

学校编码：10384

分类号密级

学号：24520141153481UDC

廈門大學

硕士学位论文

GABPA 抑制肝细胞癌的侵袭与转移

**GABPA inhibits invasion and metastasis of Hepatocellular
Carcinoma**

张康

指导教师姓名：刘平果教授

专业名称：微生物学

论文提交日期：2017年4月

论文答辩时间：2017年5月

学位授予日期：2017年6月

答辩委员会主席：

评阅人：

2017年6月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

| | |
|-----------------------|-------|
| | 2.5cm |
| GABPA 抑制肝细胞癌的侵袭与转移 张康 | |
| 指导教师 刘平泉 | |
| 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(厦门大学附属中山医院肝胆外科)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）已经成为危害人类健康的重要杀手，其发病率在全球病例数中位于第五，而导致的死亡率居于第三位。肝癌以高转移、高复发、愈后差、死亡率高为特点，但目前对其高转移、高复发的分子机制研究的还不很清楚。最近研究表明 GABPA 的异常表达与肝癌的发生发展相关，但其生物学功能、临床病理意义及相关的分子机制仍不清楚。

在本课题中，我们用 RT-PCR、WB 的方法分别检测了临床肝细胞癌病人组织中 GABPA 的 mRNA 和蛋白表达情况，分析 GABPA 与临床病理及预后的关系。接着我们构建了 GABPA 的过表达、敲低稳转细胞系，采用 transwell、划痕等方法探讨 GABPA 的生物学功能，同时我们建立荷瘤裸鼠皮下成瘤模型进一步确认了 GABPA 在肝细胞癌中的功能。最后我们通过功能回复实验初步探讨了其潜在的分子机制。

相比于正常的肝组织，RT-PCR 和 WB 结果显示 GABPA 在肝细胞癌病人组织中表达水平下调，并且 GABPA 的下调与病人的 AFP ($P=0.001$)、分化程度 ($P=0.017$) 和远处转移 ($P=0.021$) 相关，Kaplan-Meier 生存分析显示 GABPA 的低表达与病人的短期存活率具有明显的意义 ($P=0.031$)。体外细胞实验表明过表达 GABPA 可以抑制肝癌细胞的侵袭与迁移能力，相反的抑制 GABPA 的表达可以促进肝癌细胞的侵袭和迁移，在体内荷瘤裸鼠成瘤实验中得到进一步的确认。最后我们发现 GABPA 部分通过调控 E-cadherin 来减少肝癌细胞的迁移。

总之，本研究表明 GABPA 通过部分调控 E-cadherin 抑制肝癌细胞的侵袭与转移，其可能是检测肝癌病人预后的重要标志物之一。我们的实验结果也表明了 GABPA 作为肝细胞癌预后和转移的抑制基因，有可能成为治疗原发性肝癌新的药物靶点，为肝癌的治疗提供新的思路。

关键词：肝细胞癌 GABPA 预后转移 E-cadherin

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC), one of the most important killers of human health, is the fifth in the incidence of the number of cases in the global number of malignant tumors and the third of resulting mortality rate of tumor-related death. Liver cancer is characterized by high metastatic, high recurrence, poor prognosis, and high mortality. However, the molecular mechanism of high metastatic and recurrence is still not clear. Recent Increasing evidences have clarified that abnormal expression of GABPA was associated with tumor development and progression. However, its bio-function and clinic-pathological significance in hepatocellular carcinoma (HCC) remains obscure.

In this study, we examined the expression pattern of GABPA mRNA and protein in HCC clinical specimens and cell lines using Real-time PCR and Western blot methods, respectively. Following-up data were used to uncover the relationship between GABPA expression and the prognosis of HCC patients. In addition, we established HCC cell lines that stably over-expressed and down-regulated GABPA in order to explore the bio-function of GABPA in HCC cell migration and invasion potency not only via trans-well and wound healing assays *in vitro*, but also xenograft model *in vivo*. Moreover, functional restore analysis was used to discover the potential molecular mechanisms.

We found that Real-time PCR and Western blot analysis showed that GABPA protein and mRNA expression levels were down-regulated in HCC tissues compared with corresponding adjacent normal tissues. Decreased GABPA expression was correlated with AFP level ($P=0.001$), tumor grade ($P=0.017$), distant metastasis($P=0.021$). Kaplan-Meier survival analysis showed that patients with lower GABPA expression level had significantly shorter survival time compared with those with higher GABPA ($P=0.031$). Overexpression of GABPA can inhibit the migration and invasion of HCC cells. Conversely, down regulation of GABPA can promoter the migration and invasion of HCC cells. Later, *in vivo* assays demonstrated that GABPA negatively regulated HCC cells migration and invasion ability. Finally, we additionally uncovered that GABPA induced HCC cells migration partly via regulation of E-cadherin.

Collectively, our data provide evidence that GABPA inhibits HCC cells migration potency via regulation of E-cadherin and could serve as a novel biomarker

for HCC. These results also demonstrate that GABPA may acts as a tumor suppressor during HCC progress and metastasis, could be served as a potential HCC therapeutic target, and may become a novel treatment for HCC pharmaceutical approach in the future.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, GABPA, Prognosis, Metastasis, E-cadherin

厦门大学博硕士论文摘要库

英文缩略表

| 英文缩写 | 英文全名 | 中文全名 |
|------------|---|--------------------|
| HCC | Hepatocellular Carcinoma | 肝细胞癌 |
| GABPA | GA-Binding Protein Alpha Chain | GA 结合蛋白 α 链 |
| EMT | Epithelial-mesenchymal transition | 上皮细胞间质化 |
| E-Cadherin | E-Cadherin | 钙粘蛋白 |
| EZH2 | Enhancer of Zeste Homolog2 | 组蛋白甲基转移酶 |
| RT-PCR | Real time fluorescence quantitative PCR | 实时荧光定量聚合酶链反应 |
| WB | Western blotting | 蛋白免疫印迹 |
| RNA | ribonucleic acid | 核糖核酸 |
| cDNA | complement deoxyribonucleic acid | 互补脱氧核糖核酸 |
| DNA | deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| dsDNA | double-stranded DNA | 双链 DNA |
| mRNA | messenger Ribonucleic acid | 信使 RNA |
| dNTP | deoxyribonucleoside triphosphate | 脱氧核糖三磷酸 |
| shRNA | short hairpin RNA | 短发夹 RNA |
| RNase A | Robonuclease A | 核糖核酸酶 A |
| CDS | coding sequence | 编码序列 |
| PCR | polymerase chain reaction | 聚合酶链反应 |
| E.coli | Escherichia coli | 大肠杆菌 |
| IHC | Immunohistochemistry | 免疫组织化学 |
| FBS | Fetal Bovine Serum | 胎牛血清 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | 磷酸盐缓冲液 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Media | DMEM 细胞培养基 |

英文缩略表

| | | |
|------|-----------------------------------|---------------------|
| PMSF | Phenylmethanesulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| SSC | saline sodium citrate | 柠檬酸钠缓冲液 |
| RIPA | Radio Immunoprecipitation Assay | 放射免疫沉淀分析 |
| PVDF | polyvinylidene fluoride | 聚偏二氟乙烯膜 |
| TBST | Tris-Buffered Saline and Tween 20 | TBST 洗膜液 |
| TAE | Tris-acetate-EDTA | 三羟甲基氨基甲烷-冰乙酸-乙二胺四乙酸 |
| AFP | alpha-fetoprotein | 甲胎蛋白 |
| HBV | Hepatitis B virus | 乙型肝炎病毒 |

目录

| | |
|---|-----------|
| 摘要..... | I |
| Abstract..... | II |
| 英文缩略表 | IV |
| 第一章前言 | 1 |
| 1 原发性肝癌 | 1 |
| 1.1 原发性肝癌流行病学特点..... | 1 |
| 1.2 原发性肝癌的危险因素..... | 2 |
| 1.3 原发性肝癌的诊断与治疗..... | 3 |
| 1.4 原发性肝癌发病的分子机制..... | 4 |
| 2 GA-Binding Protein Alpha Chain (GABPA) | 7 |
| 2.1 GABPA 的基本结构 | 7 |
| 2.2 GABPA 与线粒体 | 7 |
| 2.3 GABPA 与细胞分化 | 8 |
| 2.4 GABPA 与细胞周期 | 8 |
| 2.5 GABPA 与肿瘤的浸润和转移 | 8 |
| 3 本论文的研究目的、内容、意义..... | 9 |
| 第二章材料与方法 | 11 |
| 1 实验材料..... | 11 |
| 1.1 细胞株、质粒、细菌及实验动物..... | 11 |
| 1.2 主要仪器设备..... | 11 |
| 1.3 主要试剂材料..... | 13 |
| 1.4 试剂制备方法..... | 15 |
| 1.5 病理组织标本..... | 16 |
| 2 实验方法..... | 16 |
| 2.1 组织样品中 cDNA 的制备及 RT-PCR 扩增实验..... | 16 |
| 2.2 蛋白质免疫印迹..... | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3 免疫组化化学..... | 21 |
| 2.4 细胞培养..... | 22 |
| 2.5 质粒提取..... | 23 |
| 2.6 细胞系的构建..... | 25 |
| 2.7 细胞功能实验..... | 27 |
| 2.8 荧光素酶报告基因技术..... | 28 |
| 2.9 染色质免疫共沉淀..... | 29 |
| 2.10 动物实验..... | 30 |
| 2.11 统计分析方法..... | 30 |
| 第三章实验结果与分析 | 31 |
| 3.1 GABPA 在肝癌组织标本中低表达..... | 31 |
| 3.2 GABPA 表达水平与肝癌患者的转移、预后相关..... | 33 |
| 3.3 体外实验中 GABPA 抑制肝癌细胞的迁移与侵袭..... | 35 |
| 3.4 GABPA 正向调节肝癌细胞中 E-cadherin 的表达 | 40 |
| 3.5 GABPA 通过调节 E-cadherin 抑制肝癌转移 | 41 |
| 3.6 荷瘤小鼠中，敲低 GABPA 促进肝癌细胞的转移能力..... | 45 |
| 第四章讨论与展望 | 47 |
| 参考文献 | 50 |
| 致谢..... | 55 |
| 附件..... | 56 |

Table of contents

| | |
|--|-----------|
| Abstract in Chinese..... | I |
| Abstract in English | II |
| Abbreviation | IV |
| Chapter I Introduction | 1 |
| 1 Hepatocellular Carcinoma(HCC) | 1 |
| 1.1 Epidemiological characteristics of hepatocellular carcinoma..... | 1 |
| 1.2 Risk factors for hepatocellular carcinoma | 2 |
| 1.3 Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma | 3 |
| 1.4 Molecular Mechanism of Pathogenesis of HCC..... | 4 |
| 2 GA-Binding Protein Alpha Chain (GABPA) | 7 |
| 2.1 The basic structure of GABPA..... | 7 |
| 2.2 Effects of GABPA on mitochondria..... | 7 |
| 2.3 Effects of GABPA on cell differentiation | 8 |
| 2.4 Effects of GABPA on cell cycle..... | 8 |
| 2.5 Effects of GABPA on tumor invasion and metastasis..... | 8 |
| 3 The purpose, content and significance of this study..... | 9 |
| Chapter II Materials and Methods | 11 |
| 1 Experimental Materials | 11 |
| 1.1 Cell lines, plasmids, bacteria and experimental animals | 11 |
| 1.2 The main equipment | 11 |
| 1.3 The main reagent materials | 13 |
| 1.4 Preparation of reagents | 15 |
| 1.5 Pathological tissue specimens..... | 16 |
| 2 Experimental Method | 16 |
| 2.1 Preparation of cDNA in Tissue Samples and RT-PCR Experiment..... | 16 |
| 2.2 Protein immunoblot assay..... | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3 Immunohistochemistry | 21 |
| 2.4 Cell culture experiments | 22 |
| 2.5 Plasmid extraction..... | 23 |
| 2.6 Construction of cell lines | 25 |
| 2.7 Cell function test | 27 |
| 2.8 Luciferase reporter gene technology..... | 28 |
| 2.9 ChIP | 29 |
| 2.10 Animal experiment..... | 30 |
| 2.11 Statistical analysis method | 30 |
| Chapter III Experimental Results and Analysis | 31 |
| 3.1 GABPA is down-regulated in human HCC tissues | 31 |
| 3.2 GABPA was correlated with the metastasis and prognosis of HCC patients | 33 |
| 3.3 GABPA inhibits the migration and invasion of HCC cells in vitro..... | 35 |
| 3.4 GABPA regulates the expression of E-cadherin in HCC cells | 40 |
| 3.5 GABPA inhibits HCC cells metastasis via regulation of E-cadherin | 41 |
| 3.6 Knock down GABPA enhances HCC metastasis in vivo | 45 |
| Chapter IV Discussion and Prospect | 47 |
| References | 50 |
| Acknowledgement | 55 |
| Appendix..... | 56 |

第一章前言

1 原发性肝癌

1.1 原发性肝癌流行病学特点

肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）简称肝癌，已经成为危害人类健康的重要杀手，其发病率在全球病例数中位于第五，而导致的死亡率居于第三位^[1]。我国是癌症的高发地区，其中肝癌在我国的发病人数和死亡人数约占全球的55%，肝癌已经成为我国主要的恶性肿瘤之一，死亡率仅次于肺癌、胃癌，位居第三^[2]。从全球范围内来看，肝癌的发病率、死亡率有明显的地区差别，其中80%左右的肝癌患者来于非洲和亚洲。在我国，肝癌发病率和死亡率的高发区主要分布在沿海城市，以东南沿海最为严重，如福建、浙江、江苏、上海、江西、广西等。这些地区的发病率较高有可能和当地的饮食文化、生活习惯以及气候相关。在我国农村地区的发病率要比城市高，可能和农村的抽烟率普遍高于城市有一定的关系。这种地区差异（农村和城市）同样体现在得病死亡率和五年生存率中，这有可能和农村地区的医疗资源有限、癌症护理水平低，以及很多患者在被诊断出癌症时已于癌症晚期有关^[2]。肝癌的发病率不仅地区有差异，而且在性别中也有很大的差异，报告显示2000-2011年中，男性的癌症发病率和死亡率整体高于女性，可能和男性的一些不良习惯和压力有关。

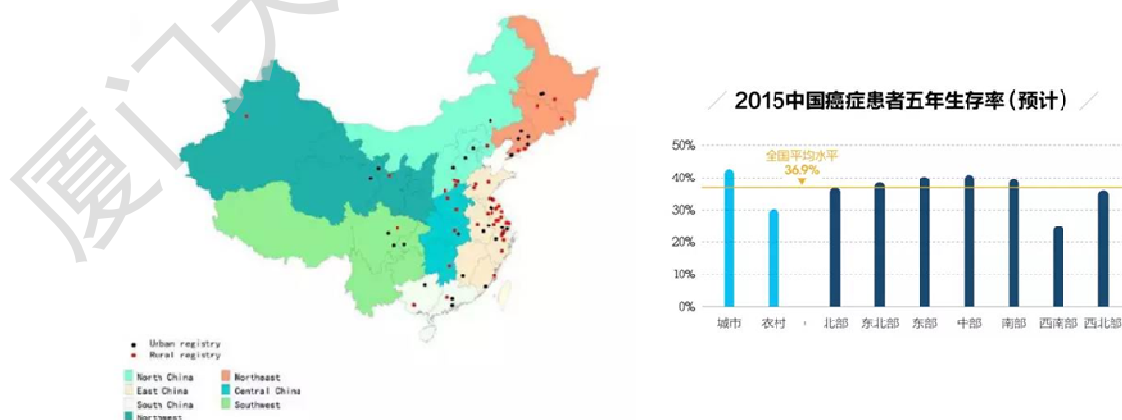


图 1-1 肝癌发病率的中国区域差异^[2]

Figure 1-1 Liver Cancer Incidence Rates by China Area^[2]

1.2 原发性肝癌的危险因素

肝癌（肝脏恶性肿瘤）根据来源不同可分为两类：原发性肝癌（Primary liver cancer）和继发性肝癌。原发性肝癌，大多来源于肝脏上皮，是我国常见的高发并且危害性很大的恶性肿瘤之一，而继发性（转移性）肝癌，来源于其他器官（胆道、肺、子宫、结直肠等）的恶性肿瘤转移到肝脏。其中原发性肝癌又可以分为三大类：肝细胞癌（Hepatocellular Carcinoma, HCC）、胆管细胞性肝癌和混合性肝癌，在我国肝细胞癌是最常见的类型，比例达到原发性肝癌的 90%。

肝癌的发生是一个复杂漫长的过程，是多诱因、多基因参与、多种步骤调控的结果，同时受到外部环境、自身免疫、社会等多种因素的影响^[3-5]。根据国内外统计调查和流行病学分析，肝癌的发生和以下因素有很大的关系。

(1) 病毒性肝炎

病毒性肝炎是一种危害极大的传染病，由多种不同的肝炎病毒引起，包括甲型、乙型、丙型和丁型等类型。在全球范围内，甲型（Hepatitis A virus, HAV）不可以导致肝癌的发生，乙型、丙型和丁型肝炎都与肝癌的发生发展有密切的相关性。其中，最常见的是乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）和丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）。在世界范围内，慢性乙肝病毒感染者占人口总数的比例大约为 5%，其中 25%的人群到后期会变成肝癌^[6,7]。在亚洲，携带有乙肝病毒的患者其发病率约为 5%^[8,9]。据调查研究发现，乙肝病毒携带者与乙肝患者比正常人群的肝癌发生率高 2-100 倍^[10]。乙肝的流行病分布和原发性肝癌的地区分布具有相关性，肝癌高发地区一般也是乙肝高发区，在有的地区 80%的肝癌患者都是乙肝携带者或乙肝患者^[11]。丙型肝炎病毒感染的肝癌发生率和认知率在发展中国家远低于乙肝，据世界范围内统计急性感染 HCV 后自发性痊愈大约在 20%-25%，进一步发展为慢性感染后有 20%的概率转为肝硬化，最后会以每年 1%-4%的概率发展为肝细胞癌^[12]。此外，在此期间大量饮酒、合并 HIV 或 HBV 感染将进一步加快疾病的进展，提高肝细胞癌的发病风险。但由于丙肝的感染症状不如乙肝明显，所以丙型肝炎病毒感染者的检出率比较低。

(2) 黄曲霉素

黄曲霉毒素（AFT）是二氢呋喃香豆素的衍生物，一种次生代谢产物，分布十分广泛，特别是污染的花生、发霉的玉米、稻米、小麦等一些粮油产品

水产品中。黄曲霉素是在已知的霉菌毒素中毒性最强的，对人类具有很强的致癌效果的一种霉菌毒素，目前已被 WHO 列为 1 类致癌物质^[13]。研究表明，黄曲霉素进入机体后会大量聚集在肝脏，破坏肝脏组织导致肝功能下降甚至导致肝癌和死亡，从而降低机体的免疫能力，增加有害微生物的感染几率。在分子层面上，则形成一种化合物结合到 DNA 上，干扰 DNA 和 RNA 的合成，导致抑癌基因的表达受阻或者发生突变(如 P53)，进而影响下游相关蛋白质的表达和细胞代谢，最终导致机体生理功能紊乱^[14]。黄曲霉素中以黄曲霉素 B1 的毒性最强，其进入人体后在肝脏转为 B1，当达到一定量后引起肝脏癌变。上海的一个动物实验表明黄曲霉素和其他致病因素如乙型肝炎病毒具有协同作用，共同感染小鼠后可使肝癌发生率增加 59 倍^[15]。因此，在平时的饮食习惯中要特别注意黄曲霉素。

(3) 饮食习惯

随着人们生活水平的提高、社会压力的增大，我国肥胖人数呈逐年增长的趋势，伴随而来的酒精肝和脂肪肝等一些富贵病也逐年增加。脂肪肝是一种病理现象，是由于一系列原因导致的脂肪堆积，但目前已成为我国的第二大肝脏疾病。据我国医师协会发布的数据分析，我国一线城市的非酒精性脂肪肝大约在 25% 左右，其中 60%-94% 的重度肥胖者都得有脂肪肝。然而脂肪肝发展为肝纤维化和肝硬化的概率为 30% 左右，以此推算我国未来大约有 600 万的脂肪肝变肝纤维化和肝硬化患者。

据调查显示，酒精性肝病也成为我国不能忽视的一个现象。2011 年的数据显示，我国大约有 5000 万左右酒精性肝病患者。目前已有研究表明长期饮酒是肝癌发生的危险因素，酒精进入肝脏引起肝脏代谢紊乱，导致脂肪堆积，从而引起脂肪肝，长期大量饮酒就会产生酒精性肝纤维化和肝硬化。但是少量饮酒是否和肝癌相关并没有研究报道。

(4) 其他因素

受到污染的饮水也是肝癌发生的诱导因素之一；一些致癌的化学物质，一般以 N-亚硝基化合物为主，另外还有一些农药、黄樟素等；丰富的营养或者缺乏一些微量元素也可以诱发肝癌；遗传和自身免疫缺陷也是诱导肝癌的重要因素。

1.3 原发性肝癌的诊断与治疗

肝癌的诊断分为两类：病理学诊以及临床诊断，其具体方法有以下几种：

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts 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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库