

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**miR-144 对乳腺癌细胞干性和增殖的影响**

**miR-144 regulates stemness and proliferation of breast  
cancer cells**

指导教师姓名: 欧阳高亮 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2014 年 7 月

论文答辩时间: 2014 年 9 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

年 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

目录

英文缩略语对照表 .....	I
摘要.....	I
Abstract .....	I
<b>第一章 前言.....</b>	<b>1</b>
<b>1.乳腺癌 .....</b>	<b>1</b>
1.1 概述 .....	1
1.2 乳腺癌研究进展 .....	1
1.3 乳腺癌的分子靶向治疗 .....	2
<b>2.肿瘤干细胞.....</b>	<b>3</b>
2.1 肿瘤干细胞理论 .....	3
2.2 肿瘤干细胞标记物 .....	4
2.3 肿瘤干细胞与肿瘤治疗 .....	5
<b>3. MicroRNA.....</b>	<b>5</b>
3.1 概述 .....	5
3.2 miRNA 生物合成 .....	6
3.3 miRNA 调节靶基因表达 .....	7
3.4 miRNA 与肿瘤相关研究 .....	7
3.5 miRNA 在乳腺癌中的作用 .....	8
3.6 miR-144 的功能 .....	8
<b>4.本课题研究的目的和意义 .....</b>	<b>9</b>
<b>第二章 材料与方 法 .....</b>	<b>10</b>
<b>1.材料.....</b>	<b>10</b>
1.1 主要材料与试剂 .....	10
1.2 主要仪器和耗材 .....	11
<b>2.实验方法.....</b>	<b>12</b>

2.1 质粒构建 .....	12
2.2 RNA 相关实验 .....	15
2.3 蛋白相关实验方法 .....	17
2.4 细胞相关实验 .....	18
2.5 小鼠相关实验.....	22
2.6 统计学分析方法.....	22
<b>第三章 实验结果与分析.....</b>	<b>23</b>
1. miR-144 在乳腺肿瘤样本和乳腺癌细胞系中高表达 .....	23
2. Fat4、Sall1 和 ST18 是 miR-144 下游靶基因 .....	25
3. miR-144 可以调控乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞的干性 .....	28
4. miR-144 可以提高乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞的增殖能力 .....	31
5.在 MDA-MB-231 细胞中敲降 miR-144 可以促进细胞自我更新和增殖 .....	34
6. miR-144 可以在体内水平促进乳腺癌细胞的生长.....	38
<b>第四章 讨论.....</b>	<b>40</b>
<b>第五章 结论.....</b>	<b>42</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>43</b>
<b>致谢.....</b>	<b>49</b>

<b>Table of Contents</b>	
<b>Abbreviation comparison table .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapter I Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.Breast Cancer .....</b>	<b>1</b>
1.1 Introduction.....	1
1.2 Progress of breast cancer research .....	1
1.3 Molecular-based breast cancer treatment.....	2
<b>2.Cancer Stem Cells.....</b>	<b>3</b>
2.1 Cancer stem cell theory.....	3
2.2 Markers of breast cancer stem cells .....	4
2.3 Cancer stem cells and cancer treatment .....	5
<b>3.MicroRNA .....</b>	<b>5</b>
3.1 Introduction.....	5
3.2 Biogenesis of miRNA .....	6
3.3 Gene regulation of miRNA .....	7
3.4 miRNA-related cancer research .....	7
3.5 Function of miRNA in breast cancer .....	8
3.6 Function of miR-144.....	8
<b>4. Aims and significance of this project .....</b>	<b>9</b>
<b>Chapter II Materials and Methods .....</b>	<b>10</b>
<b>1.Materials .....</b>	<b>10</b>
1.1 Materials and Reagents .....	101
1.2 Instruments and Consumptive material .....	111
<b>2.Methods.....</b>	<b>12</b>

2.1 Plasmid construction .....	12
2.2 Protocols for RNA .....	15
2.3 Protocols for protein .....	17
2.4 Protocols for cell biology .....	18
2.5 Animal studies.....	22
2.6 Stastical Analysis .....	22
<b>Chapter III Results and Analysis.....</b>	<b>23</b>
<b>1. miR-144 is up-regualted in breast cancer sample and breast cancer cells.</b>	<b>23</b>
<b>2. Fat4,Sall1 and ST18 are downstream targets of miRR-144 .....</b>	<b>25</b>
<b>3. miR-144 promotes self-renewal of breast cancer stem cells .....</b>	<b>28</b>
<b>4. miR-144 promotes proliferaiton of breast cancer cells .....</b>	<b>31</b>
<b>5. Knockdown of miR-144 in MDA-MB-231 cells inhibits self-renewal of breast cancer stem cells and the prolifeaiton of breast cancer cells .....</b>	<b>35</b>
<b>6. miR-144 contributes to the growth of breast cancer cells <i>in vivo</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>Chapter IV Discussion.....</b>	<b>40</b>
<b>Chapter V Conclusion .....</b>	<b>42</b>
<b>References.....</b>	<b>43</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>49</b>

## 英文缩略语对照表

Abbreviation	Full Name
c-myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene
RAS	rat sarcoma viral oncogene
BRCA1	breast cancer 1, early onset
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
ER	estrogen receptor
PR	progesterone receptor
HER2	Human epidermal growth factor receptor-2
FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase 1
PKC	protein kinase C
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
EGF	Epidermal growth factor
DFS	Disease-Free Survival
VEGF	Vascular endothelial growth factor
RHOC	ras homolog gene family, member C
DGCR8	RNA-binding protein DiGeorge critical region-8
TRBP	TAR RNA binding protein
RNP	ribonucleoprotein
RISC	miRNA-induced silencing complexes
EMT	epithelial to mesenchymal transition
TET	ten eleven translocation
SK1	sphingosine kinase 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Fat4	FAT tumor suppressor homolog 4
Sall1	spalt like transcription factor 1
ST18	suppression of tumorigenicity 18, zinc finger



GATA3	GATA binding protein 3
CDK19	cyclin-dependent kinase 19
Bmi-1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
Sox-2	SRY (sex determining region Y)-box 2
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
YAP	yes-associated protein

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

乳腺癌是当今世界发病率和死亡率较高的肿瘤之一，是女性健康的头号杀手。由于肿瘤干细胞的存在，其耐药性使得大多数乳腺癌药物治疗效果均不显著，存在复发的隐患。因此了解乳腺癌发生发展机制，进一步阐释乳腺肿瘤干细胞维持自我更新的分子机制，将有利于发现新的有效药物靶点。

作为一类参与转录后基因表达调控的非编码 RNA 分子，miRNA 已被证实多种肿瘤的发生发展过程中起到了重要的调控作用。本研究通过临床样本检测发现，相对于正常乳腺组织，miR-144 在乳腺癌样本中高表达。我们通过生物信息学分析发现在三个受到 miR-144 直接调控的靶基因，其中 Sall1 能调控肿瘤细胞干性，而 Fat4 和 ST18 则是与增殖相关。在 MDA-MB-231 细胞株中敲降原本高表达的 miR-144 可以在体外水平抑制其增殖和肿瘤干细胞的自我更新。另一方面，在 miR-144 表达水平较低的 MCF-10A 和 MCF-7 细胞中过表达 miR-144 可以促进其增殖，并提高 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>细胞亚群的比例。此外，裸鼠皮下成瘤实验表明 miR-144 促进乳腺癌细胞的致瘤能力。综上所述，miR-144 可通过增强乳腺癌细胞增殖和自我更新来促进乳腺癌的发生发展，因此阐明 miR-144 的功能有可能为乳腺癌的临床诊断和分子靶向药物的开发提供新的靶点。

关键词：乳腺癌；miR-144；肿瘤干细胞

## Abstract

In modern world, breast cancer is the leading offender of female due to its high incidence and mortality. In consequence of therapeutic resistance of cancer stem cells, most drugs which targeting the breast cancer just remain largely ineffective, and recurrence is quite common. Thus, understanding the mechanism of breast cancer progression and self-renewal would contribute to the discovery of novel therapeutic targets.

As post-transcriptional regulatory non-coding RNA, microRNA has been verified with critical roles in tumor progression. In this report, we found that miR-144 was significantly up-regulated in breast cancer samples compared to paired normal breast tissues. We identified three miR-144 downstream targets via *in silico* analysis, among which Sall1 was reported to regulate stemness of breast cancer, while Fat4 and ST18 contributed to proliferation. Knock-down of miR-144 in MDA-MB-231 cells repressed proliferation and stem-like properties *in vitro*. Furthermore, overexpression of miR-144 in MCF-10A and MCF-7 cells could promote proliferation and increase the percentage of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> subpopulation. In addition, we demonstrated that miR-144 could promotes tumor growth through the nude mice subcutaneous injection model *in vivo*. Taken together, elaboration of miR-144 function may provide novel idea to clinical diagnosis and drug development against breast cancer.

**Key Words:** breast cancer ; miR-144 ; cancer stem cell

# 第一章 前言

## 1. 乳腺癌

### 1.1 概述

乳腺癌是世界上发病率仅次于肺癌的恶性肿瘤，多见于成年女性<sup>[1]</sup>。近些年来，乳腺癌的发病率以极快的速度增长，已经超越了其他肿瘤。在2008年，全球共有140万女性被诊断出患有乳腺癌，而到了2010年已有43.8万人死亡。据统计，在2013年美国新增乳腺癌23.2万例，其中3.9万例死亡，比重高达17%<sup>[2]</sup>。罹患乳腺癌的病人平均年龄有逐年下降的趋势，给社会发展带来了极大的负担<sup>[3]</sup>。由于乳腺癌的异质性，其发生发展是涉及到多基因调控的复杂过程，信号通路之间存在各种相互作用，其中的分子机制还有待深入研究。

### 1.2 乳腺癌研究进展

传统意义上，常见的乳腺癌相关标记物大致可以分为以下几类。第一类：原癌基因和抑癌基因：c-myc、RAS、p53、p21、BRCA1等；第二类：细胞增殖与凋亡相关标记物，如Ki-67、cyclin D1、BCL-2等；第三类：肿瘤侵袭和转移相关的因子，如VEGF、CD44等；第四类：激素受体，如雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）等；第五类：特异性蛋白，如组织多肽特异性抗原（TPS）、多肽特异性抗原（PS2）等。

乳腺癌按照其基因表达差异可以分为四个亚型：管腔型 (luminal-like)、基底细胞样型 (basal-like)、HER2高表达型 (HER2<sup>+</sup>) 和正常乳腺样型 (normal breast-like)。其中管腔型又可以分为A和B两个小亚型。各亚型的基因变化很多，病程进展、治疗反应和预后各不相同。一般来说，管腔A亚型和正常乳腺样型预后情况较好，而HER2高表达型和基底细胞样型的预后相对较差<sup>[4]</sup>。

近些年来，由于分子生物学飞速发展，以基因芯片为基础的高通量筛选得到了广泛应用，乳腺癌发生发展机制有了新发现。Zhou 等人通过表达谱芯片筛选发现在乳腺癌细胞中转录因子 Snail 过表达抑制了 1,6-二磷酸酶 (FBP1)的生成，

该代谢功能转换导致乳腺癌细胞摄取体内大量的葡萄糖，促进癌细胞内各种蛋白的合成<sup>[5]</sup>。另有文献报道，线粒体中 NEETs-NAF-1 蛋白表达减少能显著降低肿瘤细胞的增殖和乳腺癌肿瘤的大小。理论上，NEET 蛋白质在细胞整体应激反应中起到关键作用，但在过度应激的条件下，NEET 会异常表达，致使细胞发生过度增殖<sup>[6]</sup>。此外，有大量研究证实 microRNA (miRNA) 在肿瘤发生发展过程中起到重要的调节作用。英国癌症研究中心通过分析 1300 例乳腺癌样本发现，不同亚型乳腺癌有不同的 miRNA“签名”，它们在肿瘤细胞内充当微型开关，帮助基因开启或关闭，调控蛋白质的合成以及协助肿瘤细胞逃逸机体的免疫反应<sup>[7]</sup>。随着研究的深入，肿瘤细胞或相关细胞的信号转导机制逐渐浮出水面，乳腺癌的分子靶向治疗也应运而生。

### 1.3 乳腺癌的分子靶向治疗

早期的乳腺癌治疗主要以手术和放疗为主，然而随着乳腺癌研究的不断发展以及治疗理念的转变与更新，乳腺癌的治疗迈进了新时代。现今多数医生会根据肿瘤的分型、分期和患者的健康状况，采用手术、放疗、化疗和分子靶向治疗等多种手段结合的方式来治疗患者。其中分子靶向治疗取得了令人瞩目的进展，是近年来乳腺癌治疗研究最热门的领域。常见的分子靶向药物如抗激素受体分子、单克隆抗体和酪氨酸激酶抑制剂等，但这些治疗除了带来跨越性的技术进步外，仍然存在着耐药性问题<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.1 他莫昔芬 (Tamoxifen)

该药是针对雌激素受体 (ER) 设计的，属于雌二醇竞争性拮抗剂，能与乳腺细胞的雌激素受体结合，上调转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 生成，还对蛋白激酶 C (PKC) 有特异性的抑制作用<sup>[9]</sup>。他莫昔芬的这些功能对依赖雌激素的乳腺癌细胞有抑制作用。2012 年 ATLAS 的追踪研究报告显示，与服用安慰剂的对照组相比，服用他莫昔芬的乳腺癌患者复发率下降了 40%<sup>[10]</sup>。但大剂量长期服用他莫昔芬会产生视力障碍、骨髓抑制、脱发或肝功能异常等副作用。

#### 1.3.2 曲妥珠单抗 (Herceptin)

曲妥珠单抗是一种人源化单克隆抗体，是首个应用于临床的靶向治疗药物。主要用于治疗 HER2 阳性的乳腺癌。它是表皮生长因子 (EGF) 的竞争性抑制

剂，能阻碍后者结合到 HER2 上。曲妥珠单抗能干扰 HER2 的自身磷酸化及阻碍异源二聚体形成，从而抑制下游信号转导通路的激活，来抑制乳腺癌细胞的增殖。在 2005 年 ASCO 会议上，有研究表明对于 HER2 阳性的乳腺癌患者，服用曲妥珠单抗 1 年可明显延长无病生存期(DFS)。与对照组相比，预计 4 年无病生存率提高了 18%<sup>[11]</sup>。与其他分子靶向药物相比，曲妥珠单抗的副作用较低，长期使用可能导致心肺功能或消化系统异常。

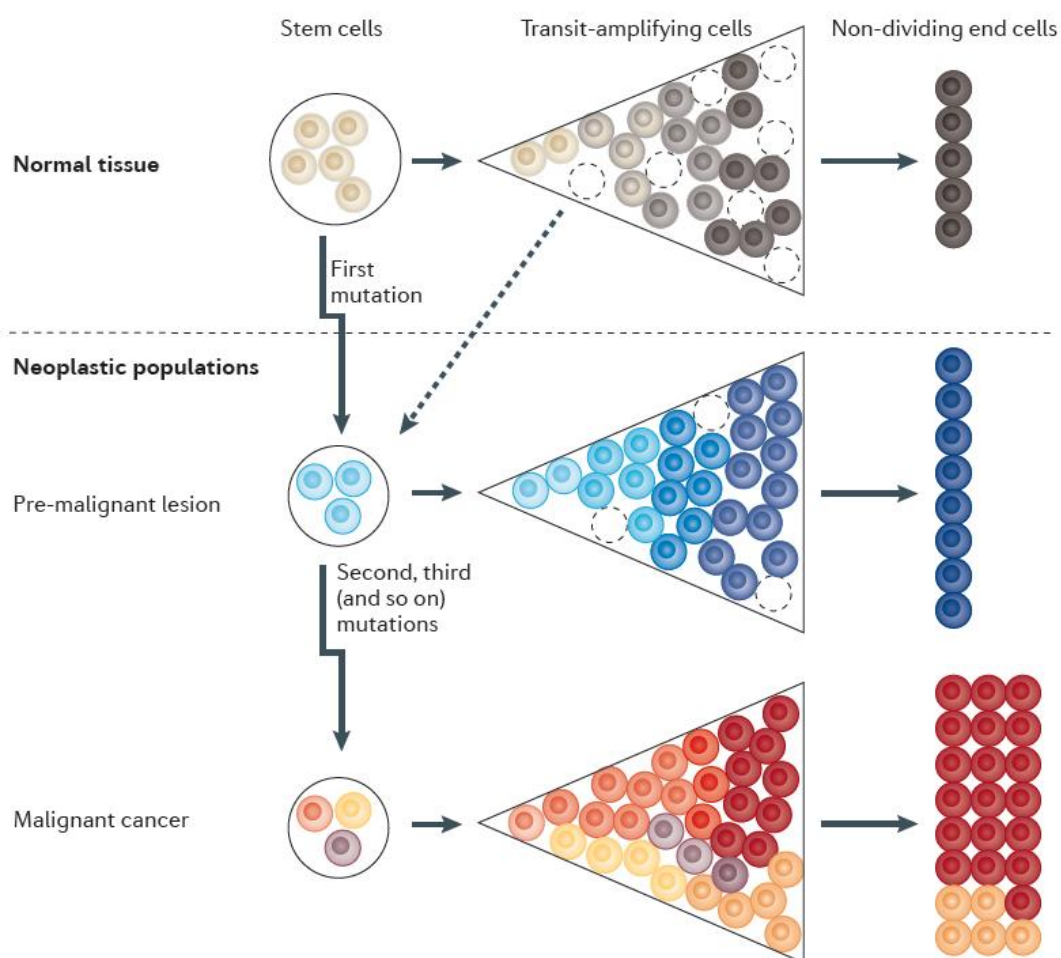
### 1.3.3 安维汀(Avastin)

安维汀可与肿瘤释放的血管内皮生长因子(VEGF)结合，阻止 VEGF 与血管内皮细胞上的受体结合来抑制肿瘤的血管新生，从而将肿瘤的给养切断，并使存活的肿瘤血管结构从异常转为正常，从而抑制肿瘤细胞生长。安维汀在治疗结肠癌和非小细胞肺癌方面取得了较大的进展，但在乳腺癌方面却收效甚微<sup>[12]</sup>。临床试验结果显示，有些患者在使用安维汀之后发生了胃肠道穿孔或动脉血栓栓塞症状。

## 2.肿瘤干细胞

### 2.1 肿瘤干细胞理论

经典的肿瘤干细胞理论认为，肿瘤中只有一小部分细胞负责肿瘤的自我更新，构成了肿瘤细胞的异质性和多态性<sup>[13]</sup>。和正常干细胞类似的是，肿瘤干细胞能自我更新或向多个方向分化，以及在不利条件下进入休眠状态<sup>[14]</sup>。肿瘤干细胞可能起源于正常组织干细胞，如图 1.1 所示，正常组织干细胞在体内生存时间比一般细胞长，受到 DNA 损伤机会更大，突变积累到一定程度引发细胞的恶性转化，产生了基因组极其不稳定的肿瘤干细胞。肿瘤干细胞理论能很好的阐释肿瘤化疗、放疗后引起的复发以及耐药性问题。

图 1.1 肿瘤干细胞演化模式图<sup>[14]</sup>Figure 1.1 Models of cancer stem cell<sup>[14]</sup>

## 2.2 肿瘤干细胞标记物

不同肿瘤干细胞之间标记物存在差异,最早的肿瘤干细胞是在急性淋巴白血病中鉴定出来的, Bonnet 等人在病人血液样本中分离出  $CD34^+/CD38^-$  的细胞,这类细胞可以在裸鼠体内分化,从而导致白血病的发生<sup>[15]</sup>。随着时间的推移,肿瘤干细胞在实体瘤中也被发现。2003 年, Al-Hajj 等人发现乳腺癌中有一小部分标记物为  $CD44^+/CD24^{-low}/Lineage^-$  的肿瘤干细胞,在裸鼠体内 100 个这样的细胞就能成瘤<sup>[16]</sup>,而这类标记物也被沿用至今。

## 2.3 肿瘤干细胞与肿瘤治疗

肿瘤干细胞与正常干细胞类似，拥有排出化疗药物的分子泵，相对于已分化的细胞有较好抵御化疗与放射治疗的能力。有文献报道，对于恶性极高的乳腺癌，其肿瘤干细胞的比例可达到肿瘤细胞总数的 25%<sup>[17]</sup>。传统的化疗药物主要是通过高通量筛选人工合成的化合物，可以杀灭分裂中肿瘤细胞。而肿瘤干细胞理论认为，只要存在肿瘤干细胞，肿瘤就无法彻底根治，肿瘤治疗的焦点应放在是杀伤肿瘤干细胞方面。然而肿瘤干细胞常处于静息状态，只有在增殖时才快速分裂产生子代细胞。因此分析出特异性针对肿瘤干细胞的分子标记物是非常重要的，在对肿瘤干细胞造成杀伤的同时，又能保护成体干细胞免受其害。近些年来芯片技术得到了广泛应用，利用此技术可以分析出肿瘤干细胞与成体干细胞差异性表达的标记物，研发出副作用较小的分子靶向药物。

## 3. MicroRNA

### 3.1 概述

miRNA 是一种长度为 22nt 左右的内源性微小 RNA 分子，可在转录后水平调节靶基因的表达，从而完成对人类生理及病理功能的调控<sup>[18]</sup>。miRNA 最早是 Lee 和他的同事在 1993 年研究秀丽新小杆状线虫时发现的<sup>[19]</sup>。2002 年，Calin 等人发现 miR15 和 miR16 的表达水平在慢性淋巴白血病中显著下调<sup>[20]</sup>，这也是 miRNA 与肿瘤相关研究的首次重大突破。2005 年，Johnson 等人发现原癌基因 RAS 受到 let-7 家族的调控<sup>[21]</sup>，直接证明了 miRNA 可以通过调控靶癌基因来影响肿瘤的发生发展。2007 年，Ma 等人研究发现 miR-10b 可以通过调控 RHOC 基因来促进乳腺癌的侵袭和转移<sup>[22]</sup>。至此，肿瘤相关 miRNA 的研究逐渐成为热点。



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