

学校编码: 10384
学号: 24520101153283

分类号 密级
UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

在胃癌细胞中 PKM2 通过 E-cadherin 依赖
的方式双向调节 EGF/EGFR 信号通路

Pyruvate kinase M2 plays a dual role on regulation of the
EGF/EGFR signaling via E-cadherin-dependent manner in
gastric cancer cells

王乐义

指导教师名称: 陈立刚 副教授

专业名称: 内科学

论文提交日期:

论文答辩日期:

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2013 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()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

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

背景和目的: EGFR 的激活和 PKM2 的表达有助于肿瘤的形成和发展。EGFR 激活是以亚室依赖性的方式调节了 PKM2 的功能并且促进了基因的转录和肿瘤的生长。此外,在恶性神经胶质瘤中,EGFR 诱导的信号上调了 PKM2 的表达。然而,我们发现在胃癌细胞中 PKM2 也能调节 EGF/EGFR 信号通路的活性。我们的研究目的是想明确 PKM2 在调节胃癌细胞迁移和侵袭功能方面的生物学机制。**方法:**我们采用短发夹 RNA 转染 BGC823、SGC7901 和 AGS 这三株胃癌细胞株,最后通过筛选稳定沉默 PKM2 的表达。我们用体外实验评估了 PKM2 对肿瘤细胞的迁移和侵袭方面发挥的作用。免疫组织化学分析是用来探索 PKM2 和其他蛋白的关系。

结果:我们的结果提示:沉默 PKM2 之后,在 E-cadherin 表达阳性的胃癌细胞株 BGC823 和 SGC7901 中,E 钙蛋白(E-cadherin)的活性降低并且 EGF/EGFR 信号通路信号的传导增强;然而,在 E-cadherin 表达阴性的胃癌细胞株 AGS 细胞中,沉默 PKM2 之后细胞的的迁移和侵袭能力减弱。免疫组织化学法分析显示:E-cadherin 的表达水平、ERK1/2 的磷酸化水平和胞质内 PKM2 的表达水平,这三者彼此相关。

结论:PKM2 可能在不同分化程度的胃癌细胞类型中发挥着不同的作用,这和以往的临床研究是一致的。我们的研究结果还发现了:在 EGFR 激活介导胃癌细胞运动过程中 PKM2 和 E-cadherin 是有着重要联系的。

关键词: M2 型丙酮酸激酶(PKM2) E 钙粘蛋白(E-Cadherin) 表皮生长因子/表皮生长因子受体(EGF/EGFR) 迁移和侵袭

Abstract

Background and Aims: EGFR activation and PKM2 expression are instrumental in tumorigenesis. EGFR activation regulates PKM2 functions in a subcellular compartment-dependent manner and promotes gene transcription and tumor growth. In addition, PKM2 is upregulated in EGFR-induced pathways in glioma malignancies. However, we found that PKM2 could also regulate the activity of the EGF/EGFR signaling pathway in gastric cancer cells. We aimed to define the biological mechanisms for PKM2 in regulating the cell motility and invasion.

Methods: We employed stable transfection with short hairpin RNA to stably silence the expression of PKM2 in the BGC823, SGC7901 and AGS gastric cancer cell lines. The effects of PKM2 in vitro were determined by assessing cell migration and invasion. Immunohistochemical analysis was used to explore the relationship among PKM2 and other proteins.

Results: Our results indicate that the knockdown of PKM2 decreased the activity of E-cadherin and enhanced the EGF/EGFR signaling pathway in the gastric cell lines BGC823 and SGC7901 that were positive for E-cadherin expression. However, in the undifferentiated gastric carcinoma cell line AGS, which lacks E-cadherin expression, PKM2 promoted cell migration and invasion. Immunohistochemical analyses showed that the levels of E-cadherin expression, ERK1/2 phosphorylation, and cytoplasmic PKM2 expression were correlated with each other.

Conclusion: PKM2 may play different roles in differently differentiated gastric cancer cell types, and this finding would be consistent with the previous clinical research. The results of our study reveal an important link between PKM2 and E-cadherin during EGFR-stimulated gastric cancer cell motility and invasion.

Key words: PKM2 E-cadherin EGF/EGFR Migration and invasion

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 前言	1
1.1 M2 型丙酮酸激酶(PKM2)	1
1.1.1 PKM2 的发现及亚型	2
1.1.2 PKM2 与肿瘤代谢	3
1.1.3 PKM2 作为辅转录激活蛋白参与信号传导	4
1.2 E 钙粘蛋白(E-CADHERIN)	5
1.2.1 E-cadherin 的结构和功能	5
1.2.2 E-cadherin 与肿瘤	6
1.3 表皮生长因子受体(EGFR)	7
1.3.1 EGFR 的结构	8
1.3.2 EGFR 与信号通路	8
1.4 实验设计	8
1.4.1 实验基本思路示意图	8
1.4.2 实验基本步骤	9
第二章 材料与amp;方法	10
2.1 相关稳转细胞系的建立	10
2.1.1 材料	10
2.1.2 方法	11
2.2 稳转细胞功能学研究	21
2.2.2 材料	21
2.2.2 方法	22
2.3 PKM2 参与细胞信号通路调控的研究	23
2.3.1 材料	23
2.3.2 方法	24

2.4 胃癌组织标本免疫组织化学染色	25
2.4.1 材料	25
2.4.2 方法	25
第三章 结果与分析	27
3.1 在 BGC823 和 SGC7901 细胞株中, 沉默 PKM2 基因后能促进细胞对 EGF 的敏感性从而促进迁移和侵袭	27
3.1.1 结果	27
3.1.2 小结	30
3.2 沉默 PKM2 后 E-CADHERIN 表达下降, EGF/EGFR 下游信号通路 PLC- γ 1 和 ERK1/2 的活性增强	31
3.2.1 结果	31
3.2.2 小结	34
3.3 沉默 PKM2 后减弱了 AGS 细胞的运动性, 而在胃癌细胞中重新表达 PKM2 后功能则发生了改变	35
3.3.1 结果	35
3.3.2 小结	37
3.4 PKM2 提高了 AGS 细胞中 EGF/EGFR 下游信号通路的活性并且在胃癌样本中发现 PKM2 和 ERK 活性相关	38
3.4.1 结果	38
3.4.2 小结	40
第四章 讨论与展望	41
4.1 胃癌转移分子机制的研究现状	41
4.2 我们的研究	42
4.3 展望	43
参考文献	45
英文缩略词表	50
致 谢	52

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Pyruvate kinase M2(PKM2)	1
1.1.1 Discovery and isoform of PKM2	1
1.1.2 PKM2 and cancer metabolize	2
1.1.3 PKM2 attend signaling pathway as a transcriptional coactivator	4
1.2 E-CADHERIN	5
1.2.1 Formation and function of E-cadherin	5
1.2.2 E-cadherin and cancer	6
1.3 Epidermal growth factor receptor (EGFR)	7
1.3.1 The structure of EGFR	8
1.3.2 EGFR and signaling pathway	8
1.4 Experiment design	8
Chapter 2 Materials and Methods	10
2.1 Establish stable cells use BGC823、SGC7901 and AGS Cells	10
2.1.1 Materials	11
2.1.2 Methods	15
2.2 Function of stable cells	21
2.2.1 Materials	21
2.2.2 Methods	22
2.3 The role of PKM2 in signaling pathway	23
2.3.1 Materials	24
2.3.2 Methods	24
2.4 Immunohistochemistry of gastric cancer specimens	25
2.3.1 Materials	25
2.3.2 Methods	25
Chapter 3 Experimental results and Conclusion	27
3.1 Depletion of PKM2 promoted cell migration and invasion in BGC823 and SGC7901 cells with EGF stimulation	27

3.1.1 Experimental results	27
3.1.2 Conclusion	30
3.2 Depletion of PKM2 decreased E-cadherin expression and enhanced the activities of the EGF/EGFR downstream signaling pathways PLC- γ 1 and ERK1/2	31
3.2.1 Experimental results	31
3.2.2 Conclusion	34
3.3 Depletion of PKM2 attenuated the motility of AGS cells and the functional changes after rescuing PKM2 in gastric cancer cell lines.	35
3.3.1 Experimental results	35
3.3.2 Conclusion	37
3.4 PKM2 enhanced the activities of the EGF/EGFR downstream signaling pathways in AGS cells and was correlated with ERK activity in gastric cancer specimens	38
3.4.1 Experimental results	38
3.4.2 Conclusion	40
Chapter 4 Discussion and expetation	41
4.1 Research of the molecular mechanisms of gastric cancer metastasis	41
4.2 Our research	42
4.3 Expetation	43
References	45
Abbreviation	50
Acknowledgement	52

第一章 前言

1.1 M2 型丙酮酸激酶

肿瘤是临床三大死亡原因之一，全世界每年死于癌症的患者仅次于心脑血管疾病患者。有关癌症早期诊断与早期治疗的问题，已成为研究的热点，但对恶性肿瘤的早期发现、早期诊断以及对患者的病情进展监测尚缺乏一个较为理想的肿瘤标物。

人们早已发现肿瘤细胞中的糖代谢是异常的。许多发现不断表明，在肿瘤的发生过程中，葡萄糖的代谢有根本的改变。然而引起这一现象的基本生化缺陷及其在肿瘤转化中的意义还没有完全搞清楚。

丙酮酸激酶(PK)是糖酵解途径最后阶段的一个限速酶，能够催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)转变成丙酮酸，生成 1 分子的 ATP。在哺乳动物细胞，PK 有 M1、M2、L 和 R 四种不同亚型，它们有选择性地表达在不同的细胞和组织中^[1]。L 型丙酮酸激酶主要表达在肝脏和肾脏中；R 型丙酮酸激酶主要表达在红细胞中；M1 型丙酮酸激酶表达于成人的肌肉、脑组织、膀胱和成纤维细胞中；M2 型丙酮酸激酶表达除成人肌肉细胞以外的绝大部分细胞中^[2-3]。PKL，PKR 和 PKM1 都是以稳定的四聚体形式存在，而 PKM2 则存在二聚体和四聚体两种形式。丙酮酸激酶 L 型和 R 型由相同的基因编码，但它们的表达由不同的启动子控制。M1 型丙酮酸激酶和 M2 型丙酮酸激酶相差 23 个氨基酸，同是 PKM 基因前体 mRNA 选择性剪切的产物。PKM1 包含外显子 9，PKM2 包含外显子 10。

许多研究表明在肿瘤组织中往往高表达 PKM2，在肿瘤中的这种高表达导致了肿瘤细胞对葡萄糖的摄取增加、糖酵解代谢产物的累积和代谢重排，这些都有利于肿瘤的生长和存活。PKM2 同时也减少细胞内 ROS 的累积，因而在氧化应激下促进了肿瘤细胞的存活。PKM2 在基因转录中的作用给我们提供了新的视角，因而 PKM2 在肿瘤发生及进展中的研究范围将更广阔，研究思路也更丰富。

最近新发表一篇文章，Lim JY 等做了一个临床研究，选取了 368 例不同分化程度的胃癌患者的组织样本进行了免疫组织化学分析，发现 PKM2 在未分化的胃癌组织中的表达量明显低于分化的胃癌组织的表达量，且在印戒细胞癌的总生存时间和 PKM2 的表达明显相关，同时分析了 60 例胃癌患者癌组织和癌旁组

织 PKM2 mRNA 的表达,发现癌组织比癌旁组织高两倍。Lim JY 等提出在未分化的印戒细胞癌中 PKM2 可以作为一个反向预测因子,PKM2 的表达提示一个更短的总生存时间,而这个总生存时间和印戒细胞癌的阶段无关^[4]。

1.1.1 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 的发现及亚型

研究发现,PKM2 在肿瘤细胞中呈过度表达。在大肠癌患者的粪便样品中,肾细胞癌,卵巢癌,肺癌,乳腺癌和许多其他癌症患者的 EDTA 抗凝血浆中,以及胸部恶性肿瘤患者的胸腔积液中都检测到了 PKM2 的存在^[5-8]。与其他亚型不同,PKM2 主要表达于分化的组织如肺,脂肪组织和胰岛等,表达于核酸合成率很高的细胞,如胚胎细胞,尤其是肿瘤细胞中^[9]。

1.1.1.1 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 基因的剪接

在肿瘤形成过程中存在着从组织特异性 PKM1 的表达到胚胎特异性 PKM2 表达之间的转变^[10]。PKM1 和 PKM2 都是由 PKM 基因前体 mRNA 选择性剪切的产物,PKM1 是剪切掉了外显子 10,PKM2 则是剪切掉了外显子 9,他们仅相差 23 个氨基酸。因此,明确 PKM2 怎样在肿瘤细胞中重新表达是研究肿瘤发生机制的重要组成部分。David CJ 等阐明了 PKM2 的选择性剪切问题^[11]。他们发现三个异质性核糖核蛋白,分别是 hnRNPA1, hnRNPA2 和多嘧啶序列结合蛋白 PTB,这三个蛋白都是 PKM2 基因选择性剪切的抑制因子,可通过结合在外显子 9 的侧翼序列而抑制其剪切,从而释放出外显子 10,使得 PKM2 的 mRNA 表达上调。通过 siRNA 技术沉默 hnRNPA1、hnRNPA1 和 PTB 后,用 RT-PCR 技术检测到 PKM1 的 mRNA 表达上调,PKM2 的 mRNA 表达下调。David 等还发现这三种蛋白受转录因子 c-Myc 调控,c-Myc 可上调这三个基因的转录,从而促进 PKM2 的表达。他们的研究结果在很大程度上解释了肿瘤细胞如何进行 PKM1 到 PKM2 的转换,为肿瘤细胞的生长提供条件。

1.1.1.2 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 的亚型

PKM2 主要两种形式存在,高活性的四聚体形式和低活性的二聚体形式。四聚体形式对其底物磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 有高亲和力,酶催化能力强,且总是与一些其他糖酵解相关的酶形成复合物。当 PKM2 以四聚体形式存在时,说明其主要存在于分化的组织和正常增殖的细胞中,葡萄糖将转化为丙酮酸用于能

量产生。与此相反, PKM2 二聚体形式常存于肿瘤细胞中, 与底物磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 的亲合力低, 这种形式的存在与一些物质合成过程如核酸和氨基酸的合成密切相关^[12-13]。当葡萄糖缺乏的时候 PKM2 在几分钟之内便可以降解为单体, 而当添加葡萄糖后单体会迅速聚集转化为四聚体。四聚体与二聚体形式的比例决定了由葡萄糖转化生成的丙酮酸是参与能量产生还是参与生物合成过程。这个比率并不是一个固定值, 可随着一些中间代谢产物如 1, 6-二磷酸果糖(FBP) 或癌基因蛋白的存在而发生波动^[14]。

尽管很多报道说: 在肿瘤中 PKM2 以二聚体的形式存在, 但是据我们所知, 目前还没有针对 PKM2 二聚体的特异性抗体。很多研究显示具有更高活性的四聚体形式的 PKM2 事实上是二聚体的二聚体^[15]。所以有关 PKM2 的存在形式各是怎样的作用及是怎样的一个转换有待进一步的研究。

1.1.2 PKM2 与肿瘤的代谢

1.1.2.1 Warburg 效应

葡萄糖是能量产生的主要来源之一, 而糖酵解是所有生物细胞糖代谢过程的第一步。糖酵解在细胞的胞质中进行, 不论有氧还是无氧环境, 糖会经过同样的过程分解为丙酮酸。不同的则是在有氧条件下, 丙酮酸会被丙酮酸脱氢酶转化为乙酰辅酶 A, 进而进入三羧酸循环完全被分解为二氧化碳, 这一过程称为糖的有氧氧化。1 分子葡萄糖彻底有氧氧化后可生成 38(或 36)ATP。只有在细胞处于相对缺氧的情况时, 丙酮酸才会被进一步分解生成乳酸, 称为糖的无氧酵解。1 分子葡萄糖在缺氧的条件下转变为 2 分子乳酸, 同时伴随 2 分子 ATP 的产生^[16]。糖代谢异常是肿瘤细胞的一个重要特征, 正常细胞依靠线粒体氧化糖类分子释放出有用的能量, 而大多数肿瘤细胞则通过通过产能率相对较低糖酵解作用为自身供能。这种作用机制不需要氧气也不需要线粒体参与。恶性, 生长迅速的肿瘤细胞通常的糖酵解率比他们的正常组织高达 200 倍。这种情况, 即使在氧气充足的条件下也会发生。这一现象在上世纪 20 年代由德国生物学家 Otto Warburg 发现, 也称为 Warburg 效应^[17]。

1.1.2.2 PKM2 作为一种蛋白激酶

越来越多的研究表明, PKM2 可能是 Warburg 效应和肿瘤发生之间的连接因素。Christofk 等^[18]利用蛋白组学方法筛选出 PK 的四个亚型中只有 M2 亚型是 pTyr

结合蛋白。这可能会导致其变构激活剂 1, 6-二磷酸果糖(FBP)的释放而降低 PKM2 的酶活性, 促进其二聚体形式的存在。Histosugi^[19]等也发现 PKM2 是一种可发生酪氨酸磷酸化的酶, 其酪氨酸残基 105(Y105)位点可被成纤维细胞生长因子受体 1(FGFR1)直接磷酸化。这种方式可打破 PKM2 与 FBP 的结合而抑制其四聚体形式的形成。在人类肺癌细胞株中, PKM2 Y105 位点的突变体, 即 PKM2 未发生酪氨酸磷酸化时, 细胞的耗氧量增加且乳酸生成量减少, 说明 Warburg 效应降低, 从而抑制细胞增殖。

此外, 与癌基因蛋白的结合也可以使 PKM2 酪氨酸残基发生磷酸化。例如, 肿瘤细胞中 pp60v-src 与 PKM2 的直接结合可促使 PKM2 二聚体形式的产生并降低其酶活性^[20]。也有报道发现 PKM2 可在其丝氨酸残基发生磷酸化, 该磷酸化依赖于 cAMP, 并可被表皮生长因子 EGF 所诱导产生^[21]。

1.1.3 PKM2 作为一种辅转录激活蛋白参与信号传导

PKM2 能与细胞核内的 HIF-1 α 相互作用, 作为 HIF-1 的转录辅助因子促进 HIF-1 靶基因(SLC2A1、LDHA 和 PDK1)的表达。PKM2 的这种转录辅助作用不依赖于它是一种丙酮酸激酶^[22]。PKM2 促进 HIF-1 靶基因的, 从而促进了从氧化磷酸化到糖酵解代谢的转变。PKM2 同时也能和 HIF-2 α 相互作用, 促进 HIF-2 介导的反式激活^[22]。除了与代谢相关基因的转录外, PKM2 同时也促进了 HIF-1 和 HIF-2 介导的血管生长因子 A(VEGFA)基因的表达, 因此促进了血管发生^[22]。Yang w^[23]等研究发现 EGFR 激活后可以诱导 PKM2 向核内转移, 反式激活 β -catenin 从而影响下游的一些周期蛋白的基因转录, 促进肿瘤细胞的形成及增殖。近来的研究表明细胞核内的 PKM2 是以二聚体的形式存在, 然而细胞质中的则出现二聚体和四聚体两种形式^[24]。有趣的是, 二聚体的 PKM2 是作为一种蛋白激酶发挥作用, 而四聚体的 PKM2 则是以一种激活的丙酮酸激酶发挥作用。核内的 PKM2 可以使转录因子 STAT3 磷酸化, 这过程中磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)是磷酸集团的供体。激活 STAT3 后, 就促进了 MEK5 基因的转录, 从而促进了细胞的增殖^[24]。除了参与这些和肿瘤的代谢和细胞增殖密切相关的蛋白的转录外, PKM2 也能辅助激活转录因子 Oct-4 来调节干细胞, PKM2 能结合在 Oct-4 的 DNA 结合区域, 促进 Oct-4 介导的基因转录^[25]。

以往大部分对 PKM2 的研究都聚焦在与肿瘤的代谢相关等方面, 自从发现

PKM2 可以转位入核参与细胞信号传导和促进基因的转录后, PKM2 的研究视野更宽阔, PKM2 作为一种蛋白激酶和转录辅助激活蛋白的作用有待进一步的挖掘。

1.2 E 钙粘蛋白 (E-CADHERIN)

恶性肿瘤的侵袭和转移是无法手术治疗和治疗后复发的主要原因之一, 抑制肿瘤的侵袭和转移成为目前肿瘤治疗研究的热点。肿瘤组织结构不完整是肿瘤转移的重要前提, 细胞上皮黏附分子 E 钙粘蛋白最初被认为是一种介导细胞间黏附的结构蛋白, 在许多上皮来源的肿瘤中 E-cadherin 表达下调甚至缺失能促进肿瘤侵袭和转移行为。E-cadherin 依赖性细胞黏附减弱能诱发肿瘤细胞的迁移和播散。近来, 它参与信号通路的功能为人所认识。E-cadherin 缺失或者表达下调会释放这些蛋白, 如 α -catenin, p120 catenin, 这些蛋白从绑定于细胞膜的位置进入细胞质, 去调节转录的活性。研究认为 E-cadherin 能和酪氨酸激酶受体相互作用, 如 EGFR。

1.2.1 E 钙粘蛋白 (E-cadherin) 的结构和功能

E-cadherin 是一个细胞黏附分子, 介导上皮细胞黏附而形成中间连接, 来维持组织结构和完整性。它是第一个被确认的钙粘蛋白家族成员, 在结构上, E-cadherin 是一种单次跨膜糖蛋白, 由 CDH1 基因编码, 分子量为 135KD, 包括 C-端胞内区、高度疏水的跨膜区及 N-端胞外区。胞内区通过 β -catenin 或者 γ -catenin 与 α -catenin 相连, 并通过 α -catenin 与微丝、中间丝、肌动蛋白等相连接而形成复合体, 使 E-cadherin 被锚定于细胞骨架上, 与相邻细胞形成稳定连接。 β -catenin 和 γ -catenin 都是 Wnt 通路中重要的信号分子, 两者可转位至核内, 与 TCF/Lef 转录因子相互作用^[26]。胞外区包含 5 个细胞外功能域, 能与钙离子特异性结合而发挥细胞黏附功能^[27]。

1.2.2 E 钙粘蛋白 (E-cadherin) 与肿瘤

1989 年 Hashimoto 等首次发现高侵袭性卵巢癌细胞中 E-cadherin 表达降低^[28]。随后有相关证据表明, E-cadherin 的异常表达与肿瘤的级别、分期、侵袭性及预后密切相关, 提示 E-cadherin 表达缺失在肿瘤的扩散中起关键作用。然而也有报道表明 E-钙粘蛋白表达较高的肿瘤仍然具有较高的侵袭转移能力, 可能是由 E-cadherin 不能正常定位于细胞膜上从而丧失黏附功能^[29]。对于 E-cadherin 为什

么在肿瘤中表达降低甚至缺失，到目前为止，主要认为有以下几类原因。

1.2.2.1 编码基因 CDH1 基因结构的改变

一般情况下肿瘤基因失活是因为基因突变或者缺失所致，而大多数恶性肿瘤中 E-cadherin 的表达只是降低，有证据表明，一个 CDH1 基因位点突变和遗传性高浸润弥漫型胃癌有关，患者具有独特的病理学特征，往往发病较早，不表达 E-cadherin^[30]。

CDH1 突变只是在某些特定的肿瘤中才发生，更多研究表明：CDH1 基因启动子甲基化是多种肿瘤的共同特征。DNA 编码区域的低甲基化同时启动子区域的高度甲基化是导致抑癌基因沉默在肿瘤中广泛存在。到目前为止，已经在多种肿瘤中发现了 CDH1 启动子甲基化，且都与 E-cadherin 表达的减少或缺失有关。

1.2.2.2 转录抑制因子对 E-cadherin 的调控

有些肿瘤中，E-cadherin 基因既没有突变或缺失，也没有 CDH1 启动子区域的甲基化，但其表达水平仍然被抑制，这可能跟转录抑制因子在转录水平对 E-cadherin 表达抑制有关。当人 E-cadherin 基因启动子的 E-box 结合转录抑制因子后可下调 E-钙粘蛋白的表达。这些转录抑制因子有 Slug、Twist、Snail 和 ZEB 等。其中 Snail 是被研究最多的。

1.2.2.3 E-cadherin 转录后的调节

E-cadherin 转录后的调节主要包括磷酸化修饰、糖基化修饰和信号通路的调节。当 E-钙粘蛋白和 β -catenin 发生异常磷酸化时将改变分子的带电性和（或）分子的空间构象，影响复合体的正常形成和功能。有研究显示：当 E-cadherin 的胞浆区域被 GSK-3 β 或者 CK-II 磷酸化时可调节 β -catenin 和 E-cadherin 的亲合力，最终增强细胞间的黏附作用^[31]。而 β -catenin 的酪氨酸磷酸化则可引起 β -catenin 和 E-cadherin 分子间相互作用的破坏，致使细胞内游离的 β -catenin 增多，参与信号通路，促进细胞的增殖^[32]。

许多小分子化合物能作用于 E-cadherin 的上游的信号通路而抑制 E-cadherin 的表达。这些信号通路中其中就包括表皮生长因子受体(EGFR)的通路。EGFR 瞬间激活可使 Caveolin-1 从细胞表面转位至内体，灭活 E-cadherin，慢性 EGFR 激活也能抑制 E-cadherin 表达，最终诱导细胞上皮-间质样转化^[33]。

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