48
3.1.9 HK2 Tyr686 位点的磷酸化促进了肿瘤的增殖.....	50
3.2 讨论.....	52
参考文献.....	55

致谢.....60

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract(in Chinese)	I
Abstract(in English)	II
Table of contents(in chinese)	III
Table of contents(in English)	VI
Chapter1 Introduction	1
1.1 The research progress of HK2	1
1.1.1 Overview of hexokinase	1
1.1.2 HK2 and cancer.....	2
1.1.3 Regulation mechanism of HK2 expression and activity.....	4
1.1.4 HK2 and apoptosis.....	5
1.2 c-Src	8
1.2.1 c-Src and v-Src.....	8
1.2.2 The structure and activation mechnism of c-Src.....	10
1.2.3 c-Src signal transduction pathway	11
1.2.4 c-Src and cancer.....	14
1.2.5 c-Src and metabolism.....	15
1.3 Bckground	16
Chapter2 Materials and methods	17
2.1 Experimental materials and equipments	17
2.2 DNA related protocols	17
2.2.1 Plasmid vector.....	17
2.2.2 Preparation of E.coli competent cells	21
2.2.3 DNA transformation.....	22
2.2.4 The extraction of plasmid DNA.....	22
2.2.5 Cloning methods and strategies	25
2.2.6 Point mutation plasmids.....	27

2.2.7 Construction of plasmids for RNA interference	28
2.3 Cell culture and transfection.....	28
2.3.1 Cell culture.....	28
2.3.2 Transient transfection.....	29
2.3.3 Lentivirus packaging and infection.....	29
2.4 Protein related protocols	30
2.4.1 Co-immunoprecipitation	30
2.4.2 SDS-PAGE electrophoresis and western blot	31
2.4.3 Expression and purification of fusion protein.....	32
2.4.3 GST-pulldown assay	32
2.4.4 Kianse assay <i>in vitro</i>	33
2.5 Glucose uptake assay	33
2.6 Cell counting.....	34
2.7 HK2 enzyme activity assay.....	34
2.8 Tumor xenograft assay	35
Chapter3 Results and discussion	36
3.1 Results	36
3.1.1 The interaction between HK2 and c-Src	36
3.1.2 Identification interaction area of c-Src and HK2.....	38
3.1.3 c-Src activity affects its interaction with HK2.....	40
3.1.4 c-Src activity affects the phosphorylation of HK2	41
3.1.5 HK2 is phosphorylated by c-Src at Tyrosine 686	43
3.1.6 The other members of SFKs also phosphorylate HK2	43
3.1.7 c-Src mediated Tyr686 phosphorylation is required for HK2 enzyme activity.....	44
3.1.8 The phosphorylation of Tyr686 promotes glucose uptake.....	48
3.1.9 c-Src mediates Tyr686 phosphorylation promotes tumor proliferation	50
3.2 Discussion	52
References	55

Acknowledgement.....60

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 HK2 的研究进展

1.1.1 己糖激酶概况

肿瘤细胞的能量代谢不同于正常组织,无论在常氧或者缺氧条件下,主要依靠糖酵解获得能量,这就是 Warburg 效应。Warburg 效应可能与线粒体的功能障碍、肿瘤基因信号以及肿瘤细胞酶谱发生变化,尤其是糖酵解关键酶活性增加和同工酶谱的改变有关。HK 是糖酵解途径中的第一个限速酶,它催化的反应是使葡萄糖磷酸化生成六磷酸葡萄糖 (Glucose 6-phosphate, G6P), G6P 不能透出细胞膜回到血液中,这对细胞利用葡萄糖是非常关键的。因此, HK 是细胞控制葡萄糖代谢速率的第一个关键酶。

在哺乳类动物体内,一共有四种亚型的己糖激酶(HK1-4),它们各自有一定的组织特异性。HK1 主要存在于脑组织中^[1]; HK2 是胰岛素敏感型的,主要存在于脂肪和肌肉组织中^[2]; HK3 在肝, 肾和肠组织中有微量的表达^[3]; HK4, 与前三者差异较大, 又称为葡萄糖激酶, 仅在肝脏和胰腺中存在^[4]。前三种异构体与葡萄糖具有很高的亲和力且可以被其底物 G6P 反馈抑制。HK1, HK2 统称为“低 K_m (约 0.02 mmol/L)”同工酶, 与葡萄糖结合的 K_m 比 HK4 (5 mmol/L) 低约 250 倍, 即对葡萄糖亲和力要远高于葡萄糖激酶(如图 1.1)。HK1, HK2, HK3 的相对分子质量相似, 约为 100 KD, 而 HK4 约为 50 KD。根据基因序列分析^[5], 前三者被认为是由 HK4 通过基因复制,融合等转变过来的。

	HKI	HKII	HKIII	HKIV (GK)
Human gene locus	10q22	2p13	5q35.2	7p15.1-3
MW (kDa)	~100	~100	~100	~50
K_m for Glc (mM)	0.030	0.300	0.003a	6
K_m for ATP (mM)	0.5	0.7	1.0	0.6
Glc-6-P inhibition (K_i - mM)	+(0.02)	+(0.02)	+(0.10)	-
P_i Attenuation of Glc-6-P inhibition	↓	↑	↑	-
Insulin regulation	-	+	?	+
Mitochondrial binding	+	+	-	-
Major tissue expression	Brain, kidney	Muscle, adipose	Lung, spleen	Liver, pancreas

图 1.1 哺乳动物己糖激酶异构体 (引自文献[6])

Fig.1.1 Mammalian hexokinase isoforms^[6]

目前研究比较多的是 HK1 和 HK2, 就结构来说, 两者都大致分为 N 端和 C 端, 且 N 端和 C 端序列有广泛的相似性。HK1 两端都可与 G6P 结合但其调节位点在 N 端^[7], 其 C 端有激酶活性即包含葡萄糖的结合位点(催化位点)而 N 端没有^[8, 9]。HK2 的 N 端和 C 端都具有催化活性且都可被 G6P 所抑制^[10, 11], 但是 N 端比 C 端的酶活性高且对 G6P 的 K_i 值比 C 端低将近 20-30 倍^[12, 13]。另外, 与其他两种异构体不同的是 HK1 和 HK2 又被称为线粒体结合型己糖激酶, 其 N 端 15 个氨基酸是与线粒体电压依赖性阴离子通道 (Voltage-dependent anion channel, VDAC) 相结合所必需的^[14]。

1.1.2 HK2 和肿瘤

高水平糖酵解是多数肿瘤细胞的一个重要特征。正常组织 90% ATP 的获取是通过线粒体氧化磷酸化过程实现的, 而在肿瘤组织中, 约 50% 的 ATP 却源自糖酵解途径, 使得肿瘤组织即使在缺氧情况下, 仍能保证足够的能源^[15]。肿瘤之所以选择糖酵解途径, 一方面糖酵解的许多中间产物可以被肿瘤细胞所利用, 用来合成蛋白质、核酸及脂类等, 从而为肿瘤细胞本身的生长和增殖提供必需的物质基础; 另一方面, 肿瘤细胞糖酵解产生的大量乳酸会造成胞外 pH 降低, 这种酸化的细胞外液对细胞基质有分解破坏作用, 有利于肿瘤细胞向周围组织扩散和侵袭; 其次肿瘤细胞的快速增殖会造成内部组织缺氧, 这种特殊的微环境有利于肿瘤的血管形成, 并促使肿瘤对化疗和放疗产生抗性。

作为催化糖酵解反应的第一个限速酶, HK1 和 HK2 在许多肿瘤组织中表达水平及活性都有增加, 但以 HK2 与肿瘤的相关性最大。Amparo Wolf 等发现与正常组织相比人神经胶质瘤中 HK2 是高表达的, HK1 基本不变, 且其表达量与病人存活时间呈负相关^[16]; Tohma 等在检测的 72 例食管癌标本中发现有 71 例 HK2 蛋白表达呈阳性^[17]; Rho 等发现 16.7%(43/257)胃癌标本中 HK2 呈强阳性表达, 并且与预后差和高浸润相关^[18]; 通过报告基因表达实验发现, 与对照组相比人正常支气管上皮细胞(NHBECs)HK2 转录活性只有 0.9%, 而非小细胞肺癌 NCI-H661 和 NCI-H460 细胞中 HK2 转录活性分别为 61%和 40%, 并且在肺癌细胞中 HK2 启动子活性不受胰高血糖素的抑制^[19]; 在 Kras 和 ErBb 诱导的小鼠模型中, HK2 也是维持肿瘤生长所必需的^[20]。

正常组织中，游离型 HK2 是占绝对优势的，但在恶性肿瘤细胞中 HK2 除了显著表达外，与线粒体结合比例也大大增高，线粒体结合型 HK2 的量及活性所占比例随着细胞恶性程度而增高^[21]。

肿瘤细胞之所以选择 HK2 作为糖酵解的第一个关键酶，一方面它有两个催化活性位点，可以加快酵解速率，促进肿瘤的增殖；另一方面，肿瘤细胞中 HK2 主要以线粒体结合的形式存在，可以优先利用线粒体产生的 ATP^[22]。在该过程中，HK2 作用的发挥离不开相关蛋白的协助^[23]，具体如图 1.2 所示，位于细胞质膜的葡萄糖转运子（Glucose transporter, GLUT）将葡萄糖转运到肿瘤细胞中，迅速被线粒体结合型的 HK2 磷酸化而固定；线粒体内膜 ATP 合酶（ATP synthase）产生的 ATP 通过腺嘌呤核苷酸转运体（Adenine nucleotide translocator, ANT）将其转运到 HK2-VDAC 复合体上，使 HK2 以近水楼台的方式优先利用 ATP。这些辅助蛋白通力合作加快了 G6P 的产生速率，随后 G6P 被分配到不同的代谢通路，一部分直接进入磷酸戊糖途径，为核酸的生物合成提供前体分子；另一部分沿着酵解途径生成丙酮酸。之后，部分丙酮酸直接生成乳酸并通过乳酸转运子（lactate transporter）运送到胞外，导致胞外基质酸化，不利于正常细胞的生长；另一部分通过丙酮酸转运子（pyruvate transporter）进入三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle, TCA）作为底物并且该过程中产生的柠檬酸可以通过柠檬酸转运子（citrate transporter）运出线粒体，用于合成膜成分磷脂和固醇等，从而满足快速增殖的肿瘤细胞对能量和物质的大量需求。

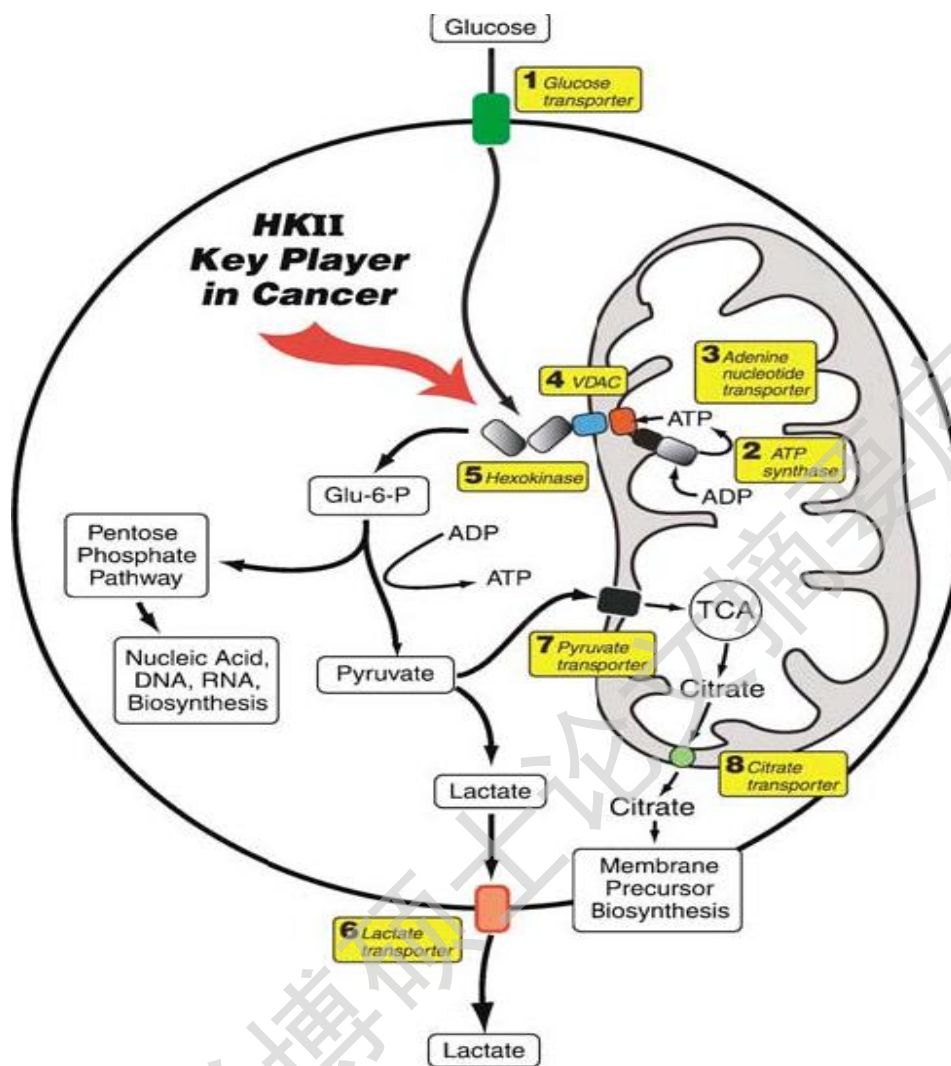


图 1.2 HK2 是肿瘤中的关键调节蛋白(引自文献[23])

Fig.1.2 HK2 as a key player in cancer^[23]

1.1.3 HK2 表达及活性调控机制

肿瘤细胞中 HK2 表达及活性增加的机制是多方面的,包括 HK2 基因拷贝数、表观遗传学修饰、癌基因的激活以及 HK2 蛋白磷酸化修饰和蛋白相互作用改变等。

HK2 表达的增多,就基因水平而言,首先是基因复制的增多。有文献报道在高糖酵解的鼠肝癌细胞系 AS-30D 中 HK2 基因的拷贝数比正常的鼠肝细胞增加 5~10 倍^[24]。限制片断长度多态性分析表明 HK2 基因并没有重排,说明了基因数量的

增多在一定程度上依赖于原基因的稳定扩增。

HK2 基因甲基化和去甲基化程度也影响其表达。Goel A 等人通过比较正常肝细胞与 AS-30D 肝癌细胞发现, *HK2* 基因的甲基化程度不同。正常肝细胞存在 18 个甲基化 CpG 位点, 而肝癌细胞则没有; DNA 甲基转移酶抑制剂处理可使正常肝细胞 *HK2* mRNA 和蛋白质表达增高; 用 DNA 去甲基化酶感染正常肝细胞也发现 *HK2* mRNA 水平和蛋白质水平增高, 说明甲基化程度越高越不利于 *HK2* 的表达^[25]。

许多肿瘤的发生涉及到原癌基因激活 (*Ras*、*c-Myc*、*HIF-1 α* 等) 和抑癌基因 (*p53*、*AKT* 等) 的失活。有文献证实在缺氧条件下缺氧诱导因子 *HIF-1 α* 可激活 *HK2*^[26], *HIF-1 α* 和功能失调的 *c-Myc* 协同作用也可促进 *HK2* 表达上调^[27]。也有研究发现, *HK2* 基因启动子中存在两个功能性 *p53* 反应元件, 在 AS-30D 肝癌细胞中共同表达 *HK2* 和突变的 *p53*, 发现过表达的 *p53* 可激活 *HK2* 的启动子^[28]。

HK2 活性的增强与 *HK2* 和线粒体的结合水平有关。如前所述, 肿瘤中大多数的 *HK2* 是与线粒体外膜 VDAC 相结合的, Akt 可促进其结合^[29, 30], 已有文献报道, Akt 可以直接磷酸化 *HK2* 的苏氨酸 473 位点, 磷酸化的 *HK2* 与线粒体的结合增强, 保护细胞免受活性氧的伤害, 促进细胞的存活^[31]。而抑癌基因 *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) 失活会导致 PI3K/Akt 信号通路激活, 进而促进 *HK2* 与线粒体的结合。除此之外, *HK2* 与线粒体的结合还受生长因子的调控^[32], Amparo Wolf 等人在神经胶质瘤细胞系 U343 中发现, EGF (Epidermal growth factor) 刺激下 *HK2* 和线粒体的共定位增强, 而这一过程可被 Akt 抑制剂所阻止, 线粒体分离实验也证实了此现象^[16]。

1.1.4 *HK2* 和细胞凋亡

细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象, 在多细胞生物去除不需要的或异常的细胞中起着重要的作用。与细胞坏死不同, 细胞凋亡不是一个被动的过程, 而是主动过程, 它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用, 它并不是病理条件下自体损伤的一种现象, 而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。在哺乳动物细胞中, 依赖于天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶 (caspases)

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.