**PAK4 通过激活 PI3K-AKT-mTOR 通路促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭**

PAK4 promoting the proliferation, migration and invation of Breast Cancer cells mediated by activating the PI3K-AKT-mTOR pathway

2011 级博士研究Th 肿瘤学

学号：21120011

姓名：许宏武导师：张国君教授

汕头大学医学院

2015 年 5 月

学位论文原创性声明

本论文是我个人在导师指导下进行的工作研究及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在论文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

作者签名： 日期： 年 月 日

学位论文使用授权声明

本人授权汕头大学保存本学位论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅；学校可将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存和汇编论文；学校可以向国家有关部门或机构送交论文并授权其保存、借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容。对于保密的论文，按照保密的有关规定和程序处理。

作者签名： 导师签名：

日期： 年 月 日 日期： 年 月 日

**学位论文知识产权声明**

本人郑重声明：我所提交答辩的学位论文，是本人在导师指导下完成的成果，该成果属于汕头大学医学院，受国家知识产权法保护。本人在毕业离校前会将有关的研究资料和结果全部上交导师，离校后使用与学位论文相关的数据资料参加学术会议、公开报告、发表论文和申请基金等，须征得导师及导师所在单位的同意。不得擅自对外披露本论文尚未公开的研究成果。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

注：保密的学位论文在解密后适用本声明。

研究生签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘 要

乳腺癌已成为女性癌症患者的第二大死因。通常，原发乳腺癌并不致命，但乳腺癌细胞侵袭其他器官甚至全身转移则常常是乳腺癌患者因癌致死的主要原因。乳腺癌的肿瘤信号转导蛋白磷酸化异常是导致乳腺癌侵袭性增强和发生转移的主要机制之一。p21 激活激酶 4（p21-activated kinases 4, PAK4）是蛋白激酶 PAKs 家族中与人类肿瘤的发生和发展关系最密切的蛋白，它能通过促进某些肿瘤信号转导蛋白磷酸化，促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。本课题组的前期研究发现，PAK4 在乳腺癌细胞系中与某些促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的蛋白的磷酸化过程有关，PAK4 蛋白过表达与乳腺癌病人的预后不良相关。磷脂酰肌醇 3-激酶（Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）信号转导通路已被众多研究者证明与多种人类肿瘤（包括乳腺癌）的发生和发展密切相关。人第 10 [号染色体缺失的磷酸酶](http://baike.baidu.com/view/1381236.htm)及[张力蛋白](http://baike.baidu.com/view/3850983.htm)同源的基因（gene of phosphate and tension homology deleted on chromsome

ten，PTEN），具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性，是PI3K的竞争性抑制分子。蛋白激酶B（protein kinase B, PKB/AKT），是一种丝氨酸/苏氨酸（Serine/ Threonine, Ser/Thr）蛋白激酶，是PI3K下游主要的效应物，在乳腺癌等多种恶性肿瘤细胞可检测到AKT的异常激活。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种非典型

Ser/Thr蛋白激酶，是AKT的下游效应蛋白，能调控转录及蛋白质合成，对肿瘤细胞的生长和增殖有重要的影响。但是，在乳腺癌细胞中PAK4是否能够调控PI3K-AKT-mTOR信号转导通路，国内外文献也未见报道。因此，本研究从多个角度全面分析乳腺癌细胞中

PAK4是否通过发挥其激酶活性作用，调控PI3K的表达以及其下游信号转导通路蛋白的磷酸化，从而促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭；旨在探索乳腺癌细胞中PAK4调控PI3K-AKT-mTOR信号转导通路的机制，为阐明乳腺癌的转移机制和进一步开发利用蛋白激酶抑制剂向乳腺癌的治疗提供新的理论依据。

首先，我们分别采用RNA干扰和质粒转染，在迁移和侵袭能力均较强的MDA-MB-231细胞系中敲减PAK4和PTEN表达以及使PAK4和PTEN过表达。实验结果发现：（1）敲减PAK4表达后，PI3K、p-AKT和p-mTOR的蛋白表达下调，而PTEN、总AKT和总mTOR蛋白表达无明显变化；（2）过表达PAK4后，PI3K、p-AKT和p-mTOR的蛋白表达上调，而PTEN、总AKT和总mTOR蛋白表达无明显变化；（3）敲减PTEN表达后，PI3K和p-AKT的蛋白表达上调，而总AKT和PAK4蛋白表达无明显变化；（4）

过表达PTEN后，PI3K和p-AKT的蛋白表达下调，而总AKT和PAK4蛋白表达无明显变化。

为了从另一个角度印证PAK4是上游基因，它能调控下游PI3K-AKT-mTOR信号通路，我们分别使用PAK4小分子抑制剂PF-3758309和PI3K抑制剂LY294002作用于稳定过表达PAK4 的MDA-MB-231 细胞系和对照细胞系。实验结果发现：（1）随着PF-3758309工作浓度的梯度上升，实验组和对照组中PAK4和PI3K的蛋白表达出现梯度下调，p-AKT和p-mTOR的蛋白表达也出现与PAK4变化一致的下调，而总AKT和总mTOR的蛋白表达则无明显变化；（2）过表达PAK4造成的PI3K、p-AKT和p-mTOR的蛋白表达上调可被PAK4抑制剂PF-3758309逆转；（3）当LY294002作用时间到5h时，实验组和对照组中PI3K、p-AKT和p-mTOR的蛋白表达均出现轻微下调；当LY294002作用时间延长到

15h时，两组中PI3K、p-AKT和p-mTOR的蛋白表达均明显下调，而AKT和mTOR的蛋白表达未出现明显变化；（4）过表达PAK4造成的AKT和mTOR的蛋白磷酸化可以被

PI3K抑制剂LY294002部分逆转。

我们用分别稳定转染了shNC、shPAK4、Vector和PAK4质粒的四个MDA-MB-231细胞系做系列功能实验，包括CCK-8细胞增殖实验、克隆形成实验、划痕实验、迁移和侵袭实验。实验结果显示：敲减PAK4后细胞增殖、迁移及侵袭能力明显下降，而过表达

PAK4可以促进乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

为了进一步验证PAK4可发挥蛋白激酶的作用调控PI3K-AKT-mTOR信号转导通路，我们使用了不同激酶活性的PAK4质粒（分别是对照质粒Vector，激酶持续活化质粒PAK4Ser，野生型质粒PAK4，和激酶灭活质粒PAK4KD）去稳定转染MDA-MB-231细胞系并观察PI3K-AKT-mTOR信号转导通路中相关蛋白的表达变化。实验结果发现：（1）与Vector组比较，PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组中PAK4、PI3K、p-AKT和p-mTOR的蛋白表达有不同程度的上调，其中，PAK4的蛋白表达的上调程度在PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD 组中基本一致；（2）PI3K、p-AKT 和p-mTOR 的蛋白表达的上调程度在

PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组中依次逐渐降低，但均高于Vector组；(3) AKT 和

mTOR的蛋白表达则无明显变化。

我们使用上述四个细胞系进行CCK-8细胞增殖实验和克隆形成实验，观察不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞的增殖能力的影响。CCK-8细胞增殖实验结果提示：另外三组细胞随着时间延长细胞增殖能力均较Vector组强，它们的细胞增殖能力由强到弱依次为PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组。克隆形成实验结果提示：四组细胞

的克隆形成率不同，由高到低依次为PAK4Ser组（84.0±3.18）%、PAK4组（77.3±4.21）%、

PAK4KD组（68.1±2.83）%, Vector组（57.6±2.89）%。我们又使用上述四组细胞进行进行划痕实验、迁移和侵袭实验。划痕实验结果提示：（1）与Vector组相比，PAK4Ser组、

PAK4组和PAK4KD组的迁移潜能及愈合能力均有不同程度增强；（2）24小时时，PAK4Ser组的划痕完全愈合，PAK4组的划痕接近愈合，PAK4KD组的划痕大部分愈合。迁移实验结果提示：四组细胞的迁移能力不同，由强到弱依次为PAK4Ser组（82.7±8.62）%, PAK4组（74.0±6.0）%, PAK4KD组（46.3±6.11）%, Vector组（32.3±4.93）%。侵袭实验结果提示：四组细胞的侵袭能力不同，由强到弱依次为PAK4Ser组（58.3±2.52）%, PAK4组（37.0±4.58）%, PAK4KD组（31.7±3.51）%, Vector组（20.7±3.79）%。上述实验说明：不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响不同；激酶活性越高，对MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响越明显。

综上所述，本研究的主要结论有：1. PAK4能发挥其蛋白激酶活性促进PI3K的蛋白表达；2. PAK4能促进AKT和mTOR的蛋白磷酸化；3. PAK4不能调控PTEN的蛋白表达，PTEN也不能调控PAK4的蛋白表达；4. PAK4能通过调控PI3K实现对AKT、mTOR的蛋白磷酸化的促进作用；5. PAK4通过发挥其蛋白激酶活性促进促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词：乳腺癌； p21-活化激酶； 4； 磷脂酰肌醇； 3-激酶； 蛋白磷酸化； 细胞增殖

Abstract

Breast cancer has become the second cause of death in women who suffer from cancer. Primary breast cancer is not often lethiferous, but the invasion of tumor cell to other organs or systemic metastases would cause death in patients of breast cancer. Phosphorylation of signal transduction proteins in breast cancer is one of the pivotal mechanisms, which leading to more invasion and metastasis of breast cancer cells. P21-activated kinases 4 (PAK4), which comes from protein kinase family, is one of the most popular proteins in cancer research area in recent years, because PAK4 can promote the phosphorylation in some tumor signal transduction proteins and facilitate proliferation, migration and invasion of cancer cells. Our previous studies have found that PAK4 was relative to the phosphorylation in some signal proteins which could promote the proliferation and migration of cancer cells, and overexpression of PAK4 was associated with poor prognosis of breast cancer patients. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway has been demonstrated by many researchers that it was closely associated with a variety of human tumors (including breast cancer). Gene of phosphate and tension homology deleted on chromsome ten (PTEN) has activity of phosphatase and is a competitive inhibitive molecule of PI3K. Protein kinase B (PKB/AKT) is a Ser/Thr protein kinase, and it is one of major downstream effectors of PI3K. Abnormal activation of AKT could be detected in some malignant cells included breast cancer. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is an atypical Ser/Thr protein kinase and a downstream protein of AKT. The mTOR gene can regulate transcription and protein synthesis and impact the growth and proliferation of tumor cells. However, no study has reported whether PAK4 could regulate PI3K-AKT-mTOR signaling pathway in breast cancer until now. To address this question, we sought to determine whether PAK4 could play the role of kinase activity in regulating the protein expression of PI3K and the phosphorylation of its downstream signal proteins, and if so, whether it could promote the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. Therefore, the goal of this study was to further investigate the mechanism that PAK4 regulating PI3K-AKT-mTOR signaling pathway in breast cancer cells, and then explore whether PAK4 would be as the indicator of poor prognosis in the patients of breast cancer.

Firstly, the technique of RNA interference and plasmid transfection were using to knock down and over express the proteins of PAK4 and PTEN in MDA-MB-231 cells, respectively. The results showed that: (1) the protein expression of PI3K, p-AKT and p-mTOR were decreased after knock down the expression of PAK4, with no statistical changed in the expression of PTEN, total AKT or mTOR; (2) after over express PAK4, the protein expression of PI3K, p-AKT and p-mTOR were increased, but there was no significantly altered in PTEN, total AKT or mTOR; (3) the protein levels of PI3K and p-AKT declined after knock down the expression of PTEN, with no significantly changed in the expression of total AKT or PAK4; (4) with overexpression of PTEN, the protein levels of PI3K and p-AKT rised significantly, but there was no statistically altered in total AKT or PAK4.

In order to confirm PAK4 was the upstream of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway, we used the small molecule inhibitor of PAK4 (PF-3758309) and the PI3K inhibitor (LY294002) to inhibit the activity of PAK4 and PI3K respectively in the group of MDA-MB-231-Vector cells (control group) and the group of MDA-MB-231-PAK4 cells (PAK4 group). We found that: (1) with the working concentration of PF-3758309 increased, the protein expression of PAK4 and PI3K showed a downward trend in both control group and PAK4 group, and the expression of p-AKT and p-mTOR also appears the same trend consistent with PAK4, but there was no statistically altered in total AKT or mTOR; (2) the up-regulation of PI3K, p-AKT and p-mTOR which caused by PAK4 overexpression could be reversed by PF-3758309; (3) the expression of PI3K, p-AKT and p-mTOR were slightly decreased in both groups after adding LY294002 for 5 hours, and they were significantly reduced when the time extended to 15 hours, but the protein levels of AKT and mTOR did not change significantly after adding LY294002;

(4) the phosphorylation of AKT and mTOR that caused by PAK4 overexpression could be partly reversed by LY294002.

We used four MDA-MB-231 cells which had stably transfected shNC, shPAK4, Vector and PAK4 plasmids to do series of functional experiments, including CCK-8 cell proliferation test, colony formation assay, scratch test, migration and invasion assay. The results indicated that the proliferation, migration and invasion of cancer cells were significantly decreased after PAK4 knockdown, and overexpression of PAK4 could promote the proliferation, migration and invasion in breast cancer.

In order to verify whether PAK4 could play the role of kinase activity in regulating PI3K- AKT - mTOR signal pathway, we used four types of PAK4 plasmid (plasmid Vector, constitutively activated kinase plasmid PAK4Ser, wild-type plasmid PAK4, and kinase dead plasmid PAK4KD) to transfect MDA-MB-231 cells for different kinase activity, and then we observed the expression of signal proteins in the PI3K-AKT-mTOR pathway. The results showed that: (1) the protein expressions of PI3K, p-AKT and p-mTOR were increased for different degrees in the PAK4Ser, PAK4 and PAK4KD groups when compared with the Vector group, and the up-regulation of PAK4 was consistent in the PAK4Ser, PAK4 and PAK4KD groups; (2) the the up-regulation extents of PI3K, p-AKT and p-mTOR were sequentially decreased in PAK4Ser, PAK4 and PAK4KD groups, but they were all still higher than control group (Vector); (3) the expression of AKT and mTOR did not change significantly.

The CCK-8 cell proliferation test and clone formation assay were used to observe the effect of different kinase activity in PAK4 plasmids on the proliferation of MDA-MB-231 cells. The results of CCK-8 assay showed that: the cell proliferation ability of the three other groups cells' was stronger than the cells of Vector group respectively, their cell proliferation ability from strong to weak was followed by PAK4Ser group, PAK4 and PAK4KD group. The data in colony formation assay indicated that: The result of CCK-8 cell proliferation test showed that the proliferation of cancer cells in the PAK4Ser, PAK4 and PAK4KD groups were significantly increased over time when comparing with the Vector group, and the ability of proliferation from strong to weak were PAK4Ser group, PAK4 group and PAK4KD group. The data in clone formation assay suggested that the capacity of cell clone formation was statistical difference between the above four groups, and the clone formation rate from strong to weak were PAK4Ser group [(84.0±3.18) %], PAK4 group [(77.3±4.21) %], PAK4KD group [(68.1±2.83) %]

And Vector group [(57.6±2.89) %]. We used the above four cell lines to do wound healing assay, migration and invasion assay at the same time. The results of wound healing assay showed that:

(1) The migration potential of cells in the PAK4Ser, PAK4 and PAK4KD groups were enhanced to varying degrees when compared with the control group; (2) the wound of cancer cells in the PAK4Ser group, PAK4 group and PAK4KD group were completely healed, almost healed and partly healed in 24 hours, respectively. The migration test showed that the migration ability of cancer cells in the PAK4Ser, PAK4, PAK4KD and Vector groups were statistical difference, and

The cell migration rate from strong to weak were PAK4Ser group [(82.7±8.62) %], PAK4 group [(74.0±6.0) %], PAK4KD group [(46.3±6.11) %] and Vector group [(32.3±4.93) %]. The result of invasion assay revealed that the cell invasion rate in the PAK4Ser, PAK4, PAK4KD and Vector groups were (58.3±2.52) %, (37.0±4.58) %, (31.7±3.51) %, (20.7±3.79) %, respectively, and there was statistical difference in the invasion capacity between the above four groups. The data in these experiments indicated that the plasmids with different PAK4 kinase activity had different effects on the proliferation, migration and invasion ability of MDA-MB-231 cells. The plasmid with higher kinase activity exhibited greater effect on the ability of proliferation, migration and invasion in the MDA-MB-231 cells.

In summary, the main conclusions of this study were: 1. PAK4 could play the role of kinase activity to promote the expression of PI3K; 2. PAK4 could promote the phosphorylation of AKT and mTOR; 3. Neither PAK4 nor PTEN could regulate each other; 4. PAK4 promoted the phosphorylation of AKT and mTOR by regulating PI3K; 5. PAK4 could play the role of kinase activity in regulating the phosphorylation of signal proteins in the PI3K-AKT-mTOR pathway, and then accelerate the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells.

Key Words: Breast Cancer; PAK4; PI3K; Proteins Phosphorylation; Cell Proliferation

# 缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PAK4 | P21-activated kinases 4 | p21 激活激酶 4 |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinase | 磷脂酰肌醇 3-激酶 |
| PTEN/TEP1/ MMAC1 | Gene of phosphate and tension homology deleted on chromsome ten | 人第 10 号染色体缺失的[磷酸酶](http://baike.baidu.com/view/1381236.htm)及[张力蛋白](http://baike.baidu.com/view/3850983.htm)同源的  基因 |
| AKT/PKB | Protein Kinase B | 蛋白激酶 B |
| p-AKT | Phospho- Protein Kinase B | 磷酸化蛋白激酶 B |
| Ser | Serine | 丝氨酸 |
| Thr | Threonine | 苏氨酸 |
| mTOR | Mammalian target of rapamycin | 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 |
| p-mTOR | Phosphor - Mammalian target of  rapamycin | 磷酸化哺乳动物雷帕霉素  靶蛋白 |
| PAKs  Cdc42 | P21-activated kinases  Cell division control protein 42 | p21 激活激酶  细胞分裂控制蛋白 42 |
| GBD | GTPase-binding domain | GTP 酶结合域 |
| AID | Auto-inhibitory domain | 自我抑制域 |
| PS | Pseudosubstrate sequence | 假底物序列 |
| SH3 | Src Homology 3 Domain | 恶性肉瘤同源基因 3 结构  域 |
| p-EGFR | Phosphor -epidermal growth factor  receptor | 磷酸化表皮Th子因子受体 |
| MMP2 | Matrix metalloproteinase 2 | 基质金属蛋白酶-2 |
| iMMECs | Immortalized mouse mammary  Epithelial cells | 永Th化小鼠乳腺上皮细胞 |
| HER2/ErbB2 | Human epidermalgrowth factor  receptor-2 | [人类表皮Th长因子受体](http://baike.baidu.com/view/598782.htm) 2 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| CDKN1C/P57  /Kip2 | Cyclindependent kinase inhibitor 1C | 周期蛋白依赖激酶抑制因子 1C |
| PK | Protein Kinases | 蛋白激酶 |
| ERK | Extracellular regulated protein  kinases | 细胞外调节蛋白激酶 |
| GEF-H1 | Guanine nucleotide exchange  factor-H1 | 鸟嘌呤核苷酸交换因子  -H1 |
| PKD | Protein kinase D | 蛋白激酶 D |
| LIMK1 | LIM kinases 1 | 单丝氨酸蛋白激酶 1 |
| SSH-1L | Slingshot-1L | SSH 磷酸酶 1L |
| VPS34 | Vacuolar sorting protein 34 | 液泡蛋白质分拣蛋白 34 |
| PI-3P | Phosphatidylinositol 3-phosphate | 3-磷酸磷脂酰肌醇 |
| PI-3,4-P2 | phosphatidyl-inositol  3,4-bisphosphate | 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇 |
| PI-3,4,5-P3 | phosphatidylinositol  3,4,5-trisphosphate | 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 |
| PH | Pleckstrin homology | 血小板-白细胞 C 激酶底  物 |
| PDK | phosphoinositide-dependent  proteinkinase | 磷脂酰肌醇依赖的蛋白激  酶 |
| PIKK | phosphatidylinositol  Kinase-related kinase | 磷脂酰肌醇激酶相关激酶 |
| EGF | Epidermal Growth Factor | 表皮Th长因子 |
| EGFR/Her1/  ErbB-1 | Epithelial growth factor receptor | 表皮Th长因子受体 |
| GF | Growth factor | Th长因子 |
| p-ChK2 | Phosphor -Check point kinase 2 | 磷酸化检验点激酶 2 |
| p-ERK | Phosphor -extracellular regulated  Protein kinases | 磷酸化细胞外调节蛋白激  酶 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| IC50 | Half maximal inhibitory concentration | 半抑制浓度 |
| GEF-H1 | Guanine nucleotide exchange factor  H1 | 鸟核苷酸转换因子 H1 |

目 录

[摘 要](#_Toc686389708) 2

[Abstract](#_Toc686389709) 3

[缩略词表](#_Toc686389710) 3

[目 录](#_Toc686389711) 7

[第1章 前言](#_Toc686389712) 8

**[1.1](#_Toc686389713)** [本课题研究的学术背景](#_Toc686389713) 8

**[1.2](#_Toc686389714)** [本课题研究主要研究内容及课题来源](#_Toc686389714) 10

[第2章 材料与方法](#_Toc686389715) 10

**[2.1](#_Toc686389716)** [主要仪器](#_Toc686389716) 11

**[2.2](#_Toc686389717)** [细胞系、菌株和质粒](#_Toc686389717) 11

**[2.3](#_Toc686389718)****[一抗：见表 1](#_Toc686389718)** 11

**[2.4](#_Toc686389719)** [其他试剂：](#_Toc686389719) 12

**[2.5](#_Toc686389720)** [实验方法](#_Toc686389720) 14

[第3章 结果与分析](#_Toc686389721) 24

**[3.1](#_Toc686389722)** [乳腺癌细胞中稳定敲减](#_Toc686389722)**[PAK4](#_Toc686389722)**[可下调](#_Toc686389722)**[PI3K](#_Toc686389722)**[表达并抑制](#_Toc686389722)**[AKT](#_Toc686389722)**[、](#_Toc686389722) 24

**[3.2](#_Toc686389723)****[PAK4](#_Toc686389723)**[抑制剂能抑制](#_Toc686389723)**[PI3K](#_Toc686389723)**[的表达和抑制](#_Toc686389723)**[AKT](#_Toc686389723)**[、](#_Toc686389723)**[mTOR](#_Toc686389723)**[蛋白磷酸化](#_Toc686389723) 25

**[3.3](#_Toc686389724)****[PAK4](#_Toc686389724)**[和](#_Toc686389724)**[PTEN](#_Toc686389724)**[可分别调控](#_Toc686389724)**[PI3K-AKT-mTOR](#_Toc686389724)**[通路，但](#_Toc686389724)**[PAK4](#_Toc686389724)** 25

**[3.4](#_Toc686389725)****[PAK4](#_Toc686389725)**[引起的](#_Toc686389725)**[PI3K](#_Toc686389725)**[、](#_Toc686389725)**[p-AKT](#_Toc686389725)**[和](#_Toc686389725)**[p-mTOR](#_Toc686389725)**[蛋白表达上调能被](#_Toc686389725) 25

**[3.5](#_Toc686389726)** [功能实验提示](#_Toc686389726)**[PAK4](#_Toc686389726)**[能提高](#_Toc686389726)**[MDA-MB-231](#_Toc686389726)**[细胞的增殖、迁移和侵袭能力。](#_Toc686389726) 25

**[3.6](#_Toc686389727)** [不同激酶活性的](#_Toc686389727)**[PAK4](#_Toc686389727)**[质粒促进](#_Toc686389727)**[PI3K](#_Toc686389727)**[、](#_Toc686389727)**[p-AKT](#_Toc686389727)**[和](#_Toc686389727)**[p-mTOR](#_Toc686389727)**[蛋白表达的程度不同。](#_Toc686389727) 26

**[3.7](#_Toc686389728)** [不同激酶活性的](#_Toc686389728)**[PAK4](#_Toc686389728)**[质粒对](#_Toc686389728)**[MDA-MB-231](#_Toc686389728)**[细胞增殖能力的影响不同](#_Toc686389728) 26

**[3.8](#_Toc686389729)** [不同激酶活性的](#_Toc686389729)**[PAK4](#_Toc686389729)**[质粒对](#_Toc686389729)**[MDA-MB-231](#_Toc686389729)**[细胞迁移和侵袭能力的影响不同](#_Toc686389729) 26

[第4章 讨论](#_Toc686389730) 27

[第5章 结论](#_Toc686389731) 28

[第6章 问题和展望](#_Toc686389732) 28

[参考文献](#_Toc686389733) 28

[个人简介](#_Toc686389734) 30

[附录一博士期间科研业绩（2011年9月到2015年6月）](#_Toc686389735) 31

[附录二博士期间发表的文章](#_Toc686389736) 31

# 第1章 前言

## **1.1** 本课题研究的学术背景

全球乳腺癌发病率自20世纪70年代末开始一直呈上升趋势。美国主导的2015年最新的统计显示美国及世界上大多数地区乳腺癌在女性癌症发病率中排第一位，乳腺癌病死率在女性癌症患者中排第二位[[2](#_bookmark27)]。根据中国肿瘤登记中心于2015年4月最新视频新闻发

布的2015中国肿瘤登记年报中的统计显示，乳腺癌发病率在我国女性恶性肿瘤发病率中高居第一位[[3](#_bookmark28)]。乳腺癌的高发病率让很多女性谈乳癌色变。然而原发乳腺癌并不致命，但乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭性导致乳腺癌细胞侵袭其他器官甚至全身转移则常常是乳腺癌患者因癌致死的主要原因。乳腺癌的肿瘤信号转导蛋白磷酸化异常是导致乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭性增强的主要机制之一。因此，阐明乳腺癌的肿瘤信号转导蛋白磷酸化和去磷酸化的分子机制，有助于阐明乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制，对临床上利用磷酸化蛋白质的筛查和鉴定评估乳腺癌的恶性程度和预后有重大意义，也对乳腺癌的基因靶向治疗有重要意义，将有利于提高乳腺癌患者的生存率。研究表明有许多蛋白激酶能促进乳腺癌肿瘤信号转导蛋白的磷酸化。p21激活激酶4（p21-activated kinases 4, PAK4）是近年来蛋白激酶家族中研究最热门的蛋白之一，它能促进结肠癌、食道癌、口腔癌、喉癌和前列腺癌等肿瘤的信号转导蛋白磷酸化[[4-9](#_bookmark29)]。而PAK4是否在乳腺癌中促进肿瘤信号转导蛋白磷酸化以及其分子机制尚未见文献报道。磷脂酰肌醇3-激酶（Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）信号转导通路相关蛋白磷酸化增强是乳腺癌侵袭和转移的重要分子机制之一。我们的研究发现，PAK4能调控PI3K的蛋白表达，并促进蛋白激酶B（protein kinase B, PKB/AKT）及其下游哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)蛋白磷酸化，进而促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。下面我们将详细阐述本项目相关的PAK4和PI3K-AKT-mTOR通路的相关研究背景。

1.1.1 P-21活化激酶（p21-activated kinases, PAKs）家族的结构和生物学特性

PAKs是1994年发现的一类丝氨酸/苏氨酸激酶。PAKs是Rho家族蛋白中的细胞分裂控制蛋白42(cell division control protein 42, Cdc42)和小分子量GTP结合蛋白（Rac蛋白）的下游效应分子，它们主要通过促进某些蛋白质的转录后磷酸化修饰起作用，在调节细胞骨架重构[[10](#_bookmark32), [11](#_bookmark33)]、细胞内信号转导[[12](#_bookmark34)]、细胞增殖[[13,](#_bookmark35) [14](#_bookmark36)]、细胞凋亡[[15](#_bookmark37), [16](#_bookmark38)]及血管生成[[17](#_bookmark39), [18](#_bookmark40)]等多种生物功能中发挥重要作用。PAKs家族共有6个成员，根据其分子结构和功能的不同，

PAKs可分为2个亚组：I组为PAK1-3，II组为PAK4-6[[19](#_bookmark41)]. II组PAKs的氨基末端（N末端）结构之间具有＞60%的同源性，但与I组PAKs的N末端之间的同源性＜40%[[20](#_bookmark42), [21](#_bookmark43)]。两组

PAKs的N末端都具有一个的GTP酶结合域（GTPase-binding domain, GBD）以及一个自我抑制域（Auto-inhibitory domain, AID），但这些基因序列和结构上的差异导致了这两组PAKs的激酶活化和自我抑制机制不尽相同[[19](#_bookmark41)]。最近的研究结果认为，I组PAKs的AID区与GBD区部分重叠，而II组的AID区与GBD区不重叠[[19](#_bookmark41)]，如图1所示。目前I组PAKs被认为是通过一种反式自我抑制机制进行自我调控的，以PAK1为例，N末端的GBD区和AID区部分重叠，两个PAK1氨基酸序列其中一个PAK1序列的AID区与另一个PAK1序列C末端（羧基末端）非磷酸化的激酶域结合在一起，聚合成为非活化形式的二聚体结构，当上游的细胞分裂控

制蛋白42（cell division control protein 42, Cdc42）或小分子量GTP结合蛋白RAC与PAK1的

zkq 20160118

GBD区结合时，将伴随着磷酸肌醇（phosphoinositide）与GBD和AID重叠区临近的富含基

础氨基酸的节段结合，导致AID区从激酶域分离出来，激酶域发生自体磷酸化，二聚体结构分离并成为单体激酶活化形式，去完成后续的激酶激活功能[[19](#_bookmark41)]。而II组PAKs的自我抑制和活化机制目前仍有不同的观点。以PAK4为例，Baskaran的假说认为它是以单体形式存在的，与GBD相邻的AID区与C末端基础磷酸化的激酶域结合是其非活化形式，当CDC42与GBD区结合时可能使其自身构象发生变化，AID区与激酶域分离从而使其成为活化形式

[[22](#_bookmark44)]. 而Ha等的另外一种假说则认为，PAK4的激酶域与一个假底物序列（pseudosubstrate sequence, PS）结合成为其自我抑制的非活化形式，在CDC42与GBD区结合后还需要一个包含有恶性肉瘤同源基因3结构域(Src Homology 3 Domain, SH3 domain)的蛋白质与PS序列结合，才能使激酶域释放成为活化形式[[23](#_bookmark45)]。

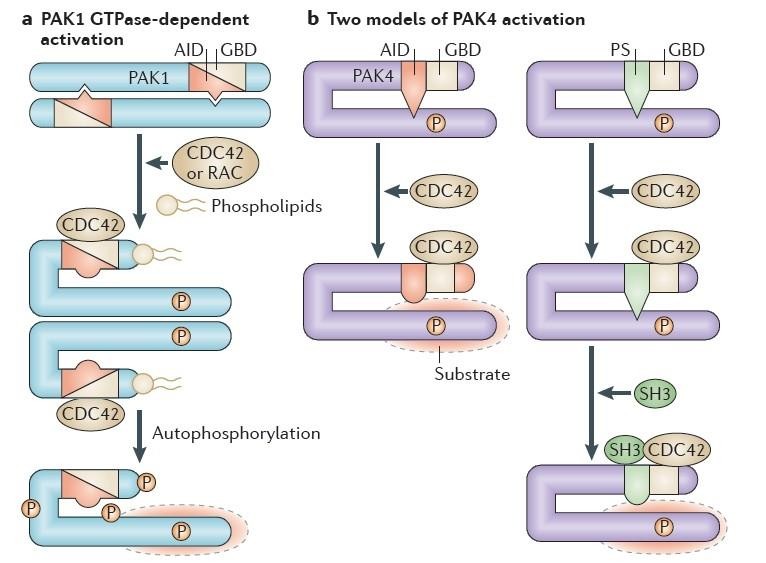


图1 PAKs激活的模型图[[19](#_bookmark41)]

Figure 1 ．The models of PAKs activation

zkq 20160118

PAKs家族蛋白有相似的生物学功能，参与许多重要的细胞活动，如：细胞骨架的重构；细胞增殖、分化及转化；细胞周期；抗细胞凋亡；基因转录调控；蛋白质转录后修饰；甾体类激素的信号转导调控；肿瘤血管生成；肿瘤细胞能量代谢；肿瘤侵袭、转移等[[24](#_bookmark46), [25](#_bookmark47)]。越来越多的研究表明，PAKs的过度表达或过度活化能通过多种不同机制促进多种肿瘤的恶性进展[[19](#_bookmark41), [26](#_bookmark48), [27](#_bookmark49)]，PAKs家族在肿瘤中的作用越来越受到重视。其中PAK4是近年来蛋白激酶家族中被研究最热门的蛋白之一。

人类PAK4基因定位于染色体19q13.2，长度为3064 bp，一共编码591个氨基酸，其相对分子质量为72000。PAK4广泛分布于正常组织中。正常情况下PAK4在发育成熟的组织中低表达，若在发育成熟的组织中过表达则往往与肿瘤有关[[28](#_bookmark50)]。近几年来众多研究表明，**PAK4是II组PAKs中与肿瘤关系最密切的一个**。文献报道在多种人类肿瘤中检测PAK4基因过表达，比如口腔鳞状细胞癌[[29](#_bookmark51)]、胰腺癌[[30](#_bookmark52)]和卵巢癌[[31](#_bookmark53)]等临床病例肿瘤细胞中均检测到PAK4基因过表达。在多种人类恶性肿瘤细胞系中也能检测到PAK4基因过表达[[1](#_bookmark26), [14](#_bookmark36), [32](#_bookmark54),

[33](#_bookmark55)]. 临床上很多恶性肿瘤也被证明与PAK4密切相关，如胃癌[[34](#_bookmark56), [35](#_bookmark57)]、肺癌[[36](#_bookmark58)]、前列腺癌[[37](#_bookmark59)]、结直肠癌[[13](#_bookmark35)]和恶性黑色素瘤[[38](#_bookmark60)]等。在小鼠肿瘤模型中，PAK4过表达会促进肿瘤的形成[[4](#_bookmark29), [39](#_bookmark61)]。Kesanakurti等研究者发现在4910和5310人胶质瘤细胞中敲减PAK4能下调磷

酸化表皮生子因子受体（phospho-epidermal growth factor receptor, p-EGFR）信号通路抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭[[40](#_bookmark62)]。Michelle等研究提示在卵巢癌细胞中，PAK4可正向调控EGFR和基质金属蛋白酶-2（matrix metalloproteinase 2, MMP2）的表达，抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭[[5](#_bookmark30)]。此外，PAK4与乳腺癌的关系[[41](#_bookmark63), [42](#_bookmark64)]越来越受到研究者的关注。

### 1.1.2 PAK4与乳腺癌的关系

随着近几年研究的进展，**PAK4与乳腺癌之间存在明显的关联已被许多研究者发现**。多个研究提示PAK4与乳腺癌的恶性程度显著相关。Li等在临床乳腺肿瘤中检测到PAK4过表达[[43](#_bookmark65)]，Yu等研究者在具有基底细胞癌特征的侵袭性乳腺癌中PAK4基因所在的染色体区域19q13.2发生基因放大效应的几率非常高[[44](#_bookmark66)]，而在人类和大鼠的正常乳腺组织中却几乎检测不到PAK4表达[[4](#_bookmark29)]。此外，众多研究者在多种乳腺癌细胞系中检测到PAK4过表达[[1](#_bookmark26), [4](#_bookmark29), [39](#_bookmark61)]。在永生化小鼠乳腺上皮细胞（immortalized mouse mammary epithelial cells, iMMECs）中，PAK4 过表达与癌基因Ras 和人类[表皮生长因子受体](http://baike.baidu.com/view/598782.htm)2(human

epidermalgrowth factor receptor-2, HER2/ErbB2)等过表达相关，能促进iMMECs细胞增殖、抑制凋亡，过表达PAK4 的iMMECsz种kq植到20裸1鼠60中11能8形成肿瘤[[39](#_bookmark61)]。在乳腺癌研究模型

MCF10A细胞系中，成瘤性更强的细胞中PAK4表达水平较未癌变的细胞更高[[42](#_bookmark64)]。Wong等研究者进一步发现PAK4基因在MDA-MB-231细胞中发挥重要的癌基因作用，过表达

PAK4可增强MDA-MB-231乳腺癌细胞系的增殖和迁移能力并显著提高这些细胞在体外形成3D 结构的能力，同样能提高这些细胞在裸鼠中形成原位种植性肿瘤的能力，提示

PAK4在乳腺癌细胞的成瘤性转化中有重要的意义[[41](#_bookmark63)]。在MCF7乳腺癌细胞系中，PAK4能负调控周期蛋白依赖激酶抑制因子1C (Cyclindependent kinase inhibitor 1C,

CDKN1C/P57/Kip2）蛋白的稳定性，从而促进乳腺癌细胞的增殖[[43](#_bookmark65)]。这些研究结果表明，

PAK4可能通过多种信号转导通路，在乳腺癌的发生发展过程中发挥重要作用。

此外，本课题组的前期研究还发现，PAK4蛋白的过表达与乳腺癌病人的预后不良相关，而国内外尚未有类似的报道。然而，PAK4作为蛋白激酶，其在乳腺癌中如何发挥激酶活性的调节机制目前尚未被阐明。除了激酶活性以外，PAK4还能通过其他什么途径促进乳腺癌的进展也不明确。因此本课题组把研究目标锁定在PAK4基因，继续深入研究PAK4是否通过发挥蛋白激酶活性促进乳腺癌的发生发展及其机制，同时尝试阐述PAK4在蛋白激酶活性以外促进乳腺癌发生发展的其他可能机制。

### 1.1.3 肿瘤信号转导蛋白磷酸化

蛋白质磷酸化于1955年由科学家Edwin Krebs和Edmond Fisher首次命名，近几十年来蛋白质磷酸化逐渐成为肿瘤领域的研究热点。蛋白质磷酸化是最常见、最重要的一种蛋白质翻译后修饰方式，它是调节和控制蛋白质活力和功能的最基本、最普遍，也是最重要的机制，它参与和调控生物体内的许多生命活动，如细胞的生长发育、周期调控、基因表达、蛋白合成以及神经功能、肌肉收缩等。众所周知，蛋白质磷酸化过程是由蛋白激酶

（Protein Kinases, PK）和蛋白磷酸酶（protein phosphatases）两种不同的酶类可逆性调控的。蛋白激酶是指能将γ磷酸基团从磷酸载体分子上转移到底物蛋白的氨基酸受体上的一大类酶，它主要通过以下两方面发挥其功能：一，磷酸化调节蛋白质的活性；二，通过使蛋白质逐级磷酸化，使信号逐级放大，引起细胞反应[[45](#_bookmark67)]。真核生物的蛋白激酶数量繁多，我们根据其底物蛋白被磷酸化的氨基酸残基的种类，可人为的把它们分为5大类，①丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶：底物蛋白质的羟基被磷酸化；②酪氨酸(Tyr)蛋白激酶：以底物蛋白质的酚羟基作为磷受体；③色氨酸蛋白激酶：以底物蛋白质的色氨酸残基作为

磷受体；④组氨酸蛋白激酶：底物蛋白质的组氨酸、精氨酸或赖氨酸的碱性基团被磷酸化，

zkq 20160118

主要出现于“双组分信号系统”(two-component signal system)；⑤天冬氨酰基/谷氨酰基蛋白

激酶：以底物蛋白质的酰基为磷受体。蛋白磷酸酶是指具有催化已经磷酸化的蛋白质分子发生去磷酸化反应的一类酶分子，[与蛋白激酶](http://baike.baidu.com/view/442602.htm)相对应存在，共同构成磷酸化和去磷酸化这一重要的蛋白质活性的开关系统[[45](#_bookmark67)]。研究发现，肿瘤信号转导蛋白的蛋白质磷酸化主要发生在前两类氨基酸残基上，即丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)和酪氨酸(Tyr) [[46](#_bookmark68)]。丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)磷酸化的主要作用是变构蛋白质以激活蛋白质的活力，主要是指酶活力，是生物体内一种普通的调节方式，在[细胞信号转导](http://baike.baidu.com/view/938287.htm)和控制细胞生长的过程中起重要作用，在肿瘤的发生和生长中也起了关键作用。PAK4是一种特异性丝氨酸(Ser)蛋白激酶[[47](#_bookmark69)]，众多研究已揭示PAK4能通过调控数个蛋白磷酸化信号转导通路来促进多种肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。Wang等证明PAK4可促进细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)磷酸化来促进结肠癌细胞的生长[[48](#_bookmark70)]。过表达PAK4可能抑制鸟嘌呤核苷酸交换因子-H1(guanine nucleotide exchange factor-H1, GEF-H1)进而影响RhoA-GDP向RhoA-GTP转换，从而降低细胞的粘附作用加快细胞的运动和迁徙[[49](#_bookmark71), [50](#_bookmark72)]。上游基因蛋白激酶D（protein kinase D, PKD）能磷酸化PAK4的Ser 474位点[[51](#_bookmark73)]，磷酸化的PAK4能通过促进单丝氨酸蛋白激酶1(LIM kinases 1, LIMK1)磷酸化[[11](#_bookmark33)]和抑制磷酸酶

Slingshot-1L的磷酸化[[52](#_bookmark74)]双重途径来调控丝切蛋白cofilin的磷酸化，最后抑制丝状肌动蛋白actin的聚合反应，影响细胞的运动和迁徙。而经过激酶灭活基因突变的PAK4则可以阻断PKD介导的PKD-PAK4-LIMK1-cofilin通路的下游基因磷酸化并抑制细胞的运动和迁移[[51](#_bookmark73)]。

上述研究表明，PAK4的蛋白激酶活性可能与多种肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭有关，但PAK4是否能通过发挥蛋白激酶活性促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭尚未见报导。因此本项目的研究着眼于PAK4以及可能的磷酸化位点为丝氨酸(Ser)的下游蛋白，期望揭示在乳腺癌细胞中PAK4对下游蛋白磷酸化的作用机制并阐明PAK4促进乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的可能机制。

### 1.1.4 PI3K-AKT-mTOR信号传导通路

PI3K通路广泛存在于细胞中，是参与细胞生长、增殖、分化调节的信号转导通路，

PI3K的活性增加常与多种肿瘤相关，它在恶性肿瘤的发生、发展、治疗及转归中发挥着重要作用[[53](#_bookmark75)]。多年来，PI3K信号转导通路也一直是乳腺癌研究的重要通路[[54](#_bookmark76), [55](#_bookmark77)]。PI3K是由两个亚基组合而成的：一个是相对zk分q子质20量1为60111108000的催化亚基p110，另一个是相对分子质量为85000的调节亚基p85. PI3K的p110亚基与蛋白激酶具有同源性，不仅如

此，P110 本身既具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性，同时也具有磷脂酰肌醇激酶的活性

[[56](#_bookmark78)]. 根据PI3K的p110亚基的结构特点和不同的底物分子类型可将P110分为三大类：I、

II、III个亚型。I型分为IA和IB亚类，IA亚类包括p110α、p110β、p110δ，这三种亚类可以与p85亚基形成二聚体；IB亚类包括p110γ，但是它并不能与p85亚基结合，而是与

1个相对分子质量为101000的接头蛋白结合，这个接头蛋白可以介导G蛋白的β、γ亚基促进p110亚基活化；II型PI3K是含有C2结构域的PI3K[[57](#_bookmark79)]；II型PI3K是在哺乳动物细胞内发现的与酵母的液泡蛋白质分拣蛋白34(Vacuolar sorting protein 34, VPS34)分子结构有同源性的蛋白质[[58](#_bookmark80)]。p85的氨基端含有SH3结构域和能与SH3结构域结合的脯氨酸富集区，其羧基端含有2个SH2结构域及1个与p110结合的区域[[59](#_bookmark81)]。PI3K对磷脂酰肌醇环上的3位羟基进行磷酸化产生磷酸化的磷脂酰肌醇的过程：包括3-磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI-3P)、3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidyl-inositol 3,4-bisphosphate, PI-3,4-P2)、3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PI 3,4,5-P3 )[[60](#_bookmark82)]。

AKT，即蛋白激酶B（protein kinase B, PKB），是一种Ser/Thr蛋白激酶，与恶性肿

瘤的发生发展关系密切，是PI3K的下游效应基因[[61](#_bookmark83)]。AKT相对分子量为60000。目前发现至少存在3种AKT家族成员：AKT1/PKBα、AKT2/PKBβ、AKT3/PKBγ。AKT氨基端含有1个与血小板-白细胞C激酶底物(pleckstrin homology, PH)同源的结构区域能特异性作用于底物中Ser/Thr残基并使之发生磷酸化，还能介导蛋白质-蛋白质和（或）脂质-蛋白质之间的相互作用；AKT羧基端是富含脯氨酸的疏水区。AKT氨基端的PH区在进化中是高度保守的氨基酸序列，表明PH区可能具有重要的功能。AKT被认为是PI3K-Akt-mTOR信号转导通路中的关键环节[[62](#_bookmark84)]，AKT被磷酸化后能激活AKT，活化状态的AKT通过调节底物蛋白进而调控细胞的一系列生理过程，多种恶性肿瘤细胞可发生

AKT的异常激活。

PI3K激活后的产物PI-3,4-P2及PI-3,4,5-P3均可与AKT的PH区结合，进而导致AKT

从细胞质转位到达细胞膜，还促使AKT的构象发生改变，从而AKT得以在Ser473 和

Thr308位点被磷酸化激活，而Ser473和（或）Thr308位点的磷酸化激活正是AKT激活的必要条件[[63](#_bookmark85)]。另外，AKT的磷酸化激活还需要磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶(phosphoinositide-dependent proteinkinase, PDK)参与，PDK家族中的PDK-1只能使Thr308位点磷酸化激活，而无法直接磷酸化激活Ser473位点，但AKT的PH区能和脂质产物发

zkq 20160118

生高亲和力结合，进而促进了PDK-1/PDK-2复合体的形成，而PDK-1/PDK-2复合体则具

有使Ser473位点磷酸化激活的能力[[64](#_bookmark86)]。活化的AKT，能进一步激活其下游众多基因，对细胞凋亡、细胞周期和血管再生等产生调节作用。

人第10[号染色体缺失的磷酸酶](http://baike.baidu.com/view/1381236.htm)及[张力蛋白](http://baike.baidu.com/view/3850983.htm)同源的基因（gene of phosphate and tension homology deleted on chromsome ten, PTEN），又称为MMAC1（mutated in mμltiple advanced cancer 1）和TEP1（TGF-regμlated and epithelial cell-enriched phosphatase 1），是一个研究广泛的抑癌基因。抑癌基因PTEN能对PI3K-AKT信号转导通路发挥负性调节[[65](#_bookmark87)]。PTEN是PI3K的竞争性抑制分子，是一种新发现的抑癌基因。PTEN定位于染色体10q23.3，由

9[个外显子](http://baike.baidu.com/view/51039.htm)组成，编码由403个[氨基酸](http://baike.baidu.com/view/15155.htm)组成的蛋白质，具有磷酸酯酶的活性。PTEN能够使PI-3,4,5-P3去磷酸化，从而抑制AKT的活化，减少AKT的活化而阻止所有由AKT调控的下游信号传导事件。抑癌基因PTEN突变或缺失的细胞由于不能将PI-3,4,5-P3去磷酸化，从而导致AKT活化，进而使细胞发生癌变[[63](#_bookmark85)]。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种非典型

Ser/Thr蛋白激酶，为磷脂酰肌醇激酶相关激酶(phosphatidylinositol kinase-related kinase,

PIKK）蛋白质家族成员，是AKT的下游效应分子。mTOR是一类大分子蛋白质，分子量

为289000，其很多区域可参与调节蛋白质之间的相互作用。mTOR参与了体内多条信号通路。其中一条主要的通路是PI3K-AKT-mTOR通路，主要在肿瘤的生成及发展中起重要作用[[66](#_bookmark88)]。活化的AKT可直接或通过某些细胞因子激活下游的mTOR,参与体内多条信号通路，调控转录及蛋白质合成，对肿瘤细胞的生长和增殖有重要的影响[[67](#_bookmark89)]。

PI3K-AKT-mTOR信号转导通路控制着庞数量大的肿瘤标志物，涉及细胞周期、细胞生存、新陈代谢、细胞运动和基因组不稳定等多方面的功能[[68](#_bookmark90)]。PI3K-AKT-mTOR信号转导通路蛋白磷酸化已被众多研究者证明与多种人类肿瘤的发生和发展密切相关[[69](#_bookmark91)]。

Yang等研究者发现表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)诱导激活PAK1并促进MDA-MB-231乳腺癌细胞迁移的过程中，PI3K/AKT信号转导通路发挥了关键作用[[70](#_bookmark92)]。PI3K-AKT-mTOR 通路的上游调节因子表皮生长因子受体（epithelial growth factor

receptor，EGFR、ErbB-1或Her1）及其家族其他成员Her2、Her3、Her4都可以调控PI3K，影响PI3K-AKT-mTOR通路的活性[[71](#_bookmark93)]。当EGFR、Her2、Her3、Her4等膜激酶被外源性生长因子（Growth factor, GF）激活后，这些膜激酶将启动受体二聚化并启动激活众多细胞内信号通路的后续事件[[72](#_bookmark94)]。AKT和mTOR就是在下游能被活化PI3K激活的其中一条细胞内信号通路（见图2）。但是，在乳腺癌细胞中PAK4是否能够调控PI3K-AKT-mTOR信号转导通路，国内外文献未见报道。

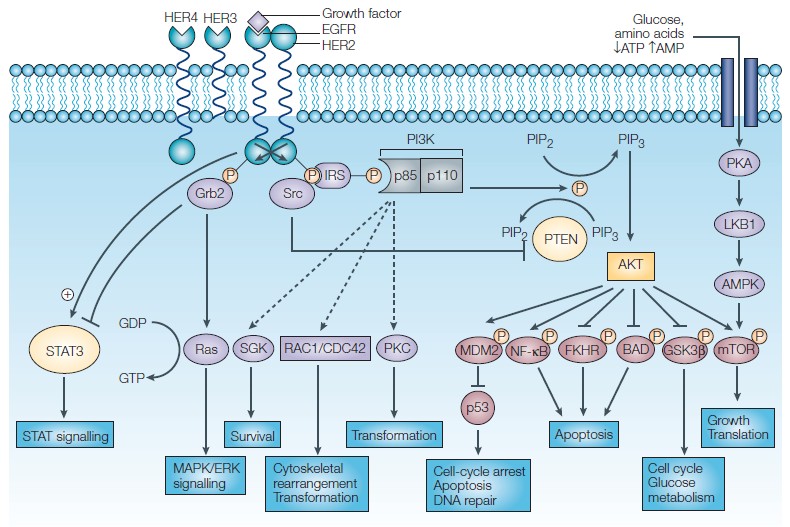


图2. PI3K/AKT通路概要图[[72](#_bookmark94)]

Figure 2 ．Schematic of signalling through the PI3K/AKT pathway

### 1.1.5 本课题组的前期研究结果

本课题组的前期研究发现（见本课题组成员贺丽芳2013 年的硕士毕业论文《PAK4

在乳腺癌发生发展中的作用及其机制研究》以及冼志荣2014年的硕士毕业论文《PAK4通过上调变异型p53的表达增强乳腺癌的化疗耐药》）：

一、PAK4高表达与乳腺癌患者的较差临床病理学特征如肿瘤直径大、淋巴结转移个数多、肿瘤分期晚等呈正相关，PAK4高表达患者的无病生存期和总生存期均较低表达者明显短。二、干扰PAK4后细胞增殖、迁移及侵袭能力明显下降，过表达PAK4可以促进乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭，说明PAK4在乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭过程中发挥着正调控作用。三、PAK4可以促进裸鼠乳腺癌的发生。四、PAK4促进乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的机制可能是通过调控p53，p-p53，p-ATM，磷酸化检验点激酶2(phosphor

-Check point kinase 2, p-ChK2），和磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphor -extracellular regulated protein kinases, p-ERK)的蛋白表达或促进MMP2的转录。五、药物敏感性实验中，过表达PAK4后，MDA-MB-231细胞对多柔比星的敏感性明显降低；而干扰PAK4后，MDA-MB-231细胞对多柔比星的敏感性明显升高。本课题组前期研究结果首次从多角度揭示PAK4可作为乳腺癌的预后指标，同时阐述PAK4在乳腺癌中可作为多个经典的肿瘤信号转导通路的调节基因，PAK4能促进乳腺癌细胞的迁移、肿瘤形成和代谢。目前这些研究结果已撰写英文论文，正在投稿中。

## **1.2** 本课题研究主要研究内容及课题来源

### 1.2.1 主要研究目标

本项目的研究旨在深入探讨PAK4作为乳腺癌预后不良指标的机制，探索乳腺癌细胞中PAK4调控PI3K-AKT-mTOR信号转导通路的机制，揭示PAK4是否通过发挥其蛋白激酶活性促进PI3K-AKT-mTOR信号转导通路蛋白磷酸化，为阐明乳腺癌的转移机制和进一步开发利用蛋白激酶抑制剂向乳腺癌的治疗提供新的理论依据。

### 1.2.2 研究内容

首先我们将证明PAK4是否调控PI3K-AKT-mTOR信号通路并促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。然后验证PAK4对PI3K-AKT-mTOR信号通路的调控是否基于PAK4 的

蛋白激酶活性发挥作用。最后，验证不同激酶活性的PAK4质粒对乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响。

⑪证明PAK4是否调控PI3K-AKT-mTOR信号通路并促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

a. 在MDA-MB-231细胞株中用shRNA和稳定敲减PAK4的表达，应用免疫印迹检测法（Western Blotting）检测PI3K-AKT-mTOR通路蛋白的变化。

b. 在MDA-MB-231细胞株中用PAK4质粒稳定过表达PAK4，应用免疫印迹检测法

（Western Blotting）检测PI3K-AKT-mTOR通路蛋白的变化。

c. 在稳定过表达PAK4乳腺癌细胞株中使用PAK4抑制剂PF-3758309，应用免疫印迹检测法（Western Blotting）检测PI3K-AKT-mTOR通路蛋白的变化。

d. 在稳定过表达PAK4乳腺癌细胞株中使用PI3K抑制剂LY294002，应用免疫印迹检测法（Western Blotting）检测PI3K-AKT-mTOR通路蛋白的变化。

e. 通过细胞增殖实验、克隆形成实验和划痕实验验证PAK4是否促进乳腺癌细胞的增殖和迁移。

⑫验证PAK4对PI3K-AKT-mTOR信号通路的调控是否基于PAK4的蛋白激酶活性发挥作用。

a. 构建激酶持续活化和激酶灭活另外两种不同激酶活性的PAK4质粒。

b. 使用不同激酶活性的PAK4质粒转染乳腺癌细胞后检测PI3K-AKT-mTOR通路蛋白的变化。

⑬验证不同激酶活性的PAK4质粒对乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响。

a．通过细胞增殖实验、克隆形成实验验证不同激酶活性的PAK4质粒促进M231细胞增殖的能力是否不同。

b．通过划痕实验、迁移和侵袭实验验证不同激酶活性的PAK4质粒促进M231细胞迁移和侵袭的能力是否不同。

### 1.2.3 课题来源

国家重点基础研究发展计划（973）（No.2011CB70770）；国家自然科学基金（No.31271068）；

广东省乳腺癌诊治研究重点实验室（No.2060299）；

国家自然科学基金重大国际（地区）合作研究项目(No. 81320108015)。

# 第2章 材料与方法

## **2.1** 主要仪器

1．细胞培养箱（Thermo公司）；

2．超净台（苏净集团安泰公司）；

3．液氮罐MVExc47/11-6（MVE-Chart Inc公司）；

4．T-25、T-75cm2细胞培养瓶（Corning公司），96孔凹底培养板（Corning公司），96、

24及6孔培养板（Corning公司），15ml、50ml离心管（Corning公司）；

5．微量可调移液器（Eppendorf公司）；

6．pH计PHS-3C型（上海雷磁仪器厂）；

7．液闪计数仪liquid scintillation counter（Wallac公司）；

8．倒置光学显微镜（Nikon公司），免疫荧光显微镜（Nikon公司），正置显微镜及照相系统（Olympus公司）；

9．PMR-30水平摇床（Grant scientific公司）； 10．常温台式离心机、低温高速离心机（Heraeus sepatech公司）；11．Bio-Rad电泳槽及其他设备，用于western blotting；

12．PCR扩增仪GeneAmp\* PCR Systerm 9700（ABI公司）；

13．荧光定量PCR仪（CFX CONNECT; BIO-RAD公司）；

14．EOS550 照相机（Canon公司）；

15．WH-2微型漩涡混合仪（上海沪西分析仪器厂）；

16. 电热恒温干燥箱（湖南长沙医用仪器厂），电热恒温水温箱（厦门医疗设备厂），冰箱

（家用冰箱）；-80℃低温冰箱；

17. 分析天平（AE200; METTLER公司）；

18. 磁力加热搅拌器（金坛市中大仪器厂）；

19. DU70紫外分光光度计（Beckman公司）。

## **2.2** 细胞系、菌株和质粒

2.2.1细胞系：MDA-MB-231、BT-549、MCF-7、T47D及SK-BR-3人乳腺癌细胞株均购于中国上海细胞生物研究所细胞库。MDA-MB-468人乳腺癌细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院。

2.2.2菌株：E. coli Competent Cells JM109感受态细胞购于Takara公司。

2.2.3 质粒：

质粒 p3XFLAG-CMV-10（即 pCMV） 瑞典 Strömblad 教授赠送质粒 Wild-type PAK4（即 PAK4） 瑞典 Strömblad 教授赠送质粒 PAK4(Ser474E)（即 PAK4Ser） 瑞典 Strömblad 教授赠送质粒 shNC 上海吉玛公司

质粒shPAK4上海吉玛公司

质粒pcDNA3 GFP GFP购自Addgene公司

质粒pcDNA3 GFP GFP PTEN购自Addgene公司质粒PAK4K350A, K351A（即PAK4KD）

[根据文献报导设计合成[1](#_bookmark26)]

## **2.3** **一抗：见表 1**

表1 一抗资料表

Table 1 Primary antibodies

| Antibodies | Animal  source | Catalog | Working  dilution | Companies |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| AKT  P-mTOR mTOR PI3K PTEN  p-ChK2 | Rabbit Rabbit Rabbit Rabbit Rabbit  Rabbit | 2938S  5536S  5537S  4255S  9559S AC508-1 | WB (1:3000)  WB (1:2000)  WB (1:3000)  WB (1:1500)  WB (1:2000)  WB (1:3000) | Cell Signaling Cell Signaling Cell Signaling Cell Signaling Cell Signaling  Beyotime Institute of Biotechnology |
| p-P53  p53  P-ATM ATM  β-actin | Rabbit Rabbit Rabbit Rabbit  Mouse | 9284S M7001 AA866-1 2873S  sc-47778 | WB (1:3000)  WB (1:3000)  WB (1:2000)  WB (1:3000)  WB (1:3000) | Cell Signaling DAKO  Beyotime Institute of Biotechnology Cell Signaling  SantaCruz Biotechnology, Inc. |

IHC: immunohistochemistry, WB: western blotting.

## **2.4** 其他试剂：

1．PBS 平衡盐溶液（自配）每升PBS平衡盐溶液中有：

KCL 0.2g; KH2PO4 0.2g; NaCL 8g; Na2HPO4.12H2O 2.88g；

2．D-Hank's平衡盐溶液（自配）每升D-Hank's平衡盐溶液中有：

KCL 0.4g; KH2PO4 0.06g; NaCL 8g; NaHCO3 0.35g; Na2HPO4.7H2O 0.09g；

3．细胞培养液：DMEM-HG（Gibco公司）；

4．胎牛血清（Gibco公司）；

5．青霉素、链霉素（华北制药股份有限公司），EDTA和胰蛋白酶（上海生工生物工程公司）；

6．抑制剂：PAK4 抑制剂PF-3758309 (S7094; Pfizer辉瑞公司)；PI3K抑制剂LY29400

（HY-10108; Pfizer辉瑞公司)；

7．β-巯基乙醇（β-mercaptoethanol; Pfizer辉瑞公司），牛血清白蛋白（Sigma公司）；

8．RIPAl裂解液（P0013B，碧云天公司），PMSF（ST506，碧云天公司），BCA测定蛋白浓度试剂盒（P0010，碧云天公司）；

9．SDS-PAGE电泳材料：DNA ladder，Agaros(e

水溶液（10μg/μl），6×Loading Buffer ；

GIBCO公司），1×TBE电泳缓冲液，Goldview

10. Western blot所需试剂：聚丙烯酰胺凝胶贮存液（29％Acr、1.0％Bis），分离胶缓冲液

（1.5M Tris-HCL, PH 6.8），浓缩胶缓冲液（1.0M Tris-HCL, PH 8.8），TEMED，10%过硫酸铵，10%SDS，电泳缓冲液（15.1g TrisBase、94g Glycine、50ml 10%SDS加水至1000ml），电泳上样缓冲液（50mM Tris-HCL PH 6.8、50mM DTT、2％SDS、0.1％溴酚蓝、10％甘油），预染的蛋白质分子量标准，考马斯亮蓝R250 染色液，脱色液

（甲醇：水：醋酸= 45: 45: 10）；

11. 转移与印迹材料：PVDF膜，转移缓冲液（Gly14.4134g、TrisBase3.0285g、甲醇200ml加水至1000ml），牛血清白蛋白，TBS-T溶液（含0.05％Tween-20的TBS），TBS溶液（10mM Tris-HCL PH 8.0、150mM NaCl），封闭液（含1.5％牛血清白蛋白的TBS-T溶液）；

12．总RNA提取材料：RNAiso试剂，异丙醇，氯仿，75％乙醇（in DEPC-treated water），

双蒸水（free-RNase treated with DEPC, 1/1000 V/V），Eppendorf Tube与Tip(treated with DEPC water)，DEPC；

13．逆转录试剂盒：PrimeScript RT reagent Kit( DRR037A,宝生物公司)；

14. Real-time PCR试剂盒SYBR Select Master Mix（4472908, ABI）；

15. Real-time PCR引物由上海生工合成（见表2）；

表2 引物序列

Table 2 Primer sequence

| Primer | Primer pair sequence | Product (bp) |
| --- | --- | --- |
| PAK4 | 5'- ATGTGGTGGAGATGTACAACAGCTA -3'  5'- GTTCATCCTGGTGTGGGTGAC -3' | 110 |
| PI3K | 5'- CAAACAGGAGAAGAAGGATGA -3'  5'- ACACTCTTCAAGCCTGAGGTT -3' | 151 |
| GAPDH | 5'- GAGACCTTCAACACCCCAGCC -3'  5'- AATGTCACGCACGATTTCCC -3' | 264 |

16. 二抗：抗鼠和抗兔的二抗（均购自Santa Cruz公司）；

17．siRNA、shRNA及相关试剂：siPTEN、siNC、shPAK4和shNC由吉玛公司合成；

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| SiPTEN 1 |  | 5'-CACAGCTAGAACTTATCAAACC-3' |
| SiPTEN 2  shPAK4: | sense | 5'-TGCACATATCATTACACCAGTT-3'  5'-CAUGUCGGUGACACGCUCCAA-3' |
|  | Antisense | 5'-UUGGAGCGUGUCACCGACAUG-3' |

ShNC: 为pGPU6/GFP/Neo-shNC

16. DNA 限制性内切酶均购自宝生物公司，质粒制备试剂盒（minipreparation and

maxipreparation）购自天根生物有限公司(DP103, DP117)。

17. BD falcon cell culture insert（353097; BD公司）;

BD BioCoat™Matrigel™Invasion Chamber（354480；BD公司）。

## **2.5** 实验方法

### 2.5.1 细胞培养

各乳腺癌细胞系均购自中国科学院细胞库，培养在含10% 胎牛血清，1%青霉素和

1%链霉素的高糖DMEM培养基中，置于恒温37℃，5%二氧化碳的细胞培养箱中培养。

### 2.5.2 质粒合成

#### 2.5.2.1 根据文献报导[[1](#_bookmark26)]设计激酶灭活的PAK4质粒PAK4(K350A, K351A)的序列，以下简称为PAK4KD：

##### 1）载体质粒pCMV图谱：



##### 2）瑞典Strömblad教授赠送的PAK4质粒插入的原始序列为PAK4基因序列中的CDS 区

（462至2237），如下：

Atgtttgggaagaggaaga agcgggtggagatctccgcgccgtccaacttcgagcaccgcgtgcacacgggcttcgacc agcacgagcagaagttcacggggctgccccgccagtggcagagcctgatcgaggagtcgg

Ctcgccggcccaagcccctcgtcgaccccgcctgcatcacctccatccagcccggggccc ccaagaccatcgtgcggggcagcaaaggtgccaaagatggggccctcacgctgctgctgg acgagtttgagaacatgtcggtgacacgctccaactccctgcggagagacagcccgccgc cgcccgcccgtgcccgccaggaaaatgggatgccagaggagccggccaccacggccagag ggggcccagggaaggcaggcagccgaggccggttcgccggtcacagcgaggcgggtggcg gcagtggtgacaggcgacgggcggggccagagaagaggcccaagtcttccagggagggct cagggggtccccaggagtcctcccgggacaaacgccccctctccgggcctgatgtcggca ccccccagcctgctggtctggccagtggggcgaaactggcagctggccggccctttaaca cctacccgagggctgacacggaccacccatcccggggtgcccagggggagcctcatgacg tggcccctaacgggccatcagcggggggcctggccatcccccagtcctcctcctcctcct cccggcctcccacccgagcccgaggtgcccccagccctggagtgctgggaccccacgcct cagagccccagctggcccctccagcctgcacccccgccgcccctgctgttcctgggcccc ctggcccccgctcaccacagcgggagccacagcgagtatcccatgagcagttccgggctg ccctgcagctggtggtggacccaggcgacccccgctcctacctggacaacttcatcaaga ttggcgagggctccacgggcatcgtgtgcatcgccaccgtgcgcagctcgggcaagctgg tggccgtcaagaagatggacctgcgcaagcagcagaggcgcgagctgctcttcaacgagg tggtaatcatgagggactaccagcacgagaatgtggtggagatgtacaacagctacctgg tgggggacgagctctgggtggtcatggagttcctggaaggaggcgccctcaccgacatcg tcacccacaccaggatgaacgaggagcagatcgcggccgtgtgccttgcagtgctgcagg ccctgtcggtgctccacgcccagggcgtcatccaccgggacatcaagagcgactcgatcc tgctgacccatgatggcagggtgaagctgtcagactttgggttctgcgcccaggtgagca aggaagtgccccgaaggaagtcgctggtcggcacgccctactggatggccccagagctca tctcccgccttccctacgggccagaggtagacatctggtcgctggggataatggtgattg agatggtggacggagagcccccctacttcaacgagccacccctcaaagccatgaagatga ttcgggacaacctgccaccccgactgaagaacctgcacaaggtgtcgccatccctgaagg gcttcctggaccgcctgctggtgcgagaccctgcccagcgggccacggcagccgagctgc tgaagcacccattcctggccaaggcagggccgcctgccagcatcgtgcccctcatgcgcc agaaccgcaccagatga

##### 3）目的质粒PAK4KD需要将上述序列中第350位和将第351位的赖氨酸（K-Lysine ）

序列(aagaag)都突变成为丙氨酸（A-alanine）；即将原来的“aagaag”突变成“gcggct”。

#### 2.5.2.2 将瑞典Strömblad 教授赠送的PAK4 质粒，由上海吉玛公司技术部辅助合成

PAK4KD质粒（上海吉玛公司编号：A7139）。实验过程及图谱如下：

##### 1）目的片段（A7139）扩增：

根据实验设计的要求和所提供模板设计引物，通过PCR的方法扩增出足够量的目的产物。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| A7139P+ | cgacgggcggggccagagaagag | |
| A7139P(1+) | gtggccgtcgccgctatggacctgcgcaagcagc | |
| A7139P(1-) | caggtccatagcggcgacggccaccagcttgccc | |
| A7139P- | cgacgggcggggccagagaagag | |
| A7139P+/(1-) | 600bp | A7139P+/P-  1320bp  BpiI/EcoRI 连入 p3XFLAG-CMV-10  2.1K + 4.3K (EcoRI/HindIII) |
|  | 模板 |
| A7139P(1+)/P-  模板 HindIII | 750bp  /BpiI 490√+ 1.6K + |

PCR反应采用的是pfu高温聚合酶。PCR各个成分的用量：（引物浓度为1OD溶于400μl ddH2O）

第一轮PCR反应体系：50μl

|  |  |
| --- | --- |
| 客户模板 | 1μl |
| 上游引物 | 2μl |
| 下游引物 | 2μl |
| dNTP | 1μl(25mM each) |
| 10X pfu Buffer | 5μl |
| Pfu | 0.4μl(5u/μl) |
| ddH2O | 39μl |

PCR程序：95℃3min 94℃30sec

58℃30sec 22cyc 72℃60sec

72℃6min

将第一轮PCR的2个片段电泳纯化回收做第二轮全长的拼接。第二轮拼接反应体系：50μl

|  |  |
| --- | --- |
| 第一轮 PCR 产物（2 个回收片段） | 各 2μl |
| A7139P+ | 2μl |
| A7139P- | 2μl |
| dNTP | 1μl(25mM each) |

|  |  |
| --- | --- |
| 10X pfu Buffer | 5μl |
| Pfu | 0.4μl(5u/μl) |
| ddH2O | 36μl |

PCR程序：95℃3min 94℃30sec

58℃30sec 22cyc 72℃60sec

72℃6min

PCR电泳图谱如下：

A7139P+/(1-) A7139P(1+) /P- 全长A7139P+/P-

##### 2）A7139P+/P- PCR产物，客户模板与载体p3XFLAG-CMV-10酶切回收：

A7139PCR产物酶切体系：50μl

|  |  |
| --- | --- |
| A7139PCR 产物 | 20μl |
| BpiI | 1μl(10u/μl) |
| EcoRI | 1μl(10u/μl) |
| 10X Buffer BamHI | 5μl |
| ddH2O | 补足至 50μl |

以上体系放入37℃恒温水浴锅中反应3h；

|  |  |
| --- | --- |
| 模板 | 1.5μg |
| BpiI | 1μl(10u/μl) |
| HindIII | 1μl(10u/μl) |
| 10X Buffer BamHI | 5μl |
| ddH2O | 23μl |

以上体系放入37℃恒温水浴锅中反应3h；载体的酶切体系：50μl

|  |  |
| --- | --- |
| p3XFLAG-CMV-  10 | 1.5μg |

|  |  |
| --- | --- |
| HindIII | 1μl(10u/μl) |
| EcoRI | 1μl(10u/μl) |
| 10X Buffer  BamHI | 10μl |
| ddH2O | 补足至 50μl |

以上体系放入37℃恒温水浴锅中反应3h；将所需目的片段切胶回收备用。

以上酶切电泳图谱如下：



A7139PCR产物酶切电泳图模板酶切电泳图载体酶切电泳图

##### 3）目的片段与载体连接：

将回收纯化好的目的DNA片段和载体，进行连接。

A7139F连接体系：20μl连接体系：

PCR产物酶切目的片段6μl (60ng)

客户模板酶切目的片段8μl(50ng)

酶切载体3μl (80ng)

10X T4 DNAligase Buffer 2μl

T4 DNAligase 1μl (5u/μl)

ddH2O补充至20μl

上述连接混合液16℃水浴2h即可。

##### 4）转化，筛选克隆：

将上述连接液转入DH5a中，检测筛选出阳性克隆进行测序。备注：QC信息及相关图谱在发货的文件中。

#### 2.5.2.3 合成质粒PAK4KD的鉴定

1）质粒样本使用EcoRI/HindIII进行酶切电泳，电泳图如下：



2）质粒样本送测序公司测序，网络比对与设计序列相符，部分截图如下：



### 2.5.3 质粒DNA的转化：

为了收集足够的质粒进行小提和大提，需要先转化扩增。质粒有上海吉玛公司合成

shPAK4（卡那霉素抗性）、shNC（卡那霉素抗性）和PAK4KD（氨苄青霉素抗性），来自瑞典Strömblad教授赠送的质粒的pCMV（氨苄青霉素抗性）、PAK4（氨苄青霉素抗性）和PAK4Ser（氨苄青霉素抗性），还有新合成的质粒PAK4KD（氨苄青霉素抗性）。

##### 1）LB液体培养基和LB固体培养基的配制：

配制1000ml LB液体培养基：称取胰蛋白胨10g, NaCl 10g，酵母提取物5g，加去离子水900ml搅拌溶解后，用10N NaOH调PH值至7.0左右，再加去离子水至总体积为

1000ml，15磅高压蒸汽灭菌20分钟，自然冷却后贮存于4℃备用。

配制1000ml LB固体培养基：称取细菌培养用琼脂（bacto agar）15g，胰蛋白胨10g, NaCL 10g，酵母提取物5g，加去离子水800ml搅拌溶解后，用10N NaOH调PH值至7.0左右，再加入去离子水至总体积为1000ml，15磅高压下蒸气灭菌20分钟。从高压灭菌器中取出培养基，轻轻旋动摇晃以使熔解的琼脂能均匀的分布于整瓶培养基溶液中。若要加入抗生素，必须等到培养基降温于50℃以下且于培养基未凝结之前，按照质粒不同的抗性加入已配好的50mg/ml氨苄青霉素或卡那霉素，使其终浓度50μg/ml，并轻轻旋动摇晃均匀。在培养基凝结之前，按照每培养皿约30ml左右的量，将培养基从烧瓶中倒出，铺制平板。待培养基完全凝结后，倒置平皿并贮存于4℃冰箱备用。

##### 2）大肠杆菌感受态的制备

A. 将菌液分装成1ml的小份置于灭菌的1.5ml离心管中，冰浴10分钟后，立即置于4℃离心机中，4, 000rpm离心2分钟；

B. 弃去上清，细菌沉淀加入200µl预冷的100mM CaCl2溶液，轻轻吹打使细菌重新悬浮，冰浴10分钟，重复离心一次；

C. 弃去上清，细菌沉淀加入100µl预冷的100 mM CaCl2溶液，轻轻吹打使细菌重新悬浮，不能过于剧烈地振摇或吹吸。制成的感受态细菌置于4℃冰箱24-48小时后使用，转化效果比立即用于转化效果更好。若当时不用也可以加入总体积的25％-30％的甘油放置于-80℃冰箱中长期冻存。

##### 3）质粒转化感受态细菌和阳性克隆的筛选

A. 取3份上述感受态细菌，分别加入10μl预备转化的质粒载体，备阳性对照质粒，以监测同一批感受态细菌的转化效率。冰上放置30分钟至1小时，不时旋转混匀；

B. 静置42℃水浴（热休克）90秒不摇动，马上放入冰浴中2-3分钟；

C. 每管加入400μl不含抗生素的LB液体培养基，放入37℃培养箱摇床温育40分钟，恢复质粒氨苄青霉素或卡那霉素的抗性；

D. 各取100-200μl菌液滴在已制备好的含有氨苄青霉素或卡那霉素的LB固体培养基上（固体培养基先先37℃预热1小时，除去冷凝水后再使用），用无菌的三角玻璃棒均匀涂布于固体培养基表面，涂好平皿后，置于超净台中放置20分钟晾干平板，37℃培养箱中倒置培养过夜，在37℃倒置培养10-16小时，观察是否长出抗性菌落，时间不能过长，否则会出现卫星菌落；

E. 取5-8个15ml离心管，每管加入约3-5ml液态LB培养基，找出长得较大、分散的单个菌落，用无菌枪尖挑取5-8个质粒转化的克隆，垂直落入离心管中，盖上离心管盖子但不拧紧，37℃培养箱中振摇扩增细菌，扩增时间最好控制在12-16小时，然后小提质粒。

### 2.5.4 质粒小提操作步骤

##### 1） 柱平衡步骤：向吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中）加入500μl的平衡液BL，12, 000

rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（取1-5 ml过夜培养的菌液，加入离心管中，使用常规台式离心机，12, 000 rpm离心1分钟，尽量吸除上清。

向留有菌体沉淀的离心管中加入250μl溶液P1（已加入RNaseA），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

2）向离心管中加入250μl溶液P2，温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解。

3）向离心管中加入350μl溶液P3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12, 000 rpm离心10分钟。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

4）将上一步收集的上清液，用移液器转移到吸附柱CP3 中（吸附柱放入收集管中），注意尽量不要吸出沉淀。12, 000 rpm离心30-60秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

5）向吸附柱CP3中加入600μl漂洗液PW（已加入无水乙醇），12, 000 rpm离心30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

6）重复操作步骤5）。

7）将吸附柱CP3放入收集管中，12, 000 rpm离心2分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，将吸附柱CP3开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

8）将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加50-100μl洗脱缓冲液EB，室温放置2分钟，12, 000 rpm离心2分钟将质粒溶液收集到离心管中。

9）DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

### 2.5.5 质粒大提操作步骤

1）柱平衡步骤：向吸附柱CP6中（吸附柱放入50 ml收集管中）加入2.5 ml的平衡液BL, 8, 000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

2）取100 ml（根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用200 ml）过夜培养的茵液加入离心管，室温8, 000 rpm离心3分钟收集细菌，尽量吸除上清。

3）注意：菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌液量以能够充分裂解为佳，菌液过多会导致裂解不充分从而降低质粒的提取效率。

4）尽量吸除上清，为确保上清液全部吸取，请用干净的吸水纸吸去瓶壁上的水滴。

5）向留有菌体沉淀的离心管中加入8 ml溶液P1（加入RNaseA），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

6）向离心管中加入8 ml溶液P2，立即温和地上下翻转6-8次，室温放置5分钟。

7）注意：温和地混匀，不要剧烈震荡，以免污染基因组DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

8）向离心管中加入8 ml溶液P4，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置10分钟左右。8, 000 rpm离心5-10分钟，使白色沉淀离至管底（可适当增加离心时间），将全部溶液小心倒入过滤器CS 中，慢慢椎动推柄过滤，滤液收集在干净的50 ml的管中。

9）向滤液中加入0.3倍滤液体积的异丙醇（加入异丙醇过多容易导致RNA污染），上下颠倒混匀后转移到吸附柱CP6中（吸附柱放入50 ml收集管中）。

10）室温8, 000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP6重新放回收集管中。

11）向吸附柱CP6中加入10 ml漂洗液PW（已加入无水乙醇），8, 000 rpm离心2分钟，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

12）重复操作步骤11）。

13）向吸附柱CP6中加入3 ml无水乙醇，室温8, 000 rpm离心2分钟，倒掉废液。

14）将吸附柱CP6重新放回收集管中，8, 000 rpm离心5分钟，目的是将吸附柱中。

15）将吸附柱CP6置于一个干净的50 ml收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加1-2 ml洗脱缓冲液TB，室温放置5分钟，然后室温8, 000 rpm离心2分钟。将50 ml离心管中的洗脱液全部移入一个干净的1.5 ml离心管，-20℃保存。

16）DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

### 2.5.6 瞬时转染

目的是将shNC，shPAK4，pCMV，PAK4Ser，PAK4, PAK4KD这6种质粒均瞬时转染到乳腺癌细胞中，检测PAK4及其下游基因蛋白表达的变化；此外，将siPTEN和质粒pcDNA3 GFP GFP PTEN分别瞬时转染到乳腺癌细胞中，检测PTEN及其下游基因蛋白表达的变化。将转染步骤按Lipofectamine 2000转染试剂说明书进行：

1）转染前一天将生长状态良好的细胞传代至60mm培养皿中，使用无抗生素的常规培养基，置于37℃培养箱中24小时。保证在转染时的细胞汇合度大约为70%，细胞应均匀贴壁。

2）在1.5 ml离心管①中分别加入不含血清、蛋白质、抗生素的细胞生长培养基Opti-MEM I Reduced Serum Medium （优化培养基）500μl，再分别加入适量的质粒（或siPTEN）；轻轻拍打1.5 ml的离心管壁，使其混匀；室温静置2-5分钟。在另外一只1.5ml的离心管

②中加入同样的Opti-MEM I Reduced Serum Medium（优化培养基）500μl，再加入Lipofectamine2000 10μl；轻轻拍打1.5 ml的离心管壁，使其混匀；①和②管均在室温静

置5 min。

3）将上一步骤①和②中两管转染试剂混匀。室温静置30 min。

4）培养箱中取出前一天备好的细胞，用PBS洗涤一边，更换5 ml新鲜不含抗生素的常规培养基。将步骤3）中的①和②两管转染试剂混合物加至细胞培养基中，“十”形上下左右轻轻摇匀。

5）37℃、5%CO2培养箱中继续培养6小时后更换成正常培养基。

6）细胞继续培养，48小时后收集细胞样品。观察细胞形态的改变，利用TRIzol法提取总RNA以及提取总蛋白含量，检测目的基因mRNA和蛋白的表达情况。

### 2.5.7 构建稳定转染细胞系

目的是将上述6种质粒（分别是: shNC, shPAK4, pCMV, PAK4Ser, PAK4, PAK4KD）构建稳定转染乳腺癌细胞系，进行后续实验。步骤如下：

1）转染前一天将生长状态良好的细胞传代至60mm培养皿中，使用无抗生素的常规培养基，置于培养箱中24小时。保证在转染时的细胞汇合度大约为70%，细胞应均匀贴壁。

2）在1.5 ml离心管①中分别加入不含血清、蛋白质、抗生素的细胞生长培养基Opti-MEM I Reduced Serum Medium（优化培养基）500μl，再分别加入适量的质粒；轻轻拍打1.5 ml的离心管壁，使其混匀；室温静置2-5分钟。在另外一只1.5ml的离心管②中加入同样的Opti-MEM I Reduced Serum Medium（优化培养基）500μl，加入Lipofectamine2000 10μl；轻轻拍打1.5 ml的离心管壁，使其混匀；室温静置5分钟。

3）将上一步骤①和②中两管转染试剂混匀。室温静置30分钟。

4）细胞用PBS洗涤一边，更换5 ml新鲜不含抗生素的常规培养基。将步骤3）中的①和

②两管转染试剂混合物加至细胞培养基中，“十”形上下左右轻轻摇匀。

5）37℃、5%CO2培养箱中继续培养6 小时后更换成正常培养基。

6）细胞继续培养，48小时后收集部分细胞提取蛋白样品并检测蛋白浓度，WB验证是否转染成功，其余细胞转回培养皿中继续培养。

7)以含G418(1000 mg/ml) 10% FBS细胞培养基培养筛选约15天，杀死不含G418抗药性的细胞（即未转染成功的细胞），仅留下抗药性良好的细胞形成克隆。

8）抗药克隆形成后，换成500 mg/ml培养基继续培养，常规传代，冻存，进行后续实验。

### 2.5.8 Western Blotting

##### 1）细胞总蛋白的提取：

①取培养皿中生长状态良好的细胞，用37℃预热的PBS洗涤两次，根据培养皿中细胞的量加入适量含1mM PMSF的RIPA裂解液（成分为50mM Tris(pH7.4), 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS以及sodium orthovanadate, sodium fluoride，EDTA，leupeptin，购自碧云天公司），一般为50-200μl 不等，加太多裂解液会导致蛋白浓度过低导致上样困难。

②用细胞刮子分别将培养皿底部贴壁的细胞刮入裂解液中，并收集到EP管中，所有操作均在冰浴上进行，冰上放置30分钟。

③4℃、12000rpm离心15分钟，弃沉淀，将上清转移到新EP管中，将样品加入5×SDS上样缓冲液[5SDS上样缓冲液：含50mM Tris-HCl (pH 6.8)，2% SDS，10%甘油，100mM二硫苏糖醇（DTT），0.1%溴酚兰]，混匀，沸水浴中煮5-10分钟，-80度保存。

④将步骤③中的上清留出一小份（7-10μl即可）测量蛋白浓度。

##### 2）蛋白浓度的测定（BCA蛋白浓度测定试剂盒，碧云天公司）：

①根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B（50:1）配制适量

BCA工作液（计算好共需要测多少个孔，每孔需要200μl工作液），充分混匀，现用现配；

②完全溶解蛋白标准品，使终浓度为0.5mg/ml。用PBS稀释标准品，将标准品按0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20μl加到96孔板的标准品孔中，加PBS补足到20μl；

③加7μl样品到另一EP管中，加63μl的PBS补足70μl将样品稀释10倍，在96孔板每孔加入20ul稀释的样品，每个样品3个复孔；

④各孔分别加入200μl BCA工作液，37℃放置30分钟或室温放置2小时；

⑤上酶标仪，在波长562 nm处测定吸光值；

⑥根据标准曲线计算出蛋白浓度，注意测得浓度需要乘以10倍才是样品的真正浓度。

##### 3） SDS-PAGE聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳:

①先配制分离胶，分离胶的浓度根据目的蛋白的分子量可自行选择8%，10%，12%

等。现以浓度为10%的分离胶为例，配制方法如下（20ml）：

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 去离子水 | 7.9ml |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 6.7ml |
| 1.5M Tris-HCl (pH 8.8) | 5ml |
| 10%SDS | 0.2ml |
| 10%过硫酸胺 | 0.2ml |
| TEMED | 0.08ml |

②依次加入以上组分，快速混匀，在安装好的两块玻璃板中间灌注丙烯酰胺溶液，灌胶过程中注意不要出现气泡，留出体积至齿下约1.5cm，再用滴管小心覆盖一层水。

③分离胶凝固（室温下约20分钟）后倾去水层，加入浓缩胶，灌胶过程中同样注意不要出现气泡。

④配制5%的浓缩胶，方法如下（5ml）：

|  |  |
| --- | --- |
| 去离子水 | 3.4ml |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 830μl |
| 1.0M Tris-HCl (pH6.8) | 630μl |
| 10%过硫酸胺 | 50μl |
| 10%SDS | 50μl |
| TEMED | 5μl |

⑤30%聚丙烯酰胺贮存液成分为29%丙烯酰胺（Acr）加1%双甲基丙烯酰胺（Bis）。

⑥待凝胶灌制完成后，马上插入1.5mm厚样品梳，插入样品梳过程中特别需要注意不要出现气泡，胶凝固后，即可上样。

⑦按15-50μg/泳道的量，上样于PAGE胶，在蛋白的两侧加入蛋白预染Marker。

⑧样品在浓缩胶中的电压为80V，30分钟；染料进入分离胶后电压调至110V，继续电泳直到染料达到分离胶底部。

⑨电泳完毕后小心取出凝胶，切除多余部分，准备转膜。

⑩5Tris-甘氨酸电泳缓冲液：15.1g Tris-碱，94g甘氨酸溶于900ml去离子水，加50ml 10% SDS，加去离子水定容1000ml。

##### 4） 转膜：

①剪2张Whatmann 1号滤纸和1块PVDF膜，其大小同SDS-PAGE凝胶相同。将剪好PVDF膜在甲醇中浸泡30秒，水中浸泡1分钟，转膜缓冲液中浸泡5分钟。

②按转膜夹子从白到黑色的顺序安装如下：1张滤纸，SDS-PAGE凝胶，PVDF膜，1张滤纸。轻轻挤压排除气泡，80V，转膜2小时。转膜时在电泳槽中加入固体冰袋，并将

转膜槽放置4度冰箱。

③转移缓冲液（1000ml）：Tris碱，3.025g； 甘氨酸，14.4g； 甲醇，78.7g，加去离子水定容1000ml。转膜缓冲液最好在电泳时提前配制好，并放-20℃冰箱预冷。

##### 5）封闭

①转膜结束后去除滤纸，把PVDF膜浸泡在封闭液中（含5%脱脂奶粉的TBS-T溶液），慢速摇床上室温作用1小时。

②TBS-T溶液（7L）配制: NaCl, 61.6g; 1M Tris-HCl (pH8.0) 141.4g; Tween-20 3.5ml。

##### 6）一抗反应

用含有1%BSA的TBS-T溶液稀释抗体。将PVDF膜放置于封口袋中，加入稀释好的抗体。尽可能排除气泡，密封口袋。将将PVDF膜平放在平缓震动的摇床上，4℃冰箱内过夜。反应结束后，用TBS-T溶液清洗滤膜3次，每次7分钟。

##### 7）二抗反应

同样用含有1%BSA的TBS-T溶液稀释二抗，稀释液可按4: 1的比例加入含5%脱脂奶粉的TBS-T溶液（作用是可减少背景）。在PVDF膜加入二抗，稀释度为1: 1000-1:4000。室温平摇1小时，将滤膜转移至一浅托盘中，用TBS-T溶液清洗滤膜3次，每次7分钟。

##### 8）生色反应

按照ECL发光试剂盒说明书进行。在西林瓶中滴加适量等体积的A液和B液，混匀，滴加到PVDF膜上，孵育2分钟（孵育时间可根据条带的情况缩短或延长）。曝光，在显影液中适度显影，再在定影液中定影。这些操作均在暗室中进行。

### 2.5.9 Real-time PCR

1）总RNA提取

按RNAIso总RNA分离试剂盒说明书（D9108A，宝生物公司）进行。主要试验流程是：

①取生长状态良好的细胞，倒出培养液，用1×PBS清洗一次。

②每60mm培养皿中生长的培养加入1 ml的RNAiso Plus，水平放置片刻，使裂解液均匀分布于细胞表面并裂解细胞，然后使用移液枪吹打细胞使其脱落。将裂解液转移至离心管中，反复吹吸至裂解液中无明显沉淀。室温静置5分钟。

③加入氯仿（RNAiso Plus的1/5体积量），盖紧离心管盖，用手剧烈振荡15秒。待溶液充分乳化后，室温静置5分钟。

④12,000 rpm，4℃离心15分钟。

⑤从离心机中小心取出离心管，此时匀浆液分为三层，即：无色的上清液、中间的白色蛋白层及带有颜色的下层有机相。吸取上清液转移至另一新的离心管中（切忌吸出白色中间层）。

⑥向上清中加入等体积的异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀后，在15～30℃下静置10分钟。

⑦12,000 rpm，4℃离心10分钟。

⑧小心弃去上清，缓慢地沿离心管壁加入75％的乙醇l ml（切勿触及沉淀），轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁。12, 000 rpm，4℃离心5分钟后小心弃去乙醇（为了更好地去除RNA中的盐离子含量，应尽量除净乙醇）。

⑨室温干燥沉淀2～5分钟，根据目视RNA的量加入30-50μl的RNase-free水溶解，RNA沉淀完全溶解后于-80℃保存。

⑩使用核酸测定仪测定核酸浓度，使用的核酸OD值在1.7-2.0之间。

2）cDNA合成：

按照PrimeScript®RT reagent Kit说明书（DRR037A，宝生物公司）逆转录。

①按顺序加入下列成分：

|  |  |
| --- | --- |
| 5×PrimeScript® Buffer | 3μl |
| PrimeScript® RT Enzyme Mix | 0.5μl |
| Oligo dT Primer（50 μM） | 0.5μl |
| Random 6 mers（100 μM） | 0.5μl |
| Total RNA | Xμl to 0.8ug |
| RNase Free dH2O | To 10 μl |

②逆转录的转录条件如下：

37℃15分钟

85℃5秒。

③合成的cDNA保存在-20℃冰箱中或者做其他实验。

3）PCR产物扩增：

我们应用applied biosystems by life technologies公司提供的SYBR Select Master Mix(4472908, ABI)试剂盒进行real-time PCR反应。使用ABI9700. 具体的引物序列见表3.

①向0.2ml Ep管中依次加入下列成分，配成20μl反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| SYBR Select Master Mix | 10 μl |
| 上下游引物 (4uM) | 2 μl |
| 模板 cDNA | 2 μl |
| 去离子水 | 6 μl |

②PCR按照以下程序扩增：50℃预变性2分钟，95℃变性2分钟，40 cycles of 95℃15

秒，60℃延伸1分钟。溶解曲线扩增程序按照机器的设置自动加入。

### 2.5.10 细胞增殖实验（CCK-8法）

为了统计比较转染不同质粒后乳腺癌细胞增殖情况，各稳定转染细胞系均进行

CCK-8试验。方法如下：

1）将生长状态良好的各稳定转染细胞系，先0.25%胰蛋白酶消化，用10%胎牛血清的

DMEM培养液制备细胞悬液，显微镜下计数算出细胞悬液浓度，再用相同培养液稀释至每100μl约2000个细胞。

2）在96孔板中，每个样品加样5个孔，每孔100μl约2000个细胞，拍打均匀，周围一圈加入PBS填充，注意加入空培养基当空白对照；

3）分别于第0、1、2、3、4、5天在相应的样品中加入10μl的CCK-8溶液，拍打均匀，放至培养箱中避光孵育2小时；

4）酶标仪450nm处测吸光度，记录并保存数据，使用统计软件统计结果并画图。

### 2.5.11 克隆形成实验

细胞克隆形成率表示接种细胞后贴壁的细胞成活并形成克隆的数量。形成克隆的细胞必为贴壁和有增殖活力的细胞。因此克隆形成率反映细胞群体依赖性和增殖能力两个重要性状。试验方法如下：

1）取对数生长期的各组细胞，分别用0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞，并把细胞悬浮在10%胎牛血清的DMEM培养液中备用。

2）将细胞悬液作梯度倍数稀释，细胞计数（至少3次，取其平均值），然后每组细胞分别以每皿400个细胞的密度分别接种于含10mL 37℃预温培养液的培养皿中，并轻轻转动，使细胞分散均匀。置37℃5% CO2及饱和湿度的细胞培养箱中培养2周。

3）经常观察，当培养皿中出现肉眼可见的克隆时，终止培养。弃去上清液，用PBS小心浸洗2次。加纯甲醇固定，固定15分钟。然后去固定液，加适量0.1%结晶紫染色液染

15分钟，然后用流水缓慢洗去染色液，空气干燥。

4）将平皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片，用肉眼直接计数克隆，计数大于50个细胞的克隆数。最后计算克隆形成率。

5）克隆形成率=（克隆数/接种细胞数）×100% 。

### 2.5.12 划痕实验

细胞划痕实验是一种简单易行的检测细胞运动的方法，实验成本低，可以用来检测贴壁生长肿瘤细胞的侵袭转移能力。方法如下：

1）取对数生长细胞，用0.25%胰蛋白酶液消化，制成单细胞悬液接种到6孔培养板中，常规培养24-48小时；

2）待细胞长成单层，划痕之前可先让细胞撤血清饥饿12－24小时，进一步去除血清的影响；

3）用100μl的黄色枪尖在培养板上划线，PBS洗涤细胞2次，加入含10%FBS的培养基，继续培养48小时；分别在0小时，24小时，48小时时显微镜拍照观察划痕愈合情况。

2.5.13迁移、侵袭实验

目的是为了检测不同激酶活性的PAK4质粒调控乳腺癌细胞株的迁移和侵袭能力。

1）迁移实验步骤如下：

①制备细胞悬液前可先让细胞撤血清饥饿12－24小时，进一步去除血清的影响。

②胰酶消化细胞，终止消化后离心弃去培养液，用PBS洗1-2遍，用含BSA的无血清培养基重新悬浮。调整细胞密度至1-10×105，接种细胞。

③取细胞悬液200μl加入24孔板BD falcon cell culture insert （353097; BD公司）。

④24孔板下室一般加入500μl含10%FBS正常培养基，下层培养液和小室间常会有气泡产生，一旦产生气泡，下层培养液的趋化作用就减弱甚至消失了，在种板的时候要特别留心，一旦出现气泡，要将小室提起，去除气泡，再将小室放进培养板。

⑤培养细胞：培养24 小时 。

⑥结果统计，取出Transwell小室，弃去孔中培养液，用PBS洗2遍，甲醇固定30分钟，将小室适当风干。0.1%结晶紫染色20分钟，用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞，用PBS 洗

3遍。400倍显微镜下随即五个视野观察细胞，记数。

2）侵袭实验（以已经铺了matrigel（BD公司）的小室替代Transwell小室），各步骤和方法同迁移实验：

①制备细胞悬液前可先让细胞撤血清饥饿12－24小时，进一步去除血清的影响。

②消化细胞，终止消化后离心弃去培养液，用PBS洗1-2遍，用含BSA的无血清培养基重悬。调整细胞密度至1-10×10 5，接种细胞。

③取细胞悬液200μl加入24孔板BD BioCoat™Matrigel™Invasion Chambe(r

公司）。

354480; BD

④24孔板下室一般加入500μl含10%FBS正常培养基，下层培养液和小室间常会有气泡产生，一旦产生气泡，下层培养液的趋化作用就减弱甚至消失了，在种板的时候要特别留心，一旦出现气泡，要将小室提起，去除气泡，再将小室放进培养板。

⑤培养细胞：培养24小时。

⑥结果记录，取出铺了matrigel（BD公司）的小室，弃去孔中培养液，用PBS洗2遍，甲醇固定30分钟，将小室适当风干。0.1%结晶紫染色20分钟，用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞，用PBS洗3遍。400倍显微镜下随即五个视野观察细胞，记数。

### 2.5.14 数据统计及处理

所有计量资料数据以“均数±标准差”表示，结果采用SPSS 17.0统计软件进行分

析。

稳定转染shNC、shPAK4和Vector、PAK4两对成对质粒后的功能试验采用的统计方

法：CCK8 实验数据采用重复测量方差分析（Repeated Measures）；克隆形成实验数据用两独立样本t检验（Independent-Samples T Test）。

稳定转染PAK4Ser、PAK4、PAK4KD和Vector四个质粒后功能实验采用的统计方法：

CCK8 实验数据采用重复测量方差分析（Repeated Measures），克隆形成实验结果因数据资料不满足正态分布和方差齐性因而采用多个独立样本的秩和检验（Kraskal-Wallis H），迁移和侵袭实验均使用单因素方差分析（One-Way ANOVA）。

# 第3章 结果与分析

## **3.1** 乳腺癌细胞中稳定敲减**PAK4**可下调**PI3K**表达并抑制**AKT**、

**mTOR蛋白磷酸化；稳定过表达PAK4可上调PI3K表达并促进AKT、**

**mTOR蛋白磷酸化**

本课题组在前期实验表明，PAK4能在MDA-MB-231细胞中表达，且用MDA-MB-231细胞建立了稳定过表达PAK4的细胞系后发现稳定转染组细胞的增殖能力、迁移及侵袭率也是明显高于对照组。由于PI3K-AKT-mTOR是一条与肿瘤细胞增殖能力、迁移及侵袭能力相关的经典通路，因此我们想观察PAK4是否对PI3K-AKT-mTOR信号转导通路有影响。我们分别在稳定敲减PAK4（shPAK4）或稳定过表达PAK4的MDA-MB-231细胞系中观察PI3K-AKT-mTOR信号通路各蛋白的表达及其蛋白磷酸化情况。通过Western Blot分析发现，稳定敲减PAK4的乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞中PI3K蛋白表达下调，PTEN蛋白表达无明显变化，总AKT和总mTOR蛋白表达无明显变化，而p-AKT和p-mTOR蛋白表达明显下调；同时，稳定过表达PAK4的乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞中PI3K蛋白表达上调，PTEN蛋白表达无明显变化，总AKT和总mTOR蛋白表达无明显变化，而p-AKT和p-mTOR蛋白表达明细上调（见图3）。上述结果说明，PAK4可以上调PI3K的蛋白表达，促进AKT、mTOR蛋白磷酸化，也就是说PAK4有可能增强PI3K的激酶活性从而促进了AKT、mTOR蛋白磷酸化；此外，PAK4不能调控PTEN的蛋白表达，即我们可以认为在MDA-MB-231细胞系中PAK4并不能通过PTEN调控PI3K-AKT-mTOR信号通路。



图3在乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞中稳定敲减或过表达PAK4能调控PI3K、p-AKT和p-mTOR的蛋白表达。Western Blot分析稳定敲减PAK4后PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达下调，而PTEN、AKT和mTOR蛋白表达无明显变化；稳定过表达PAK4后PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达上调，而PTEN、AKT和mTOR蛋白表达无明显变化。Figure 3 PAK4 regulated the expression of PTEN、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR.

## **3.2** **PAK4**抑制剂能抑制**PI3K**的表达和抑制**AKT**、**mTOR**蛋白磷酸化

为了从另一个角度验证PAK4是PI3K-AKT-mTOR信号通路的上游基因，我们使用

PAK4抑制剂PF-3758309抑制PAK4的活性后观察PI3K-AKT-mTOR信号通路蛋白表达的变化。PF-3758309是一种PAK4小分子抑制剂[[73](#_bookmark95)]，目前已经作为抗肿瘤药物进入临床阶段的实验。我们在生长良好进入对数生长期的稳定转染PAK4的MDA-MB-231细胞和对照组细胞中分别加入文献推荐的[[74](#_bookmark96)]工作浓度梯度为0μM、0.5μM和1.0μM的PF-3758309用于抑制PAK4的活性，72小时后裂解细胞提取蛋白。通过Western Blot分析发现，随着PF-3758309工作浓度的梯度上升，实验组和对照组中PAK4和PI3K蛋白表达均出现梯度下调，总AKT和总mTOR蛋白表达无明显变化，而p-AKT和p-mTOR蛋白表达也出现与PAK4蛋白表达一致的梯度下调；稳定过表达PAK4造成的PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白上调可被PAK4抑制剂PF-3758309逆转（见图4）。这个实验结果说明，使用PAK4小分子抑制剂PF-3758309能很好的抑制PAK4的活性并下调PAK4、PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白的表达，并抑制由PAK4过表达介导的PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达上调。



图4在MDA-MB-231细胞中PAK4抑制剂PF-3758309能下调PAK4的表达并抑制PI3K-AKT-mTOR通路相关蛋白的表达。Western blot分析使用PAK4抑制剂PF-3758309后，PAK4、PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达出现与抑制剂浓度梯度一致的下调；而

AKT、mTOR蛋白表达无明显变化；过表达PAK4造成的PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达上调可被PF-3758309逆转。

Figure 4 The inhibitor of PAK4 (PF-3758309) down-regulated the expression of PAK4 and the related proteins of PI3K-AKT-mTOR pathway.

## **3.3** **PAK4**和**PTEN**可分别调控**PI3K-AKT-mTOR**通路，但**PAK4**

**和PTEN之间不存在相互调控**

在上述的结果3.1中，我们在MDA-MB-231细胞系中敲减PAK4或过表达PAK4均未见PTEN蛋白表达的变化，因此我们认为在MDA-MB-231细胞系中PAK4并不能通过

PTEN调控PI3K-AKT-mTOR信号通路。那么是否在MDA-MB-231细胞系中PTEN本来就不能调控PI3K-AKT信号通路呢？因此我们又应用siPTEN和pcDNA3 GFP GFP PTEN瞬时转染MDA-MB-231细胞，48小时后裂解细胞提取蛋白，Western Blot检测PTEN和PI3K-AKT信号通路各蛋白的变化。结果提示：敲减PTEN的乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞中PI3K蛋白表达上调，总AKT和PAK4蛋白表达无明显变化，而p-AKT蛋白表达上调；同时过表达PTEN的乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞中PI3K蛋白表达下调，总

AKT和PAK4蛋白表达无明显变化，而p-AKT蛋白表达下调（见图5）。我们的实验结果提示在MDA-MB-231细胞系中PTEN可以抑制PI3K-AKT通路，但PTEN不调控PAK4的蛋白表达。结合图3和图5，我们可以认为在MDA-MB-231细胞系中PAK4和PTEN之间并不存在相互调控的关系，PAK4并不能通过PTEN调控PI3K-AKT-mTOR信号通路。



图5在MDA-MB-231细胞中PTEN抑制PI3K、p-AKT蛋白的表达。Western Blot分析敲减PTEN后PI3K、p-AKT蛋白表达上调，而AKT、PAK4蛋白表达无明显变化；过表达PTEN后PI3K、p-AKT蛋白表达下调，而AKT、PAK4蛋白表达无明显变化。Figure 5 PTEN regulated the expression of PI3K、p-AKT in MDA-MB-231 cells.

## **3.4** **PAK4**引起的**PI3K**、**p-AKT**和**p-mTOR**蛋白表达上调能被

**PI3K抑制剂所逆转**

为了验证PAK4能促进PI3K蛋白表达或者是增强PI3K的激酶活性，从而促进AKT和mTOR蛋白磷酸化，我们使用了PI3K抑制剂LY294002进行抑制试验。LY294002是一种能够阻断PI3K[细胞信号传导](http://baike.baidu.com/view/4842998.htm)通路的[蛋白激酶抑制剂](http://baike.baidu.com/view/1958988.htm)，已被广泛应用于PI3K细胞信号传导通路的特性研究中。我们使用了文献推荐的[[75](#_bookmark97)]工作浓度为20μmol/L的LY294002作用于已稳定转染PAK4质粒和对照载体质粒的MDA-MB-231细胞，分别在加药后0h，

5h, 15h裂解细胞，提取蛋白。通过Western Blot分析发现，实验组和对照组中LY294002作用时间到5h时，PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达均出现轻微下调；当LY294002作用时间延长到15h时，PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达均明显下调；而AKT和mTOR

蛋白表达未出现明显变化；过表达PAK4造成的AKT和mTOR蛋白磷酸化可以被PI3K抑制剂LY294002大部分部分逆转（见图6）。实验结果说明，选择性作用于PI3K的蛋白激酶抑制剂LY294002能够不完全性的逆转PAK4引起的AKT和mTOR蛋白磷酸化，反过来也证明了PAK4是通过调控PI3K来促进AKT和mTOR蛋白磷酸化的。



图6 PI3K抑制剂LY294002能够大部分逆转PAK4引起的AKT和mTOR蛋白磷酸化。Western Blot分析使用PI3K抑制剂LY294002后，PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达下调；而AKT、mTOR蛋白表达无明显变化。

Figure 6 The inhibitor of PI3K (LY294002) incompletely reversed the up-regulation of p-AKT and p-mTOR proteins caused by PAK4.

## **3.5** 功能实验提示**PAK4**能提高**MDA-MB-231**细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

本课题组前期研究的迁移和侵袭实验提示，敲减或过表达PAK4可分别抑制或促进MDA-MB-231细胞的迁移及侵袭能力，说明PAK4在乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭过程中发挥着正调控作用。现在我们稳转PAK4 shRNA后进行CCK-8细胞增殖实验和划痕实验，并增加克隆形成实验，进一步验证PAK4促进MDA-MB-231细胞增殖的能力。

克隆形成实验结果采用数据两独立样本*t*检验进行分析（图7 a）：shNC组细胞克隆形成率为（55.7±4.36）%, shPAK4组细胞克隆形成率为（37.6±3.06）%，两组间有显著

的统计学差异（*t* =-5.879, *df* =4, *P* =0.004），说明shPAk4组的克隆形成率较shNC组降低；Vector组细胞克隆形成率为（57.6±2.89）%, PAK4组细胞克隆形成率为（77.3±4.21）%，两组间有显著的统计学差异（*t* =6.703, *df* =4, *P* =0.003），说明PAK4组细胞克隆形成率较Vector组升高。

CCK-8细胞增殖实验结果采用重复测量方差分析进行统计，从图7 b可直观看出各组的细胞增殖能力随时间变化的趋势；其中，shNC组与shPAK4组的CCK8 OD值随时间改变的变化趋势大致相同，shPAK4组的CCK-8 OD值较shNC组呈下降趋势（95%CI=

-0.3731～-0.2916，*P* <0.001），说明shPAK4组的细胞增殖能力较shNC组减弱；Vector组与PAK4组的CCK8 OD值随时间改变的变化趋势大致相同，PAK4组的CCK8 OD值较

Vector组呈上升趋势（95%CI= 0.1969～0.278，*P* <0.001），说明PAK4组的细胞增殖能力较Vector组增强。

划痕实验结果显示，与shNC组相比，shPAK4组的迁移潜能及愈合能力明显降低；与Vector组相比，PAK4组的划痕在24小时时基本愈合（图7 c）。既往的迁移和侵袭实验以及图7所示的其他功能实验结果说明敲减PAK4后细胞增殖、迁移及侵袭能力明显下降，过表达PAK4可以促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移及侵袭，说明PAK4在乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭过程中发挥着正调控作用。



图7克隆形成实验、CCK-8细胞增殖实验、划痕实验验证PAK4在MDA-MB-231细胞的增殖、迁移及侵袭过程中发挥着正调控作用。（其中划痕实验c图放大倍数为100×）

Figure 7 Clone formation assay, wound healing test, CCK-8 cell proliferation assay suggest that PAK4 increased cell proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells.

## **3.6** 不同激酶活性的**PAK4**质粒促进**PI3K**、**p-AKT**和**p-mTOR**蛋白表达的程度不同。

我们的研究结果提示，PAK4可上调PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达。那么PAK4究竟是通过发挥其蛋白激酶的功能来促进PI3K表达以及促进AKT、mTOR蛋白磷酸化，还是在转录和/或翻译水平促进PI3K的表达进而促进AKT、mTOR蛋白磷酸化呢？为了进一步寻找这个问题的答案，我们使用激酶活性依次下降的三种PAK4 过表达质粒

PAK4Ser（激酶持续活化）、PAK4（野生型）和PAK4KD（激酶灭活）分别稳定转染MDA-MB-231细胞，与对照组（Vector组）比较，观察它们对AKT、mTOR蛋白磷酸化以及对PI3K的影响。通过Western Blot分析发现，与Vector组比较，PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组均使PAK4、PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达有不同程度的上调；其中

PAK4蛋白在PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组三组中上调程度基本一致；PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达上调程度在PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组中依次逐渐减弱但均高于对照组（Vector组）；AKT和mTOR蛋白表达则无明显变化（见图8）。实验结果提示：PAK4质粒的激酶活性越高，下游的PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达上调程度就越高。



图8 PAK4质粒的激酶活性越高，下游的PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达上调程度就越高。PAK4蛋白在PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组三组中上调程度基本一致；PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达上调程度在PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组中依次逐渐

减弱但均高于对照组（Vector组）；AKT和mTOR蛋白表达则无明显变化。

Figure 8 The up-regulation of the expression of PI3K, p-AKT and p-mTOR was different because of the kinase activity of the 4 PAK4 plasmids was different.

## **3.7** 不同激酶活性的**PAK4**质粒对**MDA-MB-231**细胞增殖能力的影响不同

为了验证不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞增殖能力的影响程度是否与其对PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达的影响程度一致，我们分别用PAK4Ser、PAK4和PAK4KD质粒以及对照Vector质粒稳定转染MDA-MB-231细胞，再进行CCK-8细胞增殖实验和克隆形成实验，与Vector组比较，观察三个不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞增殖能力的影响。

CCK-8细胞增殖实验结果采用重复测量方差分析进行统计，对稳定转染不同激酶活性的PAK4质粒和Vector质粒后的MDA-MB-231细胞系进行增殖能力比较，以不同质粒为组间处理因素，以0、24、48、72小时为重复测量变量，进行重复测量资料的方差分析，从图9 a可直观看出，各组细胞的增殖能力随时间变化的趋势大致相同，均随时间的延长而逐渐增强；与Vector组相比，另外三组的CCK-8 OD值均呈上升趋势，组间的差异有统计学意义（F=25.729, *P* <0.001），其中PAK4Ser组的95% CI=0.1966～0.2551（*P* <0.001），

PAK4组的95% CI=0.1388～0.1972(*P* <0.001)，PAK4KD组的95% CI=0.0879～0.1464(*P*

<0.001），说明另外三组细胞随着时间延长细胞增殖能力均较Vector组强，它们的细胞增殖能力由强到弱依次为PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组。

克隆形成实验结果因数据资料不满足正态分布和方差齐性，故采用多个独立样本的秩和检验（Kraskal-Wallis H）进行分析，PAK4Ser组的平均秩次为10.67，PAK4组的平均秩次为8.33，PAK4KD组的平均秩次为5.00，Vector组的平均秩次为2.00，四组间的差异有统计学意义（Chi-Square统计量为9.974, *df* =3, *P* =0.019），说明四组细胞的克隆形成率不同，由高到低依次为PAK4Ser组（84.0±3.18）%、PAK4组（77.3±4.21）%、PAK4KD组（68.1±2.83）%, Vector组（57.6±2.89）%。上述实验说明不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞增殖能力的影响不同，激酶活性越高，使MDA-MB-231细胞的增殖能力增强越明显（见图9 b）。



图9 CCK-8细胞增殖实验和克隆形成实验验证不同激酶活性的PAK4Ser、PAK4、

PAK4KD质粒促进MDA-MB-231细胞增殖的能力不同。PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD

组促进MDA-MB-231细胞增殖的能力依次下降。

Figure 9 CCK-8 cell proliferation assay and Clone formation assay suggest that different plasmids with different kinase activity increased cell proliferation of MDA-MB-231 cells inordinately.

## **3.8** 不同激酶活性的**PAK4**质粒对**MDA-MB-231**细胞迁移和侵袭能力的影响不同

为了验证不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞迁移和侵袭能力的影响程度是否与其对PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达的影响一致，我们分别用PAK4Ser、PAK4和PAK4KD质粒以及对照Vector质粒稳定转染MDA-MB-231细胞，并进行划痕实验、迁移和侵袭实验。

划痕实验结果显示，与Vector组相比，PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组的迁移潜能及愈合能力均有不同程度增强；其中，24小时PAK4Ser组的划痕已经愈合，PAK4组的划痕在24小时时接近基本愈合，PAK4KD组的划痕也已经大部分愈合（见图10 a）。

迁移实验结果使用单因素方差分析进行统计，结果显示（见图10 b）：PAK4Ser组的细胞迁移率为（82.7±8.62）%, PAK4组的细胞迁移率为（74.0±6.0）%, PAK4KD组的细胞迁移率为（46.3±6.11）%, Vector组的细胞迁移率为（32.3±4.93）%，四组间的差异有统计学意义（*F* =38.53, *df* =3, *P* <0.001），说明四组细胞的迁移能力不同，由强到弱依次为PAK4Ser组、PAK4组、PAK4KD组和Vector组。

侵袭实验结果使用单因素方差分析进行统计，结果显示（见图10 c）：PAK4Ser组的细胞侵袭率为（58.3±2.52）%, PAK4组的细胞侵袭率为（37.0±4.58）%, PAK4KD组的细胞侵袭率为（31.7±3.51）%, Vector组的细胞侵袭率为（20.7±3.79）%，四组间的差异有统计学意义（*F* =55.58, *df* =3, *P* <0.001），说明四组细胞的侵袭能力不同，由强到弱依次为PAK4Ser组、PAK4组、PAK4KD组和Vector组。

上述实验说明不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞迁移和侵袭能力的影响不同，激酶活性越高，使MDA-MB-231细胞的迁移和侵袭的能力增强越明显。



图10划痕实验、迁移和侵袭实验验证不同激酶活性的PAK4Ser、PAK4、PAK4KD质粒促进MDA-MB-231细胞迁移和侵袭的能力不同。PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组促进MDA-MB-231细胞迁移和侵袭的能力依次下降。（划痕实验a图放大倍数100×；迁移和侵袭实验b、c图放大倍数100×）

Figure 10 Wound healing assay, [Cell migration and invasion assay](http://www.baidu.com/link?url=ZGVRLT6q5fD9bS0vGFjEVpy1Drv6RBh7_a3GL_WM1rijEq6lPmUASa8osRVvUbAux2VmxrjIPuw_OfS1PTSCKq) suggest that different plasmids with different kinase activity increased cell migration and invasion of MDA-MB-231 cells inordinately.

# 第4章 讨论

PAK4是PAKs家族II组中与肿瘤的关系最密切的一个蛋白激酶。PAK4已被证明可促进多种肿瘤细胞的存活[[76](#_bookmark98)]、增殖、迁移和侵袭[[6](#_bookmark31), [77](#_bookmark99)]，比如前列腺癌、胰腺癌、绒毛膜癌等。PAK4与乳腺癌之间的关系在近几年的研究中也相当引人注目。其中，PAK4在人类正常乳腺组织中低表达而在乳腺癌中高表达，和我们的前期研究结果相符。2010年Yang JX的文章认为PAK4与乳腺癌的进展和转移有密切的关系，并预测PAK4可能可以作为乳腺癌新的诊断和治疗靶点[[78](#_bookmark100)]；我们的前期研究通过大宗临床乳腺癌病例调查和生存分析也得出结论，PAK4可作为乳腺癌预后的预测性指标。PAK4还能在乳腺癌细胞系中调控众多信号转导通路参与乳腺癌的发生发展。PAK4在MCF7细胞中可以调控细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子P57的表达，进而促进MCF7细胞的增殖[[43](#_bookmark65)]。Wong等研究者发现在MDA-MB-231细胞中过表达PAK4后可使乳腺癌细胞形成紊乱的3D结构并更容易在裸鼠体内形成乳腺癌异种移植肿瘤[[41](#_bookmark63)]。Rafn B等的研究指出PAK4是Her2诱导半胱氨酸组织蛋白酶表达和促进乳腺癌侵袭性增强的其中一个重要的介质[[79](#_bookmark101)]。So JY等的研究发现在MCF10致瘤性细胞系中能检测到PAK4、pAKT和pErk等的过表达[[42](#_bookmark64)]。但是，作为蛋白激酶的PAK4，目前尚未有文献报道PAK4是否发挥蛋白激酶活性并通过调控何种信号转导通路蛋白磷酸化促进乳腺癌细胞的存活、增殖、迁移和侵袭。本项目组前期研究中证明PAK4可促进MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭，为了说明其机制，尝试了PAK4调控肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭相关通路ERK信号通路的研究，发现PAK4可促进ERK蛋白磷酸化，但是ERK通路其他蛋白的调控却不符合预期（将在另外一个研究项目中阐述），考虑PAK4对ERK通路的调控可能存在复杂因素，准备进一步查阅文献后继续深入研究。此后，因为PI3K-AKT-mTOR信号转导通路可促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭也已有众多文献报道[[80](#_bookmark102), [81](#_bookmark103)]，因此我们尝试研究PAK4调控PI3K-AKT-mTOR信号转导通路来揭示PAK4促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本实验研究的创新点在于**首次揭示PAK4可通过激活PI3K-AKT-mTOR通路信号蛋白的表达促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭，并尝试诠释PAK4上调PI3K蛋白表达和促进AKT和mTOR蛋白磷酸化的机制。**

首先我们在迁移和侵袭能力较强的细胞系MDA-MB-231细胞中敲减PAK4表达，通过Western Blot分析发现，稳定敲减PAK4的乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞中PI3K 蛋

白表达下调，p-AKT和p-mTOR蛋白表达明显下调，而PTEN蛋白表达无明显变化，总

AKT和总mTOR蛋白表达无明显变化；我们在MDA-MB-231细胞中过表达PAK4，通过Western Blot分析发现，PI3K蛋白表达上调，p-AKT和p-mTOR蛋白表达明显上调（见图3），而PTEN蛋白表达无明显变化，总AKT和总mTOR蛋白表达无明显变化。Fu X等人的研究在胃癌细胞中敲减PAK4可抑制AKT蛋白磷酸化[[35](#_bookmark57)]，这与本研究结果相符，进一步支持了我们认为PAK4正向调控AKT通路蛋白磷酸化的假设；本研究还发现敲减

PAK4可抑制PI3K蛋白表达，同时还可抑制AKT下游蛋白mTOR的磷酸化，并且本研究使用PAK4过表达质粒做出了与敲减PAK4相反的结果，这些是目前其他研究还没有报导过的。本研究的发现支持在MDA-MB-231细胞中PAK4激活PI3K-AKT-mTOR信号通路的假设。

PTEN是PI3K的竞争性抑制基因，PAK4能激活PI3K，那么PAK4与PTEN的关系又是如何？我们在MDA-MB-231细胞中敲减PTEN，通过Western Blot分析发现，PI3K蛋白表达上调，p-AKT蛋白表达上调，而总AKT和PAK4蛋白表达无明显变化；在MDA-MB-231细胞中过表达PTEN，通过Western Blot分析发现PI3K蛋白表达下调，

p-AKT蛋白表达下调，而总AKT和PAK4蛋白表达无明显变化（见图5）。众所周知，PTEN基因能使PIP3去磷酸化，并抑制下游AKT蛋白磷酸化[[82](#_bookmark104), [83](#_bookmark105)]。我们的实验也证明在乳腺癌MDA-MB-231细胞中PTEN也可以抑制PI3K及其下游AKT蛋白磷酸化。但是，如本研究图3和图5所示的研究结果表明，在MDA-MB-231细胞中，PAK4可正向调控PI3K-AKT-mTOR信号通路，PTEN是传统的PI3K的竞争性抑制分子可以负性调控PI3K-AKT-mTOR信号通路；但PAK4并不能调控PTEN蛋白表达，也就是说PAK4对PI3K-AKT-mTOR信号通路蛋白的调控并不通过PTEN起作用；PTEN也不能调控PAK4蛋白表达，也就是说PTEN不是PAK4的上游基因，PTEN不通过PAK4来调控

PI3K-AKT-mTOR信号通路。本研究首次探讨并报道PAK4基因和PTEN基因之间在乳腺癌MDA-MB-231细胞中不存在相互调控的作用，国内外文献并未见关于PTEN与PAK4基因之间相互调控关系的报道。既然PAK4不能通过PTEN调控PI3K，那么PAK4是如何实现对PI3K蛋白表达的调控，以及如何实现对AKT、mTOR蛋白磷酸化的调控的，其中的机制尚不明确。

为了从另一个角度印证PAK4是上游基因，能调控下游PI3K-AKT-mTOR信号通路，我们使用PAK4小分子抑制剂PF-3758309作用于稳定过表达PAK4的MDA-MB-231细胞和稳定转染Vector 质粒的MDA-MB-231 细胞。通过Western Blot 分析发现，随着

PF-3758309工作浓度的梯度上升，PAK4组和Vector组中PAK4和PI3K蛋白表达出现梯度下调，p-AKT和p-mTOR蛋白表达也出现与PAK4蛋白表达一致的梯度下调，而总AKT和总mTOR蛋白表达无明显变化；过表达PAK4造成的PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白上调可被PAK4抑制剂PF-3758309逆转（见图4）。PF-3758309是一种作用较强的PAK4激酶域的ATP竞争性抑制剂[[73](#_bookmark95)]，通过竞争性抑制ATP对未活化PAK4的激活起抑制PAK4的作用。本实验结果说明，使用PAK4小分子抑制剂PF-3758309能很好的抑制PAK4的激酶活性并下调PAK4蛋白的表达，抑制由PAK4介导的PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达上调，从而起抑制PI3K-AKT-mTOR信号通路的作用。实验结果符合预期，我们通过这个实验从另一个侧面验证了，PAK4能作为上游基因激活下游PI3K-AKT-mTOR信号通路。

此外，为了多角度印证PAK4是PI3K的上游基因，我们还使用PI3K抑制剂LY294002作用于稳定过表达PAK4质粒的MDA-MB-231细胞和稳定转染Vector质粒的MDA-MB-231细胞。通过Western Blot分析发现，PAK4组和Vector组中加入LY294002作用时间到5小时，PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达均出现轻微下调；当LY294002作用时间延长到15小时，PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达均明显下调；而AKT和mTOR蛋白表达在5小时和15小时两个时间段均未出现明显变化；过表达PAK4造成的AKT和mTOR蛋白磷酸化可以被PI3K抑制剂LY294002大部分部分逆转（见图6）。LY294002是一种高选择性PI3K抑制剂，它是第一个人工合成的PI3Kα/δ/β抑制剂，能很好的抑制

PI3K的激酶活性，抑制PI3K下游AKT和mTOR蛋白磷酸化[[84](#_bookmark106)]。实验结果说明，选择性作用于PI3K的蛋白激酶抑制剂LY294002能够不完全性的逆转PAK4引起的AKT 和

mTOR蛋白磷酸化，PAK4对AKT和mTOR蛋白磷酸化的促进作用可以因PI3K活性被抑制而大部分被抵消，也就是说PAK4可通过调控PI3K来促进下游蛋白AKT和mTOR磷酸化的，证明PAK4是PI3K的上游基因。

2013年Wong等研究者发现当PAK4表达受抑制的时候，MDA-MB-231细胞增殖、迁移能力是下降的[[41](#_bookmark63)]。我们的研究用稳定转染了shNC、shPAK4、Vector和PAK4质粒的四个MDA-MB-231细胞系做系列功能实验，用于观察PAK4对MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。克隆形成实验数据结果采用两独立样本t检验进行分析（图

7 a）：shNC 组细胞克隆形成率为（55.7±4.36）%, shPAK4 组细胞克隆形成率为

（37.6±3.06）%，两组间有显著的统计学差异（t =-5.879, df =4, P =0.004），说明shPAk4

组的克隆形成率较shNC组降低；Vector组细胞克隆形成率为（57.6±2.89）%, PAK4 组

细胞克隆形成率为（77.3±4.21）%，两组间有显著的统计学差异（*t* =6.703, *df* =4, *P* =0.003），说明PAK4组细胞克隆形成率较Vector组升高。CCK-8细胞增殖实验结果采用重复测量方差分析进行统计，从图7 b可直观看出各组的细胞增殖能力随时间变化的趋势；其中，

shNC组与shPAK4组的CCK8 OD值随时间改变的变化趋势大致相同，shPAK4组的CCK-8 OD值较shNC组呈下降趋势（95%CI= -0.3731～-0.2916, *P* <0.001），说明shPAK4组的细胞增殖能力较shNC组减弱；Vector组与PAK4组的CCK8 OD值随时间改变的变化趋势大致相同，PAK4组的CCK8 OD值较Vector组呈上升趋势（95%CI= 0.1969～0.278，*P*

<0.001），说明PAK4 组的细胞增殖能力较Vector 组增强。划痕实验结果显示，与shNC组相比，shPAK4组的迁移潜能及愈合能力明显降低；与Vector组相比，PAK4组的划痕在24小时时基本愈合（图7 c）。本课题组前期实验中的迁移和侵袭实验以及图7所示的其他功能实验结果说明敲减PAK4后乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力明显下降，而过表达PAK4可以促进乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭。本研究结果中，敲减PAK4抑制MDA-MB-231细胞增殖和迁移与Wong等的研究一致。本研究还进一步研究了反面，过表达PAK4对MDA-MB-231细胞增殖和迁移，更详实的证明了PAK4基因促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭。

到目前为止**我们的研究证明了PAK4作为上游基因可上调PI3K的蛋白表达，并促进**

**AKT和mTOR蛋白磷酸化，而且证明了PAK4可能是通过调控PI3K-AKT-mTOR信号转导通路促进MDA-MB-231乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭。**为了探讨PAK4激活PI3K-AKT-mTOR通路的机制，进一步验证PAK4是否通过发挥蛋白激酶的作用激活PI3K-AKT-mTOR通路，我们使用了不同激酶活性的PAK4质粒（分别是对照质粒Vector，激酶持续活化质粒PAK4Ser，野生型质粒PAK4，和激酶灭活质粒PAK4KD）稳定转染MDA-MB-231细胞并观察PI3K-AKT-mTOR信号转导通路相关蛋白的表达变化。野生型

PAK4质粒中PAK4序列的第474位氨基酸为丝氨酸，在PAK4Ser质粒中PAK4序列第474

位丝氨酸被突变成为谷氨酸，这样的突变导致蛋白激酶出现持续活化的激酶活性[[85-87](#_bookmark107)]。

PAK4质粒中PAK4序列的第350和第351位氨基酸均为的保守赖氨酸，在PAK4KD质粒中这两个保守的赖氨酸均被突变成为没有磷酸化作用的残基蛋氨酸，这样的突变导致丝氨酸/苏氨酸激酶PAK4所有的ATP结合位点受到破坏，故PAK4KD质粒不具备激酶活性无法使下游蛋白磷酸化[[88](#_bookmark108)]。通过Western Blot分析发现，与Vector组比较，PAK4Ser组、

PAK4组和PAK4KD组均使PAK4、PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达有不同程度的上调；其中PAK4蛋白在PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组三组中上调程度基本一致；PI3K、

p- AKT和p-mTOR蛋白表达上调程度在PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组中依次逐渐降低但均高于Vector组；AKT和mTOR蛋白表达则无明显变化（见图8）。三个PAK4质粒中PAK4Ser质粒激酶活性最高，PAK4质粒激酶活性次之，PAK4KD质粒激酶活性最弱，所以才导致结果出现PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达上调程度在PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组中依次逐渐降低的情况。实验结果证明了**PAK4发挥蛋白激酶的活性上调PI3K蛋白的表达并促进AKT、mTOR蛋白磷酸化修饰；PAK4质粒的蛋白激酶活性越高，对p-AKT和p-mTOR蛋白磷酸化以及对PI3K蛋白表达的上调就越明显。**但是当激酶灭活的时候，为什么PI3K、p-AKT和p-mTOR蛋白表达仍较Vector组有所上调，目前的实验结果仍然不能解释，我们考虑其中的原因可能与PAK4基因除了发挥蛋白激酶活性以外，PAK4基因本身还可能在基因转录或翻译水平调控PI3K信号通路，这有待进一步的实验证明。

既然当PAK4的蛋白激酶活性不同的时候，PAK4对p-AKT和p-mTOR蛋白磷酸化以及对PI3K蛋白表达上调程度就不一样，那么我们想验证当PAK4的蛋白激酶活性不同的时候，PAK4对乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响是否不同。因此我们分别用

Vector、PAK4Ser、PAK4和PAK4KD质粒稳定转染MDA-MB-231细胞，再进行后续的功能实验，观察三个不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞增殖能力的影响。CCK-8 细胞增殖实验结果采用重复测量方差分析进行统计，对稳定转染不同激酶活性的

PAK4质粒和Vector质粒后的MDA-MB-231细胞系进行增殖能力比较，以不同质粒为组间处理因素，以0、24、48、72小时为重复测量变量，进行重复测量资料的方差分析，从图9 a可直观看出，各组细胞的增殖能力随时间变化的趋势大致相同，均随时间的延长而逐渐增强；与Vector组相比，另外三组的CCK-8 OD值均呈上升趋势，组间的差异有统计学意义（F=25.729, *P* <0.001），其中PAK4Ser组的95% CI=0.1966～0.2551（*P* <0.001），

PAK4组的95% CI=0.1388～0.1972(*P* <0.001)，PAK4KD组的95% CI=0.0879～0.1464(*P*

<0.001），说明另外三组细胞随着时间延长细胞增殖能力均较Vector组强，它们的细胞增殖能力由强到弱依次为PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组。克隆形成实验结果因数据资料不满足正态分布和方差齐性，故采用多个独立样本的秩和检验（Kraskal-Wallis H）进行分析，PAK4Ser组的平均秩次为10.67，PAK4组的平均秩次为8.33，PAK4KD组的平均秩次为5.00，Vector组的平均秩次为2.00，四组间的差异有统计学意义（Chi-Square统计量为9.974, *df* =3, *P* =0.019），说明四组细胞的克隆形成率不同，由高到低依次为PAK4Ser组(84.0±3.18) %、PAK4 组（77.3±4.21）%、PAK4KD 组（68.1±2.83）%, Vector 组

（57.6±2.89）%，克隆形成实验说明不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞增殖能力的影响不同，激酶活性越高，使MDA-MB-231细胞的增殖能力增强越明显（见图9 b）。划痕实验结果显示，与Vector组相比，PAK4Ser组、PAK4组和PAK4KD组的迁移潜能及愈合能力均有不同程度增强；其中，24小时PAK4Ser组的划痕已经愈合，PAK4组的划痕在24小时接近基本愈合，PAK4KD组的划痕也已经大部分愈合（见图10 a）。迁移实验结果使用单因素方差分析进行统计，结果显示（见图10 b）：PAK4Ser组的细胞迁移率为（82.7±8.62）%, PAK4组的细胞迁移率为（74.0±6.0）%, PAK4KD组的细胞迁移率为（46.3±6.11）%, Vector组的细胞迁移率为（32.3±4.93）%，四组间的差异有统计学意义（*F* =38.53, *df* =3, *P* <0.001），说明四组细胞的迁移能力不同，由强到弱依次为

PAK4Ser组、PAK4组、PAK4KD组和Vector组。侵袭实验结果使用单因素方差分析进行统计，结果显示（见图10 c）：PAK4Ser组的细胞侵袭率为（58.3±2.52）%, PAK4组的细胞侵袭率为（37.0±4.58）%, PAK4KD组的细胞侵袭率为（31.7±3.51）%, Vector组的细胞侵袭率为（20.7±3.79）%，四组间的差异有统计学意义（*F* =55.58, *df* =3, *P* <0.001），说明四组细胞的侵袭能力不同，由强到弱依次为PAK4Ser组、PAK4组、PAK4KD组和

Vector组。上述实验说明不同激酶活性的PAK4质粒对MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响不同，PAK4质粒激酶活性越高，促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的能力越大。其机制可能如前面的实验所示，不同激酶活性的PAK4质粒对p-AKT和p-mTOR蛋白磷酸化以及对PI3K蛋白表达上调程度不同，不同激活程度的PI3K-AKT-mTOR信号通路对MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响不同。**本研究首次报道了不同激酶活性的PAK4质粒对乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响不同，PAK4质粒激酶活性越高，促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的能力越大**。但是为什么激酶灭活质粒PAK4KD仍然能比Vector质粒更能促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的能力，目前的实验结果尚不能证明，我们考虑可能PAK4基因本身还在通过基因转录或翻译等其他途径调控PI3K-AKT-mTOR信号通路，进而促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的能力，这有待进一步实验证明。

通过这次使用三个不同激酶活性的质粒进行的系列实验，我们验证了当PAK4的蛋白激酶活性越高时，对PI3K蛋白表达以及p-AKT、p-mTOR蛋白磷酸化的上调就越明显，增强MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的能力就越大。因此我们认为，PAK4可通过发挥蛋白激酶活性来激活PI3K-AKT-mTOR信号转导通路，并藉此影响MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的能力**。**但是，激酶灭活的PAK4KD质粒相比Vector质粒为什么还

能激活PI3K-AKT-mTOR信号转导通路，并促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的能力，目前的实验尚无法解释，我们考虑其中的原因可能与PAK4基因除了发挥蛋白激酶活性以外，PAK4基因本身还可能存在基因转录或翻译水平等其他途径可激PI3K-AKT-mTOR信号通路，甚至调控其他信号通路，导致了促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭。

# 第5章 结论

乳腺癌是女性癌症患者的第二大死因。原发乳腺癌并不致命，但乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭性导致乳腺癌细胞侵袭其他器官甚至全身转移则常常是乳腺癌患者因癌致死的主要原因。乳腺癌的肿瘤信号转导蛋白磷酸化异常是导致乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭性增强的主要机制之一。阐明乳腺癌的肿瘤信号转导蛋白磷酸化和去磷酸化的分子机制，有助于阐明乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制有重大意义。PAK4是与肿瘤密切相关的蛋白激酶之一，PAK4与乳腺癌的关系日益受到关注。PAK4与促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的信号转导通路PI3K-AKT-mTOR通路之间的关系也被众多研究者揭示。但是在乳腺癌中PAK4与PI3K-AKT-mTOR通路的关系尚不明确。本研究综合了RNA干扰、质粒转染过表达、质粒构建技术、免疫印迹、荧光定量PCR、CCK-8细胞增殖实验、克隆形成实验、划痕实验、迁移和侵袭实验等技术方法，在MDA-MB-231细胞中深入探索PAK4调控PI3K-AKT-mTOR信号转导通路的机制，揭示PAK4是否通过发挥其蛋白激酶活性促进PI3K-AKT-mTOR信号转导通路蛋白磷酸化，为阐明乳腺癌的转移机制和进一步开发利用蛋白激酶抑制剂向乳腺癌的治疗提供新的理论依据。本研究的主要结论有：

1. MDA-MB-231细胞中PAK4能发挥其蛋白激酶活性上调PI3K的蛋白表达；

2. MDA-MB-231细胞中PAK4能促进AKT、mTOR蛋白磷酸化；

3. MDA-MB-231细胞中PAK4不能调控PTEN的蛋白表达，PTEN也不能调控PAK4的表达；

4. MDA-MB-231细胞中PAK4能通过调控PI3K实现对AKT、mTOR蛋白磷酸化的促进作用；

5. MDA-MB-231细胞中PAK4可通过发挥蛋白激酶活性激活PI3K-AKT-mTOR信号转导通路，进而促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

# 第6章 问题和展望

文献报道PAK4与PI3K-AKT-mTOR信号通路时，并不尽然都认为PAK4是PI3K-AKT-mTOR信号通路的上游基因。比如，Claire M.等认为在肝细胞生长因子刺激上皮细胞中PAK4可被PI3K激活[[89](#_bookmark109)]；Zhang HJ等认为在绒毛膜癌细胞中PI3K可激活PAK4促进癌细胞的增殖、迁移和侵袭[[77](#_bookmark99)]。此外，还有Tabusa H等研究发现在结肠癌细胞中敲减PAK4并不能调控PI3K信号通路[[13](#_bookmark35)]。尽管如此，我们前言所述的众多文献观点以及我们的研究结果仍然支持在MDA-MB-231细胞中PAK4可以调控PI3K-AKT-mTOR信号通路，并且PAK4除了发挥激酶活性调控PI3K-AKT-mTOR信号通路，可能还可以通过调控基因转录或蛋白翻译促进PI3K信号通路的活性。而我们的研究目前存在的问题是，仍无法证明PAK4是如何调控PI3K的，到底是直接调控还是通过间接调控仍未知。众所周知，EGFR是PI3K的上游基因[[90](#_bookmark110), [91](#_bookmark111)]，而近几年有研究表明PAK4可作为上游基因调控

EGFR甚至调控Her2-4 [[5](#_bookmark30), [40](#_bookmark62)]，因此我们认为可能乳腺癌MDA-MB-231细胞株存在PAK4-EGFR-PI3K-AKT-mTOR信号通路。这将是我们未来的实验研究的方向之一。此外，我们可能也会尝试设计系列实验去验证PAK4是否可直接调控PI3K，以及PI3K是否可反过来调控PAK4。

参考文献

[1]. Callow, M. G., et al., *Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines.* J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 550-8.

[2]. Siegel, R. L., K. D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015.* CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.

[3]. 全国肿瘤登记中心, *2013* 年中国肿瘤登记工作总结, 2014.

*[4].* Liu, Y., et al., *The pak4 protein kinase plays a key role in cell survival and tumorigenesis in athymic mice.* Mol Cancer Res, 2008. **6**(7): p. 1215-24.

[5]. Siu, M. K., et al., *p21-activated kinase 4 regulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and invasion and contributes to poor prognosis in patients.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(43): p. 18622-7.

[6]. Wells, C. M., et al., *PAK4: a pluripotent kinase that regulates prostate cancer cell adhesion.* J Cell Sci, 2010.**123**(Pt 10): p. 1663-73.

[7]. Jin, D., J. Durgan, and A. Hall, *Functional crosstalk between Cdc42 and two downstream targets Par6B and PAK4.* Biochem J, 2015.

[8]. Bhardwaj, A., et al., *CXCL12/CXCR4 signaling counteracts docetaxel-induced microtubule stabilization via p21-activated kinase 4-dependent activation of LIM domain kinase 1.* Oncotarget, 2014. **5**(22): p. 11490-500.

[9]. Sun, X., et al., *Inhibition of p21-activated kinase 4 expression suppresses the proliferation of Hep-2 laryngeal carcinoma cells via activation of the ATM/Chk1/2/p53 pathway.* Int J Oncol, 2013. **42**(2): p. 683-9.

[10]. Paliouras, G. N., M. A. Naujokas, and M. Park, *Pak4, a novel Gab1 binding partner, modulates cell migration and invasion by the Met receptor.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(11): p. 3018-32.

[11]. Ahmed, T., et al., *A PAK4-LIMK1 pathway drives prostate cancer cell migration downstream of HGF.* Cell Signal, 2008. **20**(7): p. 1320-8.

[12]. Baldassa, S., et al., *N-terminal interaction domain implicates PAK4 in translational regulation and reveals novel cellular localization signals.* J Cell Physiol, 2010. **224**(3): p. 722-33.

[13]. Tabusa, H., T. Brooks, and A. J. Massey, *Knockdown of PAK4 or PAK1 inhibits the proliferation of mutant KRAS colon cancer cells independently of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling.* Mol Cancer Res, 2013. **11**(2): p. 109-21.

[14]. Eswaran, J., et al., *UnPAKing the class differences among p21-activated kinases.* Trends Biochem Sci, 2008.**33**(8): p. 394-403.

[15]. Mak, G. W., et al., *Overexpression of a novel activator of PAK4, the CDK5 kinase-associated protein CDK5RAP3, promotes hepatocellular carcinoma metastasis.* Cancer Res, 2011. **71**(8): p. 2949-58.

[16]. Wells, C. M. and G. E. Jones, *The emerging importance of group II PAKs.* Biochem J, 2010. **425**(3): p. 465-73.

[17]. Setti, A., et al., *Structural insights into the extra cellular segment of integrinbeta5 and molecular interaction studies.* J Recept Signal Transduct Res, 2013. **33**(5): p. 319-24.

[18]. Liu, W., et al., *p21-Activated kinase 4 predicts early recurrence and poor survival in patients with nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma.* Urol Oncol, 2015.

[19]. Radu, M., et al., *PAK signalling during the development and progression of cancer.* Nat Rev Cancer, 2014.

**[14]** (1): p. 13-25.

20. Jaffer, Z. M. and J. Chernoff, *p21-activated kinases: three more join the Pak.* Int J Biochem Cell Biol, 2002.

**34**(7): p. 713-7.

*21.* Dammann, K., V. Khare, and C. Gasche, *Republished: tracing PAKs from GI inflammation to cancer.*

Postgrad Med J, 2014. **90**(1069): p. 657-68.

22. Baskaran, Y., et al., *Group I and II mammalian PAKs have different modes of activation by Cdc42.* EMBO Rep, 2012. **13**(7): p. 653-9.

*23.* Ha, B. H., et al., *Type II p21-activated kinases (PAKs) are regulated by an autoinhibitory pseudosubstrate.*

Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(40): p. 16107-12.

24. Bokoch, G. M., *Biology of the p21-activated kinases.* Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 743-81.

25. Ye, D. Z. and J. Field, *PAK signaling in cancer.* Cell Logist, 2012. **2**(2): p. 105-116.

26. Vadlamudi, R. K. and R. Kumar, *P21-activated kinases in human cancer.* Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(4): p. 385-93.

27. King, H., N. S. Nicholas, and C. M. Wells, *Role of p-21-activated kinases in cancer progression.* Int Rev Cell Mol Biol, 2014. **309**: p. 347-87.

28. Qu, J., et al., *PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(20): p. 7122-33.

29. Begum, A., et al., *Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma.* Cancer Sci, 2009. **100**(10): p. 1908-16.

30. Kimmelman, A. C., et al., *Genomic alterations link Rho family of GTPases to the highly invasive phenotype of pancreas cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19372-7.

31. Thompson, F. H., et al., *Amplification of 19q13.1-q13.2 sequences in ovarian cancer. G-band, FISH, and molecular studies.* Cancer Genet Cytogenet, 1996. **87**(1): p. 55-62.

32. Eswaran, J., M. Soundararajan, and S. Knapp, *Targeting group II PAKs in cancer and metastasis.* Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 209-17.

33. Whale, A., et al., *Signalling to cancer cell invasion through PAK family kinases.* Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 849-64.

34. Li, X., et al., *DGCR6L, a novel PAK4 interaction protein, regulates PAK4-mediated migration of human gastric cancer cell via LIMK1.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(1): p. 70-9.

35. Fu, X., et al., *PAK4 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells via PI3K/Akt- and MEK/Erk-dependent pathways.* Biosci Rep, 2014.

36. Ryu, B. J., et al., *PF-3758309, p21-activated kinase 4 inhibitor, suppresses migration and invasion of A549 human lung cancer cells via regulation of CREB, NF-kappaB, and beta-catenin signalings.* Mol Cell Biochem, 2014. **389**(1-2): p. 69-77.

37. Park, M. H., et al., *p21-Activated kinase 4 promotes prostate cancer progression through CREB.* Oncogene, 2013. **32**(19): p. 2475-82.

38. Zhang, H., et al., *P21-activated kinase 4 interacts with integrin alpha v beta 5 and regulates alpha v beta 5-mediated cell migration.* J Cell Biol, 2002. **158**(7): p. 1287-97.

39. Liu, Y., et al., *The protein kinase Pak4 disrupts mammary acinar architecture and promotes mammary tumorigenesis.* Oncogene, 2010. **29**(44): p. 5883-94.

40. Kesanakurti, D., et al., *Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma.* Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e445.

41. Wong, L. E., et al., *The Pak4 protein kinase is required for oncogenic transformation of MDA-MB-231 breast cancer cells.* Oncogenesis, 2013. **2**: p. e50.

42. So, J. Y., et al., *Differential Expression of Key Signaling Proteins in MCF10 Cell Lines, a Human Breast Cancer Progression Model.* Mol Cell Pharmacol, 2012. **4**(1): p. 31-40.

*43.* Li, Y., et al., *P21-activated kinase 4 regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor p57(kip2) in human*

*Breast cancer.* Anat Rec (Hoboken), 2013. **296**(10): p. 1561-7.

44. Yu, W., et al., *Chromosomal changes in aggressive breast cancers with basal-like features.* Cancer Genet Cytogenet, 2009. **193**(1): p. 29-37.

45. Eto, M. and D. L. Brautigan, *Endogenous inhibitor proteins that connect Ser/Thr kinases and phosphatases in cell signaling.* IUBMB Life, 2012. **64**(9): p. 732-9.

46. Raggiaschi, R., S. Gotta, and G. C. Terstappen, ***Phosphoproteome analysis****.* Biosci Rep, 2005. **25**(1-2): p. 33-44.

47. Chen, C., et al., *Identification of a major determinant for serine-threonine kinase phosphoacceptor specificity.* Mol Cell, 2014. **53**(1): p. 140-7.

48. Wang, Z., et al., *MiR-145 regulates PAK4 via the MAPK pathway and exhibits an antitumor effect in human colon cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **427**(3): p. 444-9.

49. Barac, A., et al., *Direct interaction of p21-activated kinase 4 with PDZ-RhoGEF, a G protein-linked Rho guanine exchange factor.* J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 6182-9.

50. Callow, M. G., et al., *PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 9): p. 1861-72.

51. Spratley, S. J., et al., *Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4.* J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 34254-61.

52. Soosairajah, J., et al., *Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin.* EMBO J, 2005. **24**(3): p. 473-86.

53. Fruman, D. A. and C. Rommel, *PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities.* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(2): p. 140-56.

54. Rexer, B. N. and C. L. Arteaga, *Optimal targeting of HER2-PI3K signaling in breast cancer: mechanistic insights and clinical implications.* Cancer Res, 2013. **73**(13): p. 3817-20.

55. Fry, M. J., *Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play*BreastCancerRes, 2001. **3**(5): p. 304-12.

56. Thorpe, L. M., H. Yuzugullu, and J. J. Zhao, *PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting.* Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 7-24.

57. Voigt, P., et al., *Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma.* J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 5121-7.

58. Ikonomov, O. C., et al., *Class III PI 3-kinase is the main source of PtdIns3P substrate and membrane recruitment signal for PIKfyve constitutive function in podocyte endomembrane homeostasis.* Biochim Biophys Acta, 2015.

59. Ikegami, Y., et al., *SH3 domain of the phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit is responsible for the formation of a sequestration complex with insulin receptor substrate-1.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **365**(3): p. 433-8.

60. Gordon, A., H. Swartz, and H. Shwartz, *3,5,3' Triiodo-L-thyronine stimulates 2-deoxy-D-glucose transport into L6 muscle cells through the phosphorylation of insulin receptor beta and the activation of PI-3k.* Thyroid, 2006. **16**(6): p. 521-9.

61. Ma, X. and Y. Hu, *Targeting PI3K/Akt/mTOR cascade: the medicinal potential, updated research highlights and challenges ahead.* Curr Med Chem, 2013. **20**(24): p. 2991-3010.

62. Cassinelli, G., et al., *Targeting the Akt kinase to modulate survival, invasiveness and drug resistance of cancer cells.* Curr Med Chem, 2013. **20**(15): p. 1923-45.

63. Georgescu, M. M., *PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control.* Genes Cancer, 2010.

**1**(12): p. 1170-7.

*64.* Roelants, F. M., P. D. Torrance, and J. Thorner, *Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in*

*The yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9.* Microbiology, 2004. **150**(Pt 10): p. 3289-304.

65. Fine, B., et al., *Activation of the PI3K pathway in cancer through inhibition of PTEN by exchange factor P-REX2a.* Science, 2009. **325**(5945): p. 1261-5.

66. Showkat, M., M. A. Beigh, and K. I. Andrabi, *mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions.* Mol Biol Int, 2014. **2014**: p. 686984.

67. Ekim, B., et al., *mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression.* Mol Cell Biol, 2011. **31**(14): p. 2787-801.

68. Hanahan, D. and R. A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.

69. Hubbard, P. A., C. L. Moody, and R. Murali, *Allosteric modulation of Ras and the PI3K/AKT/mTOR pathway: emerging therapeutic opportunities.* Front Physiol, 2014. **5**: p. 478.

70. Yang, Y., et al., *Activation of Rac1-PI3K/Akt is required for epidermal growth factor-induced PAK1 activation and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells.* J Biomed Res, 2011. **25**(4): p. 237-45.

71. Thorpe, L. M., H. Yuzugullu, and J. J. Zhao, *PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting.* Nat Rev Cancer, 2014. **15**(1): p. 7-24.

72. Hennessy, B. T., et al., *Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery.* Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(12): p. 988-1004.

73. Murray, B. W., et al., *Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9446-51.

74. Whale, A. D., et al., *PAK4 kinase activity and somatic mutation promote carcinoma cell motility and influence inhibitor sensitivity.* Oncogene, 2013. **32**(16): p. 2114-20.

75. Chang, K. Y., et al., *Novel phosphoinositide 3-kinase/mTOR dual inhibitor, NVP-BGT226, displays potent growth-inhibitory activity against human head and neck cancer cells in vitro and in vivo.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(22): p. 7116-26.

76. Gnesutta, N. and A. Minden, *Death receptor-induced activation of initiator caspase 8 is antagonized by serine/threonine kinase PAK4.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7838-48.

77. Zhang, H. J., et al., *Overexpressed PAK4 promotes proliferation, migration and invasion of choriocarcinoma.* Carcinogenesis, 2011. **32**(5): p. 765-71.

78. Yang, J. X., et al., *[Expression of PAK4 in breast cancer and benign breast pathological changes].* Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010. **30**(5): p. 981-3.

79. Rafn, B., et al., *ErbB2-driven breast cancer cell invasion depends on a complex signaling network activating myeloid zinc finger-1-dependent cathepsin B expression.* Mol Cell, 2012. **45**(6): p. 764-76.

80. Miller, T. W., et al., *Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer.* Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. 224.

81. Baselga, J., *Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer.* Oncologist, 2011. **16 Suppl 1**: p. 12-9.

82. Maehama, T. and J. E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.* J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.

83. Cantley, L. C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway.* Science, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.

84. Yap, T. A., et al., *Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises.* Curr Opin Pharmacol, 2008. **8**(4): p. 393-412.

85. Abo, A., et al., *PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia.* EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6527-40.

86. Benner, G. E., P. B. Dennis, and R. A. Masaracchia, *Activation of an S6/H4 kinase (PAK 65) from human placenta by intramolecular and intermolecular autophosphorylation.* J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21121-8.

87. Szczepanowska, J., et al., *Identification by mass spectrometry of the phosphorylated residue responsible for activation of the catalytic domain of myosin I heavy chain kinase, a member of the PAK/STE20 family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8503-8.

88. Hanks, S. K., A. M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.* Science, 1988. **241**(4861): p. 42-52.

89. Wells, C. M., A. Abo, and A. J. Ridley, *PAK4 is activated via PI3K in HGF-stimulated epithelial cells.* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 20): p. 3947-56.

90. Duan, H., L. Qu, and C. Shou, *Activation of EGFR-PI3K-AKT signaling is required for Mycoplasma hyorhinis-promoted gastric cancer cell migration.* Cancer Cell Int, 2014. **14**(1): p. 135.

91. Li, W. Q., et al., *Genetic variants in epidermal growth factor receptor pathway genes and risk of esophageal squamous cell carcinoma and gastric cancer in a Chinese population.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68999.

# 个人简介

**1. 基本信息：**

许宏武，男，1979年7月出Th，广东惠来人，汕头大学医学院肿瘤学博士研究Th。

**2. 教育背景：**

2011/09-现在，汕头大学，医学院，博士研究Th，肿瘤学

2004/09-2007/06, 汕头大学，医学院，硕士，外科学

1999/09-2004/06, 汕头大学，医学院，学士，临床医学

**3. 工作经历**

2014/11-现在 汕头大学医学院第二附属医院神经外科 副主任医师

2010/05-2014/10 汕头大学医学院第二附属医院神经外科 主治医师

2004/07-2010/04 汕头大学医学院第二附属医院神经外科 住院医师

致谢

衷心感谢我的导师张国君教授，在百忙之中悉心指导我完成博士学业和论文。在攻读博士学位4年期间，感谢他在我的学习和工作中所给与的关心、宽容和耐心指导。本项目从课题设计、实施直到论文定稿都倾注了导师大量的心血和精力。此外，他还教导我做人的道理，指导我从事临床科研，指引我找到了一条结合我从事的神经外科临床专业的科研之路，并全力指导我撰写了一篇神经系统肿瘤的临床研究文章被BMC Cancer收录，4年间两中省厅级科研课题。谨向导师致以最诚挚的敬意和最衷心的感谢！

感谢陈敏教授、李瑶琛教授、杜彩文主任医师、黄文河主任医师、倪文秀副教授等老师在实验和工作方面的提供的无私指导和帮忙。

感谢豆晓伟博士后，魏晓龙博士，刘静博士，贺丽芳师妹，冼志荣师弟，梁元科师弟，温晓芬师妹，还有张国君长江学者实验室全体师弟师妹们，他们一直以来的帮助和鼓励。没有他们，我可能无法顺利完成我的学业。再次深表谢意！

感谢汕大医学院科研科老师在学位答辩方面的支持和帮助。

感谢汕大医学院第二附属医院神经外科全体同事对我在博士期间的学习经历的理解和关心，是他们无私的帮助和善意的理解才让我在业余时间能够攻读博士学位。

最后，感谢我的家人和朋友，他们支持和关心是我攻读博士学位的动力。

附录一博士期间科研业绩（2011年9月到2015年6月）

**在乳腺癌研究领域的业绩：**

参与2011年国家重点基础研究发展计划（973）（编号: 2011CB70770）。

参与2012年教育部高校博士学科点专项科研基金（编号: 20124402110003）。

参与2013年国家自然科学基金（编号: 31271068）。

参与2014年国家自然科学基金重大国际（地区）合作研究项目（编号: 81320108015）。

第八完成人获得2014年度汕头市科学技术进步奖一等奖（证书号：201409）。

参与撰写乳腺癌科研英文论著1篇，目前正在投稿中。

**在神经系统肿瘤研究领域的业绩：**

主持2012年广东省医学科研基金项目1项（题目：细胞红蛋白干扰脑胶质瘤细胞释放免疫抑制因子的机制研究。编号：A2012396）。

主持2013年广东省科技计划项目1项（题目：调控细胞红蛋白表达对脑胶质瘤细胞释放免疫抑制因子的影响及机制研究。编号：2013B021800259）。

2013年以第一作者发表SCI期刊BMC Cancer收录论著1篇。

2012-2013年以第一作者发表国家统计源和国家科技双核心期刊论著3篇。

附录二博士期间发表的文章

1) **Hongwu Xu(许宏武)**, Yuejun Huang, Zeyu Xie\*, Lan Lin, Yanchun Guo, Zerui Zhuang, Xinpeng Lin, Wen Zhou, Mu Li, Haihua Huang, Xiaolong Wei, Kuan Man, **Guojun Zhang(张国君) \***. The expression of cytoglobin as a prognostic factor in gliomas: a retrospective analysis of 88 patients. [BMC Cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The%2Bexpression%2Bof%2Bcytoglobin%2Bas%2Ba%2Bprognostic%2Bfactor%2Bin%2Bgliomas%3A%2Ba%2Bretrospective%2Banalysis%2Bof%2B88%2Bpatients) 2013 May 20; 13:247. doi:

10.1186/1471-2407-13-247.

[2）**许宏武**](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e8%ae%b8%e5%ae%8f%e6%ad%a6&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[谢泽宇](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e8%b0%a2%e6%b3%bd%e5%ae%87&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[林岚](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9e%97%e5%b2%9a&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[郭燕春](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%83%ad%e7%87%95%e6%98%a5&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[林欣鹏](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9e%97%e6%ac%a3%e9%b9%8f&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[周文](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e6%96%87&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[李沐](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9d%8e%e6%b2%90&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[黄钦国](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%bb%84%e9%92%a6%e5%9b%bd&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B). 细胞红蛋白在脑胶质瘤的表达和临床意义. [中华临床医师杂志（电子版）](http://epub.cnki.net/kns/Navi/ScdbBridge.aspx?DBCode=CJFD&amp;BaseID=ZLYD&amp;UnitCode&amp;NaviLink=%e4%b8%ad%e5%8d%8e%e4%b8%b4%e5%ba%8a%e5%8c%bb%e5%b8%88%e6%9d%82%e5%bf%97(%e7%94%b5%e5%ad%90%e7%89%88))。2013. 23(7)：10418-10421.

[3）**许宏武**](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e8%ae%b8%e5%ae%8f%e6%ad%a6&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[谢泽宇](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e8%b0%a2%e6%b3%bd%e5%ae%87&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[林岚](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9e%97%e5%b2%9a&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[郭燕春](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%83%ad%e7%87%95%e6%98%a5&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[林欣鹏](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9e%97%e6%ac%a3%e9%b9%8f&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[周文](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e6%96%87&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[李沐](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9d%8e%e6%b2%90&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B). 轻型颅脑损伤对大鼠脑源性神经营养因子基因表达的影响及意义. 中国微侵袭神经外科杂志. 2013. 18(7)：324 -327.

[4）**许宏武**](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e8%ae%b8%e5%ae%8f%e6%ad%a6&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[谢泽宇](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e8%b0%a2%e6%b3%bd%e5%ae%87&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[林岚](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9e%97%e5%b2%9a&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[庄泽锐](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%83%ad%e7%87%95%e6%98%a5&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[林欣鹏](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e6%9e%97%e6%ac%a3%e9%b9%8f&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B)，[周文](http://www.cnki.net/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e6%96%87&amp;code=10659005%3B09519600%3B09519537%3B17256289%3B28326065%3B28326066%3B29233855%3B30751386%3B). 轻型脑外伤对大鼠空间学习记忆的影响及机制研究. 神经损伤与功能重建. 2012. 11(7): 403-406.