

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学号: 24520121153205

# 厦 门 大 学

## 硕 士 学 位 论 文

### 下调 Annexin A3 表达对肺腺癌生物学行为的影响及分子机制探讨

Study on the effects of down-regulating Annexin A3 expression on biological behaviors of lung adenocarcinoma and its molecular mechanism

刘青青

指导教师姓名: 刘迎福 副教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

2015 年 4 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

## 摘要

肺癌是我国第一大癌症，其发病率和死亡率均居恶性肿瘤之首，严重危害人类健康。肺癌按组织学类型可分为鳞癌、腺癌、小细胞癌和大细胞癌。近年来，肺腺癌（lung adenocarcinoma, AdC）的发病率呈逐步上升趋势，且患者死亡率高、预后极差。癌细胞易转移是肺腺癌患者预后差的主要原因，因此，探寻肺腺癌转移的分子机制及其新的治疗靶标，对于提高肺腺癌患者预后意义重大。我们前期研究中，采用定量蛋白质组学技术鉴定出Annexin A3（Anxa3）为一个新的肺腺癌转移相关分子，并在大量的肺腺癌临床样本中分析发现Anxa3表达与肺腺癌转移及预后密切相关，Anxa3高表达是肺腺癌淋巴结转移的危险因子及独立的预后因子。然而，Anxa3在肺腺癌中发挥怎样的生物学功能及其分子机制均未阐明。

本研究以肺腺癌细胞系A549及LTEP-a2为研究对象，采用RNAi技术下调肺腺癌细胞中Anxa3的表达，建立稳定敲除Anxa3表达的肺腺癌细胞系A549/shAnxa3和LTEP-a2/shAnxa3及相应对照细胞系A549/control和LTEP-a2/control。MTT实验及平板克隆形成实验发现，下调Anxa3的表达可明显抑制肺腺癌细胞A549和LTEP-a2的体外生长能力。划痕实验及Transwell实验结果显示，下调Anxa3的表达可明显抑制肺腺癌细胞A549和LTEP-a2的迁移和侵袭能力。为进一步分析Anxa3表达对肺腺癌生长及转移的作用，将A549/shAnxa3和A549/control两组细胞注射至裸鼠体内，建立裸鼠体内成瘤模型及转移模型。裸鼠体内成瘤实验发现：与A549/control细胞相比，A549/shAnxa3细胞在体内的成瘤能力明显下降，形成的瘤体积明显减小，这提示下调Anxa3表达可明显抑制肺腺癌细胞的体内生长能力。体内转移模型发现：与A549/control细胞相比，A549/shAnxa3细胞在裸鼠体内各脏器如肺、肝、脑中形成转移瘤的数目明显减少，这提示下调Anxa3表达能明显抑制肺腺癌细胞的转移能力。为深入探讨Anxa3在肺腺癌中潜在的作用机制，采用Western Blot技术检测下调Anxa3表达对肺腺癌细胞中信号通路激活及一些效应分子表达的影响。分析发现，Anxa3表达下调后，A549细胞中MEK、ERK、I $\kappa$ B $\alpha$ 、Akt及LTEP-a2细胞中MEK、ERK的磷酸化水平均明显下降，而P38的磷酸化水平却不受影响。同时，下调Anxa3表达后，A549

## 摘要

和LTEP-a2细胞中MMP-2、N-cadherin效应分子表达明显下降，而E-cadherin表达增强。此外，通过对裸鼠体内瘤组织中上述分子的表达进行分析，发现MMP-2、N-cadherin、E-cadherin分子的表达变化与细胞系中表达变化一致。综上所述，下调肺腺癌中Anxa3表达可明显抑制肺腺癌的生长及转移，且可调控肺腺癌中信号通路MEK/ERK的激活，调节MMP-2、N-cadherin和E-cadherin分子的表达。总之，本研究不仅明确了Anxa3在肺腺癌中的生物学功能，且对其分子机制进行了初步探讨，为筛选肺腺癌新的分子标志物及寻找新的治疗靶标提供了理论依据。

**关键词：**肺腺癌 转移 Annexin A3

## Abstract

Lung cancer is the most common cancer in our country, which has the highest incidence and mortality rates among all kinds of cancer, and has caused serious harm to human health. The histological types of lung cancer include squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, small cell carcinoma and large cell carcinoma. In recent years, the incidence of lung adenocarcinoma has been gradually rising, with high mortality and poor prognosis. Metastasis is a significant feature of cancer cells and also the leading cause of poor prognosis of lung adenocarcinoma. Therefore, it is important to explore the molecular mechanism of lung cancer metastasis and to identify new therapeutic targets to improve the prognosis of lung adenocarcinoma. In our previous studies, Annexin A3 (Anxa3) was identified as a novel metastasis-related protein of lung adenocarcinoma through quantitative proteomic techniques. We also found that Anxa3 expression was closely related with metastasis and prognosis of lung adenocarcinoma in large amount of clinical samples of lung adenocarcinoma. High-expression of Anxa3 was a risk factor for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma and an independent prognostic factor. However, the biological function and molecular mechanism of Anxa3 in lung adenocarcinoma is unclear.

In this study, the lung adenocarcinoma cell lines used for analysis were A549 and LTEP-a2. Firstly, RNAi technology was used to down-regulate the expression of Anxa3 in both cell lines, and stable Anxa3 knockdown cell lines (A549/shAnxa3 and LTEP-a2/shAnxa3) and corresponding control cell lines (A549/control and LTEP-a2/control) were established. According to MTT and colony formation experiments, we found that down-regulating the expression of Anxa3 could significantly inhibit the growing ability of both A549 and LTEP-a2 cells *in vitro*. Results of wound healing assay and transwell assay showed that down-regulating the expression of Anxa3 could seriously suppress migration and invasion ability of both A549 and LTEP-a2 cells. In order to further analyze the role of Anxa3 in the growth and metastasis of lung adenocarcinoma, A549/shAnxa3 and A549/control cells were

## Abstract

injected into nude mice to establish tumor formation and tumor metastasis models. Based on the result of tumor formation model, we found lower tumorigenicity and smaller tumor volumes in A549/shAnxa3 group compared with that in A549/control group, which indicated that down-regulating Anxa3 expression could inhibit the growth ability of lung adenocarcinoma *in vivo*. Meanwhile, according to the result of tumor metastasis model, the number of metastatic tumors in lung, liver and brain of nude mice injected with A549/shAnxa3 cells was less than nude mice injected with A549/control cells, which demonstrated that down-regulating Anxa3 expression could significantly inhibit the metastasis of lung adenocarcinoma *in vivo*. To explore the potential mechanism of Anxa3 in lung adenocarcinoma, we detected the effect of down-regulating Anxa3 expression on some molecules and pathways by Western Blot. The result showed that after down-regulation of Anxa3 expression, the phosphorylation level of ERK, MEK, I $\kappa$ B $\alpha$ , Akt in A549 cells and ERK, MEK in LTP-a2 cells were decreased, while the phosphorylation level of P38 in both cell lines were not affected. Furthermore, the expression of molecules such as MMP-2 and N-cadherin was significantly decreased while the expression of E-cadherin was increased. In addition, the expression of the previous mentioned molecules were detected in tumor tissue from nude mice by IHC, and result was consistent with the result of experiment in A549 and LTP-a2 cell lines. In conclusion, down-regulating Anxa3 expression could not only inhibit the growth and metastasis of lung adenocarcinoma, but also regulate the activation of MEK/ERK pathways and the expression of MMP-2, N-cadherin and E-cadherin. To sum up, our present study clarified the biological roles of Anxa3 in lung adenocarcinoma and explored preliminarily the underlying molecular mechanism, which provided important theoretical foundation for identifying new molecular markers and therapeutic targets of lung adenocarcinoma.

**Keywords:** Lung adenocarcinoma; Metastasis; Annexin A3

# 目 录

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| 中文摘要.....                 | I        |
| 英文摘要.....                 | III      |
| 中文目录.....                 | V        |
| 英文目录.....                 | VIII     |
| 主要缩略语表.....               | XI       |
| <b>第 1 章 前言.....</b>      | <b>1</b> |
| 1.1 Anxa3 的结构特征.....      | 2        |
| 1.2 Anxa3 在肿瘤中的研究情况.....  | 2        |
| 1.3 肿瘤相关信号通路.....         | 4        |
| 1.4 肿瘤相关效应分子.....         | 5        |
| 1.4.1 MMP 家族.....         | 6        |
| 1.4.2 钙黏蛋白家族.....         | 7        |
| <b>第 2 章 实验材料与方法.....</b> | <b>9</b> |
| 2.1 实验材料.....             | 9        |
| 2.1.1 菌株、细胞系及裸鼠.....      | 9        |
| 2.1.2 抗体.....             | 9        |
| 2.1.3 主要试剂和耗材.....        | 10       |
| 2.1.4 主要仪器.....           | 11       |
| 2.1.5 主要溶液配制.....         | 12       |
| 2.2 实验方法.....             | 13       |
| 2.2.1 质粒小提.....           | 13       |
| 2.2.2 质粒转化.....           | 14       |
| 2.2.3 质粒大提.....           | 15       |
| 2.2.4 细胞复苏.....           | 16       |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.5 细胞传代.....                           | 16        |
| 2.2.6 细胞冻存.....                           | 16        |
| 2.2.7 细胞转染.....                           | 16        |
| 2.2.8 细胞稳株构建.....                         | 17        |
| 2.2.9 细胞 RNA 抽提.....                      | 17        |
| 2.2.10 逆转录.....                           | 18        |
| 2.2.11 qPCR 反应体系.....                     | 19        |
| 2.2.12 qPCR 反应程序.....                     | 19        |
| 2.2.13 细胞全蛋白抽提.....                       | 19        |
| 2.2.14 蛋白浓度测定 (BCA 法) .....               | 19        |
| 2.2.15 Western Blot.....                  | 20        |
| 2.2.16 MTT 实验.....                        | 21        |
| 2.2.17 平板克隆形成实验.....                      | 21        |
| 2.2.18 细胞划痕实验.....                        | 21        |
| 2.2.19 Transwell 实验.....                  | 22        |
| 2.2.20 裸鼠皮下成瘤实验.....                      | 23        |
| 2.2.21 裸鼠转移瘤模型构建.....                     | 23        |
| 2.2.22 免疫组化.....                          | 23        |
| 2.2.23 数据处理.....                          | 24        |
| <b>第 3 章 实验结果.....</b>                    | <b>25</b> |
| <b>3.1 Anxa3 基因的 shRNA 质粒构建.....</b>      | <b>25</b> |
| <b>3.2 下调 Anxa3 表达的肺腺癌细胞系的建立.....</b>     | <b>26</b> |
| <b>3.3 下调 Anxa3 表达对肺腺癌细胞生物学行为的影响.....</b> | <b>28</b> |
| 3.3.1 下调 Anxa3 表达对肺腺癌细胞体外生长能力的影响.....     | 28        |
| 3.3.2 下调 Anxa3 的表达对肺腺癌细胞迁移能力的影响.....      | 30        |
| 3.3.3 下调 Anxa3 表达对肺腺癌细胞侵袭能力的影响.....       | 30        |
| <b>3.4 Anxa3 在肺腺癌细胞中的作用机制探讨.....</b>      | <b>32</b> |
| 3.4.1 下调 Anxa3 表达对肺腺癌细胞中信号通路的影响.....      | 32        |
| 3.4.2 下调 Anxa3 表达对肺腺癌细胞中相关效应分子的影响.....    | 32        |
| <b>3.5 Anxa3 对肺腺癌细胞生长及转移影响的体内研究.....</b>  | <b>33</b> |
| 3.5.1 下调 Anxa3 表达对裸鼠体内成瘤能力及肿瘤转移能力的影响..... | 33        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5.2 下调 Anxa3 表达对裸鼠皮下肿瘤组织中相关效应分子表达的影响....       | 35        |
| <b>第 4 章 讨论.....</b>                             | <b>37</b> |
| 4.1 下调 Anxa3 表达对肺腺癌细胞的生长具有抑制作用.....              | 38        |
| 4.2 下调 Anxa3 表达对肺腺癌细胞的迁移、侵袭及转移具有抑制作用.....        | 38        |
| 4.3 下调 Anxa3 表达对肺腺癌细胞中信号通路的激活及效应分子的表达具有重要影响..... | 40        |
| <b>结 论.....</b>                                  | <b>41</b> |
| <b>参 考 文 献.....</b>                              | <b>42</b> |
| <b>致 谢.....</b>                                  | <b>50</b> |

## Contents

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Abstract in Chinese.....</b>                         | <b>I</b>    |
| <b>Abstract in English.....</b>                         | <b>III</b>  |
| <b>Contents in Chinese.....</b>                         | <b>V</b>    |
| <b>Contents in English.....</b>                         | <b>VIII</b> |
| <b>Abbreviations.....</b>                               | <b>XI</b>   |
| <b>Chapter 1 Introduction.....</b>                      | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Structural feature of Anxa3.....</b>             | <b>2</b>    |
| <b>1.2 Research progress of Anxa3 in cancers.....</b>   | <b>2</b>    |
| <b>1.3 Metastasis related pathways in cancers.....</b>  | <b>4</b>    |
| <b>1.4 Metastasis related molecules in cancers.....</b> | <b>5</b>    |
| 1.4.1 MMP family.....                                   | 6           |
| 1.4.2 Calcium Protein family.....                       | 7           |
| <b>Chapter 2 Materials and metoods.....</b>             | <b>9</b>    |
| <b>2.1 Materials.....</b>                               | <b>9</b>    |
| 2.1.1 Bacterial strain、 cell lines and nude mice.....   | 9           |
| 2.1.2 Antibody.....                                     | 9           |
| 2.1.3 Reagents and Consumables.....                     | 10          |
| 2.1.4 Equipments.....                                   | 11          |
| 2.1.5 Buffers.....                                      | 12          |
| <b>2.2 Methods.....</b>                                 | <b>13</b>   |
| 2.2.1 Plasmid extraction.....                           | 13          |
| 2.2.2 Plasmid transformation.....                       | 14          |
| 2.2.3 Plasmid extraction.....                           | 15          |
| 2.2.4 Cell recovery.....                                | 16          |
| 2.2.5 Cell passenge.....                                | 16          |

## Contents

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.6 Cell cryopreserved.....  | 16        |
| 2.2.7 Cell transfection.....   | 17        |
| 2.2.8 Stable cell lines construction.....  | 17        |
| 2.2.9 RNA extraction.....  | 17        |
| 2.2.10 Reverse transcription.....  | 18        |
| 2.2.11 qPCR reaction system.....   | 19        |
| 2.2.12 qPCR reaction procedure.....  | 19        |
| 2.2.13 Total protein extraction.....   | 19        |
| 2.2.14 Protein concentration detection( BCA assay ).....   | 19        |
| 2.2.15 Western Blot.....   | 20        |
| 2.2.16 MTT assay.....  | 21        |
| 2.2.17 Colony formation assay.....   | 21        |
| 2.2.18 Wound healing assay.....  | 21        |
| 2.2.19 Transwell assay.....  | 22        |
| 2.2.20 Tumor xenograft in nude mice.....   | 23        |
| 2.2.21 Metastatic tumor model construction.....  | 23        |
| 2.2.22 Immunohistochemical.....  | 23        |
| 2.2.23 Data analysis.....  | 24        |
| <b>Chapter 3 Results.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.1 Anxa3 shRNA plasmid construction.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>3.3 Effect of down regulating Anxa3 expression on biological behavior of lung cancer cell lines .....</b> | <b>28</b> |
| 3.3.1 Effect of down regulating Anxa3 expression on growth of lung cancer cell lines in vitro.....           | 28        |
| 3.3.2 Effect of down regulating Anxa3 expression on migration and invasion of lung cancer cell lines.....    | 30        |
| 3.3.3 Effect of down regulating Anxa3 expression on invasion of lung cancer cell lines.....                  | 30        |
| <b>3.4 Study on mechanism of Anxa3 in lung cancer cell lines.....</b>  | <b>32</b> |
| 3.4.1 Effect of down regulating Anxa3 expression on the pathways in lung cancer cell lines.....              | 32        |
| 3.4.2 Effect of down regulating Anxa3 expression on related molecules in lung cancer cell lines.....         | 33        |
| <b>3.5 Effect of Anxa3 on growth and metastasis of lung cancer cell lines in vivo</b>                        | <b>33</b> |
| 3.5.1 Effect of down regulating Anxa3 expression on tumor formation and metastasis in nude mice.....         | 33        |

Contents

3.5.2 Effect of down regulating Anxa3 expression on related molecules in tumor tissue of nude mice.....35

**Chapter 4 Discussion.....37**

**4.1 Down regulating Anxa3 expression suppressed growth of lung cancer cell lines.....38**

**4.2 Down regulating Anxa3 expression suppressed migration of lung cancer cell lines.....38**

**4.3 Down regulating Anxa3 expression affected pathways and molecules in lung cancer cell lines.....40**

**Conclusions.....41**

**References.....42**

**Acknowledgements.....50**

## 主要缩略语表

| 英文简称  | 英文全称   | 中文全称       |
|-------|--|------------|
| IHC   | Immunohistochemical  | 免疫组化       |
| MMP   | Matrix Metalloproteinases  | 基质金属蛋白酶    |
| BSA   | Bovine serum Albumin   | 牛血清白蛋白     |
| DMSO  | Dimethyl Sulfoxide   | 二甲亚砜       |
| TBS   | Tris Buffered Saline   | Tris-盐酸缓冲液 |
| PBS   | Phosphate Buffered Saline  | 磷酸盐缓冲液     |
| DTT   | DL-Dithiothreitol  | 二硫苏糖醇      |
| FBS   | Fetal Bovine Serum   | 胎牛血清       |
| SDS   | Sodium Lauryl Sulfate  | 十二烷基硫酸钠    |
| PVDF  | Polyvinylidene Fluoride  | 聚偏二氟乙烯     |
| PMSF  | Phenylmethanesulfonyl Fluoride   | 苯甲基磺酰氟     |
| VEGF  | Vascular Endothelial Growth Factor                                     | 血管内皮生长因子   |
| NSCLC | None Small Cell Lung Cancer  | 非小细胞肺癌     |
| SCLC  | Small Cell Lung Cancer   | 小细胞肺癌      |
| EMT   | Epithelial-Mesenchymal Transition                                      | 上皮-间质转化    |
| MAPK  | Mitogen-activated Protein Kinase                                       | 丝裂原激活蛋白激酶  |
| TEMED | Tetramethylethylenediamine   | 四甲基乙二胺     |
| EDTA  | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid                                      | 乙二胺四乙酸     |
| MTT   | 3-(4,5)-dimethylthiaziazolo (-z-y1)-3,5<br>-di- phenytetrazoliumromide | 噻唑兰        |

## 第1章 前言

肺癌是世界范围内最常见，死亡率最高的癌症之一。每年因肺癌死亡的人数远远超过结肠癌、乳腺癌和前列腺癌的死亡人数总和<sup>[1]</sup>。目前普遍认为，肺癌的高死亡率是由于肺癌极易转移且发现时多为晚期所导致的<sup>[2]</sup>。事实上，约有三分之二的肺癌患者在发现时已经发生淋巴道浸润或远处转移<sup>[2]</sup>。至今，非小细胞肺癌（NSCLC）患者的生存率仍只有15%左右。肺癌患者的预后情况大多是由肿瘤分期及转移情况决定的。例如，肿瘤分期为IA的患者手术切除后5年生存率可达到70%，但肿瘤分期为IV，即已经发生转移的患者术后生存率只有2%<sup>[4]</sup>。NSCLC具有许多特征，其中最突出的就是NSCLC生长速率快且极易发生早期转移，患者5年生存率只有5-10%<sup>[5]</sup>。总之，肿瘤转移是肺癌治疗的一大障碍<sup>[6]</sup>。虽然近年来，原发肿瘤的治疗取得了一定进展，术后复发及转移仍是阻碍肺癌治疗的一重大问题<sup>[3]</sup>。目前，临床上关于转移瘤的治疗有化疗、放疗等方法，但这些方法都不是特异性针对肺癌的，且对改变转移瘤患者低生存率并无明显效果。因此，探寻肺癌转移诊断及预防相关靶分子对于提高肺癌转移患者生存率具有重大意义。

为筛选新的肺腺癌转移相关分子，前期研究中，以肺腺癌的临床样本作为研究对象，根据是否转移分为无转移肺腺癌组和有转移肺腺癌组，首先采用激光捕获显微切割技术对两组中的癌细胞进行纯化，去除癌间质的干扰作用，然后采用定量蛋白质组学技术——差异荧光凝胶电泳技术（DIGE）对无转移肺腺癌组和有转移肺腺癌组纯化后的癌细胞进行差异蛋白质分析。研究发现，Anxa3在有转移肺腺癌中较无转移肺腺癌中表达明显上调，且经大量肺腺癌临床样本进行回顾性分析，Anxa3表达与肺腺癌的淋巴结转移、复发及预后均密切相关，Anxa3高表达的肺腺癌易转移、易复发，且预后差<sup>[4,5]</sup>。然而，Anxa3在肺腺癌中究竟发挥怎样的生物学功能，且其作用机制如何，均需进一步研究。

Anxa3蛋白，曾被称为脂皮质素III或胎盘抗凝蛋白III，是一个以钙依赖形式结合细胞膜及磷脂的蛋白质<sup>[6]</sup>。Anxa3是annexin家族成员之一。结构上，Anxa3具有annexin家族所共有的C端中心结构域，此结构域为结合膜磷脂区域。此外，还具有独特功能的N端结构域，此结构域含钙离子结合位点和磷酸化位点，为蛋白调节区域。功能上，Anxa3参与磷脂酶A2活性的抑制、磷脂囊泡聚集的调控、

炎症反应、膜形成、膜转运、细胞信号传导等多种重要的生命过程。近年来研究发现，Anxa3在多种类型的肿瘤中表达失调，而且，越来越多研究证实，Anxa3在细胞增殖、血管生成及肿瘤的生长等过程中扮演重要角色。下面将Anxa3的分子结构特点、Anxa3在肿瘤中的研究情况及影响肿瘤发生发展的信号通路及重要效应分子做一详细阐述。

## 1.1 Anxa3 的结构特征

Anxa3位于人类4号染色体的q13-q22位置上，它有两种亚型，分子量大小分别为33KD和36KD<sup>[7]</sup>。Anxa3表达于分化的骨髓细胞中，并且在骨髓细胞向中性粒细胞或巨噬细胞的分化过程中，Anxa3的表达量不断上升，可达到胞质总蛋白的1%。Anxa3的结构与annexin家族成员，尤其与Anxa5有高度同源性。Anxa3的C末端由四个呈环状排列的保守annexin重复结构域（I、II、III、IV）组成，每个结构域又包括五个 $\alpha$ 螺旋结构（A-E）。钙结合环正位于每个结构域中由螺旋A和B所形成的凸面上。Anxa3的N端则是由20个氨基酸残基组成的<sup>[8]</sup>。Anxa3包含两个色氨酸残基，第一个位于N末端（W5），第二个位于IIIA-IIIB环末端（W190），其中，W190在Anxa3与膜接触的表面，而W5在这个接触面的反面。这两个色氨酸残基都能通过影响Anxa3的生物学功能来调控Anxa3，钙离子以及磷脂膜之间的相互作用。若W5和W190发生突变，则会影响细胞膜的通透性从而改变钙离子浓度。结构域III中的W190及与膜结合的高度灵活的N末端（尤其是W5）同Anxa3的生物学功能密切相关。此外，铰链运动会形成一个特异性的与钙离子结合的区域，这对Anxa3发挥其生物学功能具有重要作用。

## 1.2 Anxa3 在肿瘤中的研究情况

通过整理现有的文献发现，Anxa3在多种类型的肿瘤中均表达异常，如Anxa3在肝癌细胞、直肠癌组织、前列腺癌和卵巢上皮性癌细胞中均表达上调<sup>[11-13]</sup>，且Anxa3与肿瘤的发展、转移及耐药性密切相关。研究证实：Anxa3为一新的血管生成因子，其机制是通过激活HIF-1通路诱导VEGF和bEGF因子的表达来促进新生血管生成<sup>[14]</sup>。在肝细胞体外培养过程中，Anxa3对肝细胞的DNA复制发挥至关



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.