

学校编码: 10384

分类号_密级_

学号: 32320131153411

UDC_

廈門大學

硕士学位论文

以 TEAD4 为肝癌和结肠癌潜在治疗靶点
的研究

TEAD4 as a Potential Therapeutic Target for Hepatic
Carcinoma and Colon Cancer

王晓楠

指导教师姓名: 洪万进教授

李良成副教授

专业名称: 药剂学

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: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2016 年 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(药学院洪万进/李良成)课题(组)的研究成果,获得(药学院洪万进/李良成)课题(组)经费或实验室的资助,在(药学院洪万进/李良成)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）：

目录

中文摘要	7
Abstract.....	8
中英文名称术语及缩写对照	9
第一章 绪论	11
1.1 结肠癌	11
1.2.肝癌.....	11
1.3.Hippo 通路	11
1.3.1 Hippo 通路关键的调控蛋白	11
1.4. TEADs 家族.....	16
1.4.1 TEAD1.....	20
1.4.2 TEAD2.....	20
1.4.3 TEAD3.....	20
1.4.4 TEAD4.....	20
1.5 Hippo 通路的主要功能与肿瘤发生的关系	21
1.5.1 Hippo 通路器官大小控制	21
1.5.2 Hippo 通路肿瘤发生	23
1.6 本论文的基本假设及拟开展的工作.....	24
第二章 TEAD4 在结肠癌和肝癌病例样品及细胞系中的表达.....	25

2.1 实验材料.....	25
2.1.1 病例样品	25
2.1.2 细胞系	25
2.1.3 主要试剂和材料	25
2.2 实验方法.....	26
2.2.1 组织蛋白样品制备	26
2.2.2 组织蛋白样品浓度测定	26
2.2.3 组织蛋白表达水平的 WB 分析	26
2.3 实验结果与讨论.....	27
2.3.1 人结肠癌样品中 TEAD4 的表达广泛上调.....	27
2.3.2 TEAD4 在结肠癌细胞系中的表达水平检测.....	28
2.3.3 人肝癌样品中 TEAD4 的表达广泛上调.....	29
2.3.4 TEAD4 在肝癌细胞系中的表达水平检测.....	30
2.4 本章小结.....	31
第三章 下调 TEAD4 的表达对结肠癌和肝癌细胞系增殖以及侵袭转移能力的影响	33
3.1 实验材料.....	33
3.1.1 细胞系、菌种和质粒	33
3.1.2 实验主要试剂盒以及试剂	34
3.2 实验方法.....	38

3.2.1 分子克隆相关实验及方法	38
3.2.2 细胞培养相关实验及方法	40
3.2.3 蛋白质相关实验及方法	43
3.3 实验结果.....	45
3.3.1 质粒 pCI-neo-HA-TEAD4 在不同细胞系的过表达验证	45
3.3.2 TEAD4 siRNA 筛选.....	45
3.3.3 TEAD4 下调可抑制 HepG2 增殖	46
3.3.4 TEAD4 下调可抑制 HepG2 的侵袭转移	47
3.3.5 TEAD4 下调可抑制 HCT-116 的增殖.....	48
3.3.6 TEAD4 下调可抑制 HCT-116 的转移.....	49
3.3.7 TEAD4 下调可影响 N-cadherin 的表达	50
3.4 分析与讨论.....	51
全文总结与展望.....	52
参考文献	53
致谢.....	60

Contents

Abstract.....	7
Abstract.....	8
Terms and abbreviations in English and Chinese.....	9
Chapter I Introduction	11
1.1 Colorectal cancer.....	11
1.2 Hepatocellular carcinoma.....	11
1.3 Hippo pathway	11
1.3.1 The proteins take part in hippo pathway	11
1.4 TEADs family	16
1.4.1 TEAD1.....	20
1.4.2 TEAD2.....	20
1.4.3 TEAD3.....	20
1.4.4 TEAD4.....	20
1.5 Hippo pathway and tumor development	21
1.5.1 Hippo pathway and organ size control	21
1.5.2 Hippo pathway and tumor development.....	23
1.6 Research hypothesis and research plan	24
Chapter II The dection of TEAD4 with colon cancer samples and hepatocellular carcinoma samples and cell lines	25

2.1 Materials.....	25
2.1.1 Colon cancer samples and hepatocellular carcinoma samples	25
2.1.2 Cell lines	25
2.1.3 Reagents and material.....	25
2.2 Methods.....	26
2.2.1 Total protein extraction	26
2.2.2 Concentration assessment by BCA.....	26
2.2.3 Western blotting	26
2.3 Results	27
2.3.1 The expression of TEAD4 is upregULated in CRC.....	27
2.3.2 The dection of TEAD4 in different CRC cell lines	28
2.3.3 The expression of TEAD4 is upregULated in HCC.....	29
2.3.4 The dection of TEAD4 in different HCC cell lines.....	30
2.4 Conclusion.....	31
Chapter III The knock down of TEAD4 influences cell proliferation and cell metastasis.....	33
3.1 Materials.....	33
3.1.1 Cell lines, bacteria and plasmids	33
3.1.2 Kits and reagents	34
3.2 Methods.....	38

3.2.1 Molechlar cloning related experiments	38
3.2.2 Cell related experiments	40
3.2.3 protein related experiments	43
3.3 Results	45
3.3.1 The expression of pCI-neo-HA-TEAD4 in different cell lines	45
3.3.2 The selection of SiRNA targeted TEAD4	46
3.3.3 The knock down of TEAD4 could inhibit cell proliferation in HepG2.....	46
3.3.4 The knock down of TEAD4 could reduce cell metastasis in HepG2.....	47
3.3.5 The knock down of TEAD4 could inhibit cell proliferation in HCT-116...48	
3.3.6 The knock down of TEAD4 could reduce cell metastasis in HCT-116	49
3.3.7 The knock down of TEAD4 could influence the expression of N-cadherin	50
3.4 Discussion	51
Summary and outlook	52
References	53
Acknowledgement	60

中文摘要

肝癌和结肠癌是常见的恶性肿瘤，发现时往往已经到了晚期，因而这两种肿瘤都有较高的致死率。迫切需要为结肠癌和肝癌的早期诊断寻找标志物，并为结肠癌和肝癌的治疗提供更有效的新靶点，筛选出合适的药物进行治疗。

Hippo 通路效应蛋白---TEAD 蛋白家族成员在哺乳动物中高度保守，其家族有四个成员，包括 TEAD1，TEAD2，TEAD3 以及 TEAD4。该家族成员共有的特征是包含 TEA 结构域（DNA 结合结构域）以及能够与转录激活因子结合的转录激活结构域。TEAD 蛋白家族在辅转录激活因子的参与下能将信号向下游传导，发挥对细胞分化、增殖、抗凋亡以及干细胞的干性维持等功能。其中 TEAD4 可激活一些基因如 CTGF，AXL 和 Myc 等原癌基因的转录表达，参与到肿瘤的发生、发展的过程中。近年来的研究表明，TEAD4 在许多恶性肿瘤，如卵巢癌，乳腺癌，前列腺癌等的发展中都起着极为重要的作用。但 TEAD4 在结肠癌以及肝癌中的研究尚未见有报道。本论文的目的旨在，研究 TEAD4 在结肠癌和肝癌病例样品中的表达情况，并探讨以 TEAD4 为靶点进行结肠癌和肝癌早期诊断及治疗药物开发的可行性及方式。

我们的研究发现：（1）TEAD4 在 59%结肠癌及 68%肝癌样品中的均出现了表达上调的现象，提示 TEAD4 可能与一定比例的结肠癌与肝癌的发生、发展有关。（2）TEAD4 在 HepG2 肝癌细胞系敲除可抑制肝癌细胞的增殖以及转移。（3）TEAD4 的在 HCT-116 结肠癌细胞系的敲除可抑制结肠癌细胞的增殖以及转移。这表明 TEAD4 在结肠癌以及肝癌的发生发展中发挥了重要的作用，提示 TEAD4 有可能作为潜在的结肠癌与肝癌的早期诊断和药物治疗的靶点。

关键词：结肠癌；肝癌；TEAD4

Abstract

Colorectal cancer (CRC) and hepatocellular carcinoma (HCC) are most common causes of cancer-related death worldwide. Therefore, it is important to discover novel biomarkers for early detection, and to identify novel target for treatment of CRC and HCC patients.

The hippo pathway effectors ---TEAD family members that we have focused on are highly conserved in mammals with four family members, including TEAD1, TEAD2, TEAD3 and TEAD4. TEADs proteins contain a TEA domain and a transactivation domain for the interaction with transcription coactivators. TEADs also play an important role in tumor initiation via activating a series of progression-inducing genes, such as CTGF, AXL, and Myc. Recent studies have highlighted that TEAD4, together with their coactivators, promote or even act as the crucial parts in the development of various malignancies, such as ovarian, breast and prostate cancers. But there is no report regarding the relationship between expression of TEAD4 with colorectal cancer and hepatocellular carcinoma. Therefore, the aims of current study is to detect the expression of TEAD4 in colon cancer and hepatocellular carcinoma patient samples, and to figure out whether TEAD4 is a potential therapeutic target for CRC and HCC. Our results shown that: 1) The expression level of TEAD4 in tumor tissues are higher compared to normal tissues or para-carcinoma tissues in 59% colon cancer samples and 68% hepatocellular carcinoma samples. 2) Knockdown of TEAD4 inhibits the cell proliferation and reduce cell invasion and metastasis in HepG2. 3) Knockdown of TEAD4 also inhibits the cell proliferation and reduce cell metastasis in HCT-116. All of these indicating that TEAD4 may function as a tumor activator in colon cancer and hepatocellular carcinoma. Thus, TEAD4 may serve as a potential target of anti-cancer drugs development.

Key words: Colorectal cancer; Hepatocellular carcinoma; TEAD4.

中英文名称术语及缩写对照

英文缩写	英文全称	中文名称
CRC	colorectal cancer	结肠癌
HCC	hepatocellular carcinoma	肝癌
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
TBS	Tris-buffered saline	三羟基甲基氨基甲烷缓冲液
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
YAP	Yes-associated protein	Yes 相关蛋白
TEAD1	TEA domain family member1	SV40 转录增强因子
TEAD4	TEA domain family member 4	转录增强因子 4
TAZ	Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif	具有 PDZ 结合域的转录共刺激因子
ZEB	Zinc finger E-box binding homeobox	E 盒锌指结合蛋白
NDR	serine/threonine kinase	丝氨酸苏氨酸蛋白激酶
MST1/2	Mammalian sterile 20-like 1/2	哺乳动物不育系 20 样激酶 1/2
SAV1	Salvador homologue 1	萨尔瓦多同系物 1
LATS1/2	Large Tumor Suppressor 1	大肿瘤抑制因子 1
MOB1a/b	Maps one binder 1a and Maps one binder 1b	Maps1 结合蛋白 1a/1b
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	上皮间质转化
TB domain	TEAD binding domain	TEAD 蛋白结合结构域
CTGF	Connective tissue growth factor	结缔组织生长因子
Cyr61	Cysteine rich protein 61	富含半胱氨酸 61 蛋白
Axl	Axl receptor tyrosine kinase	受体酪氨酸激酶 Axl
SOX9	sex determining region Y-box9	Y 染色体性别决定区域 9
ITGB2	integrin, beta 2	整合素 β -2

英文缩写	英文全称	中文名称
KLF5	Kruppel-like factor 5	<i>Kruppel</i> 样因子 5
CCN1	cyclin A 2	细胞周期素蛋白 A 2
OD 值	Optical density	吸光度
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3-磷酸甘油醛脱氢酶
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
SiRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide-gel-electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
SCR-SiRNA	Control Scramble SiRNA	对照无功能 SiRNA

第一章 绪论

1.1 结肠癌

在发达国家结肠癌是第三位常见的恶性肿瘤，在过去十几年中，发展中国家结肠癌的发病率也在逐年上升^[1]。在结肠癌患者中，有 20% 的患者在诊断初期就伴有远端的转移^[2]。尽管放化疗对处于 I 期的结肠癌患者是相对有效的，但是处于 II 期与 III 期的结肠癌患者，在放化疗之后，仍然有较高的发生远端转移的风险，这也是 II 期与 III 期的结肠癌患者死亡率较高的主要原因^[2]。因此，除了更加深入的探究结肠癌发生、发展以及转移的机制以外，寻找结肠癌的早期诊断以及为结肠癌治疗提供新的靶点，开发更有效的治疗药物具有非常重要的意义。

1.2.肝癌

肝癌，尤其是肝细胞性肝癌，是指发生于肝实质的恶性肿瘤。癌症统计数据显示，世界范围内肝癌致死率在癌症相关的死亡中排名第二。每年因为肝癌死亡的人数超过 70 万^[3]。统计结果显示，在男性患者中，肝癌是第五位常见癌症，其致死率极高。在女性患者中，发病率居于第七位，致死率排名第六位^[4]。接近 80% 的肝癌致死患者出现在发展中国家，主要分布于东亚、东南亚及非洲中部和西部的国家，其中超过一半的病例发生在中国^[5]。在亚洲和非洲部分国家，肝癌的高发病率及致死率的原因主要是由于慢性乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒的流行^[4]。因此，在我国为肝癌的早期诊断找到标志物，以及为肝癌的治疗提供更有效的靶点具有十分迫切的需求。

1.3.Hippo 通路

Hippo 通路是由一系列激酶组成的级联放大系统（图 1.1），在调控器官大小与维持组织的内平衡方面起着非常重要的作用^[6]。

1.3.1 Hippo 通路关键的调控蛋白

1.3.1.1 Mammalian sterile 20-like 1/2 (MST1/2)

MST1/2 主要和细胞的应激有关，氧化应激可以激活 MST1/2^[7]，而 MST1/2 活化也可通过不同的机制调节胞内氧化剂的水平^[8]。在哺乳动物体内，MST1/2 活化的可负向调节 YAP^[8]，其对 Hippo 通路的调控如图 1.2 所示。总体来说，MST1/2 的缺失可导致细胞的过度增殖以及肿瘤的发生。

1.3.1.2 Salvador homologue 1 (SAV1)

SAV1 位于染色体 14q22.1 上，它的复制数目的减少，直接会导致 14q 上其他基因复制的减少^[9]。同时 SAV1 也是 Hippo 通路的一个关键的调控因子，它

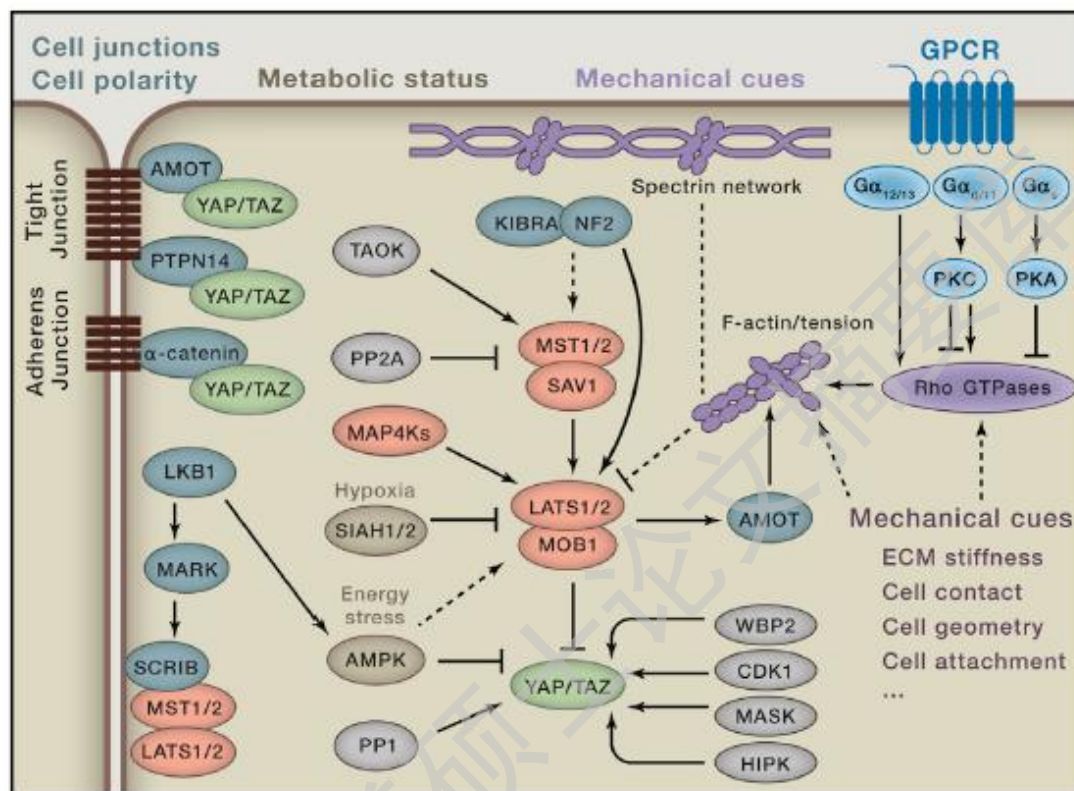


图 1.1 哺乳动物中 Hippo 通路的相关调控

Figure 1.1 Regulation of the Hippo Pathway in Mammals

图片来源: Yu FX, Cell, 2015

主要通过调控下游的基因 YAP1 起到调控器官大小和肿瘤发生^[10]。在肾上皮细胞癌细胞株中，SAV1 可以抑制细胞增殖^[11]。相反的，SAV1 的敲除则可以通过增加 YAP1 的核内定位增强 YAP 的转录活性^[11]。

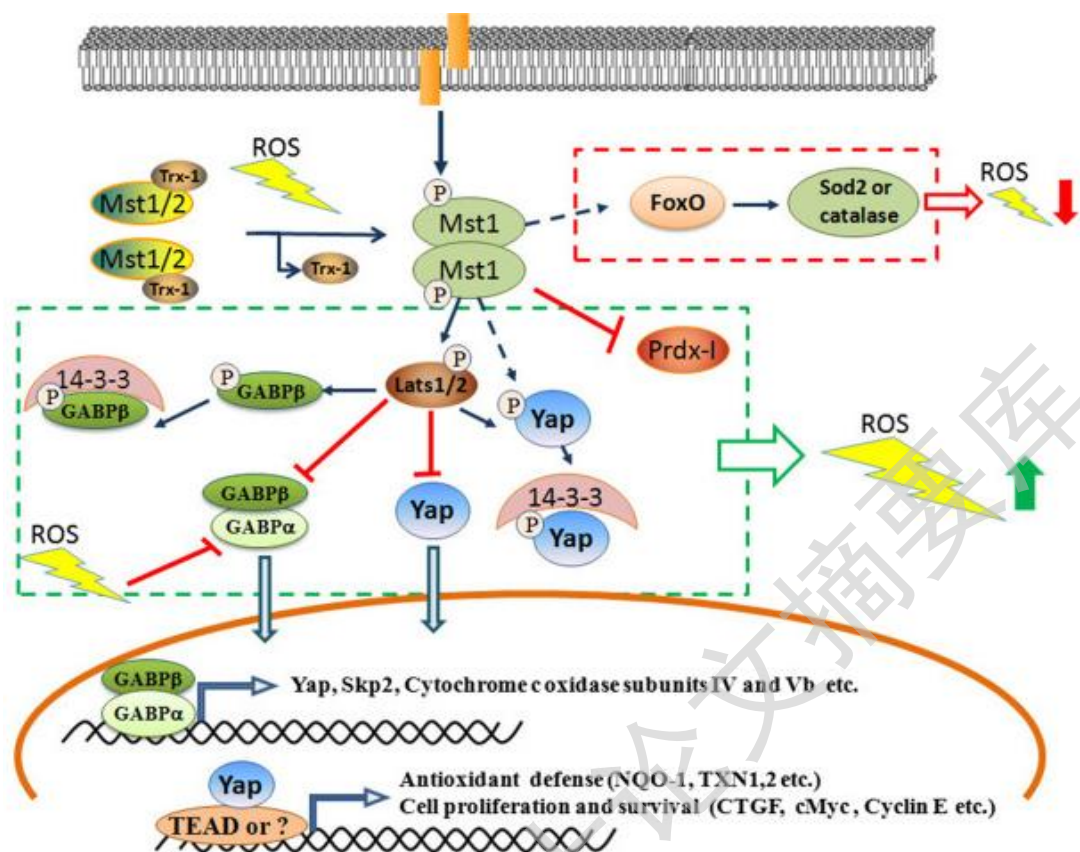


图 1.2 MST1/2 在调节细胞内氧化还原状态方面起重要作用

Figure 1.2 Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential role in the regulation of cellular redox state

图片来源: Qin F, Cell and Bioscience, 2015

1.3.1.3 Large Tumor Suppressor1 (LATS1/2)

LATS1/2 是属于丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶 AGC 亚家族 NDR 激酶家族的成员之一。该家族在物种中高度保守^[12], 主要是受磷酸化的调控。LATS1/2 可磷酸化 Hippo 通路下游的基因 YAP^[13]以及 TAZ^[14]。研究表明, LATS1/2 可以补偿 WATS 缺失导致的细胞的功能紊乱^[15], LATS1/2 是参与 Hippo 通路 WATS 下游的一个关键因子, 其对 Hippo 通路的调控如图 1.3 所示。

1.3.1.4 Maps one binder 1a and Maps one binder 1b(MOB1a/b)

MOB1a/b 是 Hippo 通路的关键调节因子, 在果蝇中 MOB1 过表达可以抑制肿瘤生长, 而 MOB1 敲除则可以促进肿瘤的发生^[16]。在人类中, MOB 有七个同源的蛋白, 尽管 MOB1a/b 没有发现有明显的结构域, 但是 MOB1a/b 却可以

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.