

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520131153507

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

在肝癌中 EZH2 和 CHD5 的相互作用
Mutual regulation between CHD5 and EZH2 in
hepatocellular carcinoma

李 钊

指导教师姓名: 尹震宇 教授

专业名称: 外科学

论文提交日期: 2016-4

论文答辩时间: 2016-5

学位授予日期: 2016-6

2016 年 6 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

在肝癌中 E2H2 和 CH25 的相互作用	2.5cm
李钊	
指导教师 尹震宇	
教授	
厦门大学	2.5cm

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略语索引

英文缩写	英文全名	中文全名
HCC	Hepatocellular Carcinoma	肝细胞癌（肝癌）
CHD5	Chromodomain helicaseDNA binding protein 5	染色质解螺旋酶 DNA 结合蛋白 5
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog2	组蛋白甲基转移酶
SWI/SNF	(Mating-type switching, SWI)/ (Sucrose non fermenting, SNF)	酵母交换型转换和蔗糖不发酵
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase B	磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链反应
qPCR	real time fluorescence quantitative PCR	实时荧光定量聚合酶链反应
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dsDNA	double-stranded DNA	双链 DNA
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
mRNA	messenger Ribonucleic acid	信使 RNA
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖三磷酸
E.coli	Escherichia coli	大肠杆菌
CDS	coding sequence	编码序列
cDNA	complement deoxyribonucleic acid	互补脱氧核糖核酸
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media	DMEM 细胞培养基
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清

PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
SSC	saline sodium citrate	柠檬酸钠缓冲液
TAE	Tris-acetate-EDTA	三羟甲基氨基甲烷-冰乙酸-乙二胺四乙酸
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay	放射免疫沉淀分析
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20	TBST 洗膜液

摘要

肝细胞癌 Hepatocellular carcinoma (HCC) 在全球范围内是发病率排第五位的癌症。由于其在手术后存在潜在的转移和复发，尽管对于肝细胞癌的治疗越来越先进，但是肝细胞癌病人的预后仍然很差。因此，研究清楚肝癌肿瘤发生发展和复发的分子机制，发现新的预后分子标志物，将会有助于肝癌治疗策略的发展。

分子机制的研究主要是以染色质调控为重要部分，其调控方式有很多不同的分类，如有些调控基因参与“书写”和“阅读”组蛋白翻译后修饰，这些调控基因在肿瘤的发生发展中控制基因的表达起到重要作用。例如：多梳蛋白 (PcG) 是特征性的转录抑制蛋白，调控很多生理学过程。组蛋白甲基化转移酶 (EZH2)，是多梳蛋白复合体 2 (PRC2) 中重要组成部分，是一个“书写”蛋白催化组蛋白 H3 的第 27 位的赖氨酸发生三甲基化(H3K27me3)，并且可以抑制下游基因表达。有研究报告揭示 EZH2 过表达之后和肝癌的恶性表型和恶性进展有关。染色质“阅读”蛋白通过阅读和特异性结合到转录后修饰的组蛋白的 N-端来控制基因表达。研究显示染色质解螺旋酶 DNA 结合蛋白 (CHD) 家族，参与核小体重塑和调控基因表达，在结构上有两个染色质 N-端和一个类似解螺旋酶 ATP 酶元件为特征，家族中的成员很多已经被证实参与肿瘤的形成和转移。

CHD5 作为 CHD 家族的一员，在癌症中发挥的作用，是作为潜在的肿瘤抑制基因，它位于染色体 1p36 位点，有报道表明在肿瘤中由于其基因损伤，启动子高甲基化，组蛋白去甲基酶 JMJD2A 和 micro-RNA 211 使 CHD5 基因功能沉默。有研究报道 CHD5 通过 p19Arf/p53 通路抑制细胞增殖和促进细胞凋亡衰老。但是，关于 CHD5 的功能被抑制，其失活的机制以及在肝癌中它与其他“书写”蛋白的相互关系都还没有详细阐明。我们现在的研究表明：CHD5 表达下调和肝癌的转移和不良预后有关以及在肝癌中 CHD5 和 EZH2 之间存在负调控关系。

关键词：肝癌 EZH2 CHD5 预后 侵袭

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequently occurring cancer worldwide. Because of its high potential for metastasis and recurrence after surgical resection, prognosis of HCC patients remains very poor, despite advances in HCC treatments. Therefore, understanding the molecular mechanisms involved in carcinogenesis and recurrence, and identifying novel prognostic molecular biomarkers, will contribute to the development of effective therapeutic strategies for HCC.

There are several different classes of chromatin regulators, such as those that take part in “writing” and “reading” histone posttranslational modifications, which have been shown to be centrally involved in gene expression control during cancer occurrence and progression. For example, the polycomb group (PcG) proteins are well-characterized transcriptional repressors that regulate several developmental and physiological processes. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a core component of the polycomb repressive complex 2 (PRC2), is a “writer” protein that catalyzes the trimethylation of histone H3 at lysine 27 (H3K27me3) and suppresses gene expression. Previous studies showed that EZH2 overexpression is closely associated with the malignant progression and aggressive phenotypes of HCC. Chromatin “reader” proteins control gene expression via reading and specifically binding to the N-terminus of post-translationally modified histones through conserved structural domains such as chromodomains, plant homeodomains (PHDs), and Tudor domains. The chromodomain helicase DNA-binding protein (CHD) family, which takes part in nucleosome remodeling and the regulation of gene expression, is structurally characterized by two N-terminal chromodomains and a helicase-like ATPase motif. Several members of this family have been confirmed to play important roles in tumorigenesis and metastasis.

CHD5 was recently found to be a potential tumor suppressor gene in cancer. CHD5 resides on the chromosomal locus 1p36 and has been reported to be silenced by genetic lesions, promoter DNA hypermethylation, histone demethylase JMJD2A, and micro-RNA211 in many cancers. CHD5 inhibits proliferation and promotes apoptosis and senescence via the p19Arf/p53 pathway, in addition to the association with PHD-mediated histone 3 binding. However, the suppressive function of CHD5,

the mechanism of CHD5 inactivation, and the relationship with other “writer” proteins in HCC have not been well elucidated. In the present study, we showed that downregulation of CHD5 correlates with HCC metastasis and poor prognosis and that mutual suppression regulation occurs between EZH2 and CHD5 in HCC.

Keywords: EZH2;CHD5;hepatocellular carcinoma;prognosis;invasion

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

缩略语索引	I
摘 要	III
ABSTRACT	IV
第一章 前言	1
1 肝细胞癌	1
2 肝癌的危险因素	2
3 肝癌发病的机理与分子机制	5
4 PcG 复合体	12
5 EZH2	13
第二章 材料与方法	15
1.主要仪器	15
2 主要试剂	17
3 临床肿瘤组织标本	19
4 细胞株	19
5 菌株和质粒	19
6 实验方法	19
第三章 实验结果	29
1 肝癌患者肿瘤组织中 CHD5 蛋白表达水平的检测	29
2 肿瘤组织中 CHD5 的差异表达与肝癌患者预后的关系	30
3 CHD5 可以抑制肝癌细胞恶性表型	32
4 EZH2 可以通过调节 H3K27me3 来抑制 CHD5 的表达	34
5 在肝癌中 EZH2 和 CHD5 的表达水平呈负相关性	38
6 在肝癌中 EZH2 也是 CHD5 的下游基因	39
7 CHD5 通过表观机制激活 EZH2 的目标基因	41
第四章 讨论	43

参 考 文 献	45
致 谢	50

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

ABBREVIATION	I
ABSTRACT IN CHINESE	III
ABSTRACT IN ENGLISH	IV
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1 Hepatocellular carcinoma	1
2 Risk factors of hepatocellular carcinoma	2
3 Molecular mechanism of hepatocellular carcinoma	5
4 PcG complex	12
5 EZH2	13
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS	15
1 Main instrument	15
2 Main reagent	17
3 Clinical tumor tissue	19
4 cell lines	19
5 Bacterial strains and plasmids	19
6 Experimental method	19
CHAPTER 3 RESULTS	29
1 Detection of CHD5 protein expression in tumor tissues of patients with hepatocellular carcinoma	29
2 Underexpression of CHD5 is associated with HCC metastasis and poor prognosis	30
3 Restoring expression of CHD5 decreases cell motility and invasion	32
4 EZH2 inhibit the expression of CHD5 by regulating H3K27me3	35
5 Expression of EZH2 and CHD5 is negatively correlated in HCC tissues	39
6 EZH2 is directly targeted by CHD5	40
7 CHD5 activates EZH2 target genes through epigenetic mechanisms	42
CHAPTER 4 DISCUSSION	43
REFERENCE	45
ACKNOWLEDGEMENT	50

第一章 前言

1 肝细胞癌

肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma）是我国最常见的恶性肿瘤之一^[1]。肝癌主要发生在在我国沿海城市，如江苏，福建，广东和广西。另外，在我国长江三角洲和沿江岛屿，肝癌的发病率也比较高，可能是由于这些地区大多受海洋气候影响。肝细胞癌发病率在所有癌症中的发病率排名第五，它也是癌症造成的死亡的最重要病因。并且它是一个全球性的问题，每年有超过一百万新患者。肝癌的发病率地区差异比较大，其中 80% 的患者位于非洲和东亚。中国患者占世界一半以上。肝癌的发病率性别差异也比较大，在全球人群中男性肝癌的发生率通常是女性的 2-4 倍，这种差异性的主要原因可能是男女暴露在肝癌危险因素的机会不同，男性更容易感染乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒，饮酒，抽烟和铁的累计较多。

早期肝癌通常症状无特异性，但是中晚期肝癌的症状则较多，常见的临床表现有肝区疼痛、腹胀、纳差、乏力、消瘦，进行性肝大或上腹部包块等；部分患者有低热、黄疸、腹泻、上消化道出血；肝癌破裂后出现急腹症表现等。大多数患者在确诊为肝癌后若不治疗半年左右就死亡了。

诊断肝癌的辅助检查首选 B 超，可以发现直径两厘米的肿瘤。通过 CT 或 MRI 可以发现更小的肿瘤以及对肿瘤准确的定位，是否有门静脉侵犯。活检是确诊的金标准，但穿刺活检有可能造成肿瘤转移将可以手术切除的肿瘤变为不可手术，因此通常不采用穿刺活检。甲胎蛋白并不是那么可靠许多肝癌可能是低表达或不表达，某些腺瘤可能高表达，在生殖细胞肿瘤，肝内胆管肿瘤，胃癌，结肠癌中也会高表达。

肝癌的外科治疗方法比如：手术切除、肝移植、介入治疗等，在大部分病人中有较好的恢复，并且期望能获得良好的生存。介入治疗也有很好的疗效，五年生存率也明显升高。目前认为肝移植是治疗肝癌的最佳治疗方案，尤其是当肝脏功能代偿或者小的肝癌时。在一些高级别的肿瘤中，往往选择保守治疗，通过对以往患者的随机对照研究，动脉栓塞和动脉化疗栓塞治疗对病人的预后也较好。

肝癌经过手术治疗后往往会有复发,这部分可能是由于原有的肝硬化疾病为肿瘤的复发,提供了良好的生长的微环境。在合并肝硬化的情况下小的肝癌通过肝移植比外科切除效果更好,受限于器官供应的短缺,许多患者不能进行肝移植。目前最好的治疗方法是手术切除,局部消融治疗如:无水酒精注射或射频消融也可以使用,肝移植是最好的治疗手段^[2, 3]。

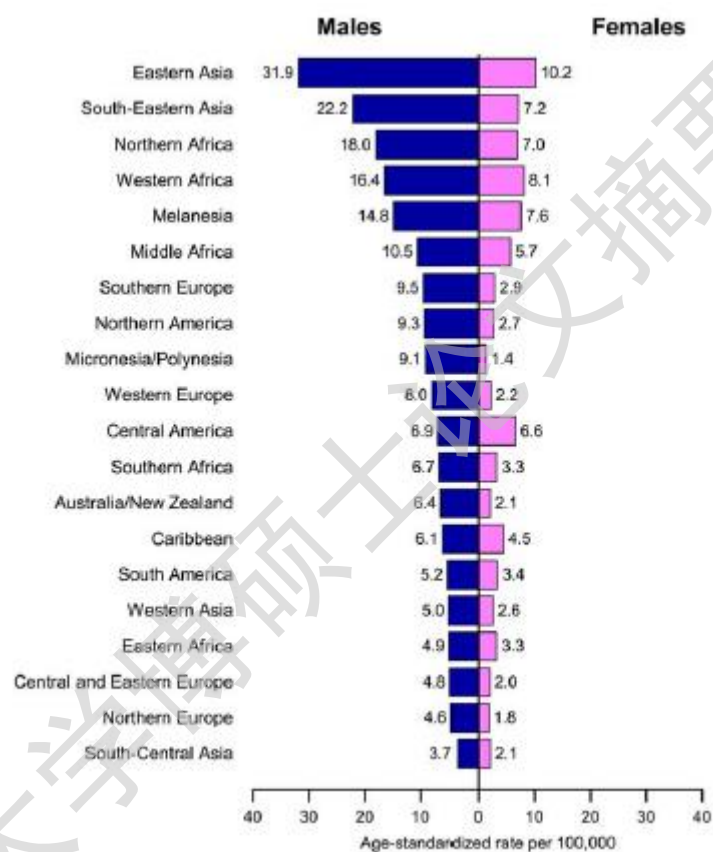


图 1.1 肝癌发病率的性别和世界区域差异^[1]

Fig. 1.1 Liver Cancer Incidence Rates by Sex and World Area^[1]

2 肝癌的危险因素

肝癌是成年人的很常见的恶性肿瘤,大部分是发生在慢性肝脏疾病和肝硬化的基础上。肝癌患者的主要原因是肝炎病毒,酒精性肝疾病和非酒精性脂肪肝炎,肝硬化,黄曲霉毒素,还有一些化学制剂如:氯乙烯、二氧化钛类;合成的类固醇等,均为肝癌发病的危险因素。

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.