

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520121153103

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**细胞膜微结构域（脂筏）/Flot 调控 MAPK
激酶及逆转肝癌细胞耐药性的研究**

**Studies on the regulation of membrane microdomains (lipid
rafts) / Flot to mitogen-activated protein kinase signaling
pathway and its effect on reversing multidrug resistance of
hepatocellular carcinoma cells**

王亚丽

指导教师姓名: 潘超 副教授

专 业 名 称: 病理学与病理生理学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 4 月

细胞膜微结构域(脂筏)/EGFR调控MMPs激酶及逆转肝细胞耐药性的研究

王亚丽

指导教师

潘超 副教授

厦门大学

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

目的:

- 1.构建耐药肝癌细胞模型。
- 2.检测 Flot 下调对 ERK1/2 信号通路的影响,明确能否通过 Flot 调控 ERK1/2 信号通路从而实现肝癌细胞耐药性的逆转。
- 3.检测脂筏破坏剂甲基- β -环糊精破坏脂筏结构对 ERK1/2 的影响,探索脂筏与 ERK1/2 之间的关联。
- 4.检测下调 Flot 对耐药肝癌细胞侵袭能力的影响。
- 5.构建过表达质粒 Flot1/pcDNA3.1 (+)、Flot2/pcDNA3.1 (+),为后续研究工作奠定基础。

方法:

- 1.用阿霉素大剂量冲击法诱导细胞,Celltiter-Glo 荧光细胞活性检测法检测细胞对阿霉素的敏感性。
- 2.设计 siRNA 和 shRNA,Real-Time-PCR 和 Western Blotting 筛选出对 Flot 的下调效果更佳的方法。后续实验采用该方法下调 Flot;Western Blotting 方法检测各组细胞中 C-RAF、MEK1/2、ERK1/2 的表达水平。
- 3.用脂筏破坏剂甲基- β -环糊精破坏脂筏结构,激光共聚焦显微镜验证其作用效果,Western Blotting 方法检测脂筏破坏后细胞内 ERK1/2 的表达水平。
- 4.体外划痕实验检测 Flot 下调后细胞越过划痕区距离的变化。
- 5.PCR 扩增 Flot 序列,将其插入 pcDNA3.1(+)真核表达载体,构建重组质粒 Flot1/pcDNA3.1 (+)、Flot2/pcDNA3.1(+)

结果:

- 1.阿霉素诱导得到的两株肝癌细胞株 SMMC-7721/ADM 和 BEL-7402/ADM 耐药指数分别为 16.44 和 20.34,符合高度耐药。
- 2.与 shRNA 方法比较,siRNA 方法沉默效率更高,故后续实验选用 siRNA 干扰的方法下调 Flot。与对照组相比,实验组细胞磷酸化 C-RAF,磷酸化 MEK1/2 表达水平明显降低,且 siRNA 转染时间越长,下调效果越明显;非磷酸化

C-RAF, MEK1/2 表达水平未受明显影响。磷酸化 ERK1/2 表达水平先短暂升高后逐渐降低, 最后明显低于对照组水平; 非磷酸化 ERK1/2 表达未受明显影响。

3.与对照组相比, 经甲基- β -环糊精作用后的实验组细胞在共聚焦显微镜下观察到的绿色荧光明显减少, 且其磷酸化 ERK1/2 显著降低。

4.siRNA 转染后的细胞组比对照组细胞越过划痕区距离明显缩短。

5.重组质粒 Flot1/pcDNA3.1 (+)、Flot2/pcDNA3.1 (+) 转入细胞后 Flot-1、Flot-2 表达水平明显升高。

结论:

1.成功构建耐药肝癌细胞模型 SMMC-7721/ADM 和 BEL-7402/ADM。

2.下调 Flot 后 ERK1/2 信号通路被抑制, 这为通过 Flot 调控 ERK1/2 信号通路从而实现耐药性的逆转提供理论依据。

3.脂筏参与调控 ERK1/2 的激活。

4.Flots 的表达水平影响肝癌细胞侵袭能力。

5.成功构建过表达质粒 Flot1/pcDNA3.1 (+)、Flot2/pcDNA3.1(+), 为后续实验奠定了基础。

关键词: Flot; ERK1/2; 肝癌; 多药耐药; 逆转

Abstract

Objective:

1. To induce poly multidrug resistant (MDR) cell models from human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines by chemotherapy drugs and detect resistance of the developed HCC MDR cells.

2. To detect the effects of ERK1/2 pathway by down-regulating Flot on HCC drug-resistant cells, thus to explore if down-regulating Flot could affect ERK1/2 pathway and reverse resistance of HCC MDR cells.

3. To detect the effects on ERK1/2 after destroying lipid raft structure by methyl β - cyclodextrin (MCD), thus to investigate the connection between lipid rafts and ERK1/2.

4. To study the expression of Flot-1 and Flot-2 in HCC MDR cells and its effect on cell invasion.

5. To construct the eukaryotic expression vector Flot1/pcDNA3.1 (+) and Flot2/pcDNA3.1(+) for further study.

Methods:

1. Human hepatocarcinoma cell lines SMMC7721 and BEL7402 were exposed to high concentration of ADM transiently. CellTiter-Glo luminescent cell viability assay was used to evaluate drug sensitivity. And then the resistance index was calculated to evaluate drug resistance of the MDR models.

2. The specific Flot-1, Flot-2 siRNA and shRNA were transfected into HCC MDR cells. The mRNA and protein expression of Flot-1 and Flot-2 were detected by RT-PCR and western blotting respectively. The higher silencing efficiency method was chosen to reduce Flot-1 and Flot-2 in the following assay. The expression of C-RAF, MEK1/2 and ERK1/2 proteins were detected by western blotting.

3. The expression of ERK1/2 protein was detected by western blotting after destroying lipid raft structure by methyl β - cyclodextrin (MCD).

4. Wound healing assay were performed to investigate the mobility and invasion ability of HCC MDR cells.

5. The open reading frame(ORF) sequence of Flot-1 and Flot-2 were amplified from HCC MDR cells by RT-PCR. Then the eukaryotic expression vectors of Flot1/pcDNA3.1 (+) and Flot2/pcDNA3.1(+) were constructed by inserting the Flot-1 and Flot-2 ORF into the pcDNA3.1(+)vector. Western blot assay was used to detect expression levels of Flot-1 and Flot-2 after transfected Flot1/pcDNA3.1 (+) and Flot2/pcDNA3.1(+) vectors into HCC MDR cells.

Results:

1. Compared to parent cells, the induced MDR cells showed less sensitivity to ADM. The IC₅₀ of ADM for SMMC7721/ADM was 16.44 times higher than that of SMMC7721 cell lines. The IC₅₀ of ADM for BEL7402/ADM was 20.34 times higher than that of BEL7402 cell lines.

2. siRNA was used in the flowing assay as the silencing efficiency of it was higher than that of shRNA in HCC MDR cells. Compared to the blank control group and the negative control group, the protein expressions of p-C-RAF, p-MEK1/2 were decreased time-dependently without affecting the total C-RAF and MEK1/2 levels after down-regulating Flot-1and Flot-2 in the siRNA group. The expression of p-ERK1/2 was increased at first and then decreased while that of ERK1/2 was uneffected.

3. The expression of p-ERK1/2 decreased significantly after the methyl- β -cyclodextrin (MCD) treatment.

4. Compared to the negative control group and the blank control group, the invasion of cells were significantly decreased in the Flot-1siRNA and Flot-2siRNA groups.

5. Compared to the negative control group and the blank control group, the expressions of Flot-1 and Flot-2 in Flot siRNA group were up-regulated at protein levels .

Conclusions:

1. SMMC7721/ADM and BEL7402/ADM showed a stable drug resistance.

2. Down-regulation of Flot-1 and Flot-2 could inhibit ERK1/2 pathway activity.
3. The destruction of lipid raft structure could inhibit ERK1/2 pathway activity.
4. Silencing of Flot-1 and Flot-2 expression could inhibit the invasion of HCC MDR cells.

5. The expression vector Flot1/pcDNA3.1(+) and Flot2/pcDNA3.1(+) have been successfully established.

Keywords: Flot; ERK1/2; Hepatocellular carcinoma; Multi-drug resistance; Reverse

厦门大学博硕士学位论文摘要

英文名词及缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
ADM	Adriamycin, Doxorubicin	多柔比星, 阿霉素, 亚德里亚霉素
APS	Ammonium persulfate	过硫酸铵
ATP	Adenosine triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸, 三磷酸腺苷
Bcl-2	B cell lymphoma 2	B 细胞淋巴瘤基因-2
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
ECL	Enhanced chemiluminescence	化学发光自显影
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid	乙二胺四乙酸
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	表皮生长因子受体
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶, G3PDH
GST	Glutathione S-Transferase	谷胱甘肽 S-转移酶
GTP	Guanosine triphosphate	鸟嘌呤-5'-三磷酸, 三磷酸鸟苷
HBV	Hepatitis B Virus	乙型肝炎病毒
HCC	Hepatocellular Carcinoma	肝细胞癌
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IC ₅₀	50% inhibiting concentration	半数抑制浓度
IL	Interleukin	白细胞介素
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
KD	Kilo dalton	千道尔顿
LRP	Lung resistance related protein	肺耐药相关蛋白, MVP
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶

MDR	Multi-drug resistance	多药耐药
MRP	Multi Drug Resistance Associated Protein	多药耐药相关蛋白
MTT	3-(4,5)-dimethylthiaziazolide (-z-y1)-3,5-diphenyltetrazoliumbromide	3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, 四甲基偶氮噻唑蓝
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白
PKC	Protein Kinase C system	蛋白激酶 C
PS	Penicillin-Streptomycin	青-链霉素
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯
RI	Resistance index	耐药指数
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基磺酸钠
TBS	Tris Buffered Saline	三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水
TEMED	N, N, N, N-tetramethyl ethylene diamine	四甲基乙二胺
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
Topo	Topoisomerase	拓扑异构酶
WB	Western blotting	蛋白免疫印迹

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
英文名词及缩略词表	VI
第一章 前 言	1
第二章 材料与方 法	7
第三章 结果与分析	30
第四章 讨 论	47
结 论.....	55
参 考 文 献	57
致 谢.....	66
附 录.....	67

Table of contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreviations and acronyms	VI
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Materials and methods	7
Chapter 3 Results and analysis	30
Chapter 4 Discussions	47
Conclusion	55
Reference	57
Acknowledgement	66
Appendix	67

第一章 前言

原发性肝癌是全球五大常见的恶性肿瘤之一，多见于亚洲和非洲，在我国占肿瘤致死原因的第三位^[1]，其发生、发展严重危害着人们的健康和生命。众所周知，肝脏具有强大的代偿能力，轻微损伤不会导致肝功能出现异常，而正是这种强大的代偿能力，使得早期肝癌患者因症状和临床体征不明显而不易察觉。当患者出现明显症状就医之时，往往已经处于中到晚期，甚至已经发生远处转移，从而失去了手术治疗的宝贵时机^[2]。目前手术治疗仍是原发性肝癌的首选治疗方法，但手术治疗具有很大的局限性，主要适用于早期肝癌患者，而多数中晚期肝癌患者就诊时就已失去手术时机。因此，化疗、分子靶向治疗、介入治疗、放射治疗、局部消融治疗等非手术治疗方法在肝癌治疗中的作用越来越重要，其中，化疗是肝癌治疗中不可或缺的重要环节。然而，肝癌多药耐药（Multidrug resistance, MDR）的产生使得肝癌细胞对化疗药物失去了敏感性，这是导致肝癌化疗失败的主要原因之一。所谓多药耐药是指肿瘤细胞对一种化疗药物耐药的同时，对其他多种作用机制以及结构并不相同的化疗药物也产生交叉耐药的一种现象^[3]。逆转肿瘤多药耐药是目前肿瘤化疗的研究热点之一，研究肝癌多药耐药的发生机制和逆转策略以提高肝癌化疗效果现已成为肝癌治疗亟待解决的难题。

1.1 肿瘤细胞多药耐药机制

1.1.1 通过耐药相关蛋白的高表达影响药物转运

1. P-gp(P-glyco protein, P-gp)的过度表达：目前的研究者们已经达成共识，认为 P-gp 的过度表达是肝癌 MDR 形成的主要原因^[4]。P-gp 属于 ABC (ATP-binding cassette transporter, ABC) 转运蛋白家族成员，是一种 ATP 依赖性的跨膜转运蛋白，其可以利用 ATP 水解释放的能量泵出进入细胞内的化疗药物，降低细胞内的药物浓度，从而使细胞耐药。

2. 多药耐药相关蛋白的过度表达。多药耐药相关蛋白（multidrug resistance protein, MRP）与 P-gp 一样，都属于 ABC 转运蛋白超家族成员，是能量依赖泵

[5], 能识别和转运与谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耦合的底物^[6], 或者改变药物在细胞内的分布^[7]。

3. 乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)^[8]也属于 ATP 依赖性跨膜转运蛋白超家族的一员, 其能利用 ATP 的能量泵出胞内药物, 减少药物在胞内的积聚而引起细胞耐药。

4. 肺耐药蛋白 (lung resistance protein, LRP)可能通过两种方式引起细胞的 MDR^[9]: 一是将核孔封闭, 使以胞核为靶点的药物无法进入细胞核; 二是使进入胞内的药物通过转运至运输囊泡的方式将其隔离, 并呈房室分布, 最终经胞吐将药物排出胞外。

1.1.2 影响药物的作用靶点

DNA 拓扑异构酶 (Topo) 在 DNA 复制和转录中起着决定性的作用。Topo 分为两型, 即 TopoI 型和 TopoII 型, 其中 TopoII 是当下很多化疗药物的作用靶点。因此, 当拓扑异构酶 TopoII 型 mRNA 和蛋白表达量下降或者发生基因突变时, 抗肿瘤药物的作用靶点随之减少或丧失, 从而引起细胞耐药性的产生^[10]。

1.1.3 影响药物代谢

谷胱甘肽是一种含巯基三肽, 在机体中的含量很高, 是细胞内重要的抗氧化剂, 可保护细胞中含巯基蛋白质和含巯基酶免于各种氧化剂氧化^[11]。在谷胱甘肽-S-转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 催化下, GSH 与化学药物结合, 使其成为无毒性的醇类物质或增加其极性而从尿液中排出^[12], 导致细胞耐药性的产生。

1.1.4 影响细胞凋亡的调控

正常细胞的增殖与凋亡需要依赖于很多癌基因或者抑癌基因参与, 这些基因如果发生改变则会导致细胞增殖与凋亡的失衡, 从而使细胞恶变。大多数化疗药物的主要作用机制就是诱导肿瘤细胞凋亡。因此, 抑制癌细胞凋亡的基因表达异常可能参与了肿瘤细胞的耐药过程, 这些主要包括突变型 P53、bcl-2 基因、突变的 RB 基因和 survivin 等^[13-17]。

1.2 多药耐药的逆转

肿瘤的多药耐药是阻碍化疗成功的重要因素，严重缩短了肿瘤患者的寿命，并降低其生活质量。针对各种不同的耐药机制，目前研究出的逆转方法主要有：

①化学药物逆转：P-gp 抑制剂，如钙通道阻滞剂维拉帕米(verapamil, VRP) 等可以增加多种化疗药物在细胞内的浓度^[18]；GSH、GST 抑制剂，如硫氨酸亚砷胺(buthionine sulfox imine, BSO)^[19]；Topo II 抑制剂；与 DNA 修复相关酶有关的逆转剂；BCRP 所致 MDR 逆转剂等。

②免疫逆转：免疫治疗基本原理是应用 P-gp 特异性单克隆抗体与 P-gp 结合，影响其药泵功能，阻断细胞内化疗药物的外排，提高细胞内化疗药物浓度而逆转耐药。另外，还有针对 MRP 和 LRP 以及新生血管的单抗等同样可以用于 MDR 的逆转。除此之外，还包括免疫靶向方法，应用免疫毫微粒包裹药物，使药物在细胞内缓释而逆转 MDR。

③细胞因子逆转：研究显示某些细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)，白细胞介素 2(IL-2) 等，可能通过抑制 MDR1 基因的表达增加细胞对化疗药物的敏感性而逆转耐药。

④基因治疗技术：随着人们对肿瘤耐药发生机制的不断研究及分子生物技术的迅猛发展，越来越多的研究结果显示肿瘤细胞耐药性的出现是由于机体某些基因表达不协调，造成一些与多药耐药相关的蛋白表达和酶活性上调或下降，可见将基因层次作为着手点有可能实现从根本上解决肿瘤细胞耐药问题。

⑤中药有效成分逆转：现已证明中药中的一些成分如皂苷、多酚、生物碱、黄酮等可以逆转肿瘤细胞的多药耐药。

面对肿瘤细胞复杂的耐药机制，先前的研究者试图从不同的途径探索逆转肿瘤耐药的策略，但由于肿瘤耐药是多种机制共同作用的结果，而当前的逆转剂或逆转方法只特异性针对某种或某几种机制的 MDR，因而均难达到临床应用的治疗效果。此外，由于很多逆转剂因其自身较大的毒副作用，甚至某些逆转药物本身就具有强烈的致癌性，限制了其临床应用，因而研究安全有效的逆转治疗手段已成为当前肿瘤治疗中最迫切的任务。

1.3 肿瘤多药耐药与 MAPK 的关系

肿瘤细胞的各种改变有赖于细胞内复杂的信号传导系统与各种激酶系统的激活^[20]。对细胞耐药相关基因改变及其耐药信号传导通路的进一步研究发现：丝

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.