

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520141153542

廈門大學

硕士学位论文

OVOL2 抑制乳腺癌侵袭与转移的机制研究

**Study on the Mechanism of OVOL2 Inhibiting Invasion and
Metastasis of Breast Cancer**

刘娜

指导教师姓名: 张志明 教授

专业名称: 外科学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩时间: 2017年5月

2017年5月

OVOL2抑制乳腺癌侵袭与转移的机制研究

刘娜

指导教师

张志明

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(李博安)课题(组)的研究成果,获得(李博安)课题(组)经费或实验室的资助,在(李博安)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

摘要	VII
ABSTRACT	VIII
前言	1
1.1 Ovvol2 蛋白	1
OVOL2 基因结构及表达蛋白	1
OVOL2 在生物发育中的作用	2
OVOL2 与临床疾病的关系	5
1.2 上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)	6
1.2.1 EMT 简介	6
1.2.2 EMT 与肿瘤进程	9
1.2.3 EMT 与乳腺癌	9
1.3 TGF- β 信号通路	10
1.3.1 TGF- β 蛋白	10
1.3.2 Smad 蛋白超家族	11
1.3.3 TGF- β 信号通路的组成及其调控机制	12
1.3.4 TGF- β 与肿瘤	14
材料和方法	20
2.1 实验材料	20
2.1.1 细胞系	20
2.1.2 菌种	20
2.1.3 抗体	20
2.1.4 常规药品和试剂	21

2.1.5	溶液配方	22
2.2	实验方法	23
2.2.1	细胞相关实验方法	23
2.2.2	核酸相关实验方法	24
2.2.3	蛋白相关实验方法	34
	实验结果	37
3.1	OVOL2 抑制 TGF-β 介导的 EMT.....	37
3.1.1	Ovol2 影响上皮细胞形态学及上皮标志物的变化	37
3.1.2	Ovol2 影响上皮细胞的侵袭能力	41
3.1.3	Ovol2 影响上皮细胞的迁移能力	41
3.2	OVOL2 通过抑制 EMT 抑制乳腺癌的侵袭和转移	42
3.2.1	OVOL2 抑制乳腺癌 EMT	42
3.2.2	OVOL2 抑制乳腺癌细胞的侵袭能力	44
3.2.3	OVOL2 抑制乳腺癌细胞的迁移能力	45
3.2.4	Oncomine 数据库内乳腺癌细胞中 OVOL2 表达的基因分析	45
3.3	OVOL2 通过抑制 TGF-β 信号通路抑制 EMT	48
3.3.1	OVOL2 直接抑制 TGF- β /Smad 信号通路	48
3.3.2	OVOL2 通过调节 Smad7 和 Smad4 表达抑制 TGF- β 信号通路	49
3.4	OVOL2 在小鼠体内抑制乳腺癌的转移	51
3.4.1	BALB / c 小鼠实验	51
3.4.2	MMTV-PyVT-Ovol2 转基因小鼠模型	53
	讨论和展望	55
	参考文献	58

致谢.....62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

ABSTRACT IN CHINESE	VII
ABSTRACT IN ENGLISH.....	VIII
CHAPTER 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 OVO proteinfamily	1
1.1.1 OVO proteinfamily	1
1.1.2 The Role of OVOL2 in Biological Development	2
1.1.3 The relationship between OVOL2 and clinical	5
1.2 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)	6
1.2.1 The review of EMT.....	6
1.2.2 EMT and tumor progression	9
1.2.3 The role of EMT in breast cancer	9
1.3 TGF-β signaling pathway	10
1.3.1 TGF- β s	10
1.3.2 Smads superfamily	11
1.3.3 The composition and regulatory of TGF - β signaling pathway	12
1.3.4 TGF- β and tumor	14
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS.....	20
2.1 Experimental Materials.....	20
2.1.1 Cell lines	20
2.1.2 Bacteria strains.....	20
2.1.3 Antibody	20
2.1.4 Chemicals and reagents.....	21

2. 1. 5	Formula of solution.....	22
2. 2	Experimental methods.....	23
2. 2. 1	Cell related experimental methods.....	23
2. 2. 2	Nucleic acid related experimental methods	24
2. 2. 3	Protein related experimental methods.....	34
CHAPTER 3	RESULTS.....	37
3.1	OVOL2 inhibits TGF-β-mediated EMT.....	37
3. 1. 1	Ovol2 with morphological/epithelial markers in epithelial cells	37
3. 1. 2	Ovol2 affects the invasion of epithelial cells	41
3. 1. 3	Ovol2 affects the metastasis of epithelial cells.....	41
3.2	OVOL2 inhibits breast cancer invasion and metastasis by inhibiting EMT	42
3. 2. 1	OVOL2 suppresses EMT in breast cancer	42
3. 2. 2	OVOL2 suppresses the invasion of breast cancer	44
3. 2. 3	OVOL2 suppresses the metastasis of breast cancer	45
3. 2. 4	Genetic Analysis of OVOL2 Expression in Breast Cancer Cells by Oncomine Database	45
3.3	OVOL2 inhibits EMT by inhibiting TGF-β signaling pathway.....	48
3.3.1	OVOL2 directly inhibits TGF- β / Smad signaling pathway	48
3.3.2	OVOL2 inhibits TGF- β signaling by modulating Smad7 and Smad4 expression	49
3.4	OVOL2 inhibits breast cancer metastasis in mice.....	51
3. 4. 1	BALB / c mouse	51
3. 4. 2	MMTV-PyVT-Ovol2 transgenic mouse	53
CHAPTER 4	DISCUSSION AND OUTLOOK.....	55

REFERENCE.....58

ACKNOWLEDGEMENT62

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

近年来，乳腺癌患者数量连年递增，其发病率和死亡率在女性恶性肿瘤中位居第二，而肿瘤的侵袭与转移是导致乳腺癌患者死亡的主要原因。因此，如果能够探究清楚乳腺癌侵袭和转移的调节机制，将对降低乳腺癌患者的临床治疗提供依据。研究表明，OVOL2 基因与蛋白在进化上高度保守，作为一种转录因子参与生物体的生长发育，OVOL2 与胚胎发育具有密切关系，但是 OVOL2 在肿瘤领域的研究却极少。实验室前期研究发现，OVOL2 能够通过抑制 Wnt 信号通路的转录活性负调控 SLUG 的表达抑制结直肠癌的 EMT 进程，从而抑制结直肠癌的侵袭与转移。这使我们对 OVOL2 能否影响乳腺癌的侵袭与转移产生了疑问。

通过 Invasive Transwell 实验、划痕实验和对 Oncomine 数据库的分析数据，我们发现 OVOL2 过表达能够明显抑制细胞的侵袭与转移能力。Neve 细胞系组别的基因评估结果提醒了我们，OVOL2 可能是通过抑制肿瘤细胞 EMT 从而抑制细胞的侵袭和转移能力。于是我们通过细胞表型的观察、免疫荧光共聚焦实验、实时荧光定量 PCR、免疫印迹法 (Western blotting) 检测 EMT 相关标志性基因的变化，结合小鼠模型构建实验结果，证实了 OVOL2 能够通过抑制肿瘤细胞的 EMT 进程从而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移能力。另外通过荧光实时定量 PCR 及 Western blotting 等实验我们发现在乳腺癌细胞中过表达 OVOL2 能够抑制 TGF- β 信号通路的活性和相关基因的表达(抑制 Smad4 的表达、上调 TGF- β Smad7 的表达)。

在上述试验中，我们发现 OVOL2 可以通过抑制上皮-间质转化进程从而抑制乳腺癌的侵袭与转移能力。在本论文中，我们将 OVOL2 和 EMT 在乳腺癌中联系起来，并初步揭示了 OVOL2 蛋白抑制乳腺癌侵袭与转移的分子机制，阐明了通过该机制调控乳腺癌进展方式。这一发现对于 OVOL2 蛋白功能及乳腺癌的研究有着重要的意义。

关键词：OVOL2 EMT 乳腺癌

Abstract

In recent years, the number of breast cancer patients increased year by year, its morbidity and mortality in women with malignant tumors in the second, and tumor invasion and metastasis is the leading cause of death in breast cancer patients. Looking for ways to regulate the invasion and metastasis of breast cancer is very important to reduce the mortality of breast cancer patients. OVOL2 is a fairly evolutionary transcription factor, and its relationship with embryonic development has been reported by many studies, but OVOL2 is not well known about the development of tumors. In the preliminary study, OVOL2 was able to inhibit the EMT progression of colorectal cancer by inhibiting the expression of SLUG by inhibiting the transcriptional activity of Wnt signaling pathway, thus inhibiting the invasion and metastasis of colorectal cancer. This has raised questions about whether OVOL2 can affect the invasion and metastasis of breast cancer.

We found that OVOL2 overexpression significantly inhibited the invasion and metastasis of cells by Invasive Transwell experiments, scratches and analysis of the Oncomine database. The genetic evaluation of the Neve cell line group reminds us that OVOL2 may inhibit the invasion and metastasis of cells by inhibiting tumor cell EMT. We observed the change of EMT-related marker gene by immunoprecipitation, real-time quantitative PCR and Western blotting. The experimental results were confirmed by the combination of mouse model and confirmed that OVOL2 could inhibit the expression of EMT. The EMT process of tumor cells inhibits tumor cell invasion and metastasis. In addition, we found that overexpression of OVOL2 in breast cancer cells could inhibit the activity of TGF- β signaling pathway and the expression of related genes (inhibition of Smad4 expression and up-regulation of TGF- β Smad7 expression) by fluorescence real-time PCR and Western blotting.

Through the above results, we propose that OVOL2 can inhibit the invasion and metastasis of breast cancer by inhibiting the process of epithelial-mesenchymal

transition. In this paper, we linked OVOL2 and EMT in breast cancer, and initially revealed the molecular mechanism of OVOL2 protein inhibiting the invasion and metastasis of breast cancer, and elucidated the mechanism of regulation of breast cancer through this mechanism. This finding is of great significance for the study of OVOL2 protein function and breast cancer.

Key words: OVOL2; EMT; breast cancer

厦门大学博硕士学位论文摘要库

前言

1.1 OVOL2 蛋白

OVOL2 是一类羧基端区域包含四个 C2H2 型 DNA 结合锌指结构的转录因，从属于 OVO 家族蛋白。OVO 基因最早于 1997 年由 YasuoMasua 在果蝇中发现^[1, 2]，是 WNT、TGF- β 、BMP 等调节生物发育的信号通路的下游靶基因，该基因家族在多种动物中高度同源，其强烈的进化保守性说明 OVO 家族的基因在许多物种的上皮组织和生殖细胞分化和发育过程中起着重要作用。

OVOL2 基因结构及表达蛋白

1.1.1.1 基因结构

鼠的 *Ovol2* 基因位于 2 号染色体上，含有 5 个外显子，其中 E1A 和 E1B 分别转录合成 *mOvo2a* 和 *mOvo2b*^[3]。人源 OVOL2 位于基因组 20 号染色体上，基因全长 900bp，含有 6 个外显子，其中 E1、E2 选择性转录合成 OVOL2A 和 OVOL2B；E4 的启用导致更短的转录片段产生；E5 则仅在一些特殊性转录中出现。人鼠细胞内，其基因编码区的碱基顺序高度同源，E1A/E2、E2/E3 和 E3/E4 的切割位点甚至完全一致。

1.1.1.2 蛋白结构

鼠源 *mOvol2* 蛋白有 *mOvol2A* 和 *mOvol2B* 和 *mOvol2C* 三种亚型 154，三者具有相同的锌指结构，但 N 端不同。*mOvol2A* 包含一个转录激活结构域和一个富含带电氨基酸的抑制结构域，后者能使 *mOvol2A* 抑制 *mOvo* 基因的转录活性，因而在体内少量存在^[4, 5]。*mOvol2B* 的转录激活结构域缺失，是体内含量最高的亚型。*mOvol2C* 缺失抑制结构域，可作为转录激活因子与 *mOvo* 的启动子结合使其激活，是另一个少量存在的亚型。

人源 OVOL2 蛋白有 OVOL2A、OVOL2B 和 OVOL2C 三种亚型，三者由同一 OVOL2 基因转录翻译产物经不同切割编辑而产生。研究发现 OVOL2A 蛋白含有 275 个氨基酸，OVOL2B 含有 241 个氨基酸，他们都包含 4 个 C2H2 锌指

结构及一个酸性的或者富含酸性氨基酸（丝氨酸）的区域（35-90 氨基酸）^[6]。另外，OVOL2A N-端的前 34 个氨基酸含有 35% 带电氨基酸，形成高电区域，而 OVOL2B 的 N-端没有高电区域。目前针对 OVOL2C 的研究较少，故其具体结构尚不清晰。

1.1.1.3 蛋白分布

鼠的 *Ovol2* 基因位于 2 号染色体上，含有 5 个外显子，其中 E1A 和 E1B 分别转录合成 *mOvo2a* 和 *mOvo2b*。人源 OVOL2 位于基因组 20 号染色体上，基因全长 900bp，含有 6 个外显子，其中 E1、E2 选择性转录合成 OVOL2A 和 OVOL2B；E4 的启用导致更短的转录片段产生；E5 则仅在一些特殊性转录中出现。在人鼠中，外显子/内含子的组织顺序十分保守，例如，E1A/E2、E2/E3 和 E3/E4 中的切割位点完全一致。

OVOL2 在生物发育中的作用

1.1.2.1 OVOL2 在干细胞分化中的作用

研究表明，OVOL2 可抑制胚胎干细胞（ESCs）的神经分化，并促进中内胚层细胞分化。在小鼠胚胎神经分化过程中，ESCs 内 *Ovol2* 的表达水平持续下降。在细胞内抑制 OVOL2 表达后 BMP 信号通路介导的促进中内胚层分化与抑制神经分化作用减弱。后续研究显示，BMP 信号因子在磷酸化的受体启动型 Smads 结合的介导下与 OVOL2 基因直接结合从而使 OVOL2 表达量增多。鸡胚实验结果内则发现 OVOL2 表达与 BMP4 及 Sox2 的表达与定位相关。

OVOL2 在滋养层干细胞（TSCs）内与 Lsd1 相互作用，共同调控胚胎胎盘发育。TSCs 是一种特殊的胚胎干细胞，在胚胎中分化为侵入母体蜕膜的胎盘。Adamo 等^[7]人研究发现组蛋白去甲基化酶 lysine-specific demethylase 1 (Lsd1) 调节人类 TSCs 细胞的自我更新和分化之间的平衡，在未分化细胞内，Lsd1 能直接抑制转录因子 OVOL2 的表达，OVOL2 过早表达能直接抑制 Lsd1 导致的细胞过早迁移和侵袭。Unezaki 等人研究 OVOL2 基因缺陷鼠胚胎，发现 *Ovol2* 突变小鼠胚胎内的 VEGF 和 β -FGF 等对心脏血管形成起重要作用的基因明显升高。VEGF, TGF, Ang1, ephrin 和 Notch 信号通路对血管心脏发育起重要作用，VEGF

信号通路影响血管形成和血管新生,对血管和心脏形成起重要作用。其突变引起的现象与 OVOL2 类似,因此猜测 OVOL2 缺失导致胚胎血管新生和胎盘发育障碍。Dongmei Zhu^[8]等人研究 LSD1 缺陷鼠胚胎原肠腔形成前期阶段,结果显示 LSD1 表达对干细胞的完全沉默状态起重要作用。

1.1.2.2 OVOL2 在胚胎颅神经管发育中的作用

Ovol2 在鼠胚胎 3.5 天时的内细胞团,6.5 天时的外胚层以及胚胎后期外胚层衍生组织内均有表达。研究表明 Ovol2 的胚胎早期表达可协助神经外胚层定位头部,维持神经嵴细胞正确迁移,确保颅神经管正常关闭^[9]。Ovol2 在神经外胚层边界的神经嵴细胞等背侧神经前体细胞的有效迁徙、增殖及存活中具有重要作用,Ovol2 通过调节表皮外胚层信号的产生,从而促进神经嵴细胞分化,调节神经嵴的迁移。Ovol2 缺陷鼠胚胎内表皮外胚层产生信号,但是腮弧不能发出吸引或者维持迁移的神经嵴细胞的信号,从而导致神经嵴细胞在迁徙途中及腮弧内的凋亡坏死。另外,Ovol2 还参与神经和非神经外胚层的构建,神经外胚层 Ovol2 缺失可导致异常神经分化。

1.1.2.3 OVOL2 在造血细胞生成中的作用

ER71 是调节血细胞及血管内皮生成的重要转录因子^[10],在细胞实验中发现 OVOL2 与 ER71 直接结合,可促进 ER71 介导的 FLK1 启动子激活,促进 FLK11 细胞,内皮细胞和造血细胞的发育。在胚胎血岛内 OVOL2 与 ER71 共表达,调节 FLK11 细胞增殖分化,上皮细胞增殖增多,红系集落数目增多,调节中胚层胚胎干细胞向血细胞及血管内皮分化^[11]。共转 OVOL2 与 ER71 比单转 ER71 对 FLK1 启动子活性加倍。相对比单独诱导 ER71 或 OVOL2,共诱导可明显提高对上皮细胞发育至关重要的 Flk1, VE-Cad, Cd31, Mef2c, and Tie2 等基因的表达。OVOL2 敲减后由 ER71 诱导的多种基因表达明显降低,内胚层标记信号减少,由此可知,ER71 介导的 FLK11 细胞分化依赖 OVOL2 的作用^[10]。

1.1.2.4 OVOL2 在乳腺组织发育中的作用

Kazuhide Watanabe 等人^[12]发现,OVOL2 可以与 Zeb1, Zeb2, Twist1, Snai1, 和 Snai2 等几乎所有 EMT 诱发基因的启动子结合,从而抑制发育中乳腺上皮细

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.

厦门大学博硕士论文摘要库