

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520131153524

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

细胞周期素依赖蛋白激酶5促进肝细胞癌的
侵袭与转移

Cyclin Dependent Kinase 5 promotes invasion and
metastasis of Hepatocellular Carcinoma

赵文兴

指导教师姓名: 尹震宇教授

张 杰 教授

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2016 年 月 日

论文答辩时间: 2016 年 月 日

学位授予日期: 2016 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

细胞周期素依赖蛋白激酶₂促进肝细胞癌的侵袭与转移

赵文兴

指导教师

尹震宇

张杰

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

肝细胞癌（Hepatocellular Carcinoma, HCC）在所有恶性肿瘤导致的死亡原因中占第三位，其发病率居恶性肿瘤的第六位。肝癌具有的高复发以及高转移，使肝癌愈后很差，而导致肝癌高复发和高转移的机制还不是很清楚。最近研究表明细胞周期蛋白激酶家族蛋白在上述调控过程中具有重要作用。

细胞周期素依赖蛋白激酶家族中的一个特殊蛋白：细胞周期素依赖蛋白激酶 5（Cyclin Dependent Kinase 5, CDK5）引起了我们的注意，CDK5 被认为主要在神经系统发挥作用。但是，最近有实验证据表明 CDK5 在非神经组织内同样发挥着重要的作用，尤其在一些恶性肿瘤的进展过程中（包括肿瘤细胞的增殖和转移），例如乳腺癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺髓样癌等。

在本课题中，我们检测了 CDK5 在肝细胞癌转移过程中的作用，期待为抑制肝癌术后的恶性转移找到新的治疗靶点。我们在临床肝细胞癌病人的组织标本检测到了 CDK5 的表达情况。接着分析了 CDK5 和肝细胞癌患者的临床信息之间的关系。为了进一步研究 CDK5 在肝细胞癌中的功能，我们在肝细胞癌细胞系上对 CDK5 进行了下调和过表达，通过细胞和裸鼠移植瘤模型进一步确认我们在组织水平得到的结论。

相比于正常的肝组织，CDK5 在肝细胞癌患者的癌组织中表达水平增加。并且 CDK5 的高表达和肝细胞癌患者的脉管侵犯和复发相关。体外实验表明过表达 CDK5 可以促进肝癌细胞的迁移和侵袭能力，而且这一过程依赖于 CDK5 的激酶活性。相反地，抑制 CDK5 的表达可以降低肝癌细胞的迁移和侵袭能力。通过使用药物抑制 CDK5 的激酶活性也可以明显抑制肝癌细胞的迁移和侵袭。最后，裸鼠成瘤模型进一步确认了 CDK5 可以促进肝癌移植瘤细胞的肝转移。

综上所述，我们的实验结果表明：在肝细胞癌中，过表达的 CDK5 可以促进肝细胞癌的转移和复发，这一作用与其激酶活性相关。而转移和复发是影响肝癌预后的关键因素，因此，CDK5 可能成为治疗肝细胞癌新的药物靶点。

关键词：肝细胞癌；细胞周期素依赖蛋白激酶 5；迁移；侵袭

Abstract

Hepatocellular Carcinoma(HCC) is the third cause of cancer related death and ranks sixth in the world among all malignancies, Metastasis and recurrence are the major risk factors for poor prognosis of liver cancer. While, the mechanism underlie the high recurrence and metastasis of Hepatocellular Carcinoma is still unclear. Recent findings indicate that Cyclin Dependent Kinase(CDKs) family proteins are closely related with tumor genesis and metastasis.

One special member of CDKs ,CDK5, draw our attention. CDK5 was thought to play vital role in nervous system. However, increasing evidence suggests CDK5 functioning in regulating non-nervous tissue tumor genesis, including cancer cell proliferation and metastasis in breast cancer, gastric cancer, lung cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, medullary thyroid carcinoma and so on.

In this study, we examined the role of CDK5 in the metastasis of Hepatocellular Carcinoma. Expression of CDK5 was detected in tissue specimens of clinical HCC patients. Then we analyzed the relationship between CDK5 expression level with patients' clinical parameters. To further characterize the functions of CDK5 in HCC, we applied genetic down-regulation and overexpression of CDK5 in HCC cell lines. CDK5 inhibitors were also used to verify our conclusions in cell based assays and nude mice xenograft models.

We found that expression of CDK5 was increased in human HCC tissues compared to paired normal liver tissues. High CDK5 levels were correlated with vascular invasion and recurrence of HCC patients. Overexpression of CDK5 can promote the migration and invasion of HCC cells dependent of its kinase activity. Conversely, down regulation of CDK5 can inhibit the migration and invasion of HCC cells. Meanwhile, CDK5 kinase activity inhibitors performed similar results as genetic down-regulation in HCC cells. Finally, by using xenograft subcutaneous transplanted model, we confirmed that CDK5 is vital to promote liver metastasis.

In summary, Our results suggest that CDK5 can promote the migration and invasion of HCC cells dependent on its kinase activity. Recurrence and metastasis are the key factors affecting prognosis of HCC. Inhibition of CDK5 may become a novel treatment for HCC pharmaceutical approach in the future.

Key words: Hepatocellular Carcinoma; Cyclin dependent kinase 5; Migration; Invasion

厦门大学博硕士学位论文摘要库

英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
HCC	Hepatocellular Carcinoma	肝细胞癌
CDK5	Cyclin dependent kinase 5	细胞周期素依赖蛋白激酶 5
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
ECs	Endothelial cell	内皮细胞
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮细胞间质化
CHB	Chronische hepatitis B	慢性乙型肝炎
CDKs	Cyclin dependent Kinases	细胞周期素依赖蛋白激酶
3D-CRT	Three dimensional conformal RT	三维适形放疗
TACE	Transcatheter Arterial Chemoembolization	经导管动脉化学栓塞
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
AFT	Aflatoxins	黄曲霉毒素
CDK7	Cyclin dependent kinase 7	细胞周期素依赖的蛋白激酶 7
MMPs	Matrix Metalloproteinases	基质金属蛋白酶家族
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
DMT	DNA methyltransferase	DNA 甲基转移酶
MTC	Medullary thyroid carcinoma	甲状腺髓样癌
CNS	Central nervous system	中枢神经系统
HAV	Hepatitis A virus	甲型肝炎病毒
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
MEF2	Myocyte enhancer factor 2	肌细胞增强因子 2
Bcl-2	B-cell lymphoma2	B 淋巴细胞瘤 2
FAK	Focal Adhesion Kinase	粘着斑激酶
HDAC1	Histone deacetylase 1	组蛋白去乙酰化酶 1
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒

目 录

第一章 绪论	1
1 肝细胞癌	1
1.1 概述	1
1.2 肝癌的病因流行病学	1
1.2.1 病毒性肝炎	1
1.2.2 肝硬化	2
1.2.3 黄曲霉毒素	2
1.2.4 其他因素	3
1.3 肝癌的综合治疗	3
1.3.1 外科手术治疗	4
1.3.2 肝动脉/门静脉化疗栓塞术	5
1.3.3 消融治疗	5
1.3.4 放射治疗	6
1.3.5 其他	6
1.4 肝癌侵袭转移机制	6
1.4.1 上皮细胞间质化	6
1.4.2 基质金属蛋白酶家族	6
1.4.3 血管生成	7
1.5 肝癌的复发	7
2 细胞周期素依赖蛋白激酶 5	8
2.1 概述	8
2.2 CDK5 与转录和翻译	8
2.3 CDK5 与细胞迁移	9
2.4 CDK5 与血管生成	10
2.5 CDK5 与肿瘤	10
2.6 CDK5 与 DNA 损伤	11
2.7 CDK5 抑制剂	12

3 本论文的研究内容与研究意义.....	12
第二章 材料与方法	14
1 材料	14
1.1 菌种与细胞株.....	14
1.2 质粒.....	14
1.3 培养基.....	14
1.3.1 大肠杆菌 LB 培养基	14
1.3.2 细胞培养基.....	14
1.4 琼脂糖凝胶.....	14
1.5 免疫蛋白印迹所需试剂.....	15
1.5.1 抗体.....	15
1.5.2 缓冲液.....	15
1.6 其它.....	15
2 实验设备	16
3 临床标本	17
4 实验方法	17
4.1 细胞培养.....	17
4.1.1 细胞复苏.....	17
4.1.2 细胞传代.....	17
4.1.3 细胞冻存.....	18
4.2 质粒提取.....	18
4.3 免疫印迹.....	20
4.3.1 细胞蛋白样品的制备.....	20
4.3.2 组织蛋白样品的制备.....	20
4.3.3 SDS-PAGE 电泳	20
4.4 DNA 胶回收.....	22
4.5 免疫组织化学技术.....	23
4.6 细胞计数实验.....	24
4.7 TurboFect 试剂转染	25
4.8 划痕实验.....	25
4.9 Transwell 实验.....	26
4.9.1 肿瘤细胞迁移实验.....	26

4.9.2 肿瘤细胞侵袭实验.....	26
4.10 细胞系构建.....	27
第三章 实验结果与分析.....	30
3.1 CDK5 在肝细胞癌中表达量增加.....	30
3.2 CDK5 与肝癌患者的脉管其侵犯和术后复发相关.....	31
3.3 过表达 CDK5 促进肝癌细胞的迁移和侵袭，且与其激酶活性相关.....	32
3.4 下调 CDK5 表达抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力.....	34
3.5 抑制 CDK5 激酶活性可以降低肝癌细胞的迁移和侵袭能力.....	35
3.6 CDK5 促进肝癌细胞裸鼠皮下移植瘤肝转移.....	36
3.7 CDK5 对部分肿瘤发生及转移相关蛋白的调节.....	37
第四章 讨论与展望.....	39
参 考 文 献.....	42
致 谢.....	50

Table of Content

Chapter 1 Introduction.....	1
1 Hepatocellular Carcinoma.....	1
1.1 Overview.....	1
1.2 Etiology Epidemiology.....	1
1.2.1 Viral hepatitis.....	1
1.2.2 Cirrhosis.....	2
1.2.3 Aflatoxin.....	2
1.2.4 Other factors.....	3
1.3 Comprehensive Treatment.....	3
1.3.1 Surgical treatment.....	4
1.3.2 Chemoembolization.....	5
1.3.3 Ablation.....	5
1.3.4 Radiation Therapy.....	6
1.3.5 Other treatments.....	6
1.4 Mechanisms of invasion and metastasis.....	6
1.4.1 Epithelial-mesenchymal transition.....	6
1.4.2 Matrix Metalloproteinases.....	6
1.4.3 Angiogenesis.....	7
1.5 Recurrence.....	7
2 Cyclin dependent kinase 5.....	8
2.1 Overview.....	8
2.2 Transcription and translation.....	8
2.3 Cell migration.....	9
2.4 Angiogenesis.....	10
2.5 Cancer.....	10
2.6 DNA damage.....	11
2.7 CDK5 inhibitors.....	12
3 Research content and significance.....	12
Chapter 2 Materials and Methods.....	14
1 Materials.....	14

1.1 Strains and cell lines	14
1.2 Plasmid.....	14
1.3 Medium.....	14
1.3.1 E. coli LB medium.....	14
1.3.2 Cell culture medium.....	14
1.4 Agarose gel.....	14
1.5 Western blot reagents required.....	15
1.5.1 Antibody.....	15
1.5.2 Buffer	15
1.6 Others.....	15
2 Laboratory Equipment	16
3 Clinical Specimens.....	17
4 Methods	17
4.1 Cell Culture.....	17
4.1.1 Cell recovery.....	17
4.1.2 Cell passage	17
4.1.3 Cell Freezing.....	18
4.2 Extracting plasmid	18
4.3 Immunoblotting.....	20
4.3.1 Preparation of cell protein samples.....	20
4.3.2 Preparation of tissue protein samples	20
4.3.3 SDS-PAGE electrophoresis.....	20
4.4 DNA Gel Extraction.....	22
4.5 Immunohistochemistry	23
4.6 Cell counting experiment.....	24
4.7 TurboFect transfection	25
4.8 Wound scratch assay	25
4.9 Transwell experiment.....	26
4.9.1 Tumor cell migration assay.....	26
4.9.2 Tumor cell invasion assay.....	26
4.10 Cell lines construction.....	27
Chapter 3 Experimental results and analysis	30
3.1 The expression of CDK5 is increased in HCC	30
3.2 CDK5 is associated with vascular invasion and recurrence of HCC patients	31

3.3 Overexpression of CDK5 promotes migration and invasion of HCC cells, which is associated with its kinase activity.....	32
3.4 Downregulation of CDK5 reduces migration and invasion of HCC cells...	34
3.5 CDK5 inhibitor can decrease migration of HCC cells.....	35
3.6 CDK5 promotes liver metastasis in xenograft implants	36
3.7 The effect of CDK5 on some key proteins associated with tumorigenesis and progression.....	37
Chapter 4 Discussion and Outlook.....	39
References	42
Acknowledgements	50

第一章 绪论

1 肝细胞癌

1.1 概述

世界范围来看，我国是肝癌高发的地区之一，且发病率和死亡率一直居高不下，仅次于肺癌、胃癌和食管癌。全世界每年新发现的 20 多万例肝癌患者中，大约有近一半的患者是在中国。肝癌分为原发性肝癌（Primary liver cancer）和转移性肝癌。其中原发性肝癌按照癌细胞来源又可分为肝细胞癌（Hepatocellular Carcinoma, HCC）、胆管细胞性肝癌和混合性肝癌，肝细胞癌是最多见的类型。肝癌大多以黄疸、肝脏区域不适、消化不良、厌食和恶心、身体消瘦为主要的临床表现。当前肝癌依然是严重损害人民群众身体健康的恶性肿瘤之一，临床上大多数肝癌患者隐匿性发病，只有少部分病人在体检或入院检查时早期发现，因而大多数病人的预后不是很理想。现在，随着我国影像学等相关医学技术手段的飞速进步，对于肝癌病人的临床诊断较以往有了很大的提高，但是由于肝癌的发病特点，大多数的病人并没有在发病的早期得到及时有效地诊断，因而也就错过了最佳的治疗时机，这大大影响了肝癌患者的治疗效果。肝癌临床治疗方法有外科手术切除、血管的化学药物栓塞治疗、射频消融和放射治疗等。多种治疗手段的综合利用使肝癌患者的治疗效果有了较明显提高，也是当今肝癌治疗的趋势。影响肝癌患者预后的主要因素包括肝癌的转移和复发，严重降低了肝癌的治疗效果，也是肝癌患者死亡率一直居高不下的主要原因。

1.2 肝癌的病因流行病学

1.2.1 病毒性肝炎

除了甲型肝炎病毒（Hepatitis A virus, HAV），其余的肝炎病毒均可以导致肝癌的发生。其中，乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）是最常见的导致肝细胞癌的原因。在世界范围内，大约有 3 亿慢性肝炎病毒感染者，他们中的四分之一将发展成为肝细胞癌^[1]。有病例对照研究表明，处于不同阶段的慢性乙型肝炎病毒携带者相比于正常的健康人群发生肝癌的风险增加了 6-20 倍^[2]。大量的

流行病学数据表明,乙型肝炎病毒感染聚集的区域与发生肝癌的地理分布相吻合。在乙型病毒性肝炎的流行地区,慢性乙型肝炎(Chronische hepatitis B, CHB)是当地居民发生肝细胞性肝癌的主要的危险因素,二者之间的相关性高达80%之多^[3]。乙型肝炎病毒可以通过垂直传播,即由怀孕母亲直接传给胎儿,这其中约有90%的感染者会经历一个慢性病程。在亚洲,慢性乙型肝炎病毒携带者每年的肝癌的发病率约为4%到6%^[4]。虽然有流行病学、临床医学和实验证据显示HBV与肝癌的发生有高度的相关性,提示乙肝疫苗的接种对预防肝癌的发生具有重要的临床医学意义。但是到目前为止,并没有实验结果表明HBV与肝癌的发生存在必然的因果关系。在成年人,乙型肝炎病毒相关的并发症,包括肝癌,所致的确切的死亡率的降低可能要经过几十年。但是有关台湾儿童的一些实验结果证明,通过预防接种肝癌也是可以控制的^[5]。通过10年的免疫接种计划,6-14岁儿童肝癌的发病率有了显著的降低,而且与肝癌相关的死亡率也同样的降低。慢性丙型肝炎病毒的感染也是肝癌发展的危险因素。丙型肝炎病毒通过促进纤维化和最终的肝硬化以增加肝癌的患病风险。此外,丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)与乙型肝炎病毒同时感染将大大地增加肝癌发生的危险性。因此,加大对血液、血液制品的采集、使用等环节的监管力度,可以有效地降低感染肝炎病毒的几率,降低因肝炎病毒引起的原发性肝癌的发病率,是防治肝癌比较重要的举措之一。

1.2.2 肝硬化

大多数由乙型肝炎病毒引发的肝硬化病人最终可发展成为原发性肝癌,即发生典型的肝炎、肝硬化、肝癌三部曲。尤其在我国,临床上大多数肝癌病人会有不同程度的肝硬化病变,而且这些肝硬化患者是由慢性乙型肝炎引起的。长期的肝炎病毒感染显著降低患者机体免疫力,因为不能及时清除肝脏内的肝炎病毒,引起反反复复的肝脏细胞变性坏死、结节状增生,最后成为肝硬化,产生一系列有害的临床表现。在肝细胞发生结节性增生的过程中,可以出现局灶性的腺瘤样增生,在致癌因素的作用下最终导致癌变的发生,演变为原发性肝癌。在我国,原发性肝癌主要是在乙型病毒性肝炎后肝硬化演变而来,而欧美发达国家的原发性肝癌主要原因是酒精性肝硬化。

1.2.3 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFT)是一种霉菌毒素,是由曲霉属真菌产生的。

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.