

学校编码：10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号：21620101152415

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

组蛋白乙酰转移酶 GCN5 在肝癌发生发展中的  
作用研究

The role of histone acetyltransferase GCN5 in human  
hepatocellular carcinoma development

刘坤

指导教师姓名：俞春东 教授

专业名称：细胞生物学

论文提交日期：2013 年 6 月

论文答辩时间：2013 年 6 月

学位授予日期：2013 年 月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2013 年 6 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



目 录

目 录.....	I
摘 要.....	1
Abstract.....	2
第一章 前 言.....	3
1.1 真核生物的染色质结构.....	3
1.2 表观遗传学与肿瘤.....	4
1.2.1 DNA 甲基化.....	5
1.2.2 组蛋白修饰.....	6
1.2.3 非编码 RNA 调控.....	7
1.3 GCN5 概述.....	9
1.3.1 GCN5 与肿瘤.....	10
1.3.2 GCN5 结构.....	10
1.3.3 GCN5 在肿瘤中分子机制.....	11
1.4 AIB1 概述.....	12
1.4.1 AIB1 的结构.....	12
1.4.2 AIB1 与肿瘤.....	13
1.4.3 AIB1 功能分子机制.....	14
1.5 PCNA 概述.....	17
1.6 细胞周期调控.....	18
1.6.1 细胞周期蛋白.....	18
1.6.2 细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 (Cyclin-dependent kinase, CDK) ...	18
1.6.3 周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制物.....	19
1.7 立题背景.....	20
第二章 材料与方 法.....	22
2.1 材 料.....	22

2.1.1 菌株、细胞和质粒.....	22
2.1.2 主要试剂.....	22
2.1.3 主要仪器.....	24
<b>2.2 方法: .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 质粒构建.....	24
2.2.2 琼脂糖电泳分离 DNA.....	25
2.2.3 质粒胶回收.....	25
2.2.4 大肠杆菌感受态制备.....	25
2.2.5 DNA 转化.....	26
2.2.6 质粒小提鉴定煮沸法.....	26
2.2.7 质粒中提 (Qiagen-tip 100) .....	28
2.2.8 蛋白样品收集.....	29
2.2.9 蛋白浓度测定.....	29
2.2.10 蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳以及 Western blotting 分析 .....	29
2.2.11 RNA 提取 .....	31
2.2.12 CDNA 合成.....	31
2.2.13 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) .....	32
2.2.14 细胞培养.....	32
2.2.15 细胞瞬时转染 Lipofectamine 2000 .....	33
2.2.16 细胞瞬时转染 (PEI) .....	34
2.2.17 siRNA 细胞转染 .....	34
2.2.18 蛋白质半衰期检测 (以 6 孔板为例) .....	35
2.2.19 MTT 测细胞生长 .....	35
<b>第三章 结果与讨论.....</b>	<b>36</b>
3.1 人肝癌样品中 GCN5 与 PCNA 广泛过表达 .....	36
3.2 人肝癌样品中 GCN5 与 PCNA 的表达存在正相关性 .....	39
3.3 人肝癌样品中 GCN5 的 mRNA 水平显著上调 .....	40
3.4 GCN5 在人肝癌细胞系中广泛过表达 .....	42
3.5 GCN5 下调会降低 PCNA 的表达水平 .....	42



---

3.6 GCN5 下调能够抑制肝癌细胞的生长 .....	43
3.7 人肝癌样品中 AIB1 与 GCN5 的蛋白表达不存在相关性 .....	45
3.8 AIB1 的下调会增强 GCN5 的表达水平.....	45
3.9 AIB1 的稳定沉默增加 GCN5 的表达水平.....	46
3.10 AIB1 的过表达降低 GCN5 的表达水平.....	47
3.11 AIB1 不影响 GCN5 的 mRNA 水平.....	48
3.12 AIB1 影响 GCN5 的半衰期.....	50
3.13 HBX 不影响 GCN5 的表达.....	51
3.14 讨论与分析 .....	52
参考文献.....	54
致 谢.....	59

**CONTENTS**

**Abstract(In Chinese) ..... 1**

**Abstract(In English)..... 2**

**Introduction ..... 3**

**1.1 Chromosome structure ..... 3**

**1.2 Epigenetics and tumor ..... 4**

        1.2.1 DNA methylation ..... 5

        1.2.2 Histone modification ..... 6

        1.2.3 Non-coding RNA modification ..... 7

**1.3 GCN5..... 9**

        1.3.1 GCN5 and tumor ..... 10

        1.3.2 GCN5 structure ..... 10

        1.3.3 GCN5 mechanism ..... 11

**1.4 AIB1..... 12**

        1.4.1 AIB1 structure ..... 12

        1.4.2 AIB1 and tumor ..... 13

        1.4.3 AIB1 mechanism ..... 15

**1.5 PCNA ..... 17**

**1.6 Cell cycle regulation..... 17**

        1.6.1 Cyclin ..... 17

        1.6.2 CDK ..... 18

        1.6.3 CDKI ..... 18

**1.7 Background of this thesis ..... 19**

**Material and methods ..... 21**

**2.1 Material..... 21**

        2.1.1 Strain, cell and plasmid ..... 21

2.1.2 Reagents.....	21
2.1.3 Equipments .....	23
<b>2.2 Methods: .....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Plasmid construct.....	23
2.2.2 DNA separation.....	24
2.2.3 Plasmid recovery.....	24
2.2.4 Preparation of competent cell .....	24
2.2.5 Plasmid transformation .....	25
2.2.6 Small-scale plasmid extraction .....	25
2.2.7 Medium-scale plasmid extraction (Qiagen-tip 100) .....	27
2.2.8 Preparation of protein samples .....	28
2.2.9 Measurement of protein concentration .....	28
2.2.10 SDS-PAGE and Western blotting analysis.....	28
2.2.11 RNA extraction.....	30
2.2.12 Reverse transcription .....	30
2.2.13 Real-time PCR.....	31
2.2.14 Cell culture .....	32
2.2.15 Cell transient transfection(Lipofectamine 2000) .....	32
2.2.16 Cell transient transfection (PEI) .....	33
2.2.17 siRNA transfection.....	33
2.2.18 Half-life of protein measurement.....	34
2.2.19 Cell proliferation assay .....	34
<b>Results and discussion.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 GCN5 and PCNA were frequently overexpressed in human HCCs.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 GCN5 expression was positively correlated with PCNA expression in human HCCs .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 GCN5 mRNA level was higher in human HCCs.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 GCN5 was overexpressed in HCC cell lines .....</b>	<b>41</b>
<b>3.5 Knockdown of GCN5 reduced PCNA expression level .....</b>	<b>41</b>

<b>3.6 Knockdown of GCN5 suppressed cell proliferation .....</b>	<b>42</b>
<b>3.7 AIB1 expression was not correlated with GCN5 in human HCCs.....</b>	<b>44</b>
<b>3.8 Knockdown of AIB1 increased GCN5 expression .....</b>	<b>44</b>
<b>3.9 Stable down-regulation of AIB1 increased GCN5 expression.....</b>	<b>44</b>
<b>3.10 Overexpression of AIB1 decreased GCN5 expression .....</b>	<b>46</b>
<b>3.11 AIB1 did not affect GCN5 mRNA level.....</b>	<b>47</b>
<b>3.12 AIB1 affected half-life of GCN5 .....</b>	<b>49</b>
<b>3.13 HBX did not affect GCN5 expression .....</b>	<b>51</b>
<b>3.14 Discussion .....</b>	<b>51</b>
<b>References .....</b>	<b>53</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>60</b>

## 摘要

GCN5 是第一个在酵母中被发现的组蛋白乙酰转移酶，它引起的赖氨酸位点的乙酰化能使组蛋白与 DNA 的结合减弱，有利于起始基因转录。有研究发现 GCN5 在乳腺癌和前列腺癌中表达异常，但是它在肝癌中的分子机制还不是很清楚。在本文中我们发现 GCN5 在人肝癌病人组织样品中蛋白水平和 mRNA 水平都出现了高表达，而且与细胞核增殖抗原 PCNA 的表达具有显著的相关性。通过 siRNA 干扰技术下调 GCN5 表达，MTT 结果显示 GCN5 的下调显著性抑制了细胞的增殖。另外有文献报告称有报道 AIB1 在在大约 70% 的人类肝癌组织中过表达，并通过增强肝癌细胞的增殖和侵袭能力来促进肝癌的发展；乳腺癌扩增性抗原 1 AIB1 可以通过募集 GCN5 来促进视黄酸受体信号通路。为了探究 AIB1 与 GCN5 之间的关系，我们构建了 AIB1 稳定沉默和稳定过表达质粒。结果发现 AIB1 的下调可以增加 GCN5 的表达，而 AIB1 的上调可以降低 GCN5 的表达。但是 RT-PCR 结果显示，GCN5 的 mRNA 水平在不同细胞系中没有差别。AIB1 的过表达能够加速 GCN5 的降解，缩短了 GCN5 的半衰期长度。我们的结果也为肝癌发生的分子机制提供了新的理论依据和治疗靶点。

关键词：GCN5；AIB1；细胞增殖

## Abstract

GCN5 is the first histone acetyltransferase identified from yeast. Acetylated Lysine can weaken interaction between histone and DNA, and then increase gene transcription. Studies have shown that GCN5 is deregulated in breast cancer and prostate cancer. However, its involvement in human hepatocellular carcinoma (HCC) progression remains unclear. In our study, we found that GCN5 is overexpressed in most of HCC samples in both protein level and mRNA level. And also a positive correlation between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein level and GCN5 protein level was established in HCC specimens, suggesting that GCN5 contributes to HCC cell proliferation. MTT assays elucidated that down-regulation of GCN5 can retard cell growth. It is reported that AIB1 is overexpressed in 70% HCC samples, also AIB1 can promote retinoid acid receptor via recruiting GCN5. In order to investigate the reaction between AIB1 and GCN5, we constructed AIB1 stable cell lines. Results demonstrated that down-regulation of AIB1 enhanced GCN5 expression while up-regulation of AIB1 reduced GCN5 level. But GCN5 mRNA level in these cell lines did not change dramatically. And we found AIB1 can shorten half-life of GCN5. This study can help us further investigate mechanism of liver cancer.

Key words: GCN5; AIB1; Cell proliferation

## 第一章 前言

### 1.1 真核生物的染色质结构

染色质是真核生物遗传信息的载体<sup>[1-2]</sup>，染色质的基本化学成分为脱氧核糖核酸核蛋白，它是一种由 DNA、组蛋白、非组蛋白和少量 RNA 组成的复合物<sup>[3]</sup>。染色体结构的最基本单位是核小体<sup>[4]</sup>。核小体的核心是由 4 种组蛋白(H2A、H2B、H3 和 H4) 各两个分子构成的扁球状 8 聚体<sup>[5]</sup>。

染色体的一级结构：脱氧核糖核酸双螺旋依次在每个组蛋白 8 聚体分子的表面盘绕约 1.75 圈，其长度相当于 140 个碱基对。组蛋白 8 聚体与其表面上盘绕的脱氧核糖核酸分子共同构成核小体。在相邻的两个核小体之间，有长约 50~60 个碱基对的脱氧核糖核酸连接线。在相邻的连接线之间结合着一个第 5 种组蛋白 (H1) 的分子。密集成串的核小体形成了核质中的 100 埃左右的纤维。在这里，脱氧核糖核酸分子大约被压缩了 7 倍<sup>[6]</sup>。

染色体的二级结构：染色体的一级结构经螺旋化形成中空的线状体，称为螺线体或核丝，这是染色体的“二级结构”，其外径约 300 埃，内径 100 埃，相邻螺旋间距为 110 埃。螺丝体的每一周螺旋包括 6 个核小体，因此脱氧核糖核酸的长度在这个等级上又被再压缩了 6 倍。

染色体的三级结构：300 埃左右的螺线体再进一步螺旋化，形成直径为 0.4  $\mu\text{m}$  的筒状体，称为超螺旋体。这就是染色体的“三级结构”。到这里，脱氧核糖核酸又再被压缩了 40 倍。

染色体的四级结构：超螺旋体进一步折叠盘绕后，形成染色单体—染色体的“四级结构”。两条染色单体组成一条染色体。到这里，脱氧核糖核酸的长度又再被压缩了 5 倍。从染色体的一级结构到四级结构，脱氧核糖核酸分子一共被压缩了  $7 \times 6 \times 40 \times 5 = 8400$  倍<sup>[7]</sup>。

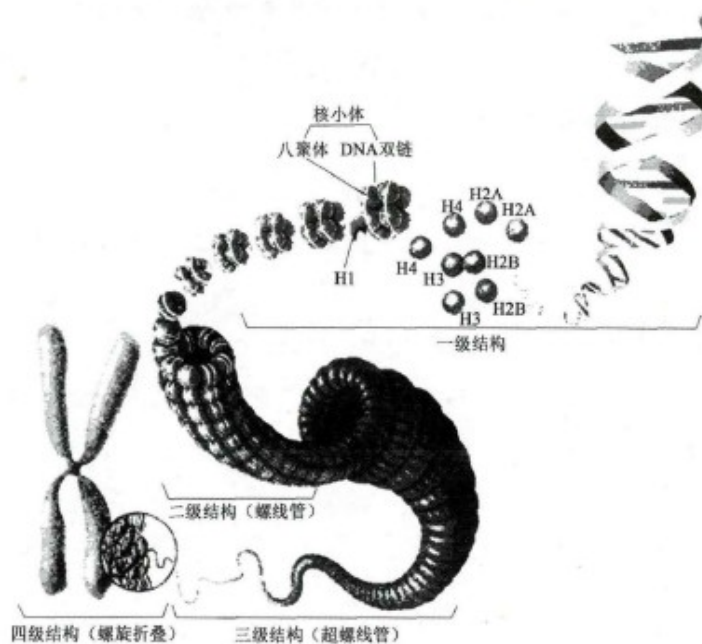


图 1.1 染色体结构示意图，引自 Luger et al., 1997<sup>[6]</sup>

Figure 1.1 Structure of chromosome

## 1.2 表观遗传学与肿瘤

表观遗传，是指在 DNA 序列不发生改变的情况下，生物的表型或基因表达发生了稳定的可遗传变化。即指亲代细胞在有丝分裂时，有能力把自己的一整套基因表达程序传递给子代细胞<sup>[8]</sup>。在生命发生过程中起着极其重要的作用。这一现象的最典型例子就是在生物体发育时的细胞命运决定。在形态发生过程中，一个全能干细胞分化形成多种多能干细胞系并进一步分化形成各种完全分化的细胞，很大程度上是通过各种表观修饰，激活一些基因的表达同时抑制另外一些基因表达而完成的。主要包括 DNA 甲基化，组蛋白共价修饰，染色体重塑，基因沉默和 RNA 编辑等调控机<sup>[9]</sup>。

表观遗传学的特点：可遗传的，即这类改变通过有丝分裂或减数分裂，能在细胞或个体世代间遗传；可逆性的基因表达调节，也有较少的学者描述为基因活性或功能的改变；没有 DNA 序列的改变或不能用 DNA 序列变化来解释。表观



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫