

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520141153458

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**Exo70 自身聚合的关键序列及其在乳腺癌
细胞迁移过程中的作用**

**Research on the self-polymerization Sequence of Exo70 and
Its Role in Breast Cancer Cell Migration**

陈雄

指导教师姓名: 占艳艳 副教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩日期: 2017 年 5 月

答 辩 主 席 高丰光 教授

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

乳腺癌是世界范围内女性癌症中发病率最高的恶性肿瘤。远处转移和复发是乳腺癌患者死亡的主要原因，因此乳腺癌转移的调控机制具有重要的医学研究价值。

Exo70 是胞外分泌复合体 Exocyst 的关键亚基，可通过参与 Exocyst 复合体的组装促进乳腺癌转移。Exo70 还能发生自身聚合并影响乳腺癌细胞的迁移，独立于 Exocyst 复合物之外发挥作用。但该过程仍有问题需进一步明确，例如：Exo70 自身聚合的关键序列目前尚不清楚；在乳腺癌转移过程中，Exo70 自身寡聚与参与形成 Exocyst 复合物相比，是辅助作用还是同样重要？我们通过研究发现，Exo70 自身形成二聚体的能力要显著强于其与 Exocyst 其它 7 个亚基的结合，提示 Exo70 自身聚合的重要作用。进一步，我们通过构建一系列的 Exo70 缺失突变体，通过蛋白免疫共沉淀实验逐渐缩小范围，最终确定了 Exo70 形成聚合体的关键位置是位于氨基酸 31~35 与 505~509 中两段同样的序列“SLEKS”。进而利用这两个序列的缺失突变体转染到乳腺癌细胞，通过 transwell 迁移实验，证实这两段“SLEKS”序列在 Exo70 聚合体及乳腺癌细胞迁移过程中的关键作用。

以上结果为 Exo70 独立于 Exocyst 复合体功能之外的新功能研究提供了依据，也为日后在乳腺癌及其转移的治疗过程中提供潜在的分子靶点。

关键词：Exo70 蛋白、自身聚合序列、乳腺癌、细胞迁移

Abstract

Breast cancer is the most common female malignancy in the world. Distant metastasis and recurrence are the main causes of death in patients with breast cancer. Therefore, it is of great significance to study the regulatory mechanisms of breast cancer metastasis.

Exo70, a key component of the Exocyst complex, promotes breast cancer metastasis via facilitating the assembly of Exocyst complex. Self-polymerization of Exo70 protein can also affect the migration of breast cancer cells, independent of the Exocyst complex. However, there are still some problems that need to be further clarified, for example, the key sequences for Exo70 polymerization remains unclear. Is Exo70 polymerization just an ancillary role or equally important to cancer metastasis when compared to the formation of the Exocyst complex? In the present study, we found that Exo70 was obviously more capable of forming self-polymerization than binding to the other seven subunits of Exocyst complex, suggesting the importance of its self-polymerization. Then we constructed a set of truncation mutants of Exo70 in order to determine the core sequence for its dimerization. With co-immunoprecipitation analysis, we identified two identical protein sequences “SLEKS” located at amino acid 31~35 and 505~509 as critical sequences for the self-polymerization of Exo70. Using transwell migration assay, we further found that the full length Exo70 significantly promotes breast cancer metastasis, while Exo70 mutant with deletion of these two sequences ($\Delta 31\sim 35/\Delta 505\sim 509$) don't possess such ability, indicating that these two “SLEKS” sequences play pivotal role in breast cancer cell migration.

Together, these results provide fundamental basis for researches on novel functions of Exo70 besides its well-known role in Exocyst complex formation, and offer a potential drug target for treating breast cancer and its metastasis.

Keywords: Exo70 protein, dimerization sequence, breast cancer, cell migration

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目 录.....	III
第一章 绪 论.....	1
1.1 乳腺癌.....	1
1.1.1 乳腺癌的分类.....	1
1.1.2 乳腺癌的发病机制.....	1
1.1.2.1 突变基因与乳腺癌.....	2
1.1.2.1.1 BRCA1、BRCA2 与乳腺癌.....	2
1.1.2.1.2 p53 与乳腺癌.....	3
1.1.2.2 细胞信号通路与乳腺癌.....	3
1.1.2.2.1 WNT 信号通路与乳腺癌.....	3
1.1.2.2.2 TGF- β 信号通路与乳腺癌.....	4
1.1.2.2.3 雌激素信号通路与乳腺癌.....	5
1.1.2.2.4 胰岛素样生长因子信号通路与乳腺癌.....	5
1.2 囊泡运输.....	6
1.2.1 胞外分泌复合体 Exocyst.....	6
1.2.1.1 Exocyst 的组成.....	6
1.2.1.2 Exocyst 在细胞质膜上的锚定.....	7
1.2.3 Exocyst 的调控.....	8
1.2.3.1 小 G 蛋白对 Exocyst 的调节.....	9
1.2.3.1.1 Rab 家族对 Exocyst 的调节.....	9
1.2.3.1.2 Rho 家族对 Exocyst 的调节.....	9
1.2.3.1.3 Ral 家族对 Exocyst 的调节.....	10
1.2.3.2 激酶对 Exocyst 的调节.....	11
1.2.4 Exocyst 的功能.....	11
1.2.4.1 Exocyst 与细胞的极性建立.....	11
1.2.4.2 Exocyst 与细胞的侵袭、迁移.....	12
1.2.4.3 Exocyst 与细胞生长进程.....	13
1.2.4.4 Exocyst 与自噬.....	14
1.2.5 Exo70.....	14
1.2.5.1 Exo70 的结构.....	14
1.2.5.2 Exo70 的定位.....	15
1.2.5.3 Exo70 的功能.....	16
1.2.5.3.1 Exo70 在细胞分泌过程中的作用.....	16
1.2.5.3.2 Exo70 在动物细胞神经元生长中的作用.....	16
1.2.5.3.3 Exo70 在细胞葡萄糖摄取过程中的作用.....	16
1.2.5.3.4 Exo70 在细胞迁移过程中的功能.....	17
1.2.5.3.5 Exo70 在细胞侵袭过程中的作用.....	17
1.2.5.3.6 Exo70 参与 mRNA 剪接.....	18

1.2.6 Exo70 促进乳腺癌侵袭转移的机制.....	18
1.2.6.1 Exo70 作为 Exocyst 亚基促进乳腺癌的侵袭转移.....	18
1.2.6.2 Exo70 独立于 Exocyst 促进乳腺癌的侵袭转移.....	19
1.3 本论文的研究目的与研究意义.....	19
第二章 实验材料与方法.....	21
2.1 实验材料.....	21
2.1.1 细胞系、质粒.....	21
2.1.2 工具酶与抗体.....	21
2.1.3 主要试剂和耗材.....	22
2.1.3.1 细胞培养试剂.....	23
2.1.3.2 主要仪器.....	23
2.2 主要溶液的配制.....	24
2.2.1 细胞培养液.....	24
2.2.2 细胞裂解液.....	25
2.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳相关溶液.....	25
2.2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳相关溶液.....	26
2.2.5 质粒提取相关溶液.....	26
2.3 实验方法.....	27
2.3.1 分子实验.....	27
2.3.1.1 过表达质粒的构建.....	27
2.3.1.2 缺失突变体质粒的构建.....	28
2.3.1.3 突变质粒的构建.....	29
2.3.4 提取质粒 DNA.....	29
2.3.4.1 小量提取质粒 DNA (碱裂解法).....	29
2.3.4.2 中量提取质粒 DNA.....	30
2.4 细胞水平实验.....	31
2.4.1 细胞的复苏.....	31
2.4.2 细胞的培养与传代.....	31
2.4.3 细胞的冻存.....	32
2.4.4 细胞转染.....	32
2.4.4.1 PEI 转染 293T 细胞:.....	32
2.4.4.2 Lipo2000 转染 231 细胞:.....	32
2.4.5 蛋白水平实验.....	33
2.4.5.2 免疫共沉淀实验.....	36
2.4.6 Transwell 实验.....	37
2.4.7 数据分析.....	37
第三章 实验结果.....	39
3.1 Exo70 自身结合强于其他亚基.....	39
3.2 Exo70 自身聚合的关键区段.....	40
3.2.1 氨基端影响 Exo70 自身聚合的序列.....	40
3.2.2 羧基端影响 Exo70 自身聚合的序列.....	41
3.2.3 影响 Exo70 自身聚合的精确序列.....	42
3.3 Exo70 自身聚合的关键序列对乳腺癌细胞迁移的影响.....	43

第四章 小结.....	45
参考文献.....	47
致 谢.....	51

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract.....	II
Contents.....	III
Chapter I Introduction.....	1
1.1 Breast Cancer.....	1
1.1.1 Classification of breast cancer.....	1
1.1.2 Pathogenesis of breast cancer.....	1
1.1.2.1 Mutation gene with breast cancer.....	2
1.1.2.1.1 BRCA1、BRCA2 & breast cancer.....	2
1.1.2.1.2 p53 & breast cancer.....	3
1.1.2.2 Cell Signaling Pathways & breast cancer.....	3
1.1.2.2.1 WNT signaling pathway & breast cancer.....	3
1.1.2.2.2 TGF- β signaling pathway & breast cancer.....	4
1.1.2.2.3 Estrogen signaling pathways & breast cancer.....	5
1.1.2.2.4. Insulin-like growth factor signaling pathway & breast cancer.....	5
1.2 Vesicular transport.....	6
1.2.1 Exocyst.....	6
1.2.1.1 Composition of Exocyst.....	6
1.2.1.2 Exocyst anchoring on the cytoplasmic membrane.....	7
1.2.3 Regulation of Exocyst.....	8
1.2.3.1 Regulation of small G protein to Exocyst.....	9
1.2.3.1.1 Regulation of the Rab family on Exocyst.....	9
1.2.3.1.2 Regulation of the Rho family on Exocyst.....	9
1.2.3.1.3 Regulation of the Ral family on Exocyst.....	10
1.2.3.2 Kinase Regulation of Exocyst.....	11
1.2.4 Functions of Exocyst.....	11
1.2.4.1 Exocyst function on cell polarity build.....	11
1.2.4.2 Exocyst function with cell invasion & migration.....	12
1.2.4.3 Exocyst with cell growth.....	13
1.2.4.4 Exocyst with autophagy.....	14
1.2.5 Exo70.....	14
1.2.5.1 Structure of Exo70.....	14
1.2.5.2 Position of Exo70.....	15
1.2.5.3 Functions of Exo70.....	16
1.2.5.3.1 The role of Exo70 in the process of cell secretion.....	16
1.2.5.3.2 The role of Exo70 in the growth of animal cell neurons.....	16
1.2.5.3.3 The role of Exo70 in cell glucose uptake.....	16
1.2.5.3.4 Functions of Exo70 during cell migration.....	17
1.2.5.3.5 The role of Exo70 in cell invasion.....	17
1.2.5.3.6 Exo70 participates in mRNA splicing.....	18
1.2.6 Mechanism of Exo70 promoting invasion and metastasis of breast cancer.....	18
1.2.6.1 Exo70 acts as an Exocyst subunit to promote the invasion & metastasis of breast cancer.....	18
1.2.6.2 Exo70 independent of Exocyst to promote the invasion and metastasis of breast cancer.....	19
1.3 Purpose of this article and its significance.....	19

Chapter II Experimental Materials And Methods.....	21
2.1 Experimental materials.....	21
2.1.1 Cell lines & plasmid.....	21
2.1.2 Enzymes & antibodies.....	21
2.1.3 Reagents and consumables.....	22
2.1.3.1 Cell culture reagents.....	23
2.1.3.2 Instrument.....	23
2.2 Preparation of the main solution.....	24
2.2.1 Cell culture medium.....	24
2.2.2 Cell lysate.....	25
2.2.3 Polyacrylamide gel electrophoresis related solution.....	25
2.2.4 DNA agarose gel electrophoresis related solution.....	26
2.2.5 Plasmid Extraction Related Solution.....	26
2.3 Methods.....	27
2.3.1 Molecular experiments.....	27
2.3.1.1 Construction of overexpression plasmids.....	27
2.3.1.2 Construction of deletion mutant plasmids.....	28
2.3.1.3 Construction of mutant plasmids.....	29
2.3.4 Extraction of plasmid DNA.....	29
2.3.4.1 Small amount of plasmid DNA extraction (alkaline lysis).....	29
2.3.4.2 Medium to extract plasmid DNA.....	30
2.4 Experiment of cell.....	31
2.4.1 Cell resuscitation.....	31
2.4.2 Cell culture and passage.....	31
2.4.3 Cell cryopreservation.....	32
2.4.4 Cell transfection.....	32
2.4.4.1 Transfection of 293T cells by PEI.....	32
2.4.4.2 Transfection of 231 cells by lip2000.....	32
2.4.5 Experiment of protein level.....	33
2.4.5.2 Immunoprecipitation experiments.....	36
2.4.6 Transwell assay.....	37
2.4.7 Data Analysis.....	37
Chapter III Experimental Results.....	39
3.1 EXO70 has a stronger self aggregation ability than other subunits.....	39
3.2 The key segment affect Exo70 own aggregation.....	40
3.2.1 Amino-terminal sequence of Exo70 self-polymerization.....	40
3.2.2 Carbox-terminals sequence of Exo70 self-polymerization.....	41
3.2.3 Exact sequence affect Exo70 self-polymerization.....	42
3.3 The key sequence affect Exo70 self-aggregation have an influence on the migration of breast cancer cells.....	43
Chapter IV Summary.....	45
Reference.....	47
Thanks.....	51

第一章 绪论

1.1 乳腺癌

据世界卫生组织（World Health Organization,WHO）发表的《全球癌症报告 2014》^[1],2012 年,乳腺癌是导致全球女性发病最高的恶性肿瘤。由于人口平均寿命的增长和不良习惯等因素的影响,乳腺癌全球患者人数在过去 30 年中翻了一番。报告指出^[1],2012 年全球女性乳腺癌新发病例 170 万（占全部女性恶性肿瘤发病率的 25%）;有 52 万女性因乳腺癌死亡（占全部女性恶性肿瘤死亡率的 15%）。乳腺癌在我国也是最主要的恶性肿瘤之一,严重危害我国居民生命健康。2011 年,我国新发女性乳腺癌 24.9 万,占女性癌症发病首位,其中城市新发病例 15.8 万（占比 63.59%）、农村地区新发病例 9.1 万（占比 36.41%）;死亡病例 6 万,位居女性死亡第六位,其中城市地区死亡 3.4 万例,农村地区死亡 2.6 万例^[2]。

1.1.1 乳腺癌的分类

传统的肿瘤解剖病理分期,如 TNM 分期（包括肿瘤的大小 T、淋巴结转移的数目 N、远处转移的情况 M）对于预测肿瘤复发转移的价值不可低估,也是临床上较为成熟的风险评估指标。

然而,乳腺癌是一种高异质性肿瘤,它在生物学行为、免疫表型、组织形态及治疗反应上存在着极大的差异,即使传统病理 TNM 分期相同的患者对临床治疗的反应及预后也将会有很大差别。

近年来,基于 DNA 微阵列技术和多基因 RT-PCR（Real-Time PCR）定量检测的方法,通过对乳腺癌进行分子分型,在预测乳腺癌的复发转移风险及乳腺癌患者对治疗的反应中发挥重要作用。目前临床上常依据基因芯片技术划定的分子亚型和免疫组织化学结合起来,将乳腺癌划分为 4 类分子亚型,包括 Luminal A 型、Luminal B 型、Erb-B2 过表达型和基底样型^[3]。

1.1.2 乳腺癌的发病机制

乳腺癌与多种因素相关,年龄、家族病史、饮酒、使用雌激素/孕激素避孕

药、绝经治疗、暴露于电离辐射 X-射线和 γ -辐射线以及高热量饮食和运动不足等不良生活方式都可能导致乳腺癌的发病。乳腺癌的发病机理非常复杂，目前为止乳腺癌发病的相关机制还没有完全阐明。在分子水平上，乳腺癌易患基因的表达、多种转录因子的异常表达、细胞内相关信号通路的异常调控都有可能导致乳腺癌的发生。

表 1 乳腺癌的分类与特点

分类	特点
基底样型	ER/PR 缺失 HER-2 阴性
HER-2 过表达型	ER/PR 缺失 HER-2 过表达
Luminal (管腔或激素受体阳性) A 型	Ki-67 低表达 (小于 14%) HER-2 阴性 ER/PR 阳性
Luminal (管腔或激素受体阳性) B 型	Ki-67 高表达 (大于或等于 14%) ER/PR 阳性 HER-2 阴性
	Ki-67 任何水平 ER/PR 阳性 HER-2 过表达

1.1.2.1 突变基因与乳腺癌

1.1.2.1.1 BRCA1、BRCA2 与乳腺癌

乳腺癌的一小部分具有家族性倾向，位于 17 号染色体上的乳腺癌易患基因 1^[4] (BRCA1) 以及位于 13 号染色体上的乳腺癌易患基因 2^[5] (BRCA2) 是较早

发现的两个肿瘤易患基因，具有调节细胞增殖、分化、凋亡及迁移的作用。它们能与 PALB2 相互作用，抑制 PALB2 在修复由同源重组造成的 DNA 双链断裂过程，从而增加乳腺癌的患病风险^[6]。在遗传性乳腺癌中，BRCA1/BRCA2 的突变被认为是最大的危险因素，具有该基因突变的乳腺癌患者人数约占乳腺癌患者总数的 5-10%^[7]。PIK3CA 是另外一个比较常见的乳腺癌突变基因，该分子在 E542K、E545K 和 H1047R 的突变引起 PI3KCA 表达上调以及其催化亚基的活性增加，进而能通过 PI3K/AKT 途径引发 AKT 持续活化，从而促进了乳腺癌上皮细胞的生长和转化，抑制了乳腺癌细胞的凋亡^[8,9]。

1.1.2.1.2 p53 与乳腺癌

p53 蛋白是由 p53 基因编码的约 40KD 的蛋白分子，野生型的 p53 具有抑癌作用，而突变型 p53 则能引起细胞转化，进而促进细胞的癌变。据报道，约有 20%-60% 乳腺癌患者存在着 p53 基因突变，其中底细胞样型乳腺癌约占 80%，而腔上皮型乳腺癌 A 型约占 15% 左右^[10]。野生型 p53 半衰期短，不易检测到表达；而突变型 p53 蛋白稳定性强，较容易检测到表达。因此，p53 在正常的乳腺组织是不表达的，而在乳腺癌中存在过表达的现象。p53 的表达量越高，乳腺癌的分化越差，恶性程度越高，预后越差^[11]。

Gadd45 α ，是生长抑制 DNA 损伤基因 45 家族中的一员，也是第一个被检测出来的 p53 下游靶基因^[12]。在细胞生命活动中，Gadd45 α 是维持基因组稳定性的最重要的基因之一，它能够通过多种机制参与维护基因组稳定性，抑制肿瘤的发生发展。Gadd45 α 在乳腺癌中的表达明显高于正常乳腺组织，p53 的表达与 Gadd45 α 的表达呈负相关，Gadd45 α 和 p53 蛋白可作为乳腺癌恶性程度的检测指标^[13]。NM23 是一种抑癌基因，广泛存在于细胞膜和细胞质上，野生型的 p53 能促进 NM23 的表达进而抑制了乳腺癌细胞的侵袭，而突变型的 p53 基因则对 NM23 的表达没有影响，这提示 p53 可能通过 NM23 的表达来抑制乳腺癌的扩散^[14]。

1.1.2.2 细胞信号通路 with 乳腺癌

乳腺癌是一种复杂的异质性疾病，基因组和分子水平上的畸变，都可以在失调的信号传导途径中表现出来。

1.1.2.2.1 WNT 信号通路 with 乳腺癌

Wnt 信号在胚胎发生、出生后发育以及怀孕期间对乳腺干细胞功能的发育过程中起调控作用。尤其是在三阴性乳腺癌的发生和转移过程中，Wnt 信号通路更是异常，涉及到 Wnt 信号通路中的典型和非典型途径。

Wnt/ β -catenin 信号途径在三阴性乳腺癌患者中明显异常，并与患者的不良预后相关。三阴性乳腺癌患者患者 Wnt/ β -catenin 信号途径的失调更容易诱导乳腺癌发生向肺和脑的转移^[15-17]。三阴性乳腺癌患者细胞的体外实验以及小鼠癌症模型中证实： β -catenin 在细胞核内的核积累促进乳腺癌细胞迁移、集落形成以及对药物的耐药性^[18]，表明典型的 Wnt 信号传导是三阴性乳腺癌肿瘤发生的主要驱动力。

miRNA 是一种内源性的，短的非编码 RNA 分子，它能在转录后水平调节癌症相关基因。在乳腺癌肿瘤干细胞和癌细胞中 miRNA 分子的差异表达，乳腺癌特异性 miRNA 分子在保持乳腺癌肿瘤干细胞的干性和促进肿瘤发生过程中发挥着重要的作用^[19]。目前有 27 个 miRNA 分子被报道在晚期三阴性乳腺癌中差异表达，其中的大多数 RNA 分子都被预测参与到 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控过程。miRNA-374a 过表达导致 PTEN 和 WIF1 的减少进而促进了由 Wnt 信号通路介导的三阴性乳腺癌的上皮间充质转换，促进了乳腺癌细胞的转移^[20]；过表达 miRNA-340 能下调 Wnt 信号通路下游基因（CTNNB1，MYC 和 ROCK1）的表达，通过抑制三阴性乳腺癌的增殖，促进三阴性乳腺癌的细胞凋亡，此外过表达 miRNA-340 降低了乳腺癌细胞活力、抑制了乳腺癌的侵袭，也进一步说明 miRNA-340 能调控乳腺癌的转移^[21]。另一项研究发现在三阴性乳腺癌细胞系中诱导 miR-340 能导致与典型的 Wnt 信号传导相关的致癌基因 SOX2 的表达降低^[22]；三阴性乳腺癌中，APC 的分解激活了典型的 Wnt 信号通路，从而上调 miRNA-142 的表达，miRNA-150 的表达因此而上调，促进了乳腺组织的增生、乳腺癌干细胞的增殖并抑制了三阴性乳腺癌细胞的凋亡^[23]。

1.1.2.2.2 TGF- β 信号通路与乳腺癌

转化生长因子 β （transforming growth factor β ，TGF- β ）超家族是由一类结构、功能相关的多肽生长因子亚家族组成，其中包括 TGF- β 、活化素、抑制素、骨形态发生蛋白和生长分化因子等。

早期的乳腺癌前细胞的生长进程可以被 TGF- β 抑制；随着肿瘤的发生发展，TGF- β 信号通路的作用发生转变，此时 TGF- β 更倾向于通过诱导上皮-间质转

化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程, 来促进肿瘤的侵袭、转移。而在乳腺癌中, 大约 95% 乳腺癌来源于上皮细胞。乳腺癌上皮细胞的转移、由乳腺导管原位癌发展而成的浸润性乳腺癌、乳腺癌治疗效果的不理想以及乳腺癌患者对化疗药物产生耐药性等问题, 都可能与 EMT 过程密切相关。此外, 临床乳腺癌细胞样本也被报道可能发生了比较明显的 EMT 变化^[24]。

据报道, TGF- β 信号通路也可以通过调节 c-Myc 进而抑制肿瘤细胞的生长。在乳腺上皮细胞中, TGF- β 可以通过 TGF- β 1 信号下游 Smad 蛋白和 CCAT 增强子 β 转录抑制复合物在 c-Myc 近端区域结合而介导 c-Myc 的表达下调^[25]。P53 是一种抑癌因子, 在细胞的凋亡、细胞的增殖、细胞的分化和细胞的 DNA 修复、维持基因稳定性等多种生物学过程中起到了调节作用。在乳腺癌发生的早期阶段, P53 也被报道能和 TGF- β 信号通路下游靶基因 Smad 蛋白相互结合, 进一步促进 p21 的表达, 阻断了细胞周期进展, 从而起到抑制肿瘤的作用; P53 基因发生突变之后, 由于 p53 蛋白的空间构象发生了改变, 丧失了细胞的生长和凋亡、细胞基因组 DNA 修复等过程中的调控作用, P53 基因转变成癌基因^[26]。

1.1.2.2.3 雌激素信号通路与乳腺癌

雌激素受体(ER)是类固醇受体超家族中的一员, 该蛋白分布于细胞核内, 含有 ER α 和 ER β 两种亚型, 通常在乳腺组织中表达。ER α 通常在良性乳腺上皮中高表达, 也被看作是乳腺癌治疗的预后指标。在 ER 阳性乳腺癌组织中, ER α mRNA 的表达量升高, 并且 ER α 突变率明显增加, ER 对雌激素的敏感性增强, 将有可能诱发乳腺癌的发生^[27]。此外, ER 也报道可以通过雌激素活化, 引发细胞内多种级联信号被激活, 其中包括活化 IGFR, 产生基质金属蛋白酶 (MMPs), 促使肝素结合样生长因子(HB-EGF)释放激活的 EGFR, 以此来诱导 MAPK 信号通路被激活^[28]。

1.1.2.2.4 胰岛素样生长因子信号通路与乳腺癌

胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)信号通路是由 2 种多肽类激素 IGF-1、IGF-II 和它的受体 IGF-1R、IGF-II R, 以及至少 7 种和 IGF 具有高度亲和力的结合蛋白(insulin-like growth factor binding proteins, IGFBPs)组成的体系。

在多种肿瘤如乳腺癌、甲状腺癌、前列腺癌中, IGF-1 和 IGF-1R 两者的表达水平同时升高; 此外在乳腺上皮细胞中 IGF-I 也可以和 EGF 相互协作, 并激

活 Akt 以及 ERK 信号通路，从而影响乳腺癌细胞的生长。2005 年，Joan 等^[29]将具有 IGF-1R 活性的融合受体转染小鼠之后，转基因鼠乳腺腺管异常增生，在 8 周龄的时候发展成了乳腺癌。此外，还有研究发现，IGFBP-7 对肿瘤细胞的生长有抑制作用，能阻滞乳腺癌细胞的生长周期于 G1 期，进而诱导乳腺癌细胞的衰老和细胞的凋亡^[30]。

1.2 囊泡运输

细胞的胞外分泌源于高尔基体的运输囊泡，通过一定的转运路径到达细胞质膜的特定区域，是细胞膜物质运输过程中不可或缺的事件。细胞内神经信号的传递、细胞通信等过程需要胞外分泌参与完成。因此，胞外分泌在细胞极性的建立、细胞的迁移等过程中起着极其关键的作用。

囊泡运输是细胞内的物质包裹在囊泡中，从高尔基体等部位向其他细胞器或细胞表面运输的过程，该系统主要包括囊泡、运输轨道和马达分子等。真核细胞中具有极性的微管和微丝被充当为运输的轨道，马达蛋白分子包括了沿微丝运动的 myosin 家族成员和沿微管运动的 kinesin 超家族成员。衣被蛋白能从供体中选择所要运输的货物并使得细胞内膜结构弯曲形成囊泡作为运输工具，这些囊泡将沿着细胞骨架运输到达目的地，之后 SNARE 蛋白复合体介导了囊泡与细胞膜的融合，囊泡与细胞膜融合，运输物质外放，完成物质转运的过程。在囊泡与细胞膜融合之前，囊泡与靶位置的锚定十分重要。锚定的过程发生在分泌囊泡被马达蛋白运输至细胞膜下之后，分泌囊泡与 SNARE 蛋白复合体结合之前，其中，胞外分泌复合体 Exocyst 对囊泡在细胞膜上的锚定发挥着重要作用。

1.2.1 胞外分泌复合体 Exocyst

1.2.1.1 Exocyst 的组成

胞外分泌复合体是由进化上较为保守的 8 个亚基组成的一个复合体，它在介导分泌囊泡向细胞膜特定区域的融合过程中起着非常重要的作用。TerBush 等^[31]在研究芽殖酵母温度敏感分泌突变株的过程中发现有许多个基因产物参与到了从高尔基体到细胞膜的运输过程，这些基因中有 6 个编码胞外分泌复合物的亚基，它们分别是：Sec3p、Sec5p、Sec6p、Sec8p、Sec10p、Sec15p。胞外分泌复合体的另外两个亚基：Exo70p、Exo84p^[32]则是从酵母中纯化出来的或者是在哺乳

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