

学校编码: 10384

分类号\_密级\_

学 号: 32320141153389

UDC\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# Rab34 对斑马鱼发育及乳腺癌细胞迁移、侵袭影响的研究

Investigation about the influence of Rab34 on the  
development of zebrafish and the migration or invasion of  
breast cancer cells

陈永军

指导教师姓名: 王团老 教授

洪万进 教授

专 业 名 称: 化学生物学

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 5 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(王团老教授)课题(组)的研究成果,获得(王团老教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(王团老/余娴文)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): 陈永军

2017年 5月 16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）：陈永军

2017年5月

## 摘要

乳腺癌是女性发病率较高的恶性肿瘤之一，约占全身各种恶性肿瘤的7-10%，已成为威胁女性健康的主要病因。然而目前，乳腺癌仍然缺少特异性的诊断标记物或治疗靶点。本实验室之前的研究发现小分子 GTP 酶蛋白 Rab34 在恶化程度高的乳腺癌病人及其癌旁组织特异性的高表达，并能促进乳腺癌细胞的迁移能力。由于胚胎发育以及肿瘤的发生、恶化常常伴随着上皮细胞间质转分化（EMT）的发生，所以研究 Rab34 是否与 EMT 存在某种关联，进而影响胚胎的发育以及细胞的迁移或侵袭能力，以及探究 Rab34 是否能做为乳腺癌的一个诊断标记物或者治疗的药物靶点及其相关的分子机制就成为了我们研究的目的和重点。

本论文以斑马鱼为主要研究对象，探究 Rab34 对其发育的影响。首先，在斑马鱼中存在 zRab34a 和 zRab34b 两种形式，免疫荧光实验发现 zRab34a 与 hRab34（human Rab34）的定位一致，主要定位于高尔基体并且可以把溶酶体募集到核周，而 zRab34b 则无此现象。然后，我们在斑马鱼中通过显微注射构建了过表达 zRab34a 的模型，以及应用 CRISPR/cas9 基因编辑技术建立了敲除 zRab34a 的纯合品系。通过对胚胎发育过程的跟踪，在原肠运动和体节期，应用胚胎整体的原位杂交和抗体染色技术分析，发现无论是过表达 zRab34a 还是敲除 zRab34a 都影响斑马鱼的发育，特别是敲除 zRab34a 后会更显著抑制斑马鱼的发育。然后，我们构建稳定敲低 Rab34 表达的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系，以斑马鱼和裸鼠为对象，进行体内肿瘤细胞移植实验，探究 Rab34 对乳腺癌细胞的迁移/侵袭的影响。结果表明乳腺癌细胞敲低 Rab34 后，其迁移/侵袭能力受到显著抑制，这提示我们 Rab34 可能与上皮细胞间质转分化（EMT）存在某种关联，为此我们选定 EMT 的常见的标记物 E-cadherin 对早期发育阶段斑马鱼胚胎进行染色，初步发现 Rab34 或能促进 EMT 的发生。

以上研究表明，Rab34 可能是通过促进 EMT 的发生影响胚胎的发育进程以及促进乳腺癌细胞的迁移/侵袭，由此或可做为乳腺癌潜在的诊断标记物或药物靶点。

关键词：乳腺癌；Rab34；斑马鱼发

## Abstract

Breast cancer is one of the higher incidence of female malignant tumors, which accounts for about 7-10% of the all kinds of malignant tumors. However, there are no specific diagnosis biomarkers or therapeutic target for breast cancer, our lab found that Rab34 which is small molecule GTP apoenzyme is highly expressed in breast cancer patients of high degree and whose tissue is adjacent to carcinoma. Because the embryonic development and the deterioration of tumor is often accompanied by the epithelial mesenchymal transdifferentiation, thus, our main task is to study the correlation between the Rab34 and EMT, further to investigate the influence of Rab34 on embryonic development and the invasion or migration of breast cancer cells and finally to look for specific diagnosis biomarkers or therapeutic target for breast cancer.

Zebrafish is our primary study object to explore the influence of Rab34 on zebrafish development. Firstly, there are zRab34a and zRab34b in zebrafish is different from the human, the test of immunofluorescence found that zRab34a is mainly located in the Golgi and can raise lysosome to the around the nucleus, which is same with hRab34. However, there is no the phenomenon about zRab34b. Next, we build zRab34a overexpression model and knockout zRab34a model using CRISPR/cas9 gene-editing techniques. Moreover, we screen the homozygous strain. Taking advantage of whole-mount in situ hybridization, we found Whether overexpression of zRab34a or knockout zRab34a could affect the growth of zebrafish and the group of knockout zRab34a significantly inhibit the development of zebrafish. Furthermore, we put zebrafish and nude as our study object to do tumor cell transplantation in vivo experiment exploring the influence of Rab34 on breast cancer cell migration/invasion ability. Finally, We found that knockdown Rab34 could inhibit the breast cancer cell migration or invasion ability. For further research that whether there is a correlation between Rab34 and EMT, we selected E-cadherin which is one of the EMT common markers at embryos early developmental stage of zebrafish. we preliminary found that Rab34 can promote the occurrence of EMT.

Our studies have shown that Rab34 may be promote the occurrence of EMT and

further affect the development of zebrafish embryo and the breast cancer cell migration or invasive ability, in the near future,Rab34 may could as a potential diagnostic marker or drug therapeutic target to breast cancer.

Key Words:Breast cancer; Rab34; Zebrafish developmen

厦门大学博硕士论文摘要库

---

目录

<b>摘要</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>第一章 前言</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 乳腺癌简介</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 乳腺癌的发展 .....	1
1.1.2 乳腺癌的治疗 .....	1
<b>1.2 Rab 蛋白</b> .....	<b>1</b>
1.2.1 Rab 蛋白简介 .....	1
1.2.2 Rab 蛋白与囊泡运输 .....	3
1.2.3 Rab 蛋白与疾病发生 .....	5
<b>1.3 Rab34 蛋白</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 Rab34 蛋白简介 .....	5
1.3.2 Rab34 研究进展 .....	6
<b>1.4 RILP</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 模式生物斑马鱼</b> .....	<b>8</b>
1.5.1 斑马鱼简介 .....	8
1.5.2 斑马鱼发育时期简介 .....	8
1.5.3 斑马鱼的研究进展 .....	10
<b>1.6 CRISPR/cas9 基因编辑技术</b> .....	<b>11</b>
1.6.1 CRISPR/Cas9 系统简介 .....	11
1.6.2 CRISPR/Cas9 系统原理 .....	11
1.6.3 CRISPR/Cas9 的应用 .....	13
<b>1.7 细胞迁移与 EMT</b> .....	<b>14</b>

1.8 本研究的内容和意义.....	15
<b>第二章 材料与amp;方法.....</b>	<b>17</b>
2.1 材料.....	17
2.1.1 常用的材料 .....	17
<b>2.1.2 主要仪器和设备.....</b>	<b>19</b>
2.1.3 试剂药品与耗材 .....	20
2.1.4 常用溶液组分 .....	22
2.2 实验方法.....	24
2.2.1 斑马鱼的胚胎收集及固定 .....	24
2.2.2 斑马鱼原位杂交 .....	24
2.2.3 斑马鱼整体荧光染色 .....	27
2.2.4 显微注射技术 .....	28
2.2.5 活体显微拍照 .....	30
2.2.6 斑马鱼 Western Blotting 样品制备 .....	30
2.2.7 CRISPR/Cas9 基因编辑技术 .....	30
2.2.8 靶位点突变检测 .....	33
2.2.9 斑马鱼肿瘤细胞移植实验 .....	34
2.2.10 裸鼠肿瘤细胞移植实验 .....	34
2.2.11 构建表达载体 .....	35
2.2.12 斑马鱼 cDNA 制备 .....	38
2.2.13 细胞培养 .....	39
2.2.14 细胞免疫荧光实验 .....	41
2.2.15 SDS-聚丙烯凝胶电泳.....	41
2.2.16 免疫印迹 .....	42



<b>第三章 结果与分析</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1 Rab34 的序列比对分析</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2 Rab34 在细胞内的定位研究</b> .....	<b>44</b>
3.2.1 hRab34 在细胞内的定位分析 .....	44
3.2.2 zRab34 在细胞内的定位分析 .....	45
<b>3.3 zRab34a 原位表达图谱分析</b> .....	<b>47</b>
<b>3.4 斑马鱼早期胚胎过表达 zRab34a mRNA 的表型分析</b> .....	<b>48</b>
<b>3.5 斑马鱼 CRISPR/cas9 敲除试验</b> .....	<b>50</b>
3.5.1 靶位点的确定 .....	51
3.5.2 靶位点在斑马鱼中存在且无突变发生 .....	51
3.5.3 sgRNA 的构建 .....	52
3.5.4 靶点有效性检测 .....	54
<b>3.6 敲除斑马鱼 zRab34a 纯合品系的建立</b> .....	<b>57</b>
3.6.1 建立纯合品系的技术路线 .....	57
3.6.2 F0 代的选择及遗传检测 .....	58
3.6.3 F1 代成鱼敲除形式的确定 .....	60
3.6.4 F1 代的扩大繁殖 .....	62
3.6.5 纯合品系的确定 .....	63
<b>3.7 敲除基因 zRab34a 对斑马鱼发育的影响</b> .....	<b>65</b>
<b>3.8 zRab34a 影响斑马鱼体轴与体节的发育</b> .....	<b>66</b>
<b>3.9 zRab34a 影响斑马鱼原肠运动</b> .....	<b>67</b>
<b>3.10 过表达 Rab34 的下游效应因子 RILP 对斑马鱼发育的影响</b> .....	<b>69</b>
<b>3.11 敲低 hRab34 对乳腺癌细胞迁移/侵袭的影响</b> .....	<b>71</b>
3.11.1 斑马鱼体内肿瘤细胞移植分析 .....	71

3.11.2 裸鼠肺体内肺转移分析 .....	72
3.12 zRab34a 对 EMT 标记物 E-cadherin 的影响.....	74
<b>第四章 讨论.....</b>	<b>75</b>
<b>第五章 结论.....</b>	<b>77</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>78</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>87</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Preface</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 The introduction of breast cancer</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 The development of breast cancer .....	1
1.1.2 The therapy of breast cancer .....	1
<b>1.2 Rab protein</b> .....	<b>1</b>
1.2.1 The introduction of Rab protein .....	1
1.2.2 Rab protein and membrane traffic .....	3
1.2.3 Rab protein and disease .....	5
<b>1.3 Rab34 protein</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 The introduction of Rab34 protein .....	5
1.3.2 The research progress of Rab34 .....	6
<b>1.4 RILP</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Zebrafish model creatures</b> .....	<b>8</b>
1.5.1 The introduction of zebrafish.....	8
1.5.2 The introduction of development about zebrafish .....	8
1.5.3 The research progress of zebrafish .....	10
<b>1.6 CRISPR/cas9 genome-editing technology</b> .....	<b>11</b>
1.6.1 The introduction of CRISPR/Cas9 .....	11
1.6.2 The theory of CRISPR/Cas9 .....	11
1.6.3 The application of CRISPR/Cas9 .....	13
<b>1.7 The cell migration and EMT</b> .....	<b>14</b>
<b>1.8 The content and significance</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 The common materials .....	17

2.1.2 Main instruments and equipment.....	19
2.1.3 Reagents drugs and consumables .....	20
2.1.4 Commonly used solution composition .....	22
<b>2.2 Methods .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 The embryo collection and fixed about zebrafish.....	24
2.2.2 The in situ hybridization of zebrafish.....	24
2.2.3 The overall immunofluorescence of zebrafish .....	27
2.2.4 The microinjection technology .....	28
2.2.5 Living microscopic pictures .....	30
2.2.6 The western Blotting sample preparation of zebrafish .....	30
2.2.7 CRISPR/Cas9 gene-editing technology.....	30
2.2.8 The detection of target .....	33
2.2.9 The transplant of cancer cells in zebrafish .....	34
2.2.10 The transplant of cancer cells in nude .....	34
2.2.11 The establishment of common vectors .....	35
2.2.12 The preparation of cDNA about zebrafish.....	38
2.2.13 Cell culture.....	39
2.2.14 The immunofluorescence about cell .....	41
2.2.15 SDS-PAGE.....	42
2.2.16 Western blot.....	42
<b>Chapter 3 The result and analysis.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 The analysis of sequence comparative about Rab34.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 The location study of Rab34 in cell.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 The location analysis of hRab34 in cell.....	44
3.2.2 The location analysis of zRab34 in cell .....	45
<b>3.3 The in-situ expression spectrum analysis about zRab34a .....</b>	<b>47</b>
<b>3.4 The phenotype analysis of overexpression zRab34a mRNA in zebrafish ...</b>	<b>48</b>
<b>3.5 CRISPR/cas9 knockout in zebrafish .....</b>	<b>50</b>
3.5.1 The ensure of target .....	51

3.5.2 There is no mutation of the target .....	51
3.5.3 The establishment of sgRNA .....	52
3.5.4 The effective detection of target .....	54
<b>3.6 The establishment of homozygous strain about knockout zRab34a in zebrafish .....</b>	<b>57</b>
3.6.1 The establishment of technical route of homozygous strain .....	57
3.6.2 The screen of F0 .....	58
3.6.3 The ensure of knock-out form about F1 .....	60
3.6.4 The expand reproduction of F1 .....	62
3.6.5 The ensure of homozygous strain .....	63
<b>3.7 The influence of knockout zRab34a on the development of zebrafish .....</b>	<b>65</b>
<b>3.8 The influence of zRab34a on the development of body axis and articulate .....</b>	<b>66</b>
<b>3.9 The influence of zRab34a on the development of archenteron .....</b>	<b>67</b>
<b>3.10 The influence of overexpress RILP which is the downstream effect factor of Rab34 on the development of zebrafish .....</b>	<b>69</b>
<b>3.11 The influence of knock down hRab34 on the migration or invasion of breast cancer cells .....</b>	<b>71</b>
3.11.1 The analysis of transplant of cancer cells in zebrafish .....	71
3.11.2 The analysis of transplant of cancer cells in nude .....	72
<b>3.12 The influence of zRab34a on E-cadherin .....</b>	<b>74</b>
<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>75</b>
<b>Chapter 5 Conclusion .....</b>	<b>77</b>
<b>Reference .....</b>	<b>78</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>87</b>

## 第一章 前言

### 1.1 乳腺癌简介

#### 1.1.1 乳腺癌的发展

乳腺癌的特点是恶性乳腺上皮组织细胞不受控制的生长。这种疾病会影响两性。乳腺癌是女性最常见的癌症类型，全球的发病率随年龄的增长有显著的上升趋势。据报道仅在2012年，全球乳腺癌在所有新增癌症病例的占29%，在全世界所有癌症死亡相关的女性占14%<sup>[1]</sup>。这意味着这一年有170万年新增妇女病例和大约522000新发病例死亡。令人担忧的是，死亡率为乳腺癌发病率比大约是0.31<sup>[2]</sup>，在中国，虽然发病率没有欧美国家高，但是近年来发病呈年轻化的趋势<sup>[3,4]</sup>。

#### 1.1.2 乳腺癌的治疗

乳腺癌分为浸润性癌、非浸润性癌以及早期浸润性癌三大类<sup>[5-7]</sup>，目前常规的乳腺癌治疗手段主要是手术切除后的放疗、化疗，这对于中晚期病人痛苦极大，而且治愈的可能性很低，近年来，免疫治疗和靶点疗法开始兴起，新兴的作用靶点不断的被尝试和改进，多数的靶点药物是针对孕激素受体(PR)、雌激素受体(ER)以及表皮生长因子受体Her-2开发的<sup>[8-10]</sup>，也取得了一些进展。然而，这种治疗方法对于三阴性乳腺癌(TNBC)束手无策，三阴性乳腺癌是特指ER、PR和表皮生长因子受体Her-2均为阴性的一类特殊的乳腺癌病例，占全部乳腺癌患者总数的15-20%<sup>[11]</sup>，它的特点是发病年龄早、高侵袭性、预后较差、早期易发生局部复发和远处转移等等<sup>[12,13]</sup>，众所周知，癌细胞是由于其无限增值和远端迁移扩散才难以治疗，所以，通过细胞生物学手段寻找TNBC细胞系的特定表达基因，探寻其在癌细胞内的相关机制，研究其对于TNBC细胞的增殖、迁移以及侵袭的影响，或能找到控制肿瘤细胞的迁移或侵袭药物靶点，也将为治疗TNBC掀开崭新的一页。

### 1.2 Rab 蛋白

#### 1.2.1 Rab 蛋白简介

Rab蛋白是一类小分子GTPase，又称鸟苷酸结合调节蛋，顾名思义，在细胞内，Rab蛋白可以结合和水解GTP，是能量GDP与GTP的转换开关，在细胞内的

囊泡转运以及信号转导方面起着非常重要的作用<sup>[14]</sup>，在酵母中有11种Rab蛋白，人类基因组中发现了60多个不同的Rab蛋白基因，Rab蛋白较小，大多约为20-30KD之间，由200多个氨基酸组成，Rab蛋白在不同物种之间都存在，有很高的保守性，通过序列比对，Rab蛋白之间根据序列相似性又可分为多个亚型。如Rab27在human中有Rab27a和Rab27b。Rab蛋白属于小G蛋白家族，G蛋白是结合鸟苷酸分子（GTP/GDP）的一类蛋白质，当Rab GTPase与GDP结合时，处于失活状态；Rab GTPase与GTP结合时，处于激活状态。状态的转换由相应的转换因子来完成，处于活化状态的Rab蛋白与胞膜结合，一旦功能完成，就会在GAP催化水解作用下失去活性，返回到细胞质内被重新利用。在细胞内的蛋白质运输等精细调控中起到重要的作用<sup>[14-16]</sup>。

不同的Rab蛋白在细胞内的定位和功能不尽相同，Rab4A、Rab4B、Rab5、Rab18、Rab20以及Rab22定位于早期内体，体外实验证明，Rab5可以促进转铁蛋白受体进入网格蛋白包被的凹窝，进而在囊泡出芽时发挥作用<sup>[17]</sup>。Rab7、Rab9以及Rab24定位于晚期内体，Rab6、Rab8、Rab12等定位于高尔基体，参与分泌小泡的形成和运输。

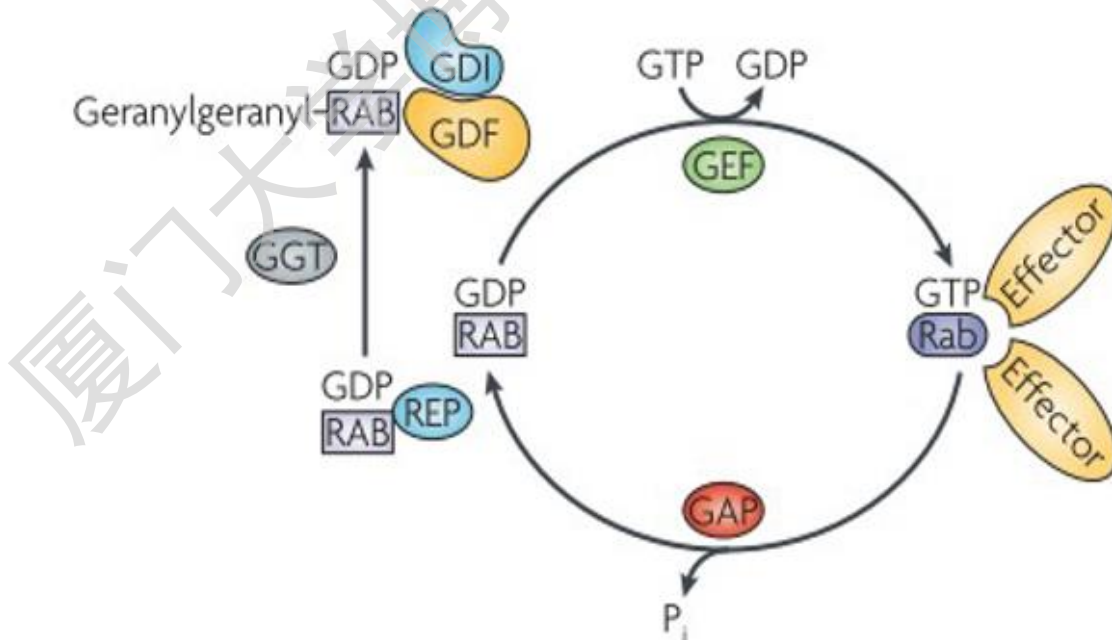


图 1-1 Rab 蛋白功能转换

Figure 1-1 the function transformation of Rab protein

注：摘自Stenmark, H 等<sup>[14]</sup>

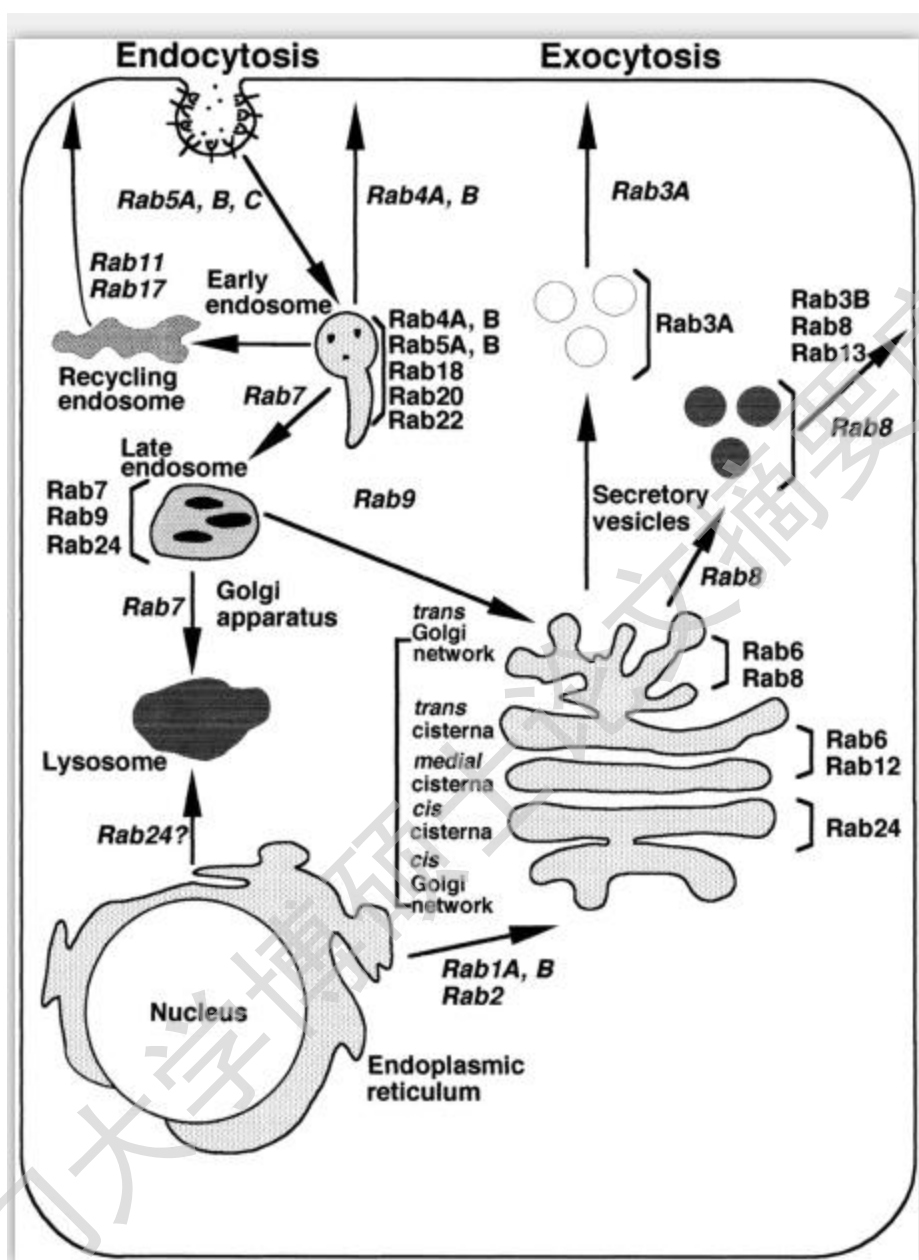


图 1-2 Rab 在细胞内的分布

Figure 1-2 the function of Rab protein in membrane traffic

注：摘自 Takai Y 等, 2001<sup>[18]</sup>

### 1.2.2 Rab 蛋白与囊泡运输

真核细胞存在的基本是细胞内各个细胞器间通过囊泡的膜转运。Rab蛋白确保了转运蛋白准确被运输至目的地。Rab蛋白是小 GTP 酶中的一大家族，它通



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.

厦门大学博硕士论文摘要库