

学校编码: 10384

分类号____密级____

学 号: 32320141153392

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Nur77 在肝癌转移中的功能和机制研究

The function and mechanism of Nur77 in liver cancer metastasis

段继燕

指导教师姓名: 曾锦章 教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2017 年 月

论文答辩时间: 2017 年 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2017 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

英文缩略词	1
摘要	3
ABSTRACT	4
第一章 前言	5
1. 核受体	5
1.1 核受体简介	5
1.2 核受体结构	6
1.3 核受体功能	7
2. Nur77	7
2.1 Nur77 简介	7
2.2 Nur77 的调控	7
2.3 Nur77 响应原件	8
2.4 Nur77 与癌症	8
3. 整合素，黏着斑激酶，桩蛋白	9
3.1 整合素简介	9
3.2 整合素结构与功能	10
3.3 整合素 $\beta 1$ 信号通路	11
3.4 黏着斑激酶与桩蛋白	12
4. 基质金属蛋白酶及基质金属蛋白酶 2	12
4.1 基质金属蛋白酶简介	12
4.2 基质金属蛋白酶活性调节	13
4.3 MMP2 及其功能	13
5. 上皮细胞间质化	14

5.1 上皮细胞间质化简介.....	14
5.2 上皮细胞间质化主要标志物: E-cadherin 和 Vimentin.....	15
6. 肝癌及乙肝病毒	16
6.1 肝癌简介.....	16
6.2 乙型肝炎病毒与乙肝病毒 x 病毒.....	17
7. 研究目的和意义	19
第二章 材料与方法	20
1. 实验材料	20
1.1 细胞系.....	20
1.2 抗体.....	20
1.3 主要试剂.....	20
1.4 主要仪器.....	21
1.5 主要溶液.....	22
2. 实验方法	25
2.1 细胞培养.....	25
2.2 稳转细胞系构建.....	26
2.3 蛋白提取与 Western Blot.....	26
2.4 免疫荧光.....	27
2.5 免疫共沉淀.....	28
2.6 MTT.....	28
2.7 荧光素酶报告基因.....	28
2.8 RNA 提取与实时荧光定量 PCR.....	29
2.9 流式细胞技术.....	31
2.10 细胞划痕.....	31
2.11 Transwell 侵袭分析.....	32
2.12 ShRNA 敲除.....	32
2.13 统计分析.....	32
第三章 实验结果与分析	33

1. Nur77 通过整合素促进肝癌细胞迁移与侵袭	33
1.1 Nur77 促进肝癌细胞迁移与侵袭	33
1.2 Nur77 正向调控整合素 $\beta 1$ 表达	34
1.3 整合素 $\beta 1$ 主要调控 Nur77 诱导的细胞迁移与侵袭	36
1.4 Nur77 激活整合素 $\beta 1$ 信号通路	38
1.5 Nur77 对细胞增殖无明显影响	39
2. HBx 通过与 Nur77 相互作用促进肝癌转移	40
2.1 Nur77 与 HBx 相互作用	40
2.2 HBx 调控 Nur77 下游基因的表达	41
2.3 HBx 调控 Nur77 诱导的肝癌细胞迁移和侵袭	43
第四章 讨论	45
第五章 结论与展望	47
参考文献	48
致 谢	59

Table of Contents

Abrreration	1
Abstract in Chinese	3
Abstract in English	4
Chapter I Preface	5
1. Nuclear Receptor	5
1.1 Introduction of Nuclear Receptor	5
1.2 Structure of Nuclear Receptor	6
1.3 Function of Nuclear Receptor	7
2. Nur77	7
2.1 Introduction of Nur77	7
2.2 Regulation of Nur77	7
2.3 Response Elements of Nur77	8
2.4 Relation between Nur77 and cancer	8
3. Integrin, FAK, Paxillin	9
3.1 Introduction of integrin	9
3.2 Structure and function of integrin β 1	10
3.3 Integrin β 1 signaling	11
3.4 FAK and Paxillin	12
4. MMPs and MMP2	12
4.1 Introduction of MMPs	12
4.2 Regulation of MMPs activity	13
4.3 MMP2 and its function	13
5. EMT	14
5.1 Introduction of EMT	14
5.2 EMT markers: E-cadherin and Vimentin	15

6. HCC and HBV	16
6.1 Introduction of HCC	16
6.2 Introduction of HBV and HBx.....	17
7. Research objectives and significance	19
Chapter II Materials and Methods	20
1. Materials	20
1.1 Cell Lines	20
1.2 Antibodies	20
1.3 Reagents	20
1.4 Apparatus	21
1.5 Solution	22
2. Methods	25
2.1 Cell Culture.....	25
2.2 Construction of stable cell lines.....	26
2.3 Protein extraction and Western Blot.....	26
2.4 Immunofluorescence.....	27
2.5 Immunoprecipitation.....	28
2.6 MTT.....	28
2.7 Luciferase reporter gene	28
2.8 RNA extraction and q-PCR	29
2.9 Flow cytometry	31
2.10 Wound healing assay	31
2.11 Matrigel trans-well invasion assay.....	32
2.12 ShRNA knock down	32
2.13 Statistic analysis	32
Chapter III Results and Analysis	33
1. Nur77 promotes liver cancer cell migration and invasion via integrin β1	33

1.1 Nur77 promotes liver cancer cell migration and invasion.....	33
1.2 Nur77 positively regulates integrin β 1 expression.....	34
1.3 Integrin β 1 mainly mediates Nur77-induced cell migration and invasion.	36
1.4 Nur77 activates integrin β 1 signaling	38
1.5 Nur77 hardly effects on hepatoma carcinoma cell.....	39
2. HBx promotes hepatocellular carcinoma metastasis by the interaction with Nur77	40
2.1 Nur77 interacts with HBx	40
2.2 HBx regulates the expression of Nur77 downstream genes.....	41
2.3 Nur77 mediates cell migration and invasion in HCC induced by HBx	43
Chapter IV Discussion	45
Chapter V Conclusion and outlook	47
References	48
Acknowledge	59

英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
AF-1	Activation Function-1	配体非依赖性转录激活区
LBD	Ligand Binding Domain	配体结合结构域
DBD	DNA Binding Domain	DNA 结合结构域
DR5	Direct Repeat 5	间隔为 5 个核苷酸的 “AGGTCA”重复序列
NurRE	Nur77 Response Element	Nur77 反应原件
NBRE	NGFI-B response element	Nur77 激素应答元件
PARP	poly ADP-ribose polymerase	聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶
GR	Glucocorticoid receptor	糖皮质激素受体
ER	Estrogen receptor	雌激素受体
RAR	Retinoic acid receptor	维甲酸受体
VDR	Vitamin d nuclear receptor	维生素 D 受体
NLS	Nuclear localization signal	核定位信号
TRs	Thyroidhormone Receptors	甲状腺激素受体
HCC	Hepatocellular Carcinoma	原发性肝细胞癌
TAD	Transcription Activation Domain	转录激活结构域
NOR	Orphan nuclear hormone receptor	孤儿核受体
RXR	Retinoic Acid Receptor	视黄酸 X 受体
JNK	c-jun N-terminal kinase	c-jun 氨基末端激酶
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	雷帕霉素靶蛋白
NRs	Nuclear receptors	核受体
TGF- β	Transforming growth factor-beta	转化生长因子 β
FAK	Focal adhesion kinase	黏着斑激酶
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	促分裂原活化蛋白激酶
PI3K	Phosphatidylinositol kinase	磷脂酰肌醇激酶

STAT	Signal transducers and activators of transcription	信号传导及转录激活因子
ILK	integrin-linked kinase	整合素连接激酶
AP-1	activator protein-1	激活蛋白 1
ORF	Open reading frame	开放阅读框
HBV	Hepatitis B Virus	乙型肝炎病毒
HBx	Hepatitis B Virus x Protein	乙肝病毒 x 蛋白
NF-KB	Nuclear factor-kappa B	核转录因子 B
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	上皮细胞间质化
SMA	smooth muscle actin	平滑肌肌动蛋白
FGF	Fibroblast growth factors	成纤维细胞生长因子
FSP1	Fibroblast-specific protein 1	成纤维细胞特异蛋白 1
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮细胞生长因子
FN	Fibronectin	纤维连接蛋白
LN	Laminin	层黏蛋白
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α	肿瘤坏死因子- α
MMPs	Matrixmetalloproteinases	基质金属蛋白酶
MMP-2	Matrixmetalloproteinases-2	基质金属蛋白酶-2
MMP-9	Matrixmetalloproteinases-9	基质金属蛋白酶-9
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质蛋白

摘要

核受体 Nur77 与多种癌症的发展密切相关, 包括乳腺癌, 结肠癌, 胰腺癌等。然而, Nur77 在肝癌中的功能却仍不清楚。本课题中, 我们发现了 Nur77 能够通过上调整合素 $\beta 1$ 的表达, 进而促进肝癌细胞的黏附, 迁移与侵袭。并且, Nur77 也能够诱导整合素 $\beta 1$ 下游因子的表达, 如 FAK、paxillin 等。FAK-paxillin 相互作用在黏着斑形成中发挥着重要作用。我们发现抑制 FAK 的表达能够逆转 Nur77 对肝癌细胞迁移和侵袭的促进功能, 进一步证明了 Nur77 调控细胞迁移的下游信号通路。

乙型肝炎 x 蛋白 (HBx) 在乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的肝癌中扮演着必不可少的角色。已有报道, HBx 能够通过钙蛋白酶促进肝癌细胞迁移。也有报道提示 HBx 在转录水平上激活 Nur77。我们已经证实 Nur77 促进肝癌细胞的转移, 进而想证实 HBx 是否作为 Nur77 的上游调控肝癌转移。我们在蛋白水平上检测了 HBx 对 Nur77 的调控作用, 结果发现, HBx 对 Nur77 的调控并不明显。有趣的是, 我们发现 HBx 与 Nur77 在肝癌细胞和肝癌标本中存在相互作用, 并且在肝癌细胞中, 两者在细胞核内存在共定位。在研究其调控机制中, 我们发现 HBx 能够增强 Nur77 的转录活性, 并且可以调控 Nur77 的下游基因, E-cadherin, vimentin, MMP2 等。基于以上结果, 我们通过 wound healing, Transwell 等细胞功能实验进一步研究 HBx 对肝癌细胞转移的调控作用, 结果发现, HBx 能够以依赖于 Nur77 的方式促进细胞迁移与侵袭。

综上, 本课题阐释了 Nur77 在肝癌转移中的功能及分子机制。Nur77 可能通过整合素 $\beta 1$ 促进肝癌细胞转移, 也初步得出 HBx 通过 Nur77 对肝癌转移的影响, 从而可通过靶向 Nur77 为治疗 HBx 引发的肝癌转移提供新的方向。

关键词: Nur77; HBx; 肝癌转移

Abstract

Nuclear receptor Nur77 is linked to the development of many types of cancer including breast cancer, colon cancer, pancreatic cancer. However, the function of Nur77 in Hepatocellular carcinoma (HCC) is still unclear. Here we found that Nur77 promotes liver cancer cell adhesion, migration and invasion through upregulating the expression of integrin $\beta 1$. And Nur77 also induces downstream effectors of integrin $\beta 1$, such as FAK and Paxillin. The interaction between FAK and Paxillin plays an important role in cell focal adhesion. We found that inhibition of FAK can inverse the function of Nur77 which can increase liver cancer cell migration and invasion and further testified Nur77 can mediate the downstream effectors of cell migration.

HBx plays an essential role in the HCC induced by HBV. It was reported that HBx can promote cell migration via calpain. Also reported that HBx can upregulate the transcription activation of Nur77 significantly. We have concluded that Nur77 can promote HCC metastasis and then we suppose that HBx may be the upstream of Nur77 inducing the migration and invasion in HCC. We tested the expression of HBx and Nur77 on protein level and the fact is HBx hardly affect the expression of Nur77. Interestingly, HBx can interact with Nur77 in hepatoma cells and clinical HCC samples and they can colocalize in the cell nucleus. Subsequently, we found HBx can enhance the transactivation of Nur77 and changed the expression of Nur77 downstream gene, like E-cadherin, vimentin, MMP2. On basis of the above results, we further studied how HBx regulates liver cancer cell migration and invasion. As we expected, HBx can augment HCC cell migration and invasion dependent of Nur77.

In conclusion, the research elucidates the function and mechanism of Nur77 in liver cancer metastasis. Nur77 could promote HCC cell migration and invasion through integrin $\beta 1$ and we confirm that HBx affects the HCC metastasis through Nur77, which provides a new strategy for the therapy of HCC metastasis caused by HBx.

Key words: Nur77; HBx; HCC metastasis

第一章 前言

1. 核受体

1.1 核受体简介

核受体 (NRs) 是由一类在进化上与DNA结合的转录因子相关的成员构成的超家族, 能够调控广泛的生理现象^[1,2,3,4]。在编码这些受体的基因被克隆之前, 第一个NR是在20世纪60年代通过生物化学方法被鉴定^[5]。Elwood Jensen和他的团队通过研究发现雌二醇能够特异性存在于分泌此荷尔蒙的靶细胞中, 并由此揭示了一类特异性高亲和力受体的细胞活动^[6]。接下来, 在仅仅20年时间里, 人类糖皮质激素(GR, NR3C1)作为第一类核受体被Ron Evans和他的同事克隆出来, 同阶段, Pierre Chambon 和杰弗里格林实验室将雌二醇克隆出 (ER, 核受体亚型, NR3A1) ^[7,8,9]。自此, 核受体被公认为是一类转录因子的超家族, NRs的研究领域也得到了快速发展, 覆盖了从结构与功能的分析到转录调控的分子机制等众多方面。

从核受体的系统发生方面来看, 它最早出现于后生动物演化, 在此之前被认为是脊椎动物或无脊椎动物演化而来^[10,11]。目前, 人类基因组测序共鉴定出48种核受体, 每种受体发挥着其重要且独特的作用, 显著体现在对很多重要生物过程的调控中, 如生长, 发育和体内平衡。核受体通过一些独特的机制调控转录, 包括激活和抑制活动, 这些活动形成了明显的核受体信号复合体, 可以是基因型的或者非基因型的, 配体依赖的或者配体非依赖的, 能够调控基因抑制, 基因抑制的释放, 基因激活或者基因转录抑制等。核受体能够靶向其他信号通路, 修饰转录后的受体, 并影响其功能。

核受体的分类方式有很多种, 最为常用的是基于其配体选择性分为三大类: 类固醇受体家族、非类固醇受体家族、孤儿受体^[12]。

第一类为类固醇受体家族, 包括糖皮质激素受体 (GR α , β)、盐皮质激素受体 (MR)、雌激素受体 (ER)、雄激素受体 (AR) 和孕激素受体 (PR)。

第二类为非类固醇受体家族, 包括视黄醇 X 受体 (RXR α , β , γ)、维甲酸受体 (RAR α , β , γ)、甲状腺激素受体 (TR α , β)、维生素 D3 (VDR)、过氧化

物酶体激活受体 (PPAR α , β , γ)。

第三类为孤儿受体, 即目前为止, 还没有发现其天然配体的一类核受体, 包括 Nur77 (TR3, NR4A1 or NGFI-B)、NOR-1、COUP-TF、DAX1(NR0B1)、SHP 等。

1.2 核受体结构

核受体在结构上有相同之处, 大多都由A/B结构域, DBD结构域和LBD结构域构成。氮末端区域, 即A/B结构域, 具有高度可变性, 至少包括一个本身具有转录活性的区域 (AF-1) 和几个自发的转录活性区域 (AD); A/B结构域在不同的核受体中, 长短不一, 短的少于50个氨基酸, 长的超过500个氨基酸。DNA结合域 (DBD, C结构域) 是最为保守的结构域, 显著表现在, 包含P-box和一个短的用于特异性结合DNA的基序 (典型的是AGGTCA基序)。此外, DBD 结构域还参与核受体二聚体的形成, 包括同源二聚体和异源二聚体。DBD区包括两个高度保守的锌指结构 - C-X₂-C-X₁₃-C-X₂-C 和CX₅-C-X₉-C-X₂-C -, 每个锌指结构的这4个半胱氨酸螯合锌离子。首次在人类糖皮质激素 (GR) 中揭示此结构^[13]。在DNA结合区和配体结合区之间有一个不太保守的区域 (D结构域), 它在C区和E区表现为一个灵活的铰链, 包含核定位信号 (NLS), 这部分与C区有重叠。最大的结构域为中度保守的配体结合区 (LBD, E结构域), 它的12个 α 螺旋结构形成的二级结构比一级结构更为保守。其3D结构在很多核受体中得到鉴定, 从有配体和无配体两种核受体中更好地了解了其配体结合机制^[14]。如, RXR α 全体和截短体形式的配体结合区存在天然的配体9-顺视黄酸^[15,16]。E结构域具有很多功能, 最多的是配体诱导的功能, 显著表现在AF-2转录激活功能, 二聚化功能, 另一个核定位信号, 也经常发挥抑制作用。核受体在C端可能包括或不包括最后一个区域, 即E结构域和F结构域, 具有极强的可变性。

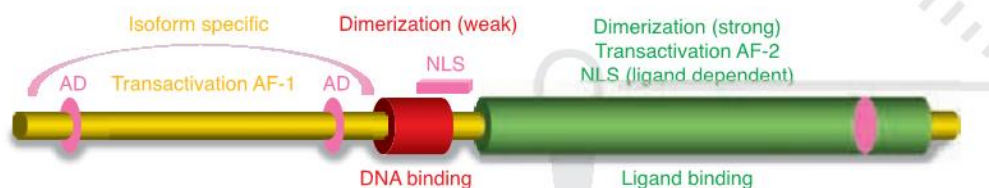


图 1. 核受体结构示意图

1.3 核受体功能

核受体虽然具有高度保守的结构,其功能和作用方式却不尽相同。事实上,除了DAX-1(NR0B1)和SHP(NR0B2),其他核受体都以特异的启动子区元件结合到靶基因上,或者单体,或者同源二聚体,或者以与RXR形成异源二聚体的方式。在48种熟知的核受体中,只有24种有其天然的配体。这些经典的受体是配体依赖性的转录因子,能直接对各种不同的激素和代谢物质有应激反应。配体能够引起受体的变构和动力学行为,转而调控共调节因子的招募和染色质修饰机制。最终,结合配体的核受体在DNA结合位点结合目的基因,加强整个转录活动的募集和功能^[17]。核受体因其在哺乳动物发育,代谢,生理等方面必不可少的作用,所以当这些核受体控制的信号功能异常时,常常伴随着再生,增殖,代谢等疾病。一些核受体可以和配体结合,使得它们成为潜在的药物靶点。目前,已经有一些核受体配体被成功运用到肝疾病的治疗中,如利福平等^[18]。

2. Nur77

2.1 Nur77 简介

Nur77(也被称为NR4A1,TR3或NGF-IB)是类固醇/甲状腺激素受体超家族中的一员。它属于一种转录因子,并且作为早期应答基因,在不同类型的细胞和组织中,能够被很多刺激物所诱导,比如血清、炎症因子,生长因子压力等^[19]。

Nur77因其涉及生长抑制,凋亡诱导等,被认为是一种较强的肿瘤抑制因子^[20,21,22,23]。然而,Nur77也被报道在结肠癌和胰腺癌中高表达。当敲除这些癌细胞中的Nur77会抑制细胞生长,诱导凋亡,降低血管生成^[24,25]。因此,Nur77在多种生物学过程中发挥着十分重要的作用。

2.2 Nur77 的调控

Nur77 在结构上具有核受体的典型特征,主要分为 N 端的转录激活区(transactivation domain, TAD)、中部的 DNA 结合区(DNA binding domain, DBD)以及 C 端的配体结合区(ligand binding domain, LBD)等功能区域。其中,N 端含有一个配体非依赖的转录区域 AF-1(activation function-1),而 C 端则含有配体依赖的转录区域 AF-2(图 2)^[26]。

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