

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520121153122

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

肝癌细胞中 *MEN1* 对印记基因 *IGF2* 调控规律及机制研究

The epigenetic mechanism of imprinted gene *IGF2*
regulated by *MEN1* in hepatocellular carcinogenesis

丁丽红

指导教师姓名: 金光辉教授

专业名称: 免疫学

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 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2015年05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 日

摘要

原发性肝癌是肝细胞或肝内胆管上皮细胞发生的恶性肿瘤。死亡率仅次于胃癌和食道癌，其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占原发性肝癌的90%。我们实验室围绕 *menin* 复合物调控的组蛋白甲基化与疾病发生关系开展了较系统深入的研究，证明了 *menin* 在肝细胞肝癌、非小细胞型肺癌及恶性黑色素瘤等非内分泌系统肿瘤中的重要生物学功能，阐明了 *menin* 调控组蛋白甲基化修饰的规律及机制。胰岛素样生长因子 2 (insulin like growth factor 2, IGF2) 是最早发现的内源性印记基因，只在父源的染色体上表达，而在母源等位基因上沉默。某些病理情况下，处于印记状态的基因也会重新表达，引起一系列病理、生理的改变，称为印记丢失 (Loss of imprinting)。研究发现，无论是肿瘤组织还是肿瘤细胞株中均存在 IGF2 印记丢失的现象。然而印记丢失的机制并不清楚。在临床肝癌病例中已证实，在肝细胞癌中 IGF2 异常表达增高是肝细胞癌发生发展及转移的关键分子。然而，分析其遗传印记却显示肝细胞癌发生过程中重新产生遗传印记，其异常调控规律及机制尚不清楚。深入阐明肝细胞癌系统中，IGF2 的印记调控规律对揭示肝细胞癌发病机制及印记调控的组织特异性规律具有重要的理论意义。

本研究主要以肝(癌)细胞、*MEN1* 敲除动物模型以及临床肝癌手术切除病例为研究对象。在 Chip-on-Chip(Chromatin Immunoprecipitation)筛选发现，肝癌细胞基因组中 *menin* 结合在 5620 个基因的转录调控区域，其中 *menin* 与 H3K4 共定位基因有 2578 个，包括 IGF2、WT1、IGF2-AS、DLK1、PEG3、ZIM、PLAGL1 等 30 多个印记基因；表达谱芯片及 Real-time qPCR 结果显示，在 PLC/PRF5、HL-7702 及 HepG2 等细胞中 IGF2 表达不同程度受 *menin* 调控；利用 *MEN1* 敲除动物模型发现，*MEN1* 高表达与 IGF2 高表达存在显著的正相关。在不同肝癌细胞系中发现 *MEN1* 不同程度上调 IGF2 表达。通过研究不同细胞系中 IGF2-H19 差异甲基化区域 (Differentially Methylated Regions, DMR) 区域的 DNA 甲基化状态发现不同肝癌细胞系在印记调控区域 (Imprinting Control Region, ICR) DNA 甲基化状态不同。初步证明了在肝癌细胞中 *MEN1* 对 IGF2 调控依赖于 ICR 区域的甲基化水平。通过 CHIP 发现，*menin* 可以与 IGF2 的关键印记调控区域 ICR

和 Enhancer 结合，并且通过促进 H3K4 正性组蛋白甲基化修饰上调其转录。进一步研究发现，menin 过表达抑制 HepG2 细胞 IGF2 转录调控区域 P3/P4 位点的 DNA 甲基化，而在 Hep3B 细胞中无影响。

本研究证实了在肝癌细胞中，menin 对 IGF2 的调控依赖于 ICR 区域的 DNA 甲基化修饰水平，同时通过促进 H3K4 正性组蛋白甲基化修饰上调其转录。IGF2 基因是目前生物、医学领域研究的热点。过去人们更多对印记机制进行研究。近年来 IGF2 印记异常与多种疾病的关系已经引起了极大的关注。然而关于在人肝癌系统中印记状态及其调控机制并不多见。其复杂的机制同时也为研究带来了难题。我们的研究首次提出了在肝癌系统中不同细胞系，menin 在 ICR 区域不同 DNA 甲基化水平对 IGF2 的产生的调控差异，以及阐明了传统印记基因新的表观遗传学调控。随着对其研究的深入，将有助于人类控制自身的疾病，也能为临床诊断、治疗带来新思路。

关键词：印记基因 IGF2 肝细胞癌 menin 蛋白 DNA 甲基化

Abstract

The malignant tumour happens in the hepatocytes or intrahepatic biliary epithelial cells are primary hepatic carcinoma. Its mortality comes only after gastric cancer and esophageal cancer. About 90% of hepatoma is hepatocellular carcinoma (HCC). Our research aims to explore the relationship between how the menin complex regulates histone methylation and disease. We found that the biological functions of menin in HCC and malignant melanoma. And we clarified the rules and mechanisms of menin regulating histone methylation. Insulin like growth factor 2 was the earliest discovered endogenous imprinting gene, which only expressed on the paternal chromosome and silence on maternal allele. Under pathological conditions, the imprinting gene will re-express, causing a series of pathological and physiological changes, which named loss of imprinting. Research has found that this phenomenon existed in both tumor tissues and tumor cell lines. But the mechanism of the loss of imprinting is still unclear. The clinical cases of hepatoma have proved that the higher abnormal expression of IGF2 is the key issue in HCC development and transfer. However, the analysis of genetic imprint showed that in the development of HCC would produce genetic imprinting. The rules and mechanisms of abnormal control is still unknown. Further clarification about the IGF2 imprinting regulation rules of HCC is of great theoretical value.

We carried out the research mainly on liver cancer cells, *MEN1* knockout animal models and clinical resection of HCC. Through the Chip-on-chip screening, we found that menin can integrate with 5620 genes in transcription regulation regions. Both Menin and H3K4 can integrate with 2578 genes, including more than 30 imprinting genes such as IGF2, WT1, IGF2-AS, DLK1 and so on. The results of Gene expression profile microarray and Real-time PCR have showed that the expression level of IGF2 was different in different cells which were regulated by menin. On *MEN1* knockout animal model, we found that the expression of *MEN1* and IGF2 had a significant positive correlation. We also found that in different hepatocytes cell lines, *MEN1*

could increase IGF2 expression on different level. By studying IGF2-H19 DMR region of DNA methylation status in different cell lines, we discovered that the DNA methylation status in the ICR area was different in various hepatocytes cell line. It was proved that the regulation of *MEN1* to IGF2 depended on DNA methylation level of the ICR area. By Chip, we found that menin can combine with the ICR and Enhancer, and through promoting H3K4 histone methylation could increase IGF2 transcription.

Our study confirmed that in hepatocytes, the regulation of menin on IGF2 was depended on the DNA methylation level in the ICR area. Meanwhile, menin could promote H3K4 histone methylation to increase IGF2 transcription. IGF2 gene is the hot spots in biology and medicine research. In the past, most of studies were focusing on the mechanism of imprinting. In recent years, relations between IGF2 imprinting disorder and diseases have attracted much attention. But seldom research was carried out on the imprinting state in human liver system and its regulatory mechanism. The research of the complex mechanism has also encountered many problems. Our study is the first one to put forward that in different hepatocytes cell lines, the regulation of *MEN1* on IGF2 depended on DNA methylation level of the ICR area. And we clarified new epigenetic regulation of the traditional imprinted. By further research, we might help human to control disease and would bring new ideas to clinical diagnosis and treatment.

Keywords: imprinting; hepatocellular; carcinoma; menin; IGF2; DNA methylation

目录

| | |
|---|-----|
| 中文摘要..... | I |
| 英文摘要..... | III |
| 第一章前言 | 1 |
| 1 肝细胞癌 | 1 |
| 1.1 肝细胞癌的简介..... | 1 |
| 1.2 肝细胞癌的表现遗传学调控..... | 2 |
| 1.2.1 DNA 甲基化的异常改变..... | 2 |
| 1.2.2 组蛋白修饰异常..... | 4 |
| 1.2.3 非编码 RNA 的异常..... | 4 |
| 2 印记基因 IGF2 | 6 |
| 2.1 IGF2 的发现..... | 6 |
| 2.2 IGF2 的生物学功能..... | 6 |
| 2.3 IGF2 基因结构及定位..... | 6 |
| 2.4 IGF2 印记调控机制..... | 7 |
| 2.4.1 DNA 甲基化对 IGF2 印记的影响..... | 7 |
| 2.4.2 CTCF(CCCTC-binding factor) 对 IGF2 印记影响..... | 8 |
| 2.4.3 H3K27 三甲基化对印记的影响..... | 9 |
| 2.4.4 Tet1 对印记的影响..... | 10 |
| 2.5 展望..... | 11 |
| 3 MEN1 生物学功能 | 12 |
| 3.1 MEN1 基因与 menin 蛋白..... | 12 |
| 3.2 MEN1 的突变..... | 13 |
| 3.3 MEN1 与内分泌肿瘤..... | 13 |
| 3.4 MEN1 与造血系统的肿瘤..... | 14 |
| 3.5 MEN1 与肺癌..... | 14 |
| 3.6 MEN1 与肝癌..... | 14 |
| 4 立项依据 | 16 |

| | |
|---|----|
| 第二章材料与方法 | 18 |
| 1 肝细胞癌临床病例来源 | 18 |
| 2 试验动物来源 | 18 |
| 3 小鼠胚胎试验 | 18 |
| 4 细胞来源及培养 | 18 |
| 5 DNA 甲基化测序 | 19 |
| 5.1 DNA 的提取 | 19 |
| 5.2 DNA 甲基化修饰 | 20 |
| 5.3 DNA 甲基化特异性 PCR | 21 |
| 6 病毒的包装、感染 | 22 |
| 6.1 逆转录病毒包装 | 22 |
| 6.2 细胞感染 | 23 |
| 6.3 稳定细胞系的筛选 | 23 |
| 7 染色质免疫共沉淀(Chip) | 23 |
| 8 染色质免疫共沉淀芯片(Chip-on-chip) | 24 |
| 9 实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR) | 25 |
| 9.1 细胞、组织总 RNA 的提取 | 25 |
| 9.2 RNA 逆转为 cDNA | 25 |
| 9.3 Real-time PCR | 26 |
| 10 Western blot | 26 |
| 10.1 细胞总蛋白质的提取 | 26 |
| 10.2 SDS-PAGE 电泳 | 26 |
| 10.3 转膜, 抗体孵育和曝光 | 27 |
| 11 试剂信息表 | 27 |
| 12 抗体表 | 28 |
| 13 引物表 | 29 |
| 14 统计分析 | 29 |
| 第三章实验结果 | 30 |
| 1 Menin 对 IGF2 调控规律研究 | 30 |
| 1.1 组学技术筛选靶基因 | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 1.2 不同肝（癌）细胞系中， <i>MEN1</i> 对 IGF2 的调控..... | 33 |
| 1.3 胚胎发育过程中， <i>MEN1</i> 对 IGF2 的调控..... | 36 |
| 1.4 肝细胞癌临床病例样本中， <i>MEN1</i> 对 IGF2 的调控..... | 38 |
| 2 <i>MEN1</i> 对 IGF2 调控的机制研究 | 40 |
| 2.1 <i>MEN1</i> 对 IGF2 的调控不通过影响 DNA 甲基化水平 | 40 |
| 2.2 <i>MEN1</i> 对 IGF2 的调控不通过影响 CTCF 表达量也不与其结合 | 49 |
| 2.3 Menin 对 IGF2 的调控不通过 Tet 家族..... | 53 |
| 2.4 Menin 结合在 IGF2 印记调控区域进行 H3K4me3 修饰促进 IGF2 的转录表达..... | 54 |
| 2.5 Menin 过表达的 HepG2 细胞抑制 P3/P4 位点 DNA 甲基化水平 | 58 |
| 2.6 肝细胞癌病例，menin 对 IGF2 的调控机制研究 | 58 |
| 第四章讨论 | 61 |
| 1 Menin 复合物介导的 IGF2 对肝细胞癌的调控规律研究..... | 61 |
| 2 Menin 对 IGF2 的转录调控 | 62 |
| 参考文献..... | 65 |
| 致谢语..... | 76 |

第一章前言

1 肝细胞癌

1.1 肝细胞癌的简介

肝细胞癌是世界上最常见的肝脏恶性肿瘤。具有较高的致死率^[1]。它是世界上排名第六的最常见的恶性肿瘤，同时是死亡原因排名第三常见的癌症相关疾病^[2]。每年大约有 700000 人死于肝细胞癌，这也提示了它的高致死率^{[2][3]}。肝细胞癌是起源于成熟肝细胞或干细胞的上皮肿瘤^[4]。

肝癌发生的病因包括许多风险因素：1) 肝炎病毒 B 和 C 的慢性感染（这种类型的肿瘤发生率占 50% 以上）。2) 酒精的过多摄入是肝硬化的主要形成因素之一，可以明显促进肝癌的发生。^{[5][6][7][8]}。鉴于此，在大部份肝癌患者中均发现了慢性肝炎和肝硬化的病史。其他的风险因素可能包括了 3) 黄曲霉素 B1^[9]，4) 吸烟^[10]，5) 肥胖^[11]，6) 糖尿病^[12]，7) 非酒精性脂肪肝病^[13]和 8) 遗传性血色素沉着病^[14]。

世界上，肝癌的发生和流行病学的统计随着地理分布的不同有着明显的差异。在东南亚和撒哈拉以南的非洲地区，其主要导致肝癌发生的因素是乙型肝炎病毒，在欧洲这种因素导致的肝癌发生率较低。南北美洲和北欧地区这种癌症的发病率最低，主要风险因素为丙型肝炎病毒的感染^[15]。

如今，有一个非常重要的临床肝癌分期系统即巴塞罗那分期系统。这种系统的引入将有助于评估病人的患病情况，提供最准确治疗方案。肝癌的治疗方案包括：外科手术，肝脏移植，射频消融治疗术，经导管动脉化疗栓塞术，放射性栓塞，索拉非尼为基础的化疗^[1, 16]。虽然，近几年关于肝癌的治疗方法在不断发展，然而却出现了很多对常规疗法抵抗的类型^[17, 18]。尤其，在近期完成必需治疗方案的患者中，选择了一定数量的患者（其中这些病人中，进行肝脏移植或切除术占 70%，射频与局部消融的占 50%）进行相关性检测^[5, 19]。在选择的患者中，5 年生存率仍然很低^[5, 20]。因此，对现有的治疗策略的发展显得至关重要，同时发现一种新型的定向治疗方法来优化现有的治疗方案也显得势在必行。有意义的是，在部分肝癌病例的病理生理中发现表观遗传机制的参与和遗传改变^[21-26]。这

一发现有利的新的治疗策略的形成。

1.2 肝细胞癌的表现遗传学调控

表观遗传是指不通过改变 DNA 序列而使基因的表达发生改变^[27,28]。主要的方式包括以下几点：1) DNA 甲基化，2) 组蛋白修饰，3) 非编码 RNA^[29]。表观遗传学的改变常常与疾病的病理生理联系起来^[30-32]，其中包括肝细胞癌。另一方面，这种机制也是保持正常生理进程所必需的，如细胞的分化、胚胎的形成、印记的形成、染色体 X 的失活^[33,34]。

1.2.1 DNA 甲基化的异常改变

在哺乳动物当中，DNA 甲基化是研究最多的表观遗传学调控^[35-37]。它主要发生在 DNA 鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C) 的碱基上，即二核苷酸 CPG。在甲基转移酶的催化下，DNA 的 CG 两个核苷酸中胞嘧啶 (C) 被选择性的添加甲基，形成 5—甲基胞嘧啶^[34,38,39]。DNA 甲基化修饰已经被认为是 X 染色体的失活^[38,40]、基因组印记^[41-43]、重复 DNA 元件失活^[38,44,45]、基因重排的重要机制^[40,45,46]。

因为在进化过程中 CPG 区域中的胞嘧啶脱氨基后形成胸腺嘧啶^[47,48]，因此 CPG 二核苷酸并不是均匀的分布在人类的基因组中^[28,49]。在基因组的某些区段，CPG 保持或高于正常概率，这些区段被称作 CPG 岛。CPG 岛经常被发现存在于人类的基因组中，尤其是在基因的启动子区域^[28,50]。CPG 岛是一段大于 200bp 的 DNA 序列，其中 CG 的含量大于 50%，约为 60% 以上的基因的启动子含有 CPG 岛^[51-53]。原则上，正常的 CPG 岛由于被保护而处于非甲基化状态^[54]。研究证明启动子区的高甲基化导致转录抑制从而使基因失活^[39,54]。

在哺乳类动物中，DNA 甲基化常常受 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 催化而成，DNMTs 主要包括：1) 重新甲基转移酶 (DNMT3a 和 DNMT3b)：可以先使其一半甲基化，继而全甲基化^[55,56]。2) 持续性甲基转移酶 (DNMT1)：对于已经发生的一条链甲基化的 DNA 双链具有更高的催化活性^[39,57]。基因表达的调控经常通过 DNA 甲基化的修饰，改变染色体的构型招募其他的分子。招募的分子包括：1) 许多甲基结合域的蛋白 (MBDs) ^[58]，2) 组蛋白修饰酶，3) 其他可以调控基因表达，细胞功能和增殖的蛋白和酶^[59-61]。

DNA 甲基化的异常是肿瘤发生的一个普遍特点，启动子的甲基化常常导致

抑癌基因的失活，也影响血管生成、细胞周期调控、DNA 修复^[62-65]。许多研究已表明，DNA 异常的高甲基化修饰是抑癌基因失活的机制，例如乳腺癌细胞中的 P16ink4A^[66]，白血病中的 P15ink4B^[67]；也会使抑制的肿瘤基因重新转录，如：胃腺癌中的 RASSF1A^[68]、肝细胞癌的 SOCS-3^[69]、大肠癌中的 SFRPs1、2、4、5^[70]和肺癌与乳腺癌中的 APC^[71]。另外，一些转录因子也会被沉默，如结直肠癌、胃癌、肺癌中的 GATA-4 和 GATA-5^[72, 73]，食管癌、胰腺癌中的 RUNX3^[74, 75]。大量的研究已经表明特定基因的 DNA 高甲基化修饰可以促进肿瘤的发展。另一方面，基因组内的低甲基化在几乎所有癌症中均可被检测到^[76, 77]，也是第一个在恶性肿瘤中被报道的表观遗传调控异常^[78]。它反映了全基因组范围内的甲基化的胞嘧啶的下降^[79, 80]，在主要的重复序列、致癌基因、印记基因中均会发生^[77, 81-83]。虽然一些主要因子被定义为这种事件发生的决定性因素，如 SAM 的总量、基因组的完整性、DNMTs 活性的抑制剂^[84, 85]，但是潜在的机制仍然大部份未被探究^[64, 84]。一般而言，重复序列的低甲基化修饰和染色体的重排导致了基因的不稳定性。因为反转录转座子缺少甲基化会增加其它基因组区域的易位活性从而增加不稳定性^[77, 84]。在许多肿瘤中，DNA 低甲基化是一种显著的标志，如大肠癌和肝癌中的 LINE1^[86-90]、卵巢癌中的 Sat2^[91]、乳腺癌中的 SATR-1^[92]。在最近的报道中，在肝癌中检测到了一些靶基因的低甲基化从而验证了低甲基化在肝癌中的重要性，如 SNCG、TFF3、CD147 等。有趣的是，基因组的低甲基化的数量明显比高甲基化的数量少，这也许是因为可以忍受低甲基化修饰的基因比较少^[84]。不过，总体上在肝癌中基因组的低甲基化与高甲基化是可以共存的，共同影响了肝癌表观基因组的不稳定性。

研究已证明，乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒的感染对肝细胞癌的发生发展的重要性^[5]。一些研究发现，这些病毒可以招募 DNMTs，从而调控它们的致癌性。另外，有研究发现丙型肝炎病毒可以上调 DNMT1 和 DNMT3b，导致 DNA 的甲基化，使 E-cadherin、p16INK4A 等抑癌基因沉默。这也提示了丙型肝炎病毒的感染在肝细胞癌发生过程中的重要性^[93-95]。有趣的是，HBx 蛋白（乙型肝炎病毒产生的主要致癌产物）可以抑制抑癌基因 E-cadherin、p16INK4A、SFRP1，促进高甲基化修饰和 DNMT1、DNMT3A 的表达，这也提示了其在肿瘤形成过程中的重要作用^[96-98]。

1.2.2 组蛋白修饰异常

染色质是遗传信息的载体,由最基本的单位——核小体串联排列而成。核小体由核心颗粒和连接区 DNA 二部分组成。核心颗粒包括组蛋白 H2A, H2B, H3 和 H4 各两分子构成的致密八聚体。每个组蛋白都有进化上保守的 N 端拖尾伸到核小体外^[99, 100]。这些拖尾是许多信号传导通路的靶位点,从而导致转录后修饰。组蛋白的共价修饰形式包括:甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、sumo 化、ADP 核糖基化等^[101, 102]。组蛋白甲基转移酶 (HMTs) 和组蛋白乙酰转移酶分别可以引起基因组的甲基化和乙酰化,组蛋白去甲基化酶 (HDMs) 和组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 可以引起基因组去甲基化和去乙酰化^[28, 50]。组蛋白的修饰引起基因表达的激活或抑制依赖参与修饰的形式。一般来说,组蛋白乙酰化与基因转录激活有关,而组蛋白甲基化则与特定氨基酸修饰形式有关^[101, 103, 104]。H3K4、H3K79 等甲基化与促进基因转录有关,而 H3K9 和 H3K27 则与基因沉默相关。

在肝细胞癌的病理生理学方面,组蛋白修饰诱导肿瘤相关基因表达上的改变,这一改变使得大部份的细胞进程发生损伤^[24, 32]。另一方面,在肝细胞癌中,发现对组蛋白甲基转移酶 (HMTs) 和组蛋白乙酰转移酶 (HDACs) 失去调控的模式。大多数的肝细胞癌与乙型肝炎和丙型肝炎病毒的慢性感染有关,一些研究认为病毒导致肝癌的形成与组蛋白修饰酶的异常改变有关^[105, 106]。例如,HBx 蛋白 (乙型肝炎病毒产生的主要致癌蛋白),可以直接与组蛋白乙酰转移复合体 CBP/p300 直接作用,导致基因表达的异常,从而促进肿瘤的发生^[107]。

1.2.3 非编码 RNA 的异常

除 DNA 甲基化和组蛋白修饰外,现有的研究强调了第三种表观遗传学修饰对基因调控的重要性。所谓的第三种表观遗传学修饰即为小非编码 RNA (small non-coding RNA, miRNAs) ^[108, 109],这种单链的 RNA 主要的功能是翻译后修饰^[110, 111]。miRNA 通常是在核内由 RNA 聚合酶 II 转录,最初产物为前体 miRNA (pre-miRNA)。当其转录后输送到细胞质后,核酸内切酶将其剪切为成熟的 miRNA,然后转入核内,抑制目标 RNA 的表达^[112, 113]。miRNA 参与细胞生长的进程如细胞周期的调控、细胞分化、增殖和凋亡^[114, 115]。已有研究指出,单个的 miRNA 可以同时作用多个信使 RNA,单个的信使 RNA 也可以被多个 miRNA 作用^[35, 116]。另一方面,肿瘤的发生常常与它们的异常相联系,正如它们似乎扮演

双重角色，既能抑制癌症的发生又有促癌作用^[115, 117, 118]。

目前，已有较多的文献表明在肝细胞癌中，miRNA 表达的异常参与了肝癌的发展进程^[23, 119]。此外，HBV 与 HCV 促进肝癌发生的机制是因为病毒可以表达 miRNA，且自身的 miRNA 可以与宿主基因相互作用，促进病毒持续感染^[120-122]。

厦门大学博硕士论文摘要库

2 印记基因 IGF2

2.1 IGF2 的发现

早在 1913 年, Carell 等在研究组织和器官移植时发现某些组织和器官的提取物能够诱导细胞的增殖。1963 年, Froesch 在人血清中发现了不能被胰岛素抗体所中和的胰岛素样生长因子, 并将其称为非抑制性胰岛素样活性因子 (Non-suppressible insulin-like activity, NSILA)^[123]。直到 1976 年 Rind-erknecht 和 Humb 通过将 NSILA 测序, 发现了不同的生长因子, 它们在结构上与胰岛素非常相似, 功能上也有部分相同, 而且有调节细胞生长和分化的作用, 所以被正式命名为胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 1 和 2^[124]。

2.2 IGF2 的生物学功能

IGF2 是目前研究以来调控机制最复杂的生长因子之一, 作为印记基因, 只有一条等位基因有活性, 另一条等位基因呈沉默状态。两条等位基因来源于亲本同时又通过表观遗传学调控来维持这种表达, 其印记状态具有组织特异性。印记基因表达异常包括印记获得 (Gain of imprinting, GOI) 和印记丢失 (Loss of imprinting, LOI)。所谓印记获得是指原本双等位表达的基因因为某些原因出现异常沉默; 印记丢失是指失去了对一条等位基因的沉默从而出现双等位基因的表达。在大部份的组织中这种印记都存在, 某些病理情况下, 处于印记状态的基因也会重新表达, 引起一系列的病理、生理改变^[125]。近年的研究表明, 印记异常是某些恶性肿瘤重要的分子生物学基础。印记丢失引起 IGF2 过表达, 直接导致胚胎发育异常或促进肿瘤恶性生长^[126]。目前发现, 在肾母细胞瘤、结直肠癌、乳腺癌及肺癌等肿瘤中 IGF2 基因发生印记丢失^[127]。

2.3 IGF2 基因结构及定位

IGF2 基因位于人染色体 11p15.5, 全长 8837 bp, 包括 9 个外显子 (E1~E9) 和 8 个内含子。第 9 外显子内有一个 ApaI 多态酶切位点。有 P1、P2、P3、P4 四个组织和发育依赖的启动子, 编码五种 5'非翻译区不同的成熟 mRNA: P1 调控 E1~3、7~9, 表达 5.3kb IGF2 mRNA; P2 调控 E4、7~9, 表达 5.0kb IGF2 mRNA; P3 调控 E5、7~9, 表达 6.kb0 和 2.2kb IGF2 mRNA; P4 调控 E6~9,

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.