分类号_____ 密级_____

U D C_____ 编号_____

中 南 大 学

CENTRAL SOUTH UNIVERSITY

硕 士 学 位 论 文

论 文 题 目 HnRNP A1、CYP2A6 及肝癌相关性的体外研究

学 科 专 业 药 理 学（临床药理学）

研 究 生 姓 名 王亦男

指 导 教 师 周宏灏 教授

分类号_____ 密级_____

硕士学位论文

HnRNP A1、CYP2A6 及肝癌相关性的体外研究

The relationships among hnRNP A1, CYP2A6 and hepatoma in vitro

作 者 姓 名： 王亦男

学 科 专 业： 临床药理学

学院（系、所）：临床药理研究所

指 导 教 师： 周宏灏 教授

论文答辩日期_____ 答辩委员会主席_____

中 南 大 学

2008 年 5 月

摘 要

背景： CYP2A6是药物代谢酶P450家族中的重要成员，约有3%的药物以及外源性物质经过其代谢，同时它的活性能够被许多内源性和外源性物质诱导。HnRNP A1作为核不均一核糖核蛋白家族的重要成员之一，对于部分mRNA的转录后水平有重要的调节作用。目前有研究报道hnRNP A1蛋白能够与CYP2A6 mRNA序列中的特殊区域结合，从而影响mRNA的表达。进一步的研究发现，在多种肿瘤组织中，hnRNP A1以及CYP2A6的表达都是明显增高的。

目的：本研究的目的在于探寻hnRNP A1, CYP2A6以及肝癌疾病三者之间是否存在某种潜在联系，并且比较在肝癌组织与正常肝脏组织中hnRNP A1和CYP2A6的表达是否存在差异。最后验证hnRNP A1蛋白对CYP2A6的表达所产生的影响程度。

方法： 在本研究中，我们收集了22例肝脏组织，其中包括11例肝癌组织和11例正常对照组织标本。采用realtime PCR的方法定量mRNA水平，western blotting的方法来定量蛋白水平。通过RNA干扰技术沉没掉hepG2细胞中的hnRNP A1基因，再分别测定hnRNP A1及CYP2A6蛋白表达水平。

结果: 通过比较癌症组与对照组之间hnRNP A1以及CYP2A6的mRNA水平，发现在癌症组中两者的表达都明显增高，其中hnRNP A1的表达P=0.002, CYP2A6的表达P=0.004。在蛋白表达水平上也出现了同样的现象，两种蛋白的表达在癌症组织中也同样增高（hnRNP A1的表达P=0.003, CYP2A6的表达P=0.002）。

相关性分析显示，在肝癌组中，hnRNP A1与CYP2A6在mRNA（P=0.013）以及蛋白水平（P=0.006）均存在显著的潜在相关性，并且hnRNP A1蛋白的表达以及CYP2A6 mRNA的表达水平之间也潜在相关。

RNA干扰的结果表明在hepG2细胞中，当hnRNP A1基因被沉默后，CYP2A6的蛋白表达水平有一定程度的下降但是没有达到统计学意义。

结论： 与对照组相比，hnRNP A1与CYP2A6在肝癌组中mRNA以及蛋白两个水平的表达都明显增高。并且在肝癌组中，两者之间存在显著的潜在相关性，而在正常对照组中这种相关性并不明显。进一步的实验证实在hepG2细胞中hnRNP A1蛋白对于CYP2A6蛋白的表达水平有所影响但不是关键的影响因素。

关键词：hnRNP A1；CYP2A6；肝癌；RNAi；体外

ABSTRACT

BACKGROUND: CYP2A6 is an important drug enzyme that can be induced by many endogenous and exogenous subtances. hnRNP A1 can play an crucial role in post-transcription regulation of some mRNAs. Rencently scientists had found out that hnRNP A1 can bound to CYP2A6 mRNA through some specific domains, then regulate the expression of mRNA. In many tumors, the expressions of hnRNP A1 and CYP2A6 were higher than normal ones. The aims of this study were to investigate the relationships among the expressions of CYP2A6, hnRNP A1 and hepatoma. The relationships would be described in mRNA level and protein expression level. In the same time, the expressions of hnRNP A1 and CYP2A6 in hepatoma tissues should be compared with normal liver tissues. And we could consider if there had any distinct between the expressions.

AIM: The objectives of current study were to investigate the relationships among CYP2A6, hnRNP A1 and hepatoma, and to find out the distinct expressions of hnRNP A1 and CYP2A6 in control and hepatoma tissues. Then try to find if hnRNP A1 protein should be a critical factor to influencing the expressiong of CYP2A6.

METHODS: 22 liver tissues were collected (11 hepatoma tissues, and 11 control ones). The mRNA levels were detected by realtime PCR, and the protein levels were quantitated by western blotting. We used RNAi to make hnRNP A1 gene silencing, then detected the protein expression of CYP2A6.

RESULT: Compared hepatoma tissues with control ones, the mRNA expressions of hnRNP A1 and CYP2A6 were much higher ($p=0.002$). The same situation was in protein level ($p=0.002$). We analyzed the relationship between hnRNP A1 and CYP2A6, there had no significant relationships between them both in mRNA and protein level in control liver tissues, but in hepatoma tissues, potential positive relationships were found ($p=0.003$ in mRNA level, and $p=0.002$ in protein level). After correlationship analysis, potential positive relationships between hnRNP A1 and CYP2A6 had been found in hepatoma ($p=0.013$ in mRNA level, $p=0.006$ and in protein level), this kind of relationship also presented between hnRNP A1 protein expression and CYP2A6 mRNA expression ($p=0.021$). But in control liver tissues, no exact relationships had been found.

CONCLUSION: The expressions of hnRNP A1 and CYP2A6 are significantly higher in hepatoma tissues than in control ones both in mRNA and protein levels. There

had no evident relationship between hnRNP A1 and CYP2A6 in control liver tissues. But in hepatoma, the positive relationship between hnRNP A1 and CYP 2A6 was showed. And further study showed that hnRNP A1 protein was not a critical factor to influence the expression of CYP2A6 in hepG2 cells.

KEY WORDS: hnRNP A1; CYP2A6; hapatoma; RNAi; *in vitro*

符号说明

CYP 450 : Cytochrome P540

hnRNP : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

UTR: untranslated region

RNAi: RNA interference

siRNA: small interfering RNA

目 录

第一章　前　言 **1**

第二章　实验材料、方法与步骤 **4**

2.1 血标本和肝脏标本来源： 4
2.2. 材料和仪器： 4
2.3 肝脏组织总 RNA 的提取、逆转录： 5
2.3.1 相关试剂的配制： 5
2.3.2 肝脏组织总 RNA 的提取： 5
2.3.3 逆转录： 6
2.3.4 凝胶纯化： 6
2.4 REAL-TIME PCR 的操作和数据提取： 7
2.5 肝组织总蛋白的提取： 10
2.5.1 相关试剂的配制： 10
2.5.2 蛋白提取： 11
2.5.3 蛋白浓度测定： 11
2.5.4 Western-blot 步骤： 12
2.6 2%琼脂糖凝胶的制备： 13
2.7 HEPG2 细胞培养： 13
2.8 瞬时 RNA 干扰： 14
2.9 数据处理和统计学分析： 15

第三章　实验结果 **16**

3.1 人类肝脏组织中 HNRNP A1 及 CYP2A6 MRNA 表达量存在差异 16
3.2 人类肝脏组织中 HNRNP A1 以及 CYP2A6 蛋白表达量存在差异 16
3.3 人类肝癌标本中 HNRNP A1 与 CYP2A6 的表达的相关性 16
3.4 RNA 干扰对 HNRNP A1 及 CYP2A6 蛋白表达水平的影响 16

第四章　讨　论 **29**

第五章　结　论 **31**

参考文献 **32**

综　　述 **36**

致　　谢 **46**

攻读学位期间主要的研究成果 **47**

第一章 前 言

CYP2A6位于第19号染色体长臂1区2亚带，包含有9个外显子，是细胞色素酶P450家族中的重要成员之一，完成整个CYP450家族代谢任务的约3%。许多外源性物质包括药物（例如香豆素、丙戊烷、氟烷等）、前致癌原（如亚硝胺、尼古丁、黄曲霉素B1等）以及其他一些化学物质都通过CYP2A6进行生物转化。同时，CYP2A6也是尼古丁的主要代谢酶[1]。众所周知，尼古丁是一类严重危害人类健康的化学物质，它能够诱发心血管系统，呼吸系统疾病以及肿瘤疾病[2, 3]。此外，在体内，70~80%的香豆素都是通过CYP2A6代谢成为7羟香豆素，因此，香豆素也被作为时CYP2A6酶活性测定的一个有效的探针药[4]。

由于CYP2A6在药理学以及毒理学上的重要作用，引起了较为广泛的关注。最初的研究着手于CYP2A6的基因型和表型与临床疾病之间的关系上。CYP2A6基因突变导致CYP2A6酶活性的降低与多种肿瘤疾病存在负相关，例如肺癌[5, 6]、结肠癌[7]、胰腺癌[8]、鼻咽癌[9]等等。而影响CYP2A6酶活性的因素多种多样，年龄、性别[25]、遗传因素[10], 药物诱导作用[11,12], 环境中的化学物质[13,14]等等都能对CYP2A6的活性产生影响。最近的研究发现核不均一核糖核蛋白A1（hnRNP A1）在转录后水平对CYP2A6的表达起到了重要的调节作用。

核不均一核糖核蛋白（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein，hnRNP）是一个蛋白超家族，包含有20多种蛋白，分别从A1命名至U。hnRNPs家族分布极为广泛，不仅在脊髓动物各组织器官中表达丰富，在其他的物种中例如植物、酵母中也存在[26]。此外，hnRNPs在不同的组织器官中表达不同，代谢旺盛的组织中表达相对较高，例如肺、脑等；即使同一组织器官，在不同的生命周期中hnRNPs表达的种类和水平也有较大的差异[27]。核不均一核糖核蛋白A1（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1，hnRNP A1）是核不均一核糖核蛋白家族的重要成员之一，hnRNP A1基因位于第12号染色体长臂1区3带1亚带，编码371个氨基酸，hnRNP A1蛋白分布极为广泛，人体肺、脑、肝、肾等组织器官中均有分布。

hnRNP A1主要分布在细胞核区，其结构主要包含了2个位于氨基端的RNA结合区（RBD I和RBD II）以及位于羧基端的一个富含甘氨酸的结构区域（见图1.1）。两个RNA结合区域能形成茎环结构，是与前体mRNA的3’非编码区结合的重要部位；而富含甘氨酸的结构区域在功能上类似于核定位系统。hnRNP A1能够自由穿梭与细胞质与细胞核之间，它能够与多种基因的前体mRNA相结合形成蛋白－mRNA复合体，帮助前体mRNA通过核孔复合体，并且屏蔽细胞内RNA酶对mRNA的攻击作用。在细胞质中，hnRNP A1还能与其他蛋白如RNA多聚酶II等一起完成对前体mRNA 的剪切加工以及修饰，然后与之解理再返回到细胞核中准备参与下一轮的转运[15]。

目前多个研究表明hnRNP A1蛋白与多种肿瘤疾病的发生、发展密切相关。Xu等

研究发现hnRNP A1在少突神经胶质细胞瘤、慢性髓细胞性白血病的表达是增高的[17]。Iervolino等研究表明hnRNP A1蛋白正常功能的改变导致了变异细胞集落的形成以及肿瘤的发生，另外一部分原因是hnRNP A1蛋白促使了抗细胞凋亡因子Bcl-xL的下调[15]。Irene等对32个肺癌患者活检得到的16种细胞株进行比较，发现在所有的细胞株中，包括小细胞癌和非小细胞癌，hnRNP A1蛋白的表达均存在差异，小细胞癌株中hnRNP A1平均mRNA的表达量比非小细胞癌株高4.3倍，其中以H69，H82以及H510细胞表达量最高。此外，一项对30个结肠癌癌组织的研究发现，hnRNP A1表达量比其自身正常结肠组织高2倍以上的占60%左右，同时其表达量也与结肠癌的临床病理分期密切相关，II、III、IV期结肠癌患者中hnRNP A1表达量增加的百分比分别为78%、64%和40%[16]。Brockstedt等研究结果显示hnRNP A1蛋白也是与伯基特淋巴瘤脱噬作用密切相关的12种蛋白之一，所谓脱噬作用即细胞调亡，是控制淋巴细胞生长与分化的必要过程[18]。此外hnRNP A1蛋白与慢性粒细胞白血病之间的相关性得倒了比较系统的研究。HnRNP A1蛋白的稳定性能够被p210 BCR/ABL融合基因通过表达量和酶依赖性诱导升高。并且hnRNP A1蛋白在慢性粒细胞白血病急性发作期的粒细胞中的表达水平比慢性期明显增高[15，19]。慢性粒细胞白血病急性发作时，其粒细胞中的BCR/ABL融合基因表达显著增高，从而诱导hnRNP A1蛋白的表达增高，hnRNP A1蛋白通过与抗细胞凋亡因子BCL-XL和SET的mRNA结合，稳定mRNA免受mRNA酶的攻击，从而使从细胞核转运到细胞质中的mRNA水平增高，进一步使BCL-XL和SET蛋白表达水平增高，而其中SET水平的增高抑制了蛋白磷酸酶2A生理抑制剂（PP2A）的活性，最终诱导细胞增殖，并抑制凋亡[15，19]。这些研究都证实hnRNP A1蛋白在多种肿瘤疾病的发生发展过程中起到了重要的作用。

既然CYP2A6与hnRNP A1在多种相同的肿瘤疾病中都发挥了各自的作用，那么这两者之间是否存在某种关联呢？首先Glisovic等人发现能够结合hnRNP A1蛋白的小鼠CYP2a5 mRNA的3’-UTR端存在有特征性的顺势作用序列即AG碱基串联重复序列。随后Gilmore等人在实验中比对了跟小鼠CYP2a5基因高度同源的人类CYP2A6基因，结果发现两者的3’-UTR区相似度达到了41%，其中也存在AG碱基串联重复序列称之为Block I和Block II（见图1.2），随后通过紫外交联等一系列实验证实CYP2A6 mRNA的3’-UTR区能够结合一个大小为34 kDa的蛋白，即hnRNP A1蛋白[8]。CYP2A6是目前所证实的唯一能够与hnRNP A1蛋白相结合的人类药物代谢酶，然而hnRNP A1蛋白作用于CYP2A6 mRNA是否能够对CYP2A6的表达乃至活性有所影响呢？目前仍没有确切的证据。本试验的目的在于研究hnRNP A1以及CYP2A6在肝癌组织中的表达与正常组织中存在差别，并进一步寻求两者之间的作用关系。

图1.1：hnRNP A1蛋白的结构示意图

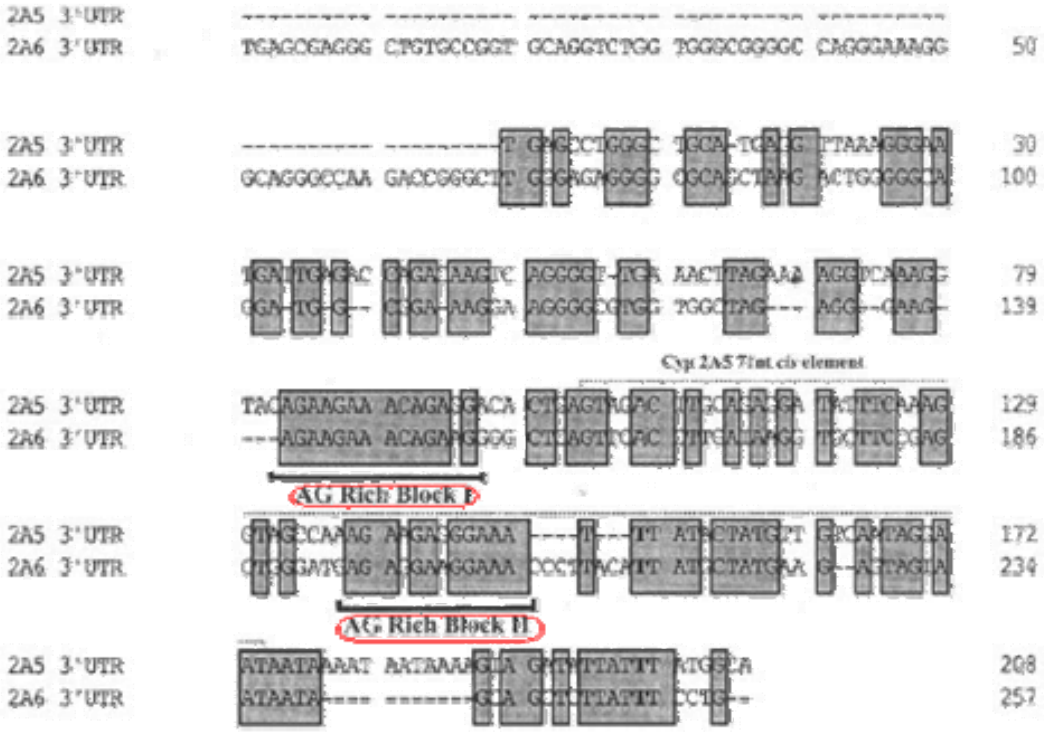


图 1.2　人类 CYP2A6 与大鼠 cyp2a5 基因 3’-UTR 区序列比对图

第二章 实验材料、方法与步骤

2.1 血标本和肝脏标本来源：

收集了 22 个肝脏组织标本，分别来自肝癌切除的癌组织，癌旁正常组织，肝内结石、胆管结石、肝血管瘤等手术中的正常组织。其中男性 15 名，女性 7 名，平均年龄 49.5±13.3 岁（均数±标准差），肝癌组织标本 11 个，肝内结石、胆管结石、肝血管瘤标本 24 个。

本研究经中南大学湘雅医学院伦理委员会通过，所有受试者均签署知情同意书。

2.2. 材料和仪器：

试剂	
DMEM 培养基及胎牛血清	美国 Gibico 公司
逆转录试剂盒	MBI Fermentas, Lithuania
Taq DNA 聚合酶及 dNTP	宝生物工程（大连）有限公司
Realtime PCR 引物	宝生物工程（大连）有限公司
HnRNP A1 一抗	美国 Promega 公司
CYP2A6 一抗	英国 Biomol 公司
CYP2A6 二抗	博士德生物工程有限公司
β-actin 一抗及二抗	博士德生物工程有限公司
HRP-ECL 化学发光底物	美国 Pierce 公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒及细胞裂解液	碧云天生物工程有限公司
SYBR Green I 试剂盒	宝生物工程（大连）有限公司
Trizol 试剂盒	美国 invitrogen 公司
凝胶回收试剂盒	宝生物工程（大连）有限公司
SiRNA	上海吉凯基因公司
Opti-MEM	美国 invitrogen 公司
DEPC	美国 Sigma 公司
氯仿，EDTA, 溴乙啶，Tris 碱，异丙醇，无水乙醇，75％乙醇，柠檬酸钠，NaOH，30％过氧化氢等	上海生工分析纯试剂

仪器设备	
CO_2 恒温孵育箱及超净工作台	美国 Thermo 公司
倒置显微镜	日本尼康公司

PCR 仪	美国 Perkin Elmer Cetus 公司
电泳仪及转膜仪	北京六一仪器厂
紫外光分析仪	日本岛津公司
酶标仪	Thermo Multiskan Ascent
凝胶成像分析系统	上海天能公司
低温冷冻离心机	美国 Sigma 公司
Realtime PCR 仪	美国 Strategene 公司

2.3 肝脏组织总 RNA 的提取、逆转录：

2.3.1 相关试剂的配制：

1）0.1％DEPC 水：

取 1mL DEPC，加入双蒸水，终体积至 1000mL。搅拌过夜。室温密封保存。

2）0.1M 柠檬酸钠 10％乙醇液：

称取 5.88g 柠檬酸钠溶解在 180mL 双蒸水中，再加入 20mL 无水乙醇，充分混匀。

3）8mM NaOH 溶液：

称取 0.16g NaOH 溶解于 1mL 双蒸水中，取 0.1mLNaOH 溶液，并加入双蒸水，终体积至 50mL.

4）0.1％Hepes 溶液：

称取 1.19g Hepes，加入双蒸水溶解，定容在 50mL.

5）0.5M EDTA 溶液：

称取 $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$ 4.653g，加入 NaOH 约 0.5g，加双蒸水 20mL，溶解后用浓盐酸调节 PH 至 8.0，最后定容至 25mL.

总 RNA 提取所用的乳钵，镊子等均在 190℃烤箱干烧 5 小时以上。Tip 头，Eppendorf 管等都用 0.1％的 DEPC 水浸泡过夜，然后高压灭菌 30 分钟，52℃烤箱中烘烤干备用。

2.3.2 肝脏组织总 RNA 的提取：

1） 取约 100mg -80℃保存的肝脏组织迅速放入液氮预冷并加入 0.2mL Trizol 的乳钵中，研磨磨碎，加入 0.8mL Trizol，继续研磨成粉红色匀浆，转移至新的 1.5mL Eppendorf 管中。

2） 在每管中加入 0.2mL 的氯仿，充分混匀，来回用手振摇 15 秒，15℃～30℃放置 2~3 分钟后，12000×g，4℃离心 10 分钟。

3） 粉红色匀浆分成上层无色含 RNA 的水相和下层含 DNA 的粉红色苯酚-氯仿有机相。取上层含 RNA 的水相至新的 1.5mL Eppendorf 管，剩下的苯酚-氯仿相另存备用。

4） 在每管中加入同体积的异丙醇，用手有力来回振荡 30 秒，15℃～30℃放置 2~3 分钟后，12000×g，4℃离心 10 分钟。

5） 可见管底有白色胶状 RNA 沉淀，去上清，在每管中加入用 DEPC 处理水配制的 75％乙醇，用以洗涤 RNA 沉淀，重悬沉淀。15℃～30℃放置 10~15 分钟后，7500×g，4℃离心 5 分钟。

6） 可见管底有白色胶状 RNA 沉淀，去上清，在每管中加入用 DEPC 处理水配制的 75％乙醇，第二次洗涤 RNA 沉淀，15℃～30℃放置 10~15 分钟后，7500×g，4℃离心 5 分钟。

7） 去上清，室温风干 RNA 沉淀 5-10 分钟，不可以用真空抽干，也不宜过度干燥。在每管中加入 DEPC 处理水以溶解 RNA 沉淀，约 30 分钟。溶解的 RNA 用以电泳，测 OD 值及逆转录。

2.3.3 逆转录：

1）RNA：0.5ng～10μg；Oligo(dT)$_{18}$: 1μL；加入 DEPC 处理水使总体积至 12μL，混合均匀，快速离心 3～5 秒，70℃孵育 5 分钟。

2）迅速放置在冰上约 30 秒，在冰浴过程中按顺序加入以下试剂：

5×Reaction buffer： 4μL

RNase Inhibitor： 1μL

10mM dNTP： 2μL

混合均匀，快速离心 3～5 秒，37℃孵育 5 分钟。

3）冰浴，加入 M-MuvL 逆转录酶：1μL，终体积达 20μL。混合均匀，快速离心 3～5 秒，42℃孵育 60 分钟，70℃孵育 10 分钟以终止反应。

2.3.4 凝胶纯化：

1）选取任意 cDNA 标本进行 PCR 扩增，制备琼脂糖凝胶。

2）紫外灯照射下选取荧光条带切胶。

3）称重，置于干净的 1.5 mL 离心管中，每 0.1g 胶加入 0.1mL Binding Buffer，56℃水浴孵育 7 分钟直至完全溶解，每 2～3 分钟颠倒混匀数次，10000×g，离心 5 分钟收集上清。

4）加入 700 μL 上清液于纯化柱中，10000×g，离心 1 分钟，弃去液体。

5）加入 300 μL Binding Buffer 洗脱纯化柱，10000×g，离心 1 分钟，弃去液体。

6）加入 700 μL SPW Buffer 静置 3 分钟，离心 1 分钟，弃去液体。该操作重复一遍。

7）空纯化柱 10000×g，离心 1 分钟至干燥。

8）将纯化柱置于干净 1.5 mL EP 管中，加入 50 μL 无菌水静置 5 分钟，10000×g，离心 1 分钟，收集液体。

2.4 Real-time PCR 的操作和数据提取：

本研究定量检测了肝脏标本 CYP2A6 即 hnRNP A1 mRNA 的表达水平。采用 Realltime PCR 的方法，选用 β-actin 作为内参照。各对应引物的序列、退火温度及 PCR 循环数见下图：

表 2.1 Real－time PCR 的各对应引物的序列及扩增片断长度

Isoforms	Primer sense	Primer sequence 5' to 3'	Anneal temperature	Target Sizes
HnRNP A1	Forward	AGGCTGGCAGATACGTTCGTC	60℃	94bp
	Reverse	CCTCAGGCTCTCATCAGTTGTTTC		
CYP2A6	Forward	AGTTTGGCCCGCAGAGTCA	60℃	95BP
	Reverse	CTCAGCACAGAGCCCAGCATAG		
β-actin	Forward	TGGCACCCAGCACAATGAA	60℃	186bp
	Reverse	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA		

试验操作步骤：

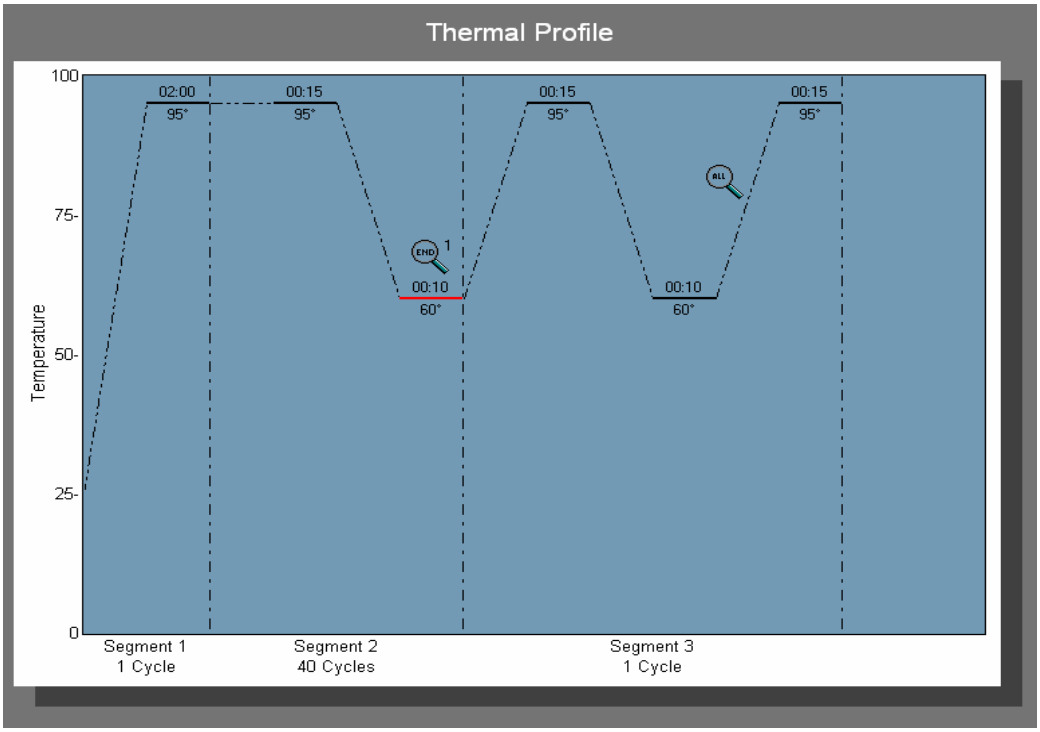
1. 溶解试剂，上下颠倒混匀，确认溶液完全溶解。避免用振荡器混匀，剧烈振荡会降低制品性能。（所有操作在冰上进行，长时间室温放置会降低制品性能）。按照说明书同时配制目的基因和内参 β-actin 的 PCR 反应用混合液，分装至 PCR 反应管中，添加 PCR 扩增用模板。

   按照 TAKARA 公司的 SYBR Green I 使用说明书要求进行实验操作。

试剂	使用量（μl）
SYBR Green I	12.5
ROX Reference Dye	0.5
PCR F primer（10μm）	0.4
PCR R primer（10μm）	0.4
cDNA	2
灭菌双蒸水	9.2
Total	25

2. 标准曲线反应体系的配置，取凝胶回收后的 cDNA 样本用双蒸水按照 10 的梯度，各取 2μl 进行 Real－time 反应。

3. 设置程序如下图：



4. 放入标本，设置标准曲线和待测标本。A C E 排分别为 β-actin，hnRNP A1 及 CYP2A6 标准曲线，B D F 排均为样品

β-actin

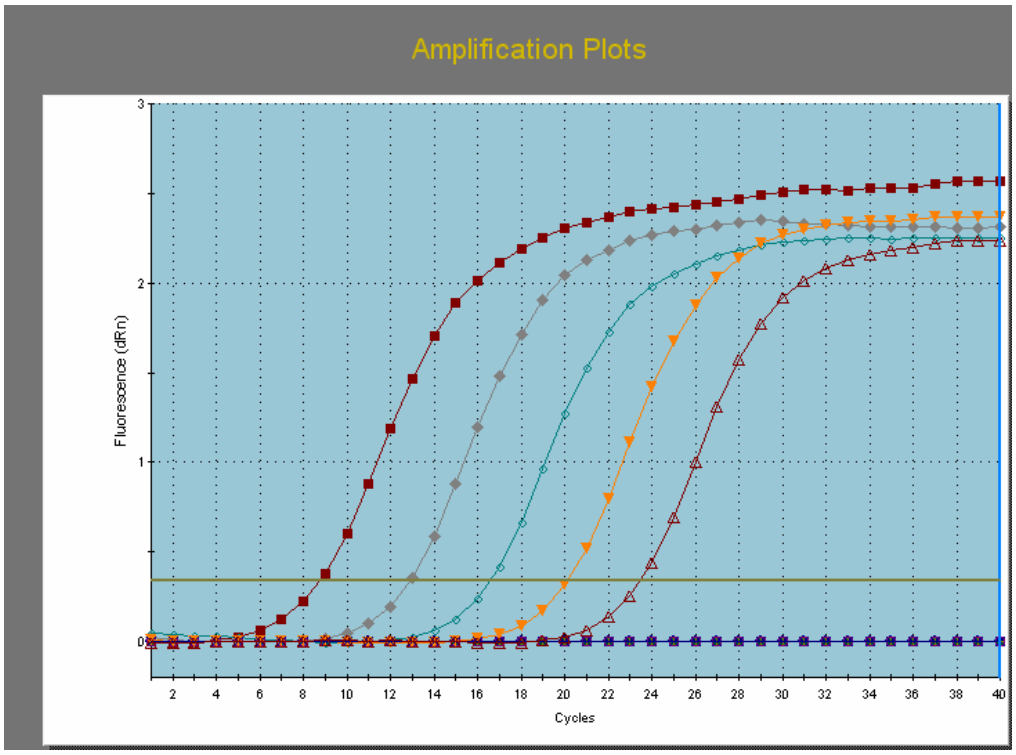
HnRNP A1

CYP2A6

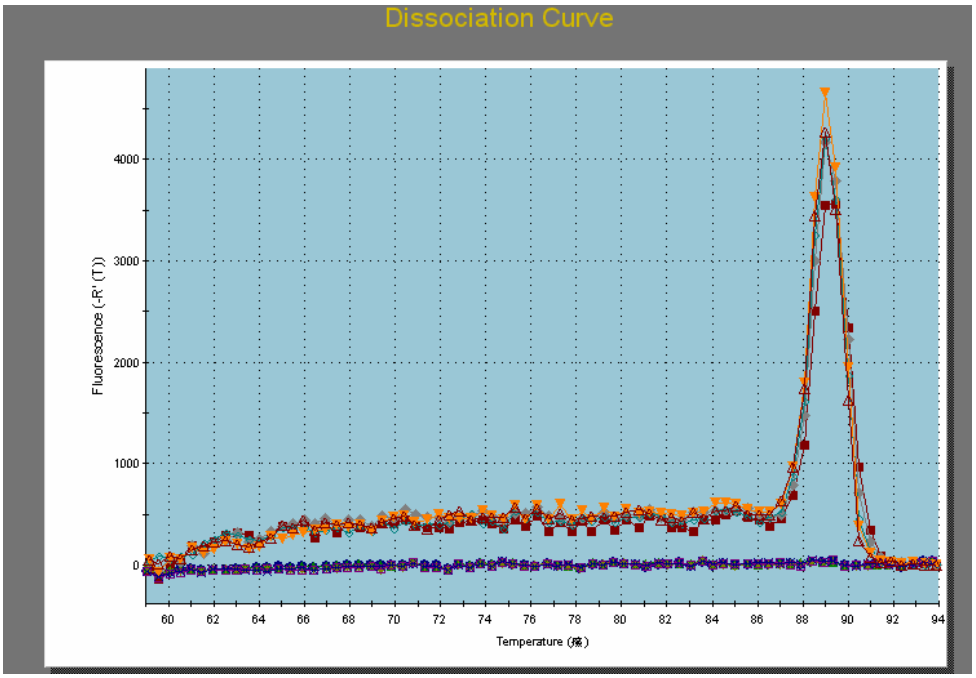
All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard REF 1.00e+005	Standard REF 1.00e+004	Standard REF 1.00e+003	Standard REF 1.00e+002	Standard REF 1.00e+001							
B	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR		Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR			
C	Standard REF 1.00e+005	Standard REF 1.00e+004	Standard REF 1.00e+003	Standard REF 1.00e+002	Standard REF 1.00e+001							
D	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR		Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR			
E	Standard REF 1.00e+005	Standard REF 1.00e+004	Standard REF 1.00e+003	Standard REF 1.00e+002	Standard REF 1.00e+001							
F	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR		Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR			
G												
H												

5. 分析 Real Time PCR 扩增曲线和融解曲线

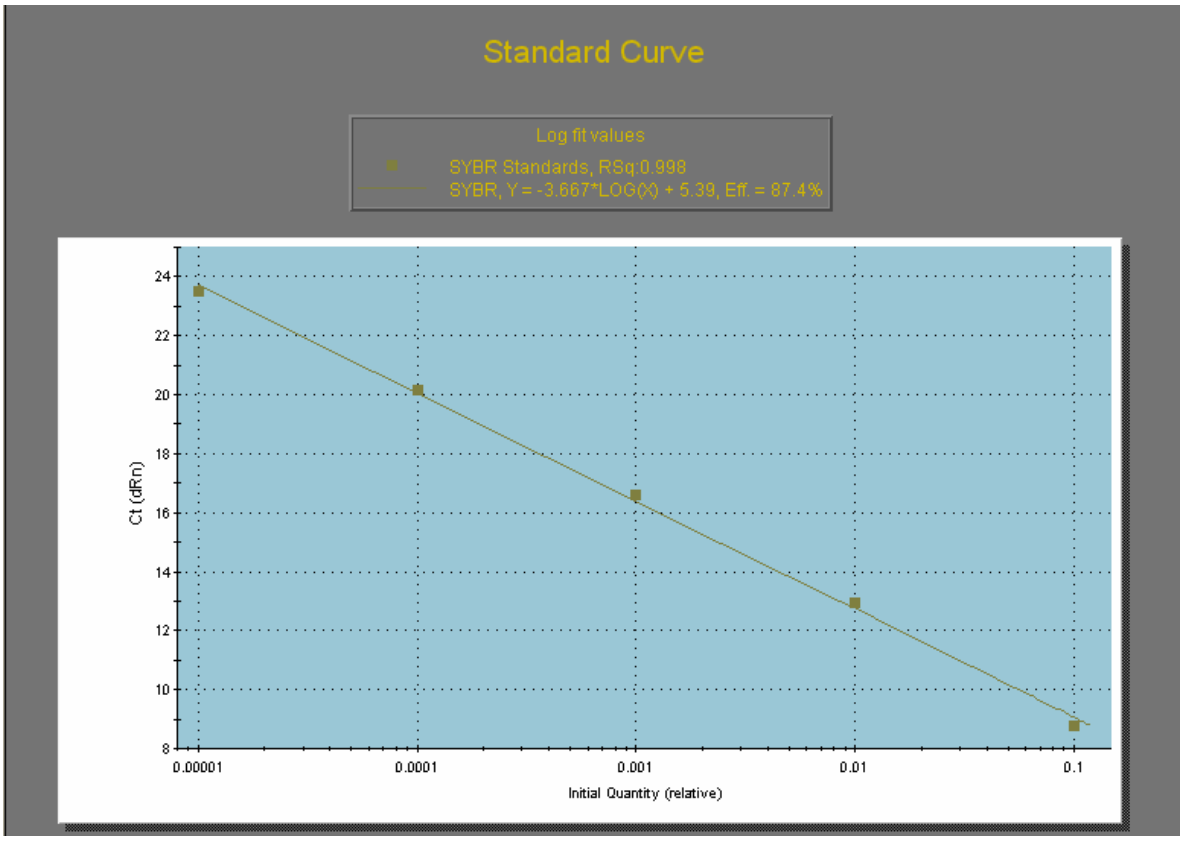
扩增曲线：



溶解曲线：



6. 制作标准定量曲线。反应结束后，由各扩增曲线得到的 Ct 值，制作标准定量曲线。



7. 实验结果分析

从融解曲线分析中可知，cDNA 的扩增产物非常单一，从标准定量曲线上可以看出，线性关系良好。因此我们可以得出结论，在实验浓度范围内，可以得到非常正确的 PCR 定量结果。

实验对象表达量＝目的基因拷贝数/管家基因拷贝数

2.5 肝组织总蛋白的提取：

2.5.1 相关试剂的配制：

1）10%分离胶溶液：

30%丙烯酰胺（含 2%甲叉）：5.0 mL

2mol/LTris-Hcl(PH=8.8)：3.8 mL

10%SDS：150μL

H_2O：5.9 mL

TEMED：6 μL

10%过硫酸铵：150 μL

2）浓缩胶：

30%丙烯酰胺（含 2%甲叉）：1.3 mL
2mol/LTris-Hcl(PH=6.8)：1.0 mL
10%SDS：80μL
H_2O：5.5 mL
TEMED：8 μL
10%过硫酸铵：80 μL

3）电泳液配方：

Tris-base 3g， glycine 14.4g， 0.1% SDS（10ml 10% SDS）/L。

4）TBST：

Tris-HCl，pH 7.5（20mM），Nacl（0.15mmol/L），Tween20（0.05%）。

5）封闭液：

4%脱脂奶粉和1%BSA溶于 TTBS 中。

6）抗体稀释液：

NaCl（0.15M/L），Tris-HCl，pH 7.4（20Mm/L），BSA （0.5%），Tween20（0.05%）。

2.5.2 蛋白提取：

1）取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入 PMSF,使 PMSF 的最终浓度为 1mM。

2）取约 100mg -80℃保存的肝脏组织迅速放入液氮预冷并加入 1mL 裂解液的乳钵中，研磨磨碎，成粉红色匀浆，转移至新的 1.5mL Eppendorf 管中。

3）冰浴超声 15 分钟，充分裂解后，10000-14000×g 离心 3～5 分钟，取上清至干净 EP 管中，-80 ℃保存。

2.5.3 蛋白浓度测定：

1）根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B（50:1）配制适量 BCA 工作液，充分混匀。

2）完全溶解蛋白标准品，取 10 微升稀释至 100 微升 ，使终浓度为 0.5mg/ml。将标准品按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 微升加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到 20 微升。加适当体积样品到 96 孔板的样品空中，加标准

品稀释液到 20 微升。各孔加入 200 微升 BCA 工作液，37℃放置 30 分钟。

3）测定 595nm 波长的吸光度值。根据标准曲线计算出蛋白浓度。

2.5.4 Western-blot 步骤：

1）洗板：用洗洁精将油脂洗净，分别用自来水和双蒸水清洗，无水酒精搽洗，再用双蒸水清洗，晾干备用。

2）配胶：

(1) 按照配方把分离胶及浓缩胶配好

(2) 封胶：灌入 2/3 的分离胶后应立即用水封胶，封胶后平放勿动。待胶凝后将封胶液倒掉，用 ddH_2O 冲洗干净，用滤纸把水吸干。 灌入浓缩胶，插入梳子。待浓缩胶干后拔除梳子。预电泳 15min 后即可上样。

3）上样，电泳：

(1) 上样前将胶板下的气泡赶走。将所有蛋白样品调至等浓度，充分混合沉淀后加 loading buffer，98℃加热 3min 后上样。

(2) 以 100V 的电压电泳，当条带跑至分离胶和浓缩胶分界面时改为 150V 电泳。在目的蛋白泳动至距胶下缘 1cm 以上结束。

4）转膜：

(1) 按目的蛋白大小，根据 MARKER 所指示的位置（CYP2A6 在 56 kD，hnRNP A1 在 34 kD, β-actin 在 42 kD 位置）切胶，用转膜缓冲液清洗。

(2) 剪六张与凝胶大小一致的 whatman3MM 滤纸和一张硝酸纤维素膜（膜在使用之前用甲醇浸泡 15s），把膜以及滤纸泡在转膜缓冲液中备用。

(3) 按顺序把膜，凝胶，滤纸叠放在半干电转仪中，以 1.5mA/cm^2 凝胶面积转膜 2.5 小时。

5）封闭及杂交：

(1) 将膜从电转槽中取出，用 TTBS 稍加漂洗，浸没于封闭液中，4℃封闭过夜。

(2) 封闭后用 TBST 浸洗 5～10 分钟，滤纸稍吸干。放入配好的一抗中，室温下轻摇孵育一小时。

(3) 一抗孵育结束后，用 TTBS 漂洗膜后再浸洗三次，每次 5～10 分钟。

(4) 放入已配好的二抗溶液中，室温轻摇一小时。

(5) 二抗孵育结束后，用 PBST 或 TTBS 漂洗膜后再浸洗三次，每次 5～10 分钟。

6）发光鉴定：使用辣根过氧化物酶 HRP-ECL 发光法显色。

(1) 将 A、B 发光液按比例稀释混合。

(2) 膜用去离子水稍加漂洗，滤纸贴角吸干，反贴法覆于 A、B 混合液滴上，熄灯至可见淡绿色荧光条带（5 分钟左右）后滤纸贴角吸干，置于保鲜膜内固定于片盒中，迅速盖上胶片，关闭胶盒，根据所见荧光强度曝光。

(3) 取出胶片立即完全浸入显影液中 1～2 分钟，清水漂洗一下后放在定影液中至底片完全定影，清水冲净晾干，标定 Marker，进行分析与扫描。

2.6 2%琼脂糖凝胶的制备：

1）称取 1.0 g 琼脂糖粉置于含有 50 mL 1×TAE 电泳缓冲液的锥形瓶中，混合，然后放入微波炉中加热至悬浮液中琼脂糖溶解，中火约 1 分钟左右。

2）溶液在室温下冷却至 60℃左右，加入 10 mg/mL 的溴乙啶 3μL，充分混匀。

3）用透明胶封住胶模两端，同时吸取少量琼脂糖溶液封固胶模边缘。

4）将温热的琼脂糖溶液倒入胶模中，凝胶的厚度在 3～5 mm 之间。插上梳子，距离底板 0.5～1 mm，以便加入琼脂糖后可以形成完好的加样孔。

5）等凝胶完全凝固后（在室温放置大约 30～45 分钟），小心移去梳子，将凝胶放入电泳槽中，并加入足量的同样电泳液，大约没过胶面 0.2 cm。在 RNA 电泳时，电泳槽要用 3%的过氧化氢浸泡 10 分钟，然后加入由 DEPC 处理水配制的电泳缓冲液。

6）足量的 PCR 产物与上样缓冲液混合后，用一次性微量移液器将混合物加至加样孔中。

7）盖上电泳槽并通电，使 DNA 向阳极移动，之至溴酚蓝盒二甲苯青在凝胶中迁移出适当的距离。

8）切断电源，将凝胶从电泳槽中取出，在紫外灯下观察并拍照，保存。

2.7 hepG2 细胞培养：

1）细胞的种类：HepG2 细胞

2）培养器材：DMEM 培养基（100U 双抗(青霉素和链霉素) ，10%Gibico 小牛血清），PBS，0.25%胰蛋白酶，细胞冻存液，吸管 ，离心管，培养瓶，6 孔培养板，细胞培养箱。

3）细胞的复苏：

(1) 将细胞冷冻管迅速由液氮罐转移到 37℃水浴中，冷冻管的顶部保持在水面上，避免污染，争取在 1 分钟内解冻完，时间越短越好。

(2) 细胞解冻后，先将冷冻管用 75%的乙醇纱布擦拭消毒，而后将细胞转移到培养瓶当中，缓慢加入 DMEM 培养基（100U 双抗(青霉素和链霉素) ，

10％Gibico 小牛血清）小心混匀，至于细胞培养箱中培养。

4）细胞的冻存：

(1) 收集对数生长期 HepG2 细胞（细胞台盼蓝记数存活率在 90％以上）于干净无菌离心管中，1300 r p m离心收集 5 分钟，小心去上层培养基，将细胞沉淀悬浮在冷冻液中，再转移到细胞冻存管中。

(2) 将冷冻管用棉花紧紧包成团，用塑胶手套固定结实，先置于－80℃冰箱过夜，第二天将其转移到液氮罐中，并做好保存标记。

5）细胞的传代培养：

(1) 将长满的 HepG2 细胞上层培养基倒掉，再用 PBS 冲洗两遍。

(2) 加入 1ml 0.25％的胰酶消化，等到细胞开始变圆，立即加入 2ml 左右 DMEM 培养基（100U 双抗(青霉素和链霉素) ，10％Gibico 小牛血清）终止消化。

(3) 用吸管吹打，使 HepG2 细胞脱壁，将细胞分瓶，每瓶补加培养基到 5ml，放于温箱中培养。

2.8 瞬时 RNA 干扰：

1）于细胞种板当日配置 siRNA 工作母液：每 2.5 nmol（即 1.0 OD）双链 siRNA 中加入 125 μL 1×Universal Buffer，得到浓度为 20 μM 的 siRNA 母液。将工作母液于 90℃保温 2 分钟，自然冷却至室温后置于 4℃过夜备用。

2）转染前用不含血清的 Opti-MEM 将工作母液稀释至 20 nM，取 5μL 20 nM siRNA 双链（100 pmol）在无菌 EP 管中与 250 μL Opti-MEM 混合。

3）将 LipofectAMINE2000 试剂轻柔摇匀，取 5μL 在另一无菌 EP 管中与 250 μL Opti-MEM 混合，室温温育 5 分钟。

4）将稀释后的 siRNA 与稀释后的 LipofectAMINE2000 在 30 分钟内混合，轻轻颠倒摇匀。

5）将混合液加入细胞再每孔加入 1.5 mL 无血清培养基，轻柔推摇培养板混匀液体。

6）转染后 5 小时将培养板中所有培养基弃去，加入新鲜含血清培养基。

siRNA 序列如下：

HnRNP A1 siRNA	Primer sense	Primer sequence 5’ to 3’
Non-silencing	orward	UUCUCCGAACGUGUCACGUtt

	Reverse	ACGUGACAGUUCGGAGAAtt
SiRNA-1	Forward	GAGAUGGCUAGUGCUUCAUtt
	Reverse	AAUCUCUUAGGUGAUGUUCtt
SiRNA-2	Forward	GAGAUGGCUAGUGCUUCAUtt
	Reverse	AUGAAGCACUAGCCAUCUCtt
SiRNA-3	Forward	CUGUGUGGUAUGAGAGAUtt
	Reverse	AUCUCUCAUUACCACACAGtt

2.9 数据处理和统计学分析：

癌症组和正常对照组间平均 hnRNP A1, CYP2A6 mRNA 及蛋白表达水平的比较采用非参数检验。HnRNP A1 和 CYP2A6 表达相关性分析是采用 Person 和 Spearman 回归分析。各 RNA 干扰组之间采用 LSD-t 检验。统计软件采用 SPSS 11.5 （SPSS Inc, Chicago, III）。$P< 0.05$ 认为具有统计学显著性。

第三章 实验结果

3.1 人类肝脏组织中 hnRNP A1 及 CYP2A6 mRNA 表达量存在差异

我们通过real-time PCR定量了22例人类肝脏标本中的hnRNP A1以及CYP2A6 mRNA表达水平。其中在肝癌组中hnRNP A1 mRNA的表达量为0.579±0.375 (AV±SD, n=11)，明显高于正常对照组0.181±0.092 (AV±SD, n=11)，两者方差不齐，非参数检验显示P=0.002，具有统计学意义（表3.1，图3.1）。

在肝癌组中CYP2A6 mRNA表达量为0.795±0.295 (AV±SD, n=11)，与正常对照组中表达量0.367±0.261 (AV±SD, n=11)相比明显增高，两者方差齐，ANOVA检验显示P=0.002，具有统计学意义（表3.1，图3.1）。

图3.2-3.4显示的是Realtime PCR扩增后产物凝胶电泳图。

3.2 人类肝脏组织中 hnRNP A1 以及 CYP2A6 蛋白表达量存在差异

使用Wewtern blotting的方法对22例人类肝脏组织中hnRNP A1以及CYP2A6的蛋白表达水平进行半定量。在癌症组和正常对照组中hnRNP A1蛋白表达水平分别为0.286±0.264和0.063±0.040 (AV±SD, n=11)，统计分析显示两者方差不齐，非参数检验显示癌症组中hnRNP A1蛋白表达水平明显高于正常对照组，P=0.003，具有统计学意义（图3.5）。

癌症组中CYP2A6蛋白水平也明显高于正常对照组，分别为3.230±2.117和1.061±0.678 (AV±SD, n=11)，两组数据方差不齐，采用Mann-Whitney非参数检验，显示P=0.002，两者间差别具有统计学意义（图3.5）。

图3.6-3.8显示的是SDS-PAGE胶中目的蛋白显影图。

3.3 人类肝癌标本中 hnRNP A1 与 CYP2A6 的表达的相关性

为了研究肝癌组中同时表达增高的hnRNP A1与CYP2A6之间的相关关系，我们对两者的表达进行了相关分析。在肝癌组中，无论是mRNA还是蛋白表达水平hnRNP A1与CYP2A6之间都存在明显的正相关关系，相关系数分别为0.716和0.764，两者P值分别为0.013与0.006，但是这种相关性在正常对照组中并没有被发现。此外，我们又对hnRNP A1蛋白表达水平与CYP2A6 mRNA表达水平之间是否也存在相关性进行了分析，发现同样在肝癌组中两者相关系数为0.682，P值为0.021，而在正常对照组中无明显相关关系（表3.2）。

3.4 RNA 干扰对 hnRNP A1 及 CYP2A6 蛋白表达水平的影响

通过Western blotting的方法对经过hnRNP A1基因48、72、96小时干扰后的hepG2细胞中的hnRNP A1及CYP2A6蛋白表达水平进行测定分析hnRNP A1蛋白水平对CYP2A6的表达的影响。3对siRNA片段对hnRNP A1基因进行RNA干扰48、72及96小时后hnRNP A1蛋白的表达量均明显下降，P值均小于0.05，具有统计学意义（表3.4）。3个时间段中hepG2

细胞中CYP2A6蛋白表达量均有下降趋势，但没有统计学意义（表3.4）。

图3.9-3.11显示的分别为48、72、96小时hnRNP A1、CYP2A6及β-actin蛋白表达水平。

图9.12显示的是与处理因素相对应的hnRNP A1、CYP2A6及β-actin蛋白10% SDS-PAGE凝胶显影图。

表 3.1 正常对照组与肝癌组中 hnRNP A1 及 CYP2A6 mRNA 表达水平（平均值±标准差）

	正常对照组	肝癌组	P 值 (方差齐性检验)	P 值
hnRNP A1 (n=11)	0.181±0.092	0.579±0.375	0.000	0.002 (Mann-Whitney test)
CYP2A6 (n=11)	0.367±0.261	0.795±0.295	0.997	0.002 (ANOVA)

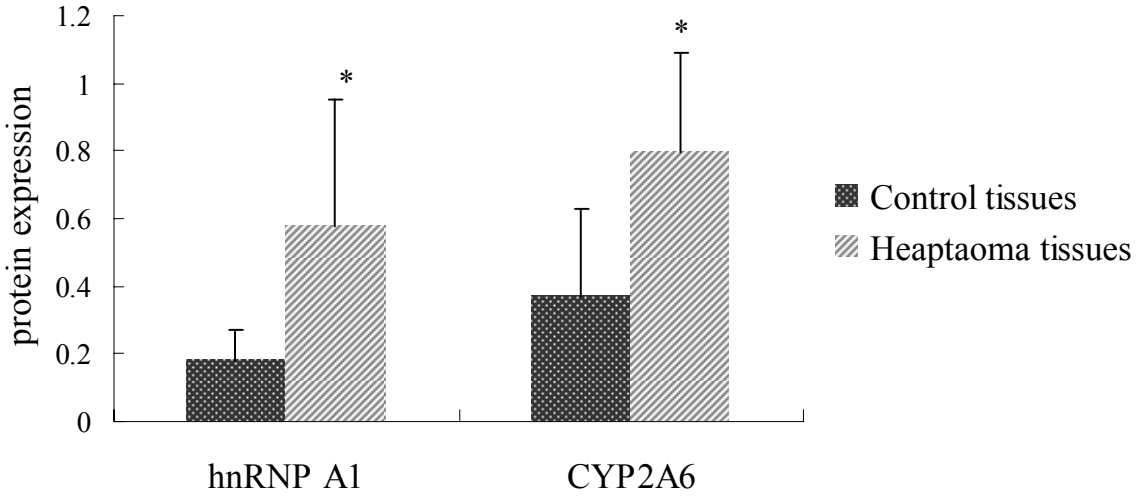


图 3.1 正常对照组及肝癌组中 hnRNP A1 及 CYP2A6 mRNA 表达水平（*表示 P<0.01）

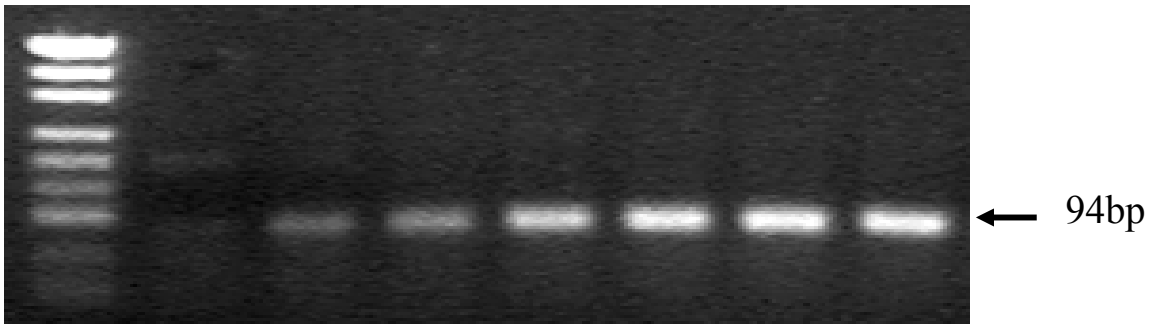


图3.2 hnRNP A1 realtime PCR扩增后产物凝胶图

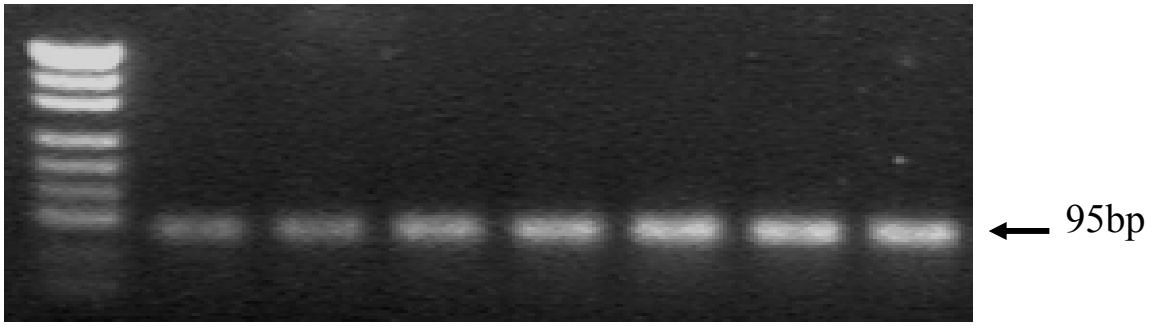


图3.3 CYP2A6 realtime PCR扩增后产物凝胶图

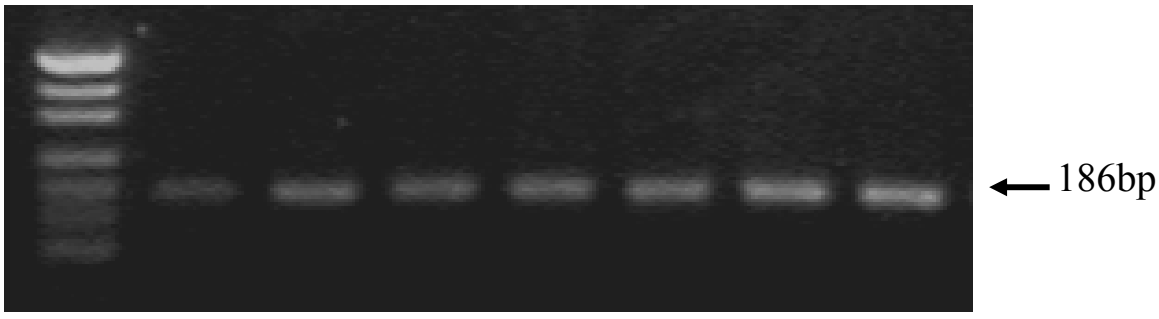


图3.4 β-actin realtime PCR扩增后产物凝胶图

表 3.2 正常对照组与肝癌组中 hnRNP A1 及 CYP2A6 蛋白表达水平（平均值±标准差）

	正常对照组	肝癌组	P 值 (方差齐性检验)	P 值 (Mann-Whitney test)
hnRNP A1 (n=11)	0.063±0.040	0.286±0.264	0.011	0.003
CYP2A6 (n=11)	1.061±0.678	3.230±2.117	0.006	0.002

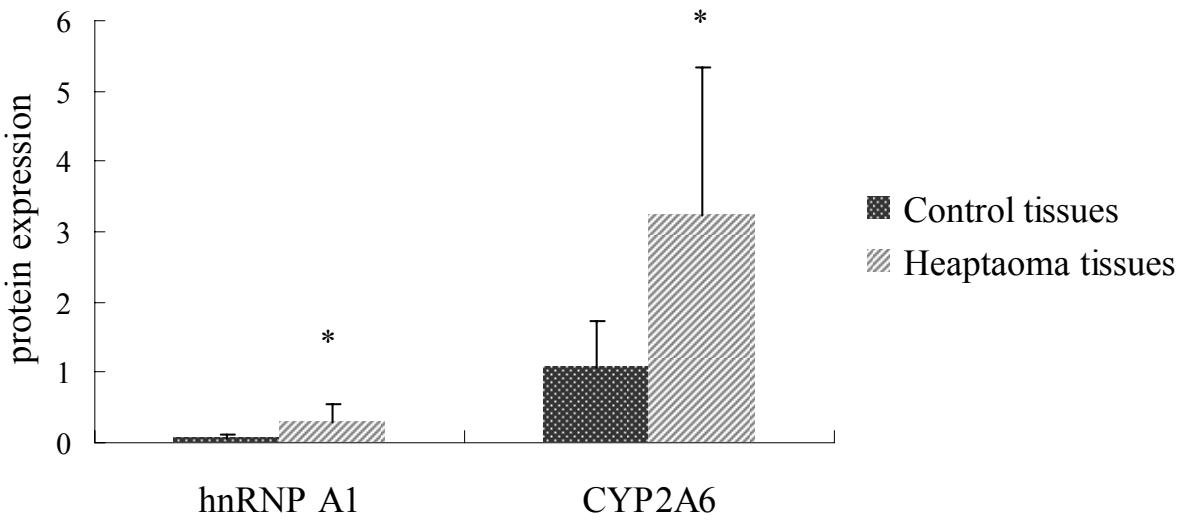


图 3.5 正常对照组及肝癌组中 hnRNP A1 及 CYP2A6 蛋白表达水平（*表示 P<0.01）

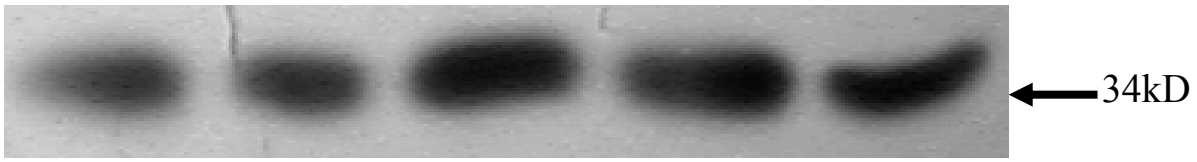


图3.6 hnRNP A1蛋白10% SDS-PAGE凝胶图

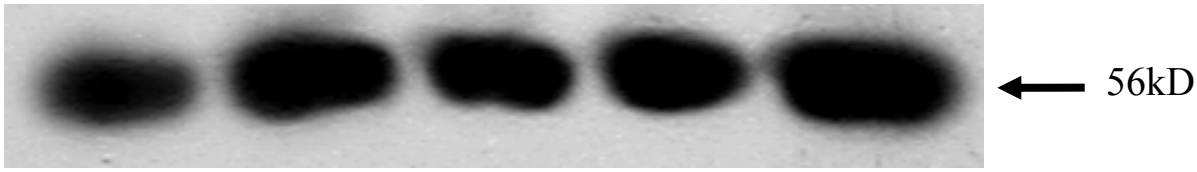


图3.7 CYP2A6蛋白10% SDS-PAGE凝胶图

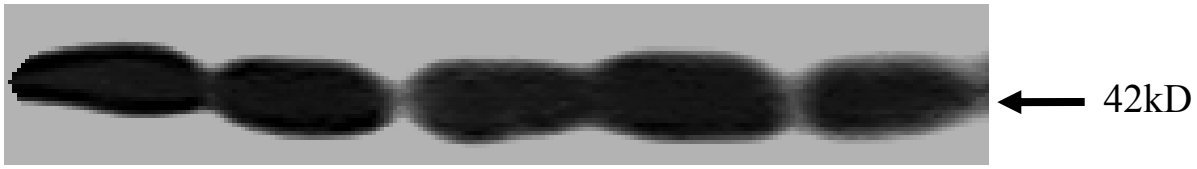


图3.8 β-actin蛋白10% SDS-PAGE凝胶图

表3.3 hnRNP A1及CYP2A6表达水平相关性分析（平均值±标准差）

	mRNA 表达水平		蛋白表达水平	
	正常对照组	肝癌组	正常对照组	肝癌组
HnRNP A1	0.063±0.040	0.579±0.375	0.063±0.040	0.579±0.375
CYP2A6	0.367±0.261	0.795±0.295	0.286±0.264	3.230±2.117
P 值 (方差齐性检验)	0.001	0.257	0.000	0.000
相关系数	-0.455	0.716	-0.173	0.764
P 值	0.160 (spearman)	0.013 (pearson)	0.612 (spearman)	0.006 (spearman)

	hnRNP A1 蛋白表达水平	CYP2A6 mRNA 表达水平	P 值 (方差齐性检验)	相关系数	P 值 (spearman)
正常对照组	0.063±0.040	0.367±0.261	0.000	-0.273	0.417
肝癌组	0.579±0.375	0.795±0.295	0.045	0.682	0.021

表3.4 RNA干扰后hnRNP A1及CYP2A6蛋白表达水平比较（平均值±标准差）

	干扰后48小时				
	空白对照	阴性对照	SiRNA-1	SiRNA-2	SiRNA-3
HnRNP A1	0.563±0.042	0.603±0.038	0.157±0.027** ##	0.188±0.020** ##	0.177±0.013** ##
CYP2A6	0.318±0.042	0.320±0.025	0.293±0.031	0.300±0.016	0.268±0.017

	干扰后72小时				
	空白对照	阴性对照	SiRNA-1	SiRNA-2	SiRNA-3
HnRNP A1	0.557±0.032	0.530±0.032	0.135±0.022** ##	0.156±0.012** ##	0.182±0.027** ##
CYP2A6	0.325±0.027	0.317±0.026	0.299±0.022	0.292±0.021	0.291±0.016

	干扰后96小时				
	空白对照	阴性对照	SiRNA-1	SiRNA-2	SiRNA-3
HnRNP A1	0.874±0.029	0.833±0.027	0.781±0.025*	0.804±0.039*	0.774±0.026* #
CYP2A6	0.325±0.039	0.320±0.026	0.283±0.029	0.295±0.013	0.298±0.021

* 表示与空白对照相比P<0.05

** 表示与空白对照相比P<0.01

表示与阴性对照相比P<0.05

表示与阴性对照相比 P<0.01

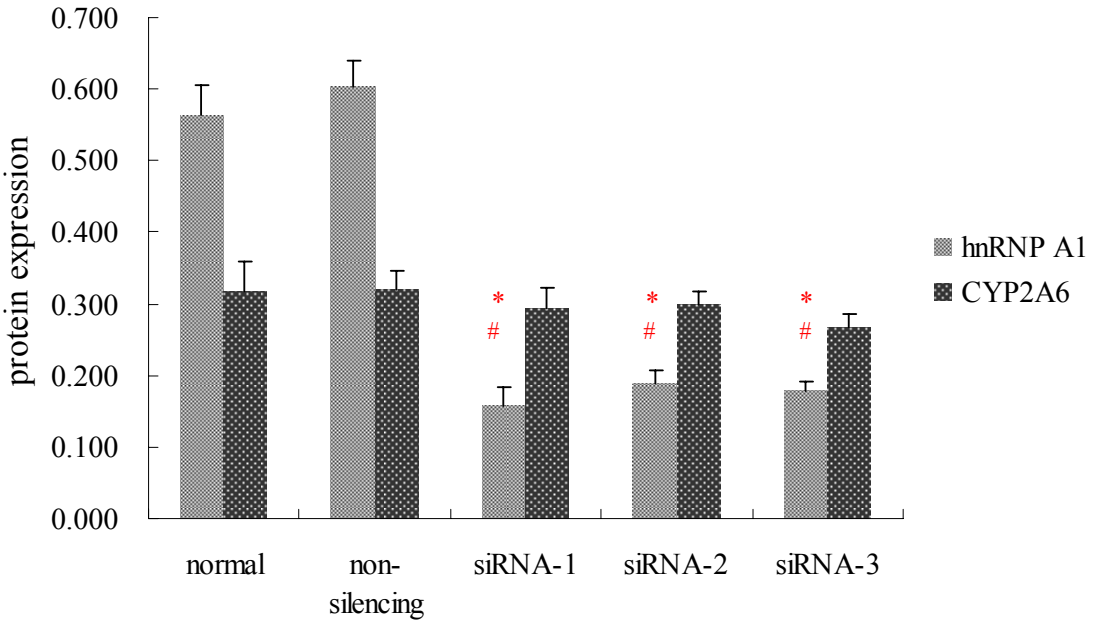


图 3.9 干扰 48 小时后 hepG2 细胞中 hnRNP A1 及 CYP2A6 蛋白表达水平直方图（*表示与空白比较 P<0.01, #表示与阴性对照比较 P<0.01）

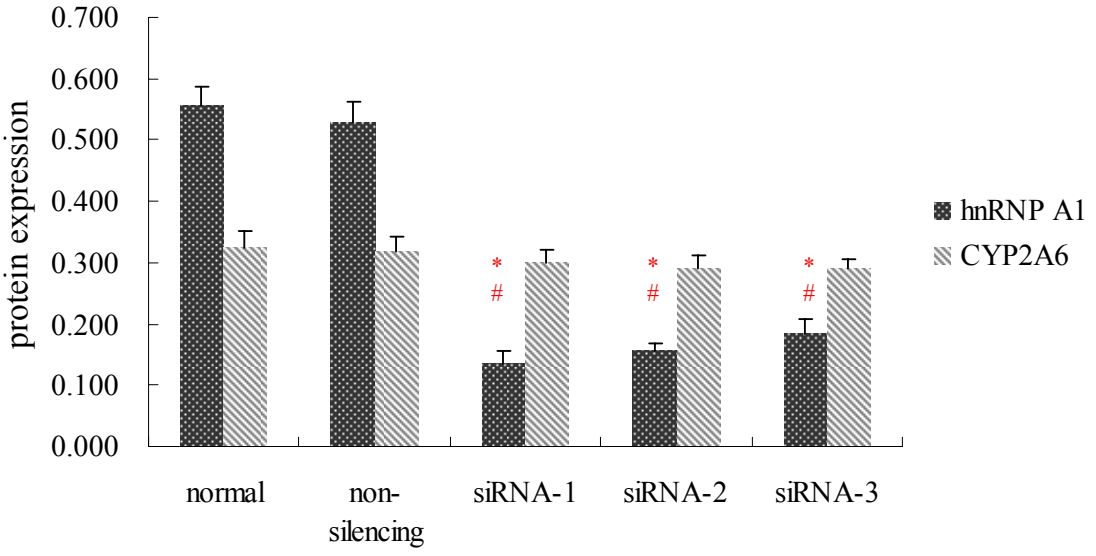


图 3.10 干扰 72 小时后 hepG2 细胞中 hnRNP A1 及 CYP2A6 蛋白表达水平直方图（*表示与空白比较 P<0.01, #表示与阴性对照比较 P<0.01）

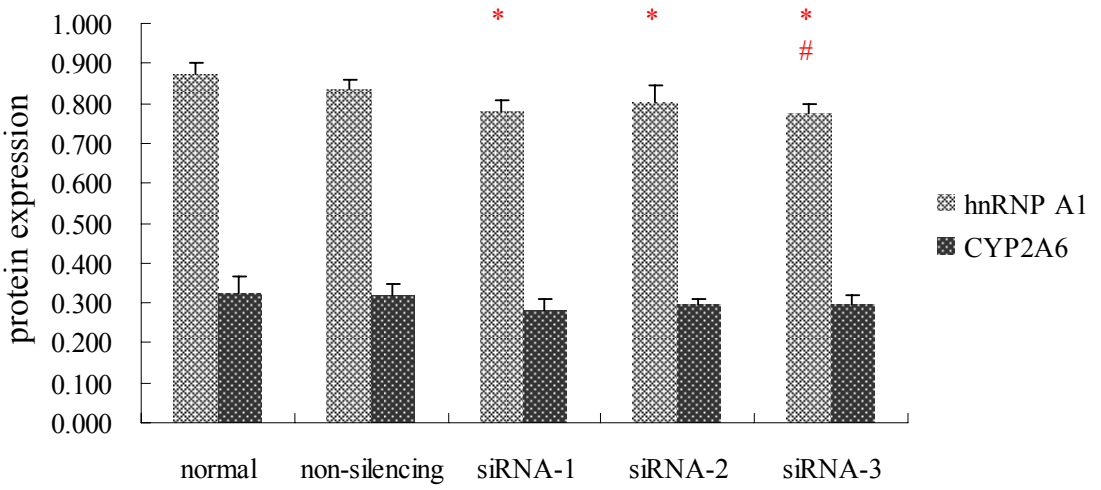


图 3.11 干扰 96 小时后 hepG2 细胞中 hnRNP A1 及 CYP2A6 蛋白表达水平直方图（*表示与空白比较 P<0.05, #表示与阴性对照比较 P<0.05）

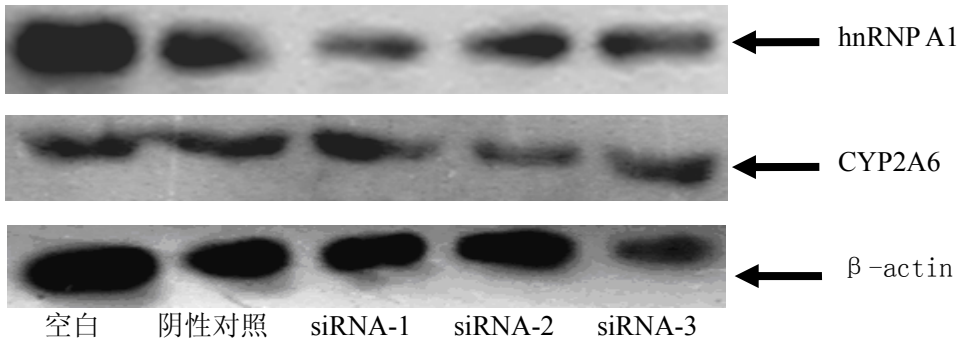


图3.12 hepG2细胞中hnRNP A1、CYP2A6及β-actin蛋白10% SDS-PAGE凝胶显影图

第四章 讨 论

肿瘤作为目前人类健康的大敌，越来越受到医学工作者们的重视。然而肿瘤疾病的病因复杂，是遗传、环境、药物等多因素共同作用的结果。随着科学技术的进步，越来越多能够影响肿瘤疾病发生、发展的因素被人类认识并加以应用到肿瘤疾病的防治当中。本实验所涉及的hnRNP A1蛋白及CYP2A6基因在多种肿瘤疾病中的作用正引起人们的广泛关注。

CYP2A6是体内最为重要的药物代谢酶之一，能够代谢多种外源性物质，包括药物（例如香豆素、丙戊烷、氟烷等）、前致癌原（如亚硝胺、尼古丁、黄曲霉素B1等）以及其他化学物质，在药理学和毒理学上CYP2A6占有重要的地位。此外，CYP2A6也在多种肿瘤疾病的发生和发展过程中起到了至关重要的作用。目前越来越多的研究热点都集中在CYP2A6与肿瘤疾病相关性上。

在本研究中，我们首次比较了肝癌组织与正常对照组织（包括正常、胆结石以及胆汁淤积患者的肝脏组织）CYP2A6 mRNA和蛋白水平的差异，无论是mRNA水平还是蛋白水平，癌症组明显高于正常对照组。这一结果与文献报道的在肺癌[5,6]、结肠癌[7]、胰腺癌[8]以及鼻咽癌[9]中的结果一致。CYP2A6表达增高可能导致由它代谢的外源性物质尤其是前致癌原的代谢率增高，从而促进肝癌等各类癌症的发生与发展。但是这一结果还需要进行大样本量试验验证，并且要结合肝癌的种类、临床分期以及患者的性别、年龄等多种因素对实验结果进行统计分析，此外，CYP2A6在肝癌的发生发展过程中发挥作用的机制还需要进一步的研究来明确。

hnRNP A1是人类生命系统中一种具有重要功能意义的蛋白，由于它的分子量小，仅34kD，并且具有特殊的类似核定位系统的结构，能够自由的穿梭于细胞核与细胞质之间，从而在转录后的调节包括mRNA转运、剪切以及修饰过程中发挥着极其重要的作用。一旦hnRNP A1蛋白的表达量或者正常的生理功能发生改变，整个机体将会受到影响。目前hnRNP A1蛋白与多种疾病尤其是肿瘤疾病的相关性研究得到了广泛的重视。多项研究表明在结肠癌[16]、少突神经胶质细胞瘤[17]、伯基特淋巴瘤[18]、慢性髓细胞性白血病原始细胞危象[15, 19]的发生、发展过程中hnRNP A1蛋白的表达量明显增高。在本研究中，肝癌组织中hnRNP A1 mRNA以及蛋白的表达水平也明显高于正常对照组，该结果与之前在其他肿瘤组织中得出的结论一致。该结果提示hnRNP A1蛋白可能在肝癌的发生、发展过程中也起到了一定的作用。同样的这一结果与CYP2A6的表达结果都需要更多的样本量予以支持，肝癌标本提供者的生理条件和病理状况都需要被纳入统计分析的过程中，从而得到更为全面且有临床意义的实验结果。

既然根据实验结果我们发现在hnRNP A1与CYP2A6无论是mRNA还是蛋白的表达水平在肝癌组中同时增高，那么这两者之间是否存在某种潜在关系呢？Francoise等人在大鼠

原代肝细胞中进行了hnRNP A1和cyp2a5活性之间的相关性研究。当原代肝细胞经过吡唑处理后，细胞质中hnRNP A1蛋白的量明显增高，导致cyp2a5 mRNA表达水平增高。这一结果提示hnRNP A1蛋白是cyp2a5基因表达的重要调节因素[20]。进一步的实验通过紫外交联和免疫共沉淀等方法证实了hnRNP A1蛋白能够与大鼠cyp2a5 3'-UTR中的包含发夹结构的特异性序列相结合[21, 22]。就目前的研究来看CYP2A6 mRNA是唯一经过证实的能够与hnRNP A1蛋白结合的人类药物代谢酶。在多种癌症疾病组织中两者的表达均增高，例如结肠癌等，但是CYP2A6与hnRNP A1之间到底存在着怎样一种调控关系目前的研究尚未给出明确的结论。

通过相关性分析，我们发现在肝癌组中hnRNP A1与CYP2A6无论在mRNA还是蛋白表达水平都存在强相关性。并且CYP2A6 mRNA表达量与hnRNP A1蛋白表达量之间也存在正性相关关系。该结果的产生可能是由于hnRNP A1在肝癌组织中表达异常增高，能够与之结合的CYP2A6 mRNA的量也相应增高，从而导致更多的CYP2A6 mRNA从细胞核转运到细胞质中，并且避免被RNA酶攻击，细胞中CYP2A6 mRNA水平得到上调，进而蛋白水平也随之增高。

随后我们对hnRNP A1基因进行了RNA干扰试验，通过沉没掉该基因来考察该基因对CYP2A6蛋白表达水平的影响程度。实验结果显示3对siRNA片段均能够使hnRNP A1蛋白的表达量明显下降，达到了干扰目的基因的效果，相应的CYP2A6的蛋白表达水平也有所下降，但下降的程度不大，没有统计学意义。该实验结果说明在hepG2细胞中hnRNP A1蛋白的表达量对CYP2A6基因表达水平具有一定的影响但不是影响其表达的关键因素。之前的研究也表明影响CYP2A6表达以及活性的因素很多，年龄、性别尤其是雌激素水平[25]、遗传因素[10]、药物诱导作用[11.12]、环境中的化学物质[13, 14]等都能对CYP2A6基因的表达产生一定程度的影响，因此在肝癌组织中之所以出现CYP2A6 mRNA及蛋白水平明显增高的现象可能是多种因素共同作用的结果。

综合整个实验来看，在肝癌组织中我们首次发现的hnRNP A1及CYP2A6两种基因的表达水平明显增高，提示了两者在肝癌疾病的发生与发展过程中可能分别起到了某种程度的作用，但是这些作用是通过什么样的途径和机制来实现的到底有什么样的临床意义，还需要进一步的实验来予以分析解读。其次通过相关性分析以及RNA干扰实验，我们发现同时表达增高的这两种基因之间确实存在一定的相互作用，该作用的可能机制是跟hnRNP A1蛋白的基本功能密切相关的。虽然hnRNP A1蛋白水平的增高是CYP2A6表达水平升高的一个因素，但是并不是唯一因素。那么在能够引起CYP2A6表达以及活性的多种因素中哪一个才是造成肝癌组织中其表达增高的关键因素？同时肝癌组织中hnRNP A1蛋白表达水平的升高是否也能影响肝脏内其它的代谢酶的表达与活性呢？此外，在肝癌组织中到底又是什么样的机制引起了hnRNP A1表达水平的上升？这些问题都有待于更加深入的研究来进行探讨。

第五章 结 论

我们通过对肝癌组织和正常肝脏组织的对比研究首次发现在肝癌组织中hnRNP A1及CYP2A6这两种基因的mRNA及蛋白表达水平都显著增高，同时表达增高的这两种基因中存在一定的因果关系，即hnRNP A1蛋白水平对CYP2A6的表达水平有着一定程度的影响。

这些研究结果为进一步明确肝癌疾病的病因明确提供了一条新的线索。

参考文献

[1] Ho MK, Mwenifumbo JC, Zhao B, *et al*. A novel CYP2A6 allele, CYP2A6*23, impairs enzyme function *in vitro* and *in vivo* and decrease smoking in a population of Black-African descent. Pharmacogenet Genomics. 2008 Jan;18(1):67-75

[2] Noritaka Ariyoshi, Masami Miyamoto, Yuri Umetsu, Hideo Kunitoh, Hirotoshi Dosaka-Akita, Yu-ichi Sawamura, Jun Yokota, Nobuo Nemoto, Kunio Sato, and Tetsuya Kamataki. Genetic Polymorphism of CYP2A6 Gene and Tobacco-induced Lung Cancer Risk in Male Smokers. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 890 Vol. 11, 890–894, September 2002.

[3] N Minematsu,H Nakamura,M Iwata,H Tateno,T Nakajima,S Takahashi,S Fujishima,K Yamaguchi, Association of CYP2A6 deletion polymorphism with smoking habit and development of pulmonary emphysema, Thorax 2003;58:623-628.

[4] Von Weymarn LB, Chun JA, Knudsen GA, *et al*. Effects of eleven isothiocyanates on P450 2A6- and 2A13-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. Chem Res Toxicol. 2007 Sep;20(9):1252-9

[5] Matsuda Y, Yamakawa K, Saoo K, *et al*. CYP2A6 overexpression in human lung cancers correlates with a high malignant status. Oncol Rep. 2007 Jul;18(1):53-7

[6] Oyama T, Suqio K, Uramoto H, *et al*. Increased cytochrome P450 and aryl hydrocarbon receptor in bronchial epithelium of heavy smokers with non-small cell lung carcinoma carries a poor prognosis. Front Biosci. 2007 May 1;12:4497-503

[7] Matsuda Y, Saoo K, Yamakawa Y, *et al*. Overexpression of CYP2A6 in human colorectal tumors. Cancer Sci. 2007 Oct;98(10):1582-5

[8] MacLeod SL, Chowdhury P. The genetics of nicotine dependence: relationship to pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2006 Dec 14;12(46):7433-9

[9] Tiwawech D, Srivatanakul P, Karalak A, *et al*. Cytochrome P450 2A6 polymorphism in

nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett. 2006 Sep 8:241(1):135-41

[10] Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, *et al*. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 2004 Sep 15;199(3):193-209

[11] Madan A, Graham RA, Carroll KM, *et al*. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. Drug Metab Dispos. 2003 Apr,31(4):421-31

[12] Nekvindová J, Masek V, Veinlichová A, *et al*. Inhibition of human liver microsomal cytochrome P450 acticities by adefovir and tenofovir. Xenobiotica. 2006 Dec;36(12):1165-77

[13] Takeuchi H, Saoo K, Yokohira M, *et al*. Pretreatment with 8-Methoxypsoralen, a Potent Human CYP2A6 Inhibitor, Strongly Inhibits Lung Tumorigenesis Induced by 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone in Female A/J Mice. Cancer Res. 2003 Nov 15;63(22):7581-3

[14] Rahnasto M, Wittekindt C, Juvonen RO, *et al*. Identification of inhibitors of the nicotine metabolising CYP2A6 enzyme-an in silico approach. Pharmacogenomics J. 2007 Oct 9

[15] Iervolino A, Santilli G, Trotta R, *et al*. HnRNP A1 nucleocytoplasmic shutting activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. Mol Cell Biol. 2002 Apr;22(7):2255-66

[16] Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, *et al*. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers [J]. Int J Oncol, 2005;26(3):635-640

[17] Xu X, Joh HD, Pin S, *et al*. Expression of multiple larger-sized transcripts for several genes in oligodendrogliomas: potential markers for glioma subtype [J]. Cancer Lett, 2001;171(1):67-77

[18] Brockstedt E, Rickers A, Kostka S, *et al*. Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3 [J]. J Biol Chem, 1998;273(43):28057-28064

[19] Neviani P, Santhanam R, Trotta R, *et al*. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein [J]. Cancer Cell, 2005;8(5):355-368

[20] Raffalli-Mathieu F, Glisovic T, Ben-David Y, *et al*. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 and Regulation of the Xenobiotic-Inducible Gene Cyp2a5. Mol Pharmacol. 2002 Apr;61(4):795-9

[21] Glisovic T, Söderberg M, Christian K, *et al*. Interplay between transcriptional and post-transcriptional regulation of Cyp2a5 expression. Biochem Pharmacol. 2003 May 15;65(10):1653-61

[22] Glisovic T, Ben-David Y, Lang MA, *et al*. Interplay between hnRNP A1 and cis-acting element in the 3′UTR of CYP2A5 mRNA is central for high expression of the gene. FEBS Lett. 2003 Jan 30;535(1-3):147-52

[23] Gilmore J, Rotondo F, Pelletier AM, *et al*. Identification of a 43-kDa protein in human liver cytosol that binds to the 3’-untranslated region of CYP2A6 mRNA. Biochem Pharmacol. 2001 Sep 15;62(6):669-78

[24] Christian K, Lang M, Maurel P, *et al*. Interaction of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 with Cytochrome P450 2A6 mRNA: Implications for Post-Transcriptional Regulation of the CYP2A6 Gene. Mol Pharmacol. 2004 Jun;65(6):1405-14

[25] Higashi E, Fukami T, Itoh M, *et al*. Human CYP2A6 is Induced by Estrogen via Estrogen Receptor. Drug Metab Dispos. 2007 Oct;35(10):1935-41

[26] Kamma H, Portman DS, Dreyfuss G, Cell type-specific expression of hnRNP Proteins.

Experiment Cell Research. 1995 221:187-196

[27] Bronstein NB, Kishore R, Ismail Z, et al. cDNA cloning and spatiotemporal expression during avian embryogenesis of hnRNP A1, a regulatory factor in alternative splicing.Gene Expr Patterns. 2003 Jun;3(3):285-95

综　　述

核不均一核糖核蛋白(hnRNPs)与肿瘤关系的研究进展

王亦男，陈尧，周宏灏*

（中南大学湘雅医学院临床药理研究所，湖南 长沙 410078）

[关键词] 核不均一核糖核蛋白；癌症；肿瘤；稳定

基金项目：国家自然科学基金项目（No：30572226）

作者简介：王亦男（1983-），女，中南大学临床药理研究所硕士生，研究方向：遗传药理学， Tel：0731-4805379，Mob：(0)13574891580，Fax：0731-4805379，E-mail：w_yinan@163.com

*通讯作者：周宏灏（1939-），男，中国工程院院士，博士生导师，研究方向：遗传药理学， Tel：0731-4805379，Fax：0731-4805379，E-mail：hhzhou@public.hn.com

核不均一核糖核蛋白（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein，hnRNP）是一个蛋白超家族，包含有20多种蛋白，分别从A1命名至U。hnRNPs家族分布极为广泛，不仅在脊髓动物各组织器官中表达丰富，在其他的物种中例如植物、酵母中也存在[1、2]。此外，hnRNPs在不同的组织器官中表达不同，代谢旺盛的组织中表达相对较高，例如肺、脑等；即使同一组织器官，在不同的生命周期中hnRNPs表达的种类和水平也有较大的差异[3]。

hnRNPs主要分布在细胞核区，其结构具有相似性，主要包含了2个位于氨基端的RNA结合区（RBD I和RBD II）以及位于羧基端的一个富含甘氨酸的结构区域[4]。两个RNA结合区域能形成茎环结构，是与前体mRNA的3’非编码区结合的重要部位；而富含甘氨酸的结构区域在功能上类似于核定位系统。通过比较hnRNPs之间的结构，发现各个蛋白家族成员结构上的主要区别在于RBD I和RBD II两者的序列组成，而富含甘氨酸的结构区域在序列上区别不大。由此可见RNA结合区域的变化可能是产生各蛋白功能特异性的决定因素[5]。按照生理功能的不同，hnRNPs可以分为两大类：一类是定位于细胞核内，不能自有穿梭于质核之间的蛋白，例如hnRNP B、C等，这类蛋白与前体mRNA结合形成复合体，在前体mRNA转运出细胞核之前就脱离复合体；还有一类是可以自由穿梭在细胞核与细胞质之间的蛋白，如hnRNP A、D、E、I、K，它们与前体mRNA形成复合体以后一直伴随着前体mRNA 通过核孔复合体进入细胞质，并与其他蛋白如RNA多聚酶II等一起完成对前体mRNA 的剪切加工以及修饰，然后与之解离再返回到细胞核中准备参与下一轮的转运[5]。在环境、遗传等因素的作用下，一旦hnRNP蛋白正常生理功能发生变异，也将导致人类诸多疾病的发生，而最为密切的是肿瘤疾病，并

且不同的hnRNP蛋白与不同的肿瘤疾病紧密关联，亦即各个hnRNP蛋白在同一种肿瘤疾病发生中的地位是不同的。

1．与各hnRNPs家族主要成员相关的肿瘤疾病

hnRNPs成员	相关肿瘤疾病	关系性质	参考文献
hnRNP A1	少突神经胶质细胞瘤	表达增高	6
	慢性髓细胞性白血病	表达增高	6
	肺癌	小细胞癌中较非小细胞癌中表达高4.3倍	7
	结肠癌	表达增高，与病理分期相关，II、III、IV期中分别升高78%、64%和40%	8
	伯基特淋巴瘤	抑制细胞凋亡	9
	慢性粒细胞白血病	在急性发作期表达明显增高	10、11
hnRNP A2/B1	肺癌	表达增高，小细胞癌中的表达较非小细胞癌高，并且与肺癌的临床病理分期相关：高、中、低分化肺癌该蛋白的表达率分别为100%、67%和37%	14、18、19、20、21
	乳腺癌	表达增高	15
	胰腺癌	表达增高	16
	食管癌	表达增高	17
hnRNP E1	子宫颈鳞癌	hnRNP E1表达降低	22
hnRNP E2	口腔鳞癌	hnRNP E2表达与病理分期正相关：中低分化鳞癌中表达较低，高分化鳞癌中表达较高	23
	慢性粒细胞白血病	hnRNP E2表达增高	24
hnRNP K	慢性粒细胞白血病	表达增高	25、26、27、28

hnRNP H/H’	胰腺腺癌	表达增高	29
	肝细胞癌	表达增高	29
	胃癌	表达增高	29
hnRNP F	肝细胞癌	表达显著增高	29
hnRNP L	肺癌	表达显著增高	30

2. hnRNPs与肿瘤疾病发生发展的机制研究

2.1 hnRNPs对端粒的作用

肿瘤的发生和发展是一个极其复杂的过程，它是遗传、环境等多种因素共同作用的结果。就发生的机制而言，肿瘤与细胞的凋亡关系最为直接，而控制细胞凋亡的重要因素是端粒，它位于染色体的末端，有稳定染色体，参与真核细胞有丝分裂的功能。在染色体复制的过程中端粒不断缩短，从而造成染色体不稳定以及细胞衰老。肿瘤细胞之所以不会调亡依赖于端粒与特定蛋白的结合，以及端粒酶的作用。一系列的体外试验显示hnRNP D, hnRNP A2/B1, 以及hnRNP A1都能够与端粒的DNA序列相结合。此外，hnRNP D和hnRNP A1蛋白亚型UP1都能够直接与端粒酶发生相互作用。进一步的试验表明在不表达hnRNP A1的CB3细胞株中端粒的长度比表达hnRNP A1的CB7细胞株中端粒的长度明显缩短。Hela细胞中通过RNA干扰，减少hnRNP A1/A2/B1基因的表达后端粒G尾的长度会发生明显的变化。然而不是所有的hnRNPs家族成员都具备诱导端粒延长的功能，虽然在体外的试验中证实hnRNP A1与其同基因的亚型UP1都可能够与单链的端粒DNA序列相结合，但是只有UP1亚型能够直接在细胞中发生作用，诱导端粒的延长。这一现象的出现说明hnRNP家族中同一基因的不同亚型可能具有不同的细胞功能。

2.2 hnRNPs在具体肿瘤疾病发生发展中的作用机制

由表1可见hnRNPs家族成员与各大常见肿瘤疾病的发生、发展关系密切。不同的蛋白家族成员在不同的肿瘤疾病中的作用机制也各不相同，而且过程也极为复杂。以针对慢性粒细胞白血病急性期过程中hnRNPs家族主要成员的作用机制为例进行说明。

研究表明hnRNP A1蛋白的稳定性能够被p210 BCR/ABL融合基因通过其表达量和酶的依赖性诱导升高。并且hnRNP A1蛋白在慢性粒细胞白血病急性发作期的粒细胞中的表达水平和慢性期比较也有明显的增高[10、11]。慢性粒细胞白血病急性发作时，其粒细胞中的*BCR/ABL*融合基因表达显著增高，诱导hnRNP A1蛋白的表达增高。增高的hnRNP A1蛋白与抗细胞凋亡因子BCL-X_L和SET的mRNA结合增加，形成蛋白-mRNA复合物，该复合物的形成能稳定mRNA免受mRNA酶的攻击，并且帮助mRNA通过核孔复合体从细胞核转运到细胞质中，从而上调mRNA水平，进一步使BCL-X_L和SET蛋白表达水平增高，而其中SET水平的增高抑制了蛋白磷酸酶2A生理抑制剂（PP2A）的活性，最终诱导细胞增殖，并抑制凋亡[10、11]。

除了hnRNP A1蛋白，hnRNP E2在慢性粒细胞白血病的发生发展中也起到了重要的作用。急性期骨髓干细胞失去终末分化功能是慢性粒细胞白血病发生的一大特点，而这一现象的产生依赖于抑制转录因子CCAAT/增强子结合蛋白（C/EBPα）[24]。在慢性粒细胞白血病急性发作期*BCR/ABL*融合基因的表达增高，导致hnRNP K蛋白水平升高。而hnRNP K能够与*CEBPA*基因的mRNA 5’非编码区结合，从翻译水平抑制该基因的表达，从而下调慢性粒细胞白血病急性发作期患者原代骨髓细胞中C/EBPα蛋白水平，最终抑制细胞

分化，导致肿瘤的发生[24]。

hnRNP K与hnRNP E1/E2拥有一个相同的结构基序，称为hnRNP K同源区域，该区域为hnRNP K与mRNA的结合提供了结构基础。在有*BCR/ABL*融合基因表达的骨髓细胞、淋巴细胞以及处于慢性粒细胞白血病急性发作期的原代细胞中，通过*BCR/ABL*表达水平依赖途径，*hnRNP K*基因的转录水平和mRNA稳定性能够被细胞丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节酶1/2 ($MARK^{ERK1/2}$) 诱导升高。在BCR/ABL阳性的细胞中hnRNP K能够下调受损的细胞因子依赖的集落生成并且引起白血病[25]。这些效应的产生可能依赖于致癌基因MYC的水平下调[26]，而hnRNP K通过内核糖体进入位点与MYC的mRNA结合，从转录和翻译水平上调*MYC*基因的表达，最终细胞增殖被诱导，避免了细胞的凋亡[27、28]。

综上所述，核不均一核糖核蛋白家族与目前威胁人类生命的肿瘤疾病关系密切，多种肿瘤的形成和发展都或多或少的与该家族蛋白有关。该蛋白家族将来可能作为相应肿瘤疾病的分子生物标记而被人们所应用，正如hnRNP A2/B1已经被作为肺癌早期诊断的指标一样，而目前在这个领域的研究还属于起步阶段，有许多关键的问题期待着解决，如该家族的某些成员作为肿瘤相关抗原指标已经有较高的敏感性，但其特异性还需要更加有力的证据；此外在各肿瘤组织中，hnRNP的过表达是否与其他导致肿瘤的因素存在相关性需要进一步的工作确认。相信在不久的将来，该蛋白家族对于肿瘤的重要意义将被人们进一步发现和重视。

[参考文献]

[1] Kamma H, Fujimoto M, Fujiwara M , et al . Interactionof hnRNP A2/ B1 isoforms with telomeric ss DNA and the in vitro function [J]. Biochem Biophy Res Comm. 2001; 280 :625-30

[2] Kamma H, Portman DS, Dreyfuss G, Cell type-specific expression of hnRNP Proteins. Experiment Cell Research 221.1995:187-196.

[3] Bronstein NB, Kishore R, Ismail Z, et al. cDNA cloning and spatiotemporal expression during avian embryogenesis of hnRNP A1, a regulatory factor in alternative splicing.Gene Expr Patterns. 2003 Jun;3(3):285-95.

[4] Cartegni L, Maconi M, Morandi E, et al. hnRNP A1 Selectively Interacts Through its Gly-rich Domain with Different RNA-binding Proteins.J Mol Biol. 1996 Jun 14;259(3):337-48.

[5] Visa N, Alzhanova-Ericsson AT, Sun X, et al. Bjorkroth B, Wurtz T, Daneholt B，A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. Cell. 1996 Jan 26;84(2):253-64.

[6] Alain Expert-Bezançon, Alain Sureau, Patrice Durosay, et al. hnRNP A1 and the SR Proteins ASF/SF2 and SC35 Have Antagonistic Functions in Splicing of β-Tropomyosin Exon 6B [J]. Biological Chemistry. 2004; 279(37): 38249-59

[7] Xu X, Joh HD, Pin S, et al. Expression of multiple largersized transcripts for several genes in oligodendrogliomas: potential markers for glioma subtype [J]. Cancer Lett. 2001;171:67-77.

[8] Iervolino A, Santilli G, Trotta R, et al. hnRnp A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and Bcr/Abl leukemogenesis [J]. Mol Cell Biol. 2002; 22:2255-66.

[9] M Ushigome, T Ubagai, H Fukuda, N Tsuchiya, T Sugimura, J Takatsuka, and H Nakagama. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers [J]. Int J Oncol. 2005; 26(3): 635-40.

[10] Ekkehard Brockstedt, Anke Rickers, Susanne Kostka, et al. Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3 [J]. J Biol Chem. 1998 Dec 11;273(50):33884.

[11] Iervolino A, Santilli G, Trotta R, et al. hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. Mol Cell Biol 2002;22:2255-66.

[12] Neviani P, Santhanam R,Trotta R, et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. Cancer Cell 2005;8: 355-68.

[13] Kamma H , Horiguchi H , Wan L , et al . Molecular characterization of the hnRNP A2/ B1 pro2 teins: tissue specific expression and novel iso forms [J]. Exp Cell Res. 1999; 246(2) ： 399-11.

[14] Michelson RJ , Collard MW, Ziemba AJ , et al . Nuclear DEAF212related (NUDR) protein con2 tains a novel DNA binding domain and represses transcription of the heterogeneous nuclear ribonu2 cleoprotein A2/ B1 promoter [J]. J Biol Chem, 1999; 274 (43): 305102-09.

[15] Fielding P, Turnbull L, Prime W, Walshaw M, Field JK. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: a clinical marker of early lung cancer detection [J]. Clin Cancer Res. 1999; 5: 4048-52.

[16] Zhou J, Allred DC, Avis I, et al. Differential expression of the early lung cancer detection marker, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 (hnRNP-A2/B1) in normal breast and neoplastic breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat. 2001; 66:217-24.

[17] Yan-Sanders Y, Hammons GJ, Lyn-Cook BD. Increased expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (hnRNP) in pancreatic tissue from smokers and pancreatic tumor cells [J]. Cancer Lett. 2002; 183:215-20.

[18] Matsuyama S, Goto Y, Sueoka N, et al. Heterogeneous nuclear

ribonucleoprotein B1 expressed in esophageal 142 I. Pino et al. squamous cell carcinomas as a new biomarker for diagnosis [J]. Jpn J Cancer Res. 2002; 91:658-63.

[19] Tockman MS, Mulshine JL, Piantadosi S, et al. Prospective detection of preclinical lung cancer: results from two studies of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression [J]. Clin Cancer Res.1997; 3:2237-46.

[20] 戴晓天,杨和平。hnRNP A2/ B1 在肺癌组织中的表达及其临床意义[J]。第三军医大学学报。2005; 5（27）:418-22

[21] Irene Pino, Rube´n Pı´o, Gemma Toledo. Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer [J]. Lung Cancer. 2003; 41:131-43

[22] M R Pillai, P Chacko, L A Kesari, P G Jayaprakash, H N Jayaram and A C Antony tissue to cancer papillomavirus mediated transformation of cervical nuclear ribonucleoprotein E1 in women with human expression of folate receptors and heterogeneous [J]. J Clin Pathol. 2003; 56:569-74

[23] Roychoudhury P, Paul RR, Chowdhury R, et al. HnRNP E2 is downregulated in human oral cancer cells and the overexpression of hnRNP E2 induces apoptosis. Mol Carcinog. 2007; 46(3):198-207.

[24] Perrotti D, Cesi V, Trotta R, et al. BCR-ABL suppresses C/EBPa expression through inhibitory action of hnRNP E2. Nat Genet 2002;30:48-58.

[25] Notari M, Neviani P, Santhanam R, et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. Blood 2006;107:2507-16.

[26] Sawyers CL, CallahanW,Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation byABL oncogenes. Cell 1992;70:901-10.

[27] Evans JR, Mitchell SA, Spriggs KA, et al. Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry

segment in vitro and in vivo. Oncogene 2003;22:8012-20.

[28] Michelotti EF, Michelotti GA, Aronsohn AI, Levens D. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor.Mol Cell Biol 1996;16:2350-60.

[29] Honore B, Baandrup U, Vorum H.Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues [J]. Exp Cell Res. 2004 Mar; 10; 294(1):199-09.

[30] Taguchi F, Kusaba H, Asai A, Iwamoto Y, Yano K, Nakano H, Mizukami T, Saijo N, Kato H, Nishio K.hnRNP L enhances sensitivity of the cells to KW-2189 [J]. Int J Cancer. 2004 Feb; 20; 108(5):679-85.

致　　谢

光阴荏苒，随着这本论文的完成，我的研究生学习生涯已经接近尾声了，回想起来，要感谢的人真的很多。

感谢我的导师周宏灏教授三年里对我学习上启迪和指教，是他为我开启了通往生命科学的大门，指引我在遗传药理学天空里汲取营养、蕴育思考。他向我们示范了一个真正的科学家应该具备怎样的作风和思想，激励我们为日后独立地研究奠定坚实的基础；生活上他如慈父般细心地关怀，潜移默化地教导着我们人生的哲理。

衷心感谢办公室主任王丹老师、欧阳冬生教授、刘昭前教授、王连生教授、刘洁教授三年来对我的帮助和鼓励。

衷心感谢谭志荣老师、陈尧师兄、郭栋师姐以及色谱室的所有兄弟姐妹们，陪伴我度过三年幸福快乐的时光，有你们相伴的日子，将会成为我人生中最美丽的一段回忆。

衷心感谢答辩秘书陈尧、郭栋在论文答辩过程中付出的辛勤劳动。

衷心感谢在肝脏标本收集过程中给予过无私帮助的湘雅医学院附一肝胆外科的黄云、丘东达，湘雅医学院附一肝胆外科的郑核。

衷心感谢黄远飞老师、胡冬莉老师、刘英姿老师给予的无私帮助。

衷心感谢陈尧、郭栋、刘艳等师兄师姐们给我在生活和实验上的帮助。

衷心感谢05级所有的同学，是你们和我一起经历了成长中的欢乐和痛苦。

衷心感谢答辩委员会全体老师的宝贵建议。

衷心感谢全所所有关心和支持我的老师和同学们。

衷心感谢多年来一直默默支持我的亲人和朋友们。

感谢国家自然科学基金30572226的资助

特别感谢我的家人对我一如既往的支持和无私的奉献。你们的理解和鼓励让我勇敢地面对人生的风风雨雨，你们的爱让我充满力量。

攻读学位期间主要的研究成果

参与主要研究项目：

CYP2A6酶活性与hnRNP A1蛋白表达的关系 国家自然科学基金项目（No：30572226）

参与编辑的书籍：

《药理学》，中国科学出版社，2008

《护师医用手册》人民卫生出版社，2008

发表的文章：

王亦男，陈尧，周宏灏，核不均一核糖核蛋白(hnRNPs)与肿瘤关系的研究进展。《广州医学院学报》（已发表）。

王亦男，谭志荣，陈尧，郭栋，韩仰，陶共由，陈豪，陈英，肖昌琼，张敏，周宏灏，液质联用法测定健康受试者血浆中他林洛尔的浓度。《中南药学》（已发表）。

Yi-nan Wang, Yao Chen, Wei Zhang, Dong Guo, Hong-hao Zhou. Relationships Among hnRNP A1, CYP2A6 and Hepatoma. Biochemical Pharmacology. （已投稿）。

陈秋华、**王亦男**、彭向东、谭志荣，液质联用法测定健康受试者血浆中氟桂利嗪的浓度。《中南药学》（已发表）。

Tan Zhi-Rong, Zhou Gan, **Wang Yi-Nan**, Zhang Wei，Lei He-Ping, Zhou Hong-Hao, LC-MS-MS Determination of Voriconazole in Human Plasma. Chromatographia. 已投稿。

陈英、谭志荣、陈尧、郭栋、韩仰、陈豪、肖昌琼、**王亦男**、张敏、许婷、周宏灏，LC-MSMS 方法检测人血浆中奥美沙坦的浓度。《中南药学》待发表。

陈豪、谭志荣、郭栋、陈尧、杨智、韩仰、陈英、张敏、肖昌琼、**王亦男**、周宏灏，高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中伊托必利的浓度。《中国新药杂志》待发表。