

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620110153962

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

类固醇激素受体辅激活因子 1 通过增强  
Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进肝癌发展

Steroid Receptor Coactivator 1 Promotes Human  
Hepatocellular Carcinoma Progression by Enhancing  
Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling

童章炜

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: 2016 年 04 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 05

## 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.....	2
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma) .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 肝细胞癌的流行病学特征.....	3
1.1.1.1 肝细胞癌发生的地区分布.....	3
1.1.1.2 肝细胞癌发生的性别差异.....	3
1.1.1.3 肝细胞癌发生的人种差异.....	4
1.1.2 肝细胞癌发生的相关分子机制.....	5
1.1.2.1 原癌基因的激活.....	5
1.1.2.2 抑癌基因的抑制.....	5
1.1.2.3 肝癌与细胞因子.....	6
1.1.3 影响肝癌发生的因素.....	7
1.1.3.1 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染.....	7
1.1.3.2 丙型肝炎病毒 (HCV) 感染.....	8
1.1.3.3 黄曲霉素.....	8
1.1.3.4 其他因素.....	9
<b>1.2 SRC 家族 .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 SRC 家族的发现及分类.....	10
1.2.2 SRC 基因结构.....	10
1.2.3 SRC 家族的功能机制.....	12
1.2.4 SRC-1 基因的表达及其生理功能.....	13
1.2.4.1 SRC-1 在生殖和子宫中的作用.....	14
1.2.4.2 SRC-1 在前列腺和睾丸中的作用.....	14
1.2.4.3 SRC-1 在乳腺中的作用.....	14
1.2.4.4 SRC-1 在其他器官中的作用.....	14
1.2.5 SRC-1 在代谢中的作用.....	15
1.2.6 SRC-1 在癌症中的作用.....	16
1.2.6.1 SRC-1 在乳腺癌中的作用.....	17
1.2.6.2 SRC-1 在前列腺癌中的作用.....	18
1.2.6.3 SRC-1 在其他癌症中的作用.....	19
<b>1.3 Wnt 信号通路.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Wnt 信号通路的发现.....	20
1.3.2 Wnt 信号通路的组成.....	20
1.3.3 经典 Wnt 信号通路途径.....	21
1.3.4 非经典 Wnt 信号通路.....	22
1.3.5 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在正常肝脏生长和肝再生中的作用.....	23
1.3.6 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在肝癌发生发展中的作用.....	24
<b>1.4 c-Myc 概述.....</b>	<b>25</b>

1.4.1 c-Myc 蛋白结构 .....	25
1.4.2 c-Myc 的调控 .....	26
1.4.3 c-Myc 的生物学功能 .....	27
1.4.3.1 c-Myc 在细胞周期中的调控作用 .....	27
1.4.3.2 c-Myc 在细胞增殖中的作用 .....	28
1.4.3.3 c-Myc 在细胞凋亡中的作用 .....	28
1.4.3.4 c-Myc 在代谢中的作用 .....	29
1.4.3.5 c-Myc 与肿瘤和其他疾病 .....	29
1.5 立题背景、内容和意义 .....	30
<b>第二章 材料与方</b> .....	<b>32</b>
<b>1 材料</b> .....	<b>32</b>
1.1 细胞株 .....	32
1.2 质粒载体及菌株 .....	32
1.3 siRNA .....	32
1.4 实验小鼠 .....	33
1.5 主要试剂 .....	33
1.6 主要仪器 .....	35
<b>2 实验方法</b> .....	<b>36</b>
2.1 分子克隆 .....	36
2.1.1 大肠杆菌感受态制备（以 DH5 $\alpha$ 为例） .....	36
2.1.2 质粒转化感受态细胞 .....	37
2.1.3 质粒的构建 .....	38
2.1.3.1 引物设计 .....	38
2.1.3.2 PCR 过程 .....	38
2.1.3.3 双酶切 .....	39
2.1.3.4 DNA 胶回收 .....	39
2.1.3.5 载体与克隆片段的连接 .....	40
2.1.3.6 小量提取质粒 DNA .....	40
2.1.3.7 中量提取质粒 DNA .....	41
2.2 RNA 相关实验及方法 .....	42
2.2.1 RNA 的提取 .....	42
2.2.2 反转录合成 cDNA .....	42
2.2.3 实时荧光定量 PCR .....	43
2.3 蛋白质相关实验与方法 .....	43
2.3.1 蛋白样品的制备 .....	43
2.3.2 蛋白浓度测定 .....	44
2.3.3 SDS-PAGE 电泳以及 Western Blot 分析 .....	44
2.3.4 GST 融合蛋白的诱导 .....	45
2.3.5 GST 沉淀实验（GST-pulldown assay） .....	46
2.3.6 免疫共沉淀实验（Co-IP） .....	47
2.4 细胞相关实验及方法 .....	48

2.4.1 细胞培养及传代.....	48
2.4.2 肝癌细胞瞬时转染及稳定转染.....	48
2.4.3 细胞 siRNA 转染.....	49
2.3.4 CaCl <sub>2</sub> 转染 HEK293T 细胞.....	50
2.3.5 细胞荧光素酶活性检测.....	51
2.4.6 MTT 测细胞生长.....	52
2.4.7 EdU 染色检测增殖细胞.....	52
2.4.8 克隆形成实验.....	53
2.4.9 利用流式细胞仪检测细胞周期.....	53
2.4.10 利用流式细胞仪检测细胞存活率.....	53
<b>2.5 小鼠相关实验及方法.....</b>	<b>54</b>
2.5.1 小鼠尾部基因组的提取.....	54
2.5.2 SRC-1 基因敲除小鼠的鉴定.....	54
2.5.3 裸鼠移植瘤实验.....	55
2.5.4 DEN/CCL <sub>4</sub> 诱导小鼠原发性肝癌模型.....	56
2.5.5 LiCl 激活小鼠正常肝细胞的模型.....	56
2.5.6 H&E 染色.....	57
2.5.7 Ki-67 组化染色.....	57
<b>第三章 结果与分析.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 SRC-1 在人肝癌样品中广泛过表达并与 PCNA 呈正相关.....</b>	<b>59</b>
3.1.1 SRC-1 在肝癌组织中广泛过表达.....	59
3.1.2 SRC-1 阴性的肝癌组织样品中 PCNA 的表达量显著降低.....	61
3.1.3 SRC-1 的表达量与 PCNA 呈显著正相关关系.....	62
<b>3.2 下调 SRC-1 显著抑制肝癌细胞的增殖.....</b>	<b>63</b>
3.2.1 SRC-1 在肝癌细胞系中过表达.....	63
3.2.2 siRNA 敲低 SRC-1 在肝癌细胞系中表达.....	63
3.2.3 瞬时敲低 SRC-1 显著抑制肝癌细胞系的增殖.....	64
3.2.4 稳定敲低 SRC-1 显著抑制 HepG2 细胞的增殖.....	65
3.2.5 稳定敲低 SRC-1 显著抑制 HepG2 细胞的克隆形成.....	67
<b>3.3 下调 SRC-1 显著抑制 c-Myc 的表达.....</b>	<b>68</b>
3.3.1 稳定敲低 SRC-1 阻抑细胞周期进程.....	68
3.3.2 稳定敲低 SRC-1 抑制增殖细胞的数量.....	68
3.3.3 SRC-1 正向调节 c-Myc 的表达.....	69
3.3.4 瞬时敲低 c-Myc 显著抑制 HepG2 细胞的增殖.....	70
3.3.5 瞬时敲低 c-Myc 抑制增殖细胞的数目.....	71
3.3.6 在 SRC-1 敲低的细胞株中回补 c-Myc 能恢复肝癌细胞增殖.....	72
3.3.7 SRC-1 阳性肝癌样本中 c-Myc 的 mRNA 水平显著升高.....	72
<b>3.4 SRC-1 协同 <math>\beta</math>-catenin 促进 c-Myc 的表达.....</b>	<b>73</b>
3.4.1 SRC-1 协同 $\beta$ -catenin 增强 c-Myc 启动子活性.....	73
3.4.2 SRC-1 增强 $\beta$ -catenin 的转录活性.....	74
3.4.3 下调 SRC-1 抑制 $\beta$ -catenin 诱导的 c-Myc 的表达.....	75
3.4.4 SRC-1 <sup>-/-</sup> 小鼠中 LiCl 激活的 c-Myc 表达量显著降低.....	76
3.4.5 SRC-1 与 $\beta$ -catenin 相互结合.....	76

3.4.6 SRC-1 与 $\beta$ -catenin 直接结合 .....	78
3.4.7 SRC-1 与 $\beta$ -catenin 的 Arm3-10 区域结合 .....	78
3.4.8 SRC-1 的 bHLH-S/T 和 HAT 片段与 $\beta$ -catenin 结合 .....	79
<b>3.5 下调 SRC-1 抑制肝癌细胞移植瘤的维持 .....</b>	<b>80</b>
3.5.1 下调 SRC-1 抑制肝癌细胞移植瘤的生长 .....	80
3.5.2 下调 SRC-1 抑制肝癌细胞移植瘤的大小 .....	80
3.5.3 SRC-1 敲低的肿瘤中增殖细胞数量显著低于对照组肿瘤 .....	81
3.5.4 SRC-1 敲低肿瘤中 PARP 和 PCNA 的表达消失 .....	82
3.5.5 下调 SRC-1 显著促进肝癌细胞的死亡 .....	83
<b>3.6 SRC-1 基因敲除抑制 DEN/CCl<sub>4</sub> 诱导的原发性肝癌 .....</b>	<b>84</b>
3.6.1 SRC-1 基因敲除抑制 DEN/CCl <sub>4</sub> 诱导的原发性肝癌 .....	84
3.6.2 SRC-1 基因敲除显著抑制 DEN/CCl <sub>4</sub> 诱导的原发性肝癌的数目和大 小 .....	85
3.6.3 SRC-1 基因敲除显著抑制 DEN/CCl <sub>4</sub> 诱导的原发性肝癌中的 c-Myc 和 PCNA 的表达 .....	86
3.6.4 SRC-1 基因敲除显著抑制 DEN/CCl <sub>4</sub> 诱导的原发性肝癌的增殖细胞 数量 .....	88
<b>3.7 SRC-1 协同 SRC-3 共同促进肝癌细胞增殖 .....</b>	<b>88</b>
3.7.1 肝癌组织样本中 PCNA 的表达量与 SRC-1 和 SRC-3 相关 .....	88
3.7.2 siRNA 敲低 SRC-1 和 SRC-3 在 HepG2 细胞中的表达 .....	90
3.7.3 共同敲低 SRC-1 和 SRC-3 能进一步抑制 HepG2 细胞增殖 .....	90
3.7.4 蟾蜍灵处理显著抑制 c-Myc 的表达 .....	91
3.7.5 蟾蜍灵处理显著抑制 HepG2 细胞增殖 .....	92
<b>3.8 GEO 数据库中 SRC-1 的表达量与 c-Myc 和 PCNA 的表达量呈正相关 .....</b>	<b>92</b>
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>94</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>96</b>
<b>图表索引 .....</b>	<b>109</b>
<b>缩略语及英文对照 .....</b>	<b>111</b>
<b>在学期间发表论文 .....</b>	<b>114</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>115</b>

**TABLE OF CONTENT**

**Abstract(Chinese) .....1**

**Abstract(English).....2**

**CHAPTER 1 Introduction .....3**

**1.1 Hepatocellular carcinoma .....3**

1.1.1 Epidemiology of HCC ..... 3

1.1.1.1 Region distribution in HCC incident ..... 3

1.1.1.2 Sex distribution in HCC incident..... 3

1.1.1.3 Race distribution in HCC incident..... 4

1.1.2 Molecular mechanism of hepatocarcinogenesis ..... 5

1.1.2.1 Activation of oncogene ..... 5

1.1.2.2 Inactivation of tumor suppressors ..... 5

1.1.2.3 Cytokines and HCC ..... 6

1.1.3 The main causative factors of HCC ..... 7

1.1.3.1 HBV infection ..... 7

1.1.3.2 HCV infection ..... 8

1.1.3.3 Aflatoxins ..... 8

1.1.3.4 other factors ..... 9

**1.2 SRC family.....10**

1.2.1 Discover and component of SRC family ..... 10

1.2.2 Structure of SRC family..... 10

1.2.3 Molecular mechanism of SRC family..... 12

1.2.4 SRC-1 expression and biological functions..... 13

1.2.4.1 Role of SRC-1 in reproductive organs..... 14

1.2.4.2 Role of SRC-1 in prostate and testis..... 14

1.2.4.3 Role of SRC-1 in mammary gland..... 14

1.2.4.4 Role of SRC-1 in other organs..... 14

1.2.5 Role of SRC-1 in metabolism ..... 15

1.2.6 Role of SRC-1 in cancer ..... 16

1.2.6.1 Role of SRC-1 in breast cancer..... 17

1.2.6.2 SRC-1 Role of SRC-1 in prostate cancer..... 18

1.2.6.3 Role of SRC-1 in other cancers ..... 19

**1.3 Wnt signalling pathway .....20**

1.3.1 Discover of Wnt signalling pathway..... 20

1.3.2 Component of Wnt signalling pathway ..... 20

1.3.3 Canonical Wnt signaling pathway ..... 21

1.3.4 Noncanonical Wnt signaling pathway ..... 22

1.3.5 Role of Wnt signalling in normal liver growth and liver regeneration. 23

1.3.6 Role of Wnt signalling pathway in HCC progression ..... 24

**1.4 Review of c-Myc .....25**



1.4.1 Protein structure of c-Myc .....	25
1.4.2 Regulation of c-Myc .....	26
1.4.3 Biological functions of c-Myc .....	27
1.4.3.1 Role of c-Myc in cell cycle .....	27
1.4.3.2 Role of c-Myc in cell proliferation .....	28
1.4.3.3 Role of c-Myc in cell apoptosis .....	28
1.4.3.4 Role of c-Myc in metabolism .....	29
1.4.3.5 Role of c-Myc in cancers and diseases .....	29
<b>1.5 Background, content and significance of this project.....</b>	<b>30</b>
<b>CHAPTER 2 Materials and methods .....</b>	<b>32</b>
<b>1 Materials .....</b>	<b>32</b>
<b>1.1 Cell lines .....</b>	<b>32</b>
<b>1.2 Plasmid and bacterial strain .....</b>	<b>32</b>
<b>1.3 siRNA .....</b>	<b>32</b>
<b>1.4 Mice .....</b>	<b>32</b>
<b>1.5 Chemicals and reagents .....</b>	<b>33</b>
<b>1.6 Instruments.....</b>	<b>35</b>
<b>2 Methods.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Molecular cloning.....</b>	<b>36</b>
2.1.1 Competent cells.....	36
2.1.2 Plasmid transformation .....	37
2.1.3 Construction of plasmid.....	38
2.1.3.1 Primer designing.....	38
2.1.3.2 PCR .....	38
2.1.3.3 Double enzyme digestion .....	38
2.1.3.4 Gel extraction .....	39
2.1.3.5 Ligation .....	40
2.1.3.6 Plasmid mini-extraction .....	40
2.1.3.7 Plasmic mid-extraction.....	41
<b>2.2 RNA experiments .....</b>	<b>42</b>
2.2.1 RNA extraction .....	42
2.2.2 Reverse transcription of RNA.....	42
2.2.3 Real-time PCR .....	43
<b>2.3 Protein experiment.....</b>	<b>43</b>
2.3.1 Preparation of protein sample .....	43
2.3.2 Quantitation of protein.....	44
2.3.3 SDS-PAGE and Western Blot .....	44
2.3.4 Expression and purification of GST-fusion protein .....	45
2.3.5 GST-pulldown assay .....	46
2.3.6 Co-IP .....	47
<b>2.4 Cell experiments.....</b>	<b>48</b>

2.4.1 Cell culture.....	48
2.4.2 cell transfection.....	48
2.4.3 siRNA transfection.....	49
2.3.4 CaCl <sub>2</sub> transfection .....	50
2.3.5 Luciferase assay .....	51
2.4.6 MTT assay .....	52
2.4.7 EdU staining.....	52
2.4.8 Colony formation assay .....	53
2.4.9 Cell cycle analysis.....	53
2.4.10 Cell death analysis with FCM.....	53
<b>2.5 Mice experiments .....</b>	<b>54</b>
2.5.1 Extraction of mice genomic DNA .....	54
2.5.2 Genotyping.....	54
2.5.3 Xenograft .....	55
2.5.4 DEN/CCl <sub>4</sub> induced liver cancer .....	56
2.5.5 LiCl activates Wnt in normal liver cell.....	56
2.5.6 H&E staining .....	57
2.5.7 Ki-67 staining.....	57
<b>CHAPTER 3 Results and analysis .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 SRC-1 is overexpressed in HCC and correlated with PCNA expression..59</b>	
3.1.1 SRC-1 is overexpressed in HCC specimens .....	61
3.1.2 Expression of PCNA is lower in SRC-1 negative HCC specimens.....	61
3.1.3 Expression of SRC-1 positively correlates with PCNA expression.....	62
<b>3.2 Downregulaion of SRC-1 inhibits HCC cell proliferation .....</b>	<b>63</b>
3.2.1 SRC-1 is overexpressed in HCC cell lines .....	63
3.2.2 Downregulaion of SRC-1 in HCC cell lines with siRNA.....	63
3.2.3 SRC-1 transient knockdwon inhibits HCC proliferation .....	64
3.2.4 SRC-1 stable knockdown inhibits HepG2 cell proliferation .....	65
3.2.5 SRC-1 stable knockdown inhibits HepG2 colony formation .....	67
<b>3.3 Downregulaion of SRC-1 decreases the expression of c-Myc .....</b>	<b>68</b>
3.3.1 Downregulation of SRC-1 results in cell cycle arrest.....	68
3.3.2 Downregulaion of SRC-1 decreases the number of proliferative cells.....	68
3.3.3 SRC-1 positively regulates the expression of c-Myc.....	69
3.3.4 Downregulation of c-Myc inhibits HepG2 cell proliferation .....	70
3.3.5 Downregulation of c-Myc inhibits the number of proliferative cells ...	71
3.3.6 Transfection of c-Myc into SRC-1 knockdown cells restores cell proliferation.....	72
3.3.7 The mRNA level of c-Myc is elevated in SRC-1 positive HCC specimens.....	72
<b>3.4 SRC-1 cooperates with <math>\beta</math>-catenin to enhance the expression of c-Myc....</b>	<b>73</b>
3.4.1 SRC-1 cooperates with $\beta$ -catenin to enhance the promoter activity of c-Myc .....	73
3.4.2 SRC-1 enhances the transcriptional activity of $\beta$ -catenin.....	74

3.4.3 Downregulation of SRC-1 decreases the expression of c-Myc induced by $\beta$ -catenin transfection.....	75
3.4.4 LiCl-induced c-Myc expression is lower in SRC-1 <sup>-/-</sup> mice .....	76
3.4.5 Co-IP analysis of the interaction between SRC-1 and $\beta$ -catenin .....	76
3.4.6 GST-pulldown analysis of the interaction between SRC-1 and $\beta$ -catenin .....	78
3.4.7 SRC-1 interacts with the Arm3-10 domain of $\beta$ -catenin .....	78
3.4.8 $\beta$ -catenin interacts with the bHLH-S/T domain of SRC-1.....	79
<b>3.5 Downregulation of SRC-1 attenuates tumor maintenance .....</b>	<b>80</b>
3.5.1 Downregulation of SRC-1 inhibits xenograft tumor growth .....	80
3.5.2 Downregulation of SRC-1 inhibits tumor volume of xenograft .....	80
3.5.3 H&E and Ki-67 staining in xenograft.....	81
3.5.4 Expression of PARP and PCNA in xenograft .....	82
3.5.5 Downregulation of SRC-1 increases cell death .....	83
<b>3.6 Knockout of SRC-1 inhibits HCC formation in DEN/CCl<sub>4</sub> model.....</b>	<b>84</b>
3.6.1 Knockout of SRC-1 inhibits HCC formation in DEN/CCl <sub>4</sub> model .....	84
3.6.2 Knockout of SRC-1 inhibits tumor number and tumor volume .....	85
3.6.3 Knockout of SRC-1 inhibits the expression of c-Myc and PCNA .....	86
3.6.4 Knockout of SRC-1 inhibits the number of proliferative cells.....	88
<b>3.7 SRC-1 cooperates with SRC-3 to enhance HCC cell proliferation .....</b>	<b>88</b>
3.7.1 The expression of PCNA correlated with the expression of SRC-1 and SRC-3 in HCC specimens.....	88
3.7.2 Downregulation of SRC-1 and SRC-3 in HepG2 cells with siRNA.....	90
3.7.3 Simultaneous downregulation of SRC-1 and SRC-3 further inhibits HepG2 cell proliferation .....	90
3.7.4 Bufalin treatment inhibits the expression of c-Myc.....	91
3.7.5 Bufalin treatment inhibits HepG2 cell proliferation .....	92
<b>3.8 Positive correlation between SRC-1 and c-Myc, PCNA is identified in GEO database .....</b>	<b>92</b>
<b>CHAPTER 4 Discussion .....</b>	<b>94</b>
<b>References.....</b>	<b>96</b>
<b>List of figures and tables .....</b>	<b>109</b>
<b>Abbreviation.....</b>	<b>111</b>
<b>Publications .....</b>	<b>114</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>115</b>

## 摘要

SRC-1 (Steroid receptor coactivator 1) 不仅是雄激素受体 (androgen receptor, AR) 和雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 等激素受体的转录辅激活因子, 而且能辅激活许多转录因子。SRC-1 在乳腺癌和前列腺癌的发生发展进程中起着重要的作用, 但是人们对于它在肝癌发生发展进程中所起的作用仍不清楚。在本文中, 我们报道了 SRC-1 在 62.5 % (25/40) 的肝癌组织样本 (human hepatocellular carcinoma, HCC) 中过表达。敲低 SRC-1 能抑制肝癌细胞的增殖和异种移植瘤的维持。敲低 SRC-1 降低了细胞增殖标记物 PCNA 和癌基因 c-Myc 的蛋白水平。在小鼠中敲除 SRC-1 降低了 DEN/CCl<sub>4</sub> 诱导的肝癌发生, 以及小鼠肝癌组织中 c-Myc 和 PCNA 的表达。我们发现 SRC-1 通过与  $\beta$ -catenin 相互结合而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路。与这些结果相一致的是, 在人肝癌组织样品中 SRC-1 的表达水平与 PCNA 的表达水平呈正相关, SRC-1 阳性的肝癌组织样本中 c-Myc 的表达量显著高于 SRC-1 阴性肝癌组织样本。此外, SRC-1 和 SRC-3 在 47.5 % 的肝癌组织样本中共同过表达, 并协同促进肝癌细胞的增殖。同时敲低 SRC-1 和 SRC-3 能显著抑制 HCC 细胞的增殖。我们的结果证明了 SRC-1 通过增强 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路而促进肝癌的发生发展进程, 暗示 SRC-1 是肝癌治疗的一个潜在分子靶标。

关键词: SRC-1; 肝癌; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

## Abstract

Steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) is a transcriptional coactivator not only for steroid receptors such as androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER), but also for other transcription factors. SRC-1 has been shown to play an important role in the progression of breast cancer and prostate cancer. However, its role in liver cancer progression remains unknown. In this study, we report that SRC-1 was overexpressed in 25 (62.5 %) of 40 human hepatocellular carcinoma (HCC) specimens. Downregulation of SRC-1 decreased HCC cell proliferation and impaired tumor maintenance in HCC xenografts. Knockdown of SRC-1 reduced protein levels of the proliferation marker proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the oncogene c-Myc. Knockout of SRC-1 in mice reduced DEN/CCl<sub>4</sub>-induced tumor formation in the liver and the expression of c-Myc and PCNA in liver tumors. SRC-1 promoted c-Myc expression, at least in part, by directly interacting with  $\beta$ -Catenin to enhance Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling. Consistent with these results, the expression of SRC-1 was positively correlated with PCNA expression in human HCC specimens, and the expression levels of c-Myc in SRC-1-positive HCC specimens were higher than in SRC-1-negative HCC specimens. In addition, SRC-1 and SRC-3 were co-overexpressed in 47.5 % of HCC specimens, and they cooperated to promote HCC cell proliferation. Simultaneous downregulation of SRC-1 and SRC-3 dramatically inhibited HCC cell proliferation. Our results demonstrate that SRC-1 promotes HCC progression by enhancing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and suggest that SRC-1 is a potential therapeutic molecular target for HCC.

**Keywords:** Steroid receptor coactivator 1 (SRC-1); hepatocellular carcinoma (HCC); Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling

## 第一章 前言

### 1.1 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)

原发性肝癌可以分为肝细胞型肝癌 (HCC)、胆管细胞型肝癌(CC)以及混合型肝癌,其中以 HCC 最为常见<sup>[1]</sup>,约占总数的 85 %~90 %。原发性肝癌,特别是肝细胞癌,在全球范围内的癌症发病率中排在第 5 位<sup>[2, 3]</sup>,在男性癌症死亡率中排在第 2 位,仅次于肺癌<sup>[3]</sup>。

尽管近年来肝癌的基础和临床研究不断取得新的进展<sup>[4, 5]</sup>,但统计数据表明其发病率和死亡率均未下降,仍呈逐渐升高的趋势<sup>[1]</sup>。2015 年的统计数据指出,2012 年全球新发肝癌患者 78.25 万,死亡患者 74.55 万,其中我国肝癌新发和死亡患者均占全球总数的 50 %以上<sup>[3]</sup>。我国历年调查统计结果亦表明,肝癌死亡率居于恶性肿瘤的第二位,其发病率和死亡率均呈现男性大于女性,农村高于城市,随年龄增长而上升的趋势<sup>[6, 7]</sup>。我国的肝癌研究虽然取得极大进展,但仍面临着严峻的挑战。

#### 1.1.1 肝细胞癌的流行病学特征

##### 1.1.1.1 肝细胞癌发生的地区分布

世界范围内肝癌的发病率和死亡率均存在明显的地理差异。如图 1.1 所示,东亚、东南亚及北非为高发区,而中南亚地区,欧洲北部,中部及东部,是发病率较低的地区。我国肝癌的地理分布特点为:东南地区高于其他地区,沿海高于内陆。发病率较高的地方有江苏启东市、福建同安区、广东扶绥县等。这些地区大多温暖、潮湿、多雨,全年平均气温高,相对湿度大。

##### 1.1.1.2 肝细胞癌发生的性别差异

全球各地调查表明男性肝癌发病率明显高于女性。如图 1.1 所示,大多数地区的肝癌发病率男女比例大于 2:1。一般认为造成肝癌在男性中高发生率的原因可能是男性更容易暴露在肝癌的危险因子之中,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；更多的吸烟等。也有一些研究表明<sup>[8-11]</sup>，雄激素能促进肝细胞癌的发生。

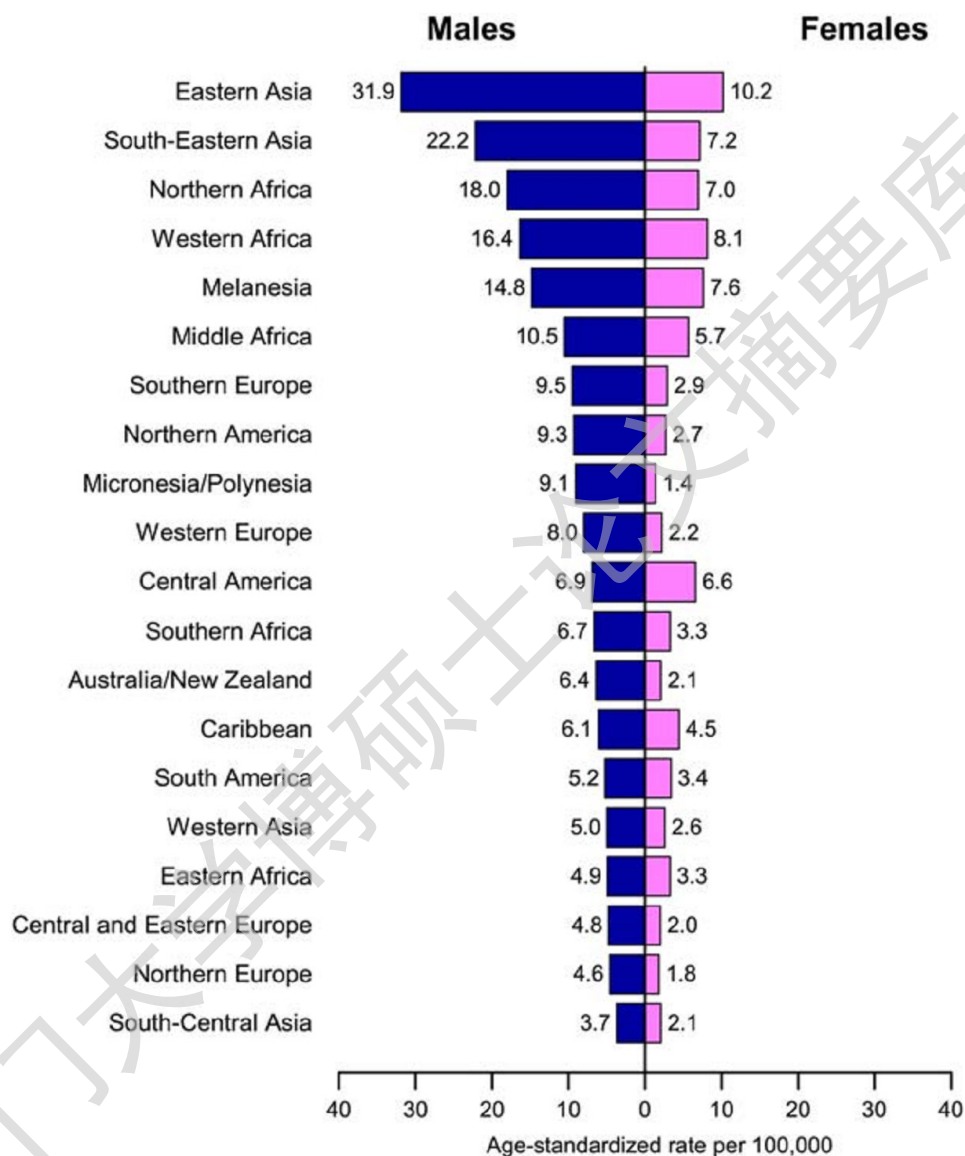


图 1.1 肝癌发生的地区及性别差异。引自 Torre L A et al.2015[3]

Figure 1.1 Liver cancer incidence rates by sex and world area

### 1.1.1.3 肝细胞癌发生的人种差异

肝细胞癌在同一地区不同人种中发病率也不一样。Hashem 等人<sup>[12]</sup>报道在 1975~2002 年这一期间内，美国国内的不同人种的肝癌发病率为：亚种人的发病

率是白人的 2 倍,而白人的发病率又是黑人的 2 倍。如在 2000~2002 年这 3 年中,亚种人种发病率为 8/10 万,白人发病率为 5/10 万,黑人发病率为 2.5/10 万。

## 1.1.2 肝细胞癌发生的相关分子机制

### 1.1.2.1 原癌基因的激活

原癌基因几乎存在于每一种正常细胞中,对于维持正常细胞的生长、分化起着调控作用。它能够促进细胞进入增殖周期,抑制细胞分化和凋亡,在正常细胞中一般只低表达或者不表达,而在癌细胞中一般存在高表达。当细胞受到化学、物理或者其他因素的影响时,原癌基因会发生 DNA 重排、插入、扩增或者调控序列改变等,原癌基因随即被激活,导致细胞恶性转化。

Ras 家族与人类肿瘤相关的蛋白有 3 种,它们分别是 H-ras、K-ras 和 N-ras。其中 N-ras 是首先被证实的人肝癌转化基因之一,它的主要突变位点是第 12、13 和第 61 位密码子,在肝细胞癌中,N-ras 的第 12 和第 13 位密码子的基因突变率甚至达到了 79.31%<sup>[13]</sup>。Manam 等人采用动物实验证明,化学致癌剂可以导致鼠肝癌中 N-ras 第 12 位和第 13 位密码子的 G-T 突变,证明 N-ras 在小鼠肝癌发生中的重要作用<sup>[14]</sup>。Challen 等人对 19 例原发性肝癌 N-Ras 基因第 61 位密码子进行检测时发现 3 例突变:突变均发生于伴有肝硬变的肝癌患者中<sup>[15]</sup>。N-ras 通过 G 蛋白信号转导通路发挥效应,正常情况下 N-Ras 编码的蛋白将生长信号传递至靶细胞的效应分子之后就会自动失活,但是突变的 N-ras 蛋白会保持激活状态,持续刺激细胞增殖,进而引发癌变。

c-Myc 是一种恶性的癌基因,当生长因子和激素信号经 N-ras 基因产物从细胞膜向细胞内传递之后,c-Myc 基因的表达随之上调。1982 年 Collins 和 Fravera 报道在白血病细胞中发现 c-Myc 癌基因的扩增,之后人们在许多肿瘤及细胞系中均发现 c-Myc 癌基因的扩增<sup>[16,17]</sup>。因此,c-Myc 基因的过表达可能是肿瘤细胞恶性增殖的原因之一。免疫组化数据也显示 c-Myc 蛋白在肝癌组织中过表达<sup>[18]</sup>。

### 1.1.2.2 抑癌基因的抑制

抑癌基因是存在于正常细胞的,与原癌基因共同调控细胞生长和分化的一类



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.