

学校编码: 10384
学号: 21720091152155

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

EphrinA3 在乳腺癌血管新生的作用
Roles of EphrinA3 on Breast Cancer Angiogenesis

指导教师姓名: 袁立 教授
专 业 名 称: 细胞生物学
论文提交日期: 2012 年 5 月
论文答辩时间: 2012 年 6 月
学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

2012 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 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
1 前言	1
1.1 Eph 受体和 Ephrin 配体	1
1.2 Eph 受体和 Ephrin 配体与肿瘤形成	5
1.3 Eph 受体和 Ephrin 配体与血管新生	5
1.4 Eph 受体和 Ephrin 配体与肿瘤血管新生	8
1.5 EphrinA3 的研究进展及研究意义	10
2 实验材料与仪器设备	14
2.1 材料与试剂	14
2.2 主要仪器	16
2.3 试剂配方	17
2.4 载体图谱	19
3 实验方法	21
3.1 人 EFNA3 基因的克隆	21
3.2 载体的构建	22
3.3 病毒的包装、浓缩与滴定	28
3.4 Western blot 技术	30
3.5 Real Time PCR 技术	31
3.6 肿瘤细胞增殖、迁移与成瘤实验	32
3.7 内皮细胞增殖、迁移与成管实验	37
4 结果与分析	40
4.1 EFNA3 在内皮细胞增殖、迁移与成管的作用	40
4.2 EFNA3 在乳腺癌临床病例及乳腺细胞系中的表达情况	44

4.3 EFNA3 表达细胞系及干扰细胞系的构建	45
4.4 EFNA3 在肿瘤细胞增殖和迁移中的作用	50
4.5 小鼠体内成瘤及免疫组化.....	57
5 讨论.....	61
6 结论.....	64
7 参考文献	65
8 致谢.....	71

厦门大学博硕士学位论文摘要

Table of Contents

Abstract in Chinese	III
Abstract in English	III
1 Forewords	1
1.1 Eph receptors and their ephrin ligands.....	1
1.2 The function of Eph receptors/ephrins in tumor formation	5
1.3 The function of Eph receptors/ephrins in angiogenesis	5
1.4 The function of Eph receptors/ephrins in tumor angiogenesis	8
1.5 Significance of research on EphrinA3	10
2 Materials and Equipment	14
2.1 Materials and Reagents	14
2.2 Equipment	16
2.3 Reagents Formula.....	17
2.4 Vector Map.....	19
3 Methods	21
3.1 Cloning of human EFNA3	21
3.2 Vector construction	22
3.3 Virus packaging、concentrating and titering	28
3.4 Western blot	30
3.5 Real Time PCR.....	31
3.6 Proliferation & migration assay on cancer cells.....	32
3.7 Proliferation,migration and tube formation assay on human endothelial cells.	37
4 Results and analysis	40
4.1 The impact of EFNA3 on human endothelial cells	40
4.2 The expression of ligand EFNA3 in breast cancer cells and clinical samples...	44
4.3 Establish EFNA3 overexpression breast cancer cell lines and EFNA3 knock down breast cancer cell lines.....	45

4.4 The impact of EFNA3 on cancer cells.....	50
4.5 The subcutaneous injection in nude mice	57
5 DISCUSSIONS.....	61
6 CONCLUSIONS	64
7 REFERENCES	65
8 ACKNOWLEDGEMENTS	71

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

Eph 受体和它的配体 ephrins 是在 20 世纪 80 年代末被发现的, 到目前为止已发现的 Eph 受体有 15 个, 配体有 9 个。与其它受体酪氨酸激酶相比, Eph/ephrins 在活性与信号方面表现出独特的潜能。它们在相互作用过程中除了存在双向传导信号外还与其他信号通路之间存在着复杂的 cross-talk。“正向信号”的启动需要相应的 ephrin 配体结合到特定的 Eph 受体上, 从而使得 Eph 受体细胞内的酪氨酸激酶活化而导致自身磷酸化从而激活下游的底物分子, 并会招募含 PDZ 结构域的蛋白, 逐级传导细胞内信号。“反向信号”中 ephrins 则作为信号接收的受体, 被 Eph 激活后向自身所在的细胞传递信号。Eph/ephrins 被认为在不同生理及病理过程中都发挥着重要的作用, 例如, 胚胎与神经系统的发育、血管新生、肿瘤发生等。近年来 Eph 家族在肿瘤细胞生长、繁殖、转移中的作用成为研究的热点。已有众多关于 Eph 受体的研究表明: Eph 受体及其配体 ephrins 的高水平表达与肿瘤的恶性进展、临床预后有关。EphrinA3 是 ephrinA 亚族中第三个被发现的配体, 实验室前期工作中发现它在乳腺癌、肺癌、结肠癌和肝癌细胞系中表达量都有所上调。但到目前为止, EphrinA3 的研究仅局限在神经系统发育方面, 对于它在血管新生、肿瘤生长以及肿瘤血管新生方面的研究几乎为零。我们希望通过体内和体外实验探讨 EphrinA3 在肿瘤及肿瘤血管新生中的作用。我们的实验结果显示, 体外水平过量表达 EphrinA3 可以促进乳腺癌细胞的增殖和迁移, 而干扰 EphrinA3 能够抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移。裸鼠皮下成瘤实验显示, 过量表达 EphrinA3 并不能有效促进肿瘤形成; 干扰 EphrinA3 的表达, 不仅不能有效抑制肿瘤形成, 甚至还出现在干扰效率不高(约 40%)的情况下促进肿瘤形成的趋势。我们对裸鼠成瘤实验获得的肿瘤样品进行组织切片, 利用免疫组织化学技术观察肿瘤实体中血管生长的情况。发现: 过量表达 EphrinA3 会抑制肿瘤中血管的生长, 而干扰 EphrinA3 表达反而能够促进血管向肿瘤的生长。内皮细胞体外实验也显示, EphrinA3 能够抑制 HUAEC 和 HUVEC 细胞的增殖, 并能够抑制 HUVEC 细胞的迁移和成管。因此, EphrinA3 作用于乳腺癌细胞时能

促进细胞的增殖和迁移，而在肿瘤形成过程中，EphrinA3 通过抑制肿瘤血管新生影响肿瘤的形成。EphrinA3 在肿瘤发展中的作用值得结合其对肿瘤血管新生的影响而进一步深入研究。

关键词：Eph/ephrins；乳腺癌；EphrinA3；肿瘤血管新生

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Eph receptors and their ephrin ligands were identified in the late 1980's. Until today, 15 different receptors and 9 ligands are known. In contrast to other receptor tyrosine kinases, Eph receptors/ephrins show unique properties in their activation and signaling. Eph receptor/ephrin signaling can proceed bidirectionally, ie "forward" and "reverse" signaling. Forward signaling involves binding of ephrins by the appropriate Eph receptor. This leads to autophosphorylation of intracellular tyrosine residues of the Eph receptor and further to activation of its downstream signal transduction cascades. Reverse signaling can take place if the cytoplasmic tail of the ephrin is phosphorylated, which results in further activation of different signaling cascades. Many studies in the last decade indicate also complex cross-talk of Eph/ephrin signaling with other signaling pathways in executing its biological functions. Eph /ephrin signaling has been linked to different physiological and pathophysiological processes, including embryonic development, angiogenesis, and tumorigenesis. The roles of Eph receptors and ephrins during tumorigenesis have recently attracted growing attention. It has been reported that the overexpression of Eph receptors and their ligands ephrins were implicated in tumor malignancy and clinical prognosis. However, research on EphrinA3 function in cancer is limited. In this study, we explored the function of EphrinA3 in breast cancer. We found that the expression of EphrinA3 was significantly upregulated in clinical samples and in five breast cancer cell lines. Overexpression of EphrinA3 in breast cancer cell lines accelerated cell growth and migration. In contrast, downregulation of EphrinA3 inhibited cell proliferation and migration. In nude mice subcutaneous tumor model, overexpression of EphrinA3 fails to effectively promote tumor growth, while knockdown of EphrinA3 cannot suppress tumor growth effectively either, associated with tendency to promote tumor growth at low interference efficiency. Tumors acquired from nude

ABSTRACT

mice were sectioned and used for further histological analysis focused on tumor angiogenesis. It was observed that overexpression of EphrinA3 reduced blood vessel density, while increased vessel density was observed in EphrinA3 knockdown tumors. These results were in accordance with in vitro endothelial cell assay, implicating EphrinA3 suppresses the proliferation of HUAEC and HUVEC, migration and tube-formation of HUVEC. EphrinA3 promotes proliferation and migration of breast cancer cells in vitro, however, this effect might be abrogated by tumor angiogenesis in tumor formation in vivo. Therefore, it will be important to define the role of EphrinA3 in tumor growth in combination with the effect of tumor angiogenesis.

Keywords: Eph/ephrins; Breast cancer; EphrinA3; Tumor angiogenesis

1 前言

1.1 Eph受体和Ephrin配体

1.1.1 结构与信号通路

Eph受体于20世纪80年代被发现^[1]，它是受体酪氨酸激酶族 (RTKs) 中最大的亚族，与其配体ephrin (Eph family receptor interacting proteins) 相结合介导细胞间信号转导。根据分子的结构、序列同源性、膜结合的方式，ephrin配体被分为ephrinA和ephrinB两个亚家族，ephrinA亚群是以糖基磷脂酰肌醇链(GPI) 锚定在细胞膜表面的膜外蛋白，而ephrinB亚类则是以跨细胞膜形式存在的跨膜分子。相应地，Eph受体根据其细胞膜外段的相互关系及与ephrin两个亚群接合的特性也分为A、B两个亚群。EphrinB有胞外Eph结合区和短的胞质区，其中胞质尾区高度保守，包括跨膜蛋白的胞内小区，包含5个不可变酪氨酸残基，羧基端也形成一个PDZ结构域的结合基序^[2] (图1.1)，因此这些配体本身也具有受体般的信号转导功能。目前发现的ephrin配体成员共有9个，其中ephrinA亚族有6个成员，即ephrinA1-A6，ephrinB亚族有3个成员，EphrinB1-B3。Eph受体成员共有15个^[3,4]，其中EphA受体亚族有9个成员，即EphA1-EphA9^[4]。EphB受体亚族有6个成员，它们是EphB1-EphB6^[3]。Eph受体与经典的酪氨酸激酶受体相似，以跨膜形式存在于细胞膜表面，由三部分组成，即胞外配体结合区、跨膜区和胞内区。典型的Eph家族受体结构是胞外区由一个球形结构域(Glb)、一个独特的富含半胱氨酸的基序和两个纤维连接蛋白III型(FN III)基序构成；胞外区和胞内区之间由一个短的跨膜结构域连接；胞内近胞膜区相对保守，包括具酪氨酸激酶活性的结构域(TK)、SAM(sterile alpha motif)结构域和C端的PDZ(post-synaptic density protein, discs-large, zona occludens)结构域^[5]。其中，位于近膜区结构域中的两个酪氨酸残基是自磷酸化的主要位点(Y-P)，含SH2结构域的信号蛋白，Src族酪氨酸激酶家族(Src及Fyn)、Ras GTPase-活化蛋白(Ras GAP)及Nck均可与这两个酪氨酸残基相互作用。

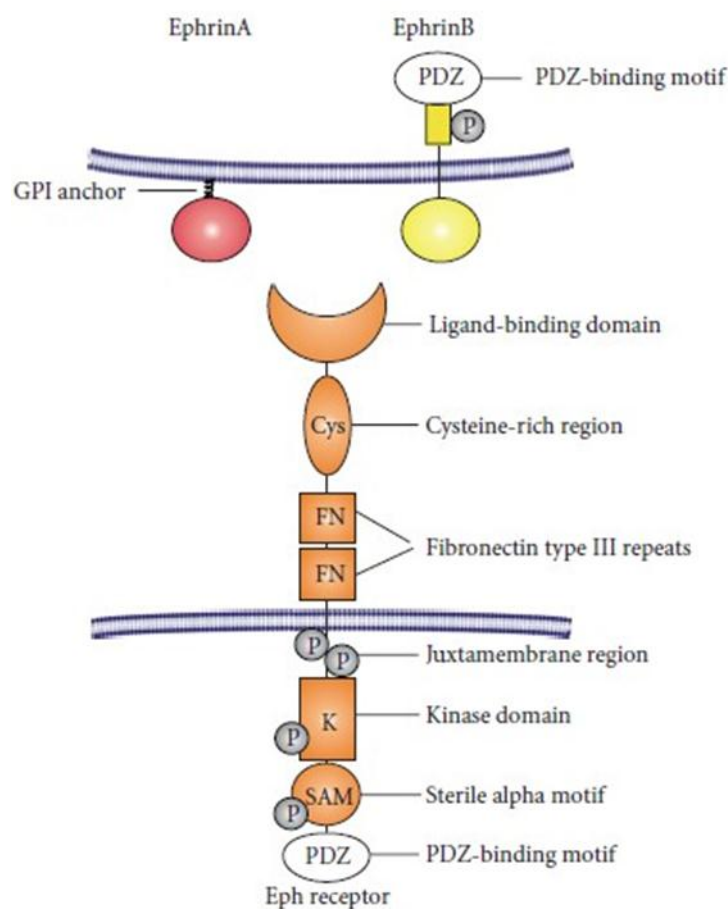


图 1.1 Eph 受体与 ephrin 配体的结构示意图 (BirgitMosch et al, 2009)

Figure 1.1 Structure of Eph receptors and ephrin ligands (BirgitMosch et al, 2009)

PDZ: Postsynaptic density 95-Discs large-Zonula occludentes-1-protein

GPI: glycosylphosphatidylinositol

研究表明, 在每个亚群内一个配体可与多个受体以不同亲和力交叉结合而发挥不同作用, EphA亚群优先与ephrinA相互作用, 而EphB亚群优先与ephrinB结合而起作用(图1.2)。但它们之间的这种优先结合并不是很严格, 如EphrinA5除与EphA类受体结合外还可以与EphB2结合, EphA4则可分别与ephrinA和ephrinB家族的特定配体相结合^[6-8]。

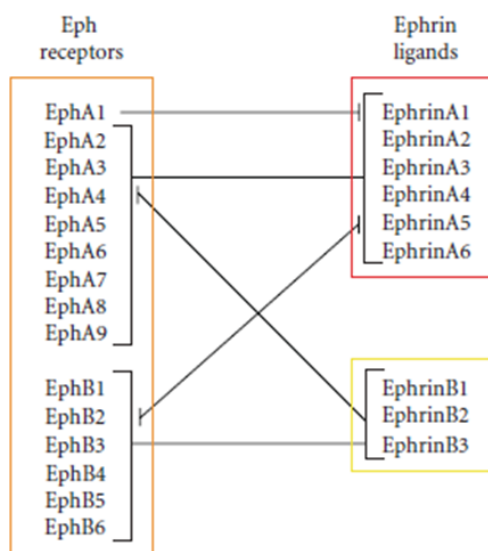


图1.2 Eph受体与ephrin配体间相互作用示意图 (BirgitMosch et al, 2009)

Figure 1.2 Major interactions of Eph receptors and ephrin ligands (BirgitMosch et al, 2009)

与其他受体酪氨酸激酶不同的是Eph/ephrins在它们激活和信号中有着独特的功能。受体的激活除了与其它受体酪氨酸激酶同样形成二聚体之外，还会与它的配体形成多聚体^[9]。多聚化后激发的信号与普通二聚化激发的信号不同，而且ephrin多聚化的程度与生物功能的类型和强弱有关^[10]。由于Eph受体与它的配体均为膜蛋白，所以Eph受体的激活一般需要细胞的接触。这种细胞间的信号转导有一独特之处在于受体和配体间的反应引发所属细胞间的双向信号转导，即受体和配体之间的相互作用会导致受体和配体两者均发生酪氨酸磷酸化，Eph受体介导经典的正向信号，ephrin配体胞浆区域介导反向信号，共同引发双向信号。“正向信号”的启动需要相应的ephrin配体结合到特定的Eph受体上，从而使得Eph受体细胞内的酪氨酸激酶活化而导致自身磷酸化并激活下游的底物分子活化，并招募含PDZ结构域的蛋白，逐级传导细胞内信号^[11,12]。“反向信号”中Eph受体行使“配体”的作用，ephrins则作为信号接收的受体，被Eph激活后向自身所在的细胞传递信号。在反向信号中，ephrinB胞内区会有丝氨酸和酪氨酸磷酸化，并会招募信号底物。EphrinA介导的反向信号需要一个跨膜信号转导因子的协助^[6] (图1.3)。然而，最近有实验证明至少A亚族的ephrins是可以从细胞表面分泌出来的^[13,14]。例如，可溶性EphrinA1蛋白是具有功能活性的，并且可以在不与靶细胞接触的情况下抑制Ras-MAPK信号通路^[15-17]。

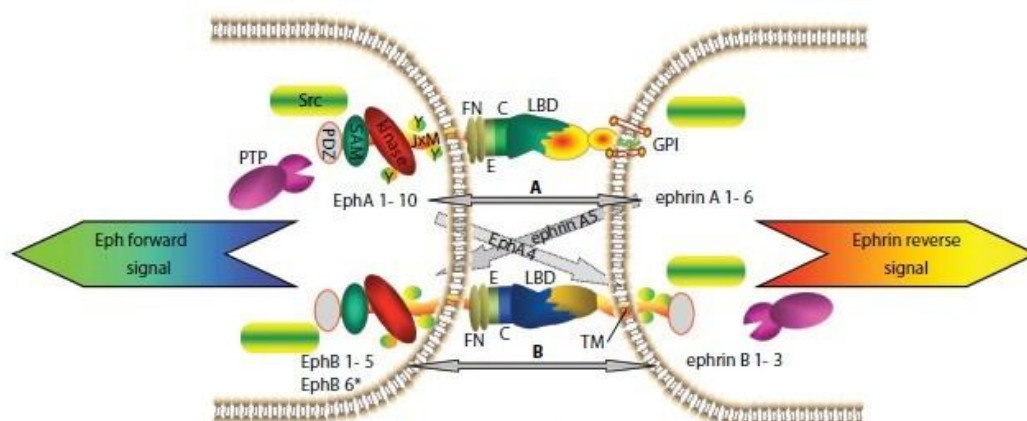


图1.3 Eph/ephrin双向信号通路示意图

Figure 1.3 Bidirectionally signaling proceed by Eph receptor/ephrin

在过去十几年的研究中发现Eph/ephrins和其他的信号通路之间还存在着复杂的cross-talk^[18]。Eph/ephrins与不同的细胞表面受体、粘附分子、缝隙连接蛋白以及细胞表面蛋白酶之间相互作用^[19]。

1.1.2 胚胎和神经系统发育中的作用

Eph/ephrins 在胚胎发育中发挥着重要作用^[20]。例如，外源性过量表达 EphA3 和 EphrinA5 会导致原肠胚和体节发育的缺陷^[21]。另外，Eph/ephrins 信号可以与整合素 $\alpha 5$ 和纤连蛋白共同作用，影响间充质向皮质转化以及体节边界的形成^[22]。

Eph/ephrins 信号在生长发育以及成体脊椎动物脑发育中发挥作用。基于受体与配体在相邻菱脑原节中交错表达，EphA4、EphB2、EphB3 以及它们的 B 亚族 ephrin 配体被认为在菱脑原节边界形成中发挥着重要作用^[23,24]。EphA4 和 EphrinB3 敲除小鼠中的研究显示，这两种蛋白在形成正常的皮质脊髓束纤维中是必要的，此过程是通过 Eph 受体正向信号来实现的^[25,26]。Hornberge 等人证明，正确的 ephrins 的表达对于视网膜神经节细胞轴突的正常生长是很重要的，颞叶神经轴突中非正常的 EphrinA2 的过量表达会使得防止尾顶盖轴突过度增长的抑制作用减弱^[27]。在视觉系统发育过程中，EphB2 和 EphB3 受体和 B 亚族的 ephrin 配体在引导视网膜神经节细胞导向视神经节的过程中发挥作用，因此 EphB2 和 EphB3 的敲除将会使得轴突导向出错率增加^[28]。此外，EphB2 受体在成体哺乳动物中枢神经系统中在突触的形成和成熟、突触信号传递和突触重塑过程中起着一定的作用^[29,30]。Henderson 等人发现缺乏 EphB2 受体的小鼠中，N-甲基-D-天

冬氨酸介导的突触电流降低,并且会降低海马趾和齿状脑回突触间电流的长时程增强效应(LTP)^[31]。

1.2 Eph受体和Ephrin配体与肿瘤形成

Eph/ephrins 不仅仅在正常生理过程中发挥作用,在肿瘤形成这样的病理过程也发挥着重要的作用^[9,32]。据报道,EphA2、A3和EphB1、B2、B3、B4、B6以及EphrinA1、A5和EphrinB2等在许多人类癌症中都会表达量上调,并且发现这种表达量上调与肿瘤形成以及肿瘤迁移有关^[9,32-34]。而EphA1在大肠癌,EphA7在前列腺癌,EphB6在黑色素瘤中的下调会促进肿瘤转移和癌变^[35-37]。Eph受体活性调节异常能够影响到细胞与基质的粘附、细胞与细胞的粘附、细胞骨架的构型以及肿瘤细胞存活的修正,这可能会导致细胞运动、肿瘤细胞侵袭及转移能力的增强。Eph受体和ephrin配体的配比也会影响细胞粘附性的变化。例如,Eph受体高水平表达和ephrin配体低水平表达,会促进肿瘤的生长和迁移^[32]。

Eph受体可通过调节整合素活性影响细胞与基质之间的粘附。例如,EphA2被EphrinA1激活能下调粘着斑激酶(FAK)磷酸化程度,从而使整合素变为非活性构象,最终抑制整合素介导的粘附、细胞伸展和迁移^[38]。Eph受体和ephrin配体与E-cadherin等粘附分子相互作用会影响细胞与细胞的粘附。E-cadherin会影响Eph受体的表达和细胞定位,而Eph受体也会影响E-cadherin的表达和细胞定位^[39-41]。细胞骨架的重构是细胞运动和侵袭能力增强的另一个先决条件,并且已有相应的Eph受体参与细胞骨架重构的证据。例如,EphA3/EphrinA5信号可以诱导视网膜神经节细胞生长锥崩解,并在表达EphA3的人肾上皮细胞及黑色素瘤细胞系中导致细胞融合、起泡和脱离^[42,43]。在上述两个研究中,Rho激酶均参与作用。在横纹肌肉瘤细胞系中EphA3受体通过调控Rho GTPase来抑制细胞运动^[44]。Eph/ephrin信号还可以影响细胞存活。在肝癌细胞中,EphrinA2可以通过抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α)来提高肿瘤细胞存活能力^[45]。Jurkat TAg T细胞中,ephrinA诱导Scr和Akt激活的信号,能够抑制由抗原受体诱导的细胞凋亡^[46]。

1.3 Eph受体和Ephrin配体与血管新生

1.3.1 血管新生

血管新生指的是在已有的血管上通过出芽的方式长出新的血管^[47,48]。这一过程与血管内皮细胞迁移和增殖相关。覆盖于血管腔内面的单层扁平上皮被称作内

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫