**学号：201320241**

**大黄酸调控 Rac1/LIMK1/Cofilin 通路与抑制卵巢癌淋巴结高转移细胞的侵袭转移关系研究**

唐 敏

**导** 师姓名：黎丹戎 专业名称：肿瘤学

**申请学位类型：学术型学位答辩委员会主席：胡晓霞**

**答辩委员会委员：蒋** 丽 孙 燕

**张洁清** 王 鹤

万方数据

**二 Ο 一六年五月**

原 创 性 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含获得广西医科大学或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月日

---------------------------------------------------------------------

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：在校期间论文的知识产权属广西医科大学。学校有权保存论文的电子和纸质文档，可以借阅或上网公布本论文的部分或全部内容，可以采用影印、复印或其它手段保存、汇编本论文，学校可以向国家有关机关或机构送交论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅。同意广西医科大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。保密论文在解密后遵守此规定。

学位论文作者签名： 导师签字：

签字日期： 年 月 日 签字日期： 年 月日

个人简历

基本情况

姓名：唐 敏 性别：女

民族：汉 出生年月：1989.06

籍贯：湖南省永州市 政治面貌：中共党员

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 学习工作经历 |  | | |
| 起止时间 | 所在院校或单位 | 学历学位 | 职称 |
| 2008.09-2013.07 | 湖南师范大学树达学院 | 本科学士 | 学生 |
| 2013.09-2016.07 | 广西医科大学 | 研究生硕士 | 学生 |

研究生期间科研经历

项目起止时间 项目名称 本人承担任务

1、2011.01-2013.12

淋巴管内皮细胞形成机制与卵巢癌淋巴结定向转移的关系研究

细胞培养

2、2014.11-

2015．10

大黄素衍生物 A 抑制卵巢癌淋巴结细胞定向转移的作用机制

药物作用机制研究 形态学研究

项目起止时间 项目名称 本人承担任务

3、2014.06-2017.05

大黄素衍生物 A 调控

Rac1/cofilin 信号通路抑制卵巢癌淋巴结细胞定向转移的作用

细胞培养蛋白检测

大黄素衍生物 A 调控

细胞功能

4、2014.01-2017.12

Rac1/cofilin 信号通路抑制卵巢癌淋巴结细胞定向转移的作用及干预靶点确认

实验

蛋白检测

目 录

[英文缩略词](#_Toc686222750) 4

[摘 要](#_Toc686222751) 6

[Abstract](#_Toc686222752) 8

[第一章 大黄酸对卵巢癌SKOV3-pm4细胞运动迁移能力的抑制与细胞超微结构的关系](#_Toc686222753) 9

[前 言](#_Toc686222754) 9

[1 材料和方法](#_Toc686222755) 9

[1.1 材料](#_Toc686222756) 9

[1.2 方法](#_Toc686222757) 10

[2 实验结果](#_Toc686222758) 12

[2.1 大黄酸对SKOV3-pm4细胞增殖能力的影响](#_Toc686222759) 12

[2.2 大黄酸对SKOV3-pm4细胞侵袭能力的影响](#_Toc686222760) 12

[2.3 扫描电子显微镜观察细胞形态和超微结构变化](#_Toc686222761) 13

[2.4 激光扫描共聚焦显微镜观察细胞骨架变化](#_Toc686222762) 13

[3 讨论](#_Toc686222763) 14

[第二章 大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂调控卵巢癌SKOV3-pm4细胞Rac1-GTPase活性研究](#_Toc686222764) 14

[前 言](#_Toc686222765) 14

[1 材料与方法](#_Toc686222766) 15

[1.1 材料](#_Toc686222767) 15

[1.2 方法](#_Toc686222768) 19

[1.3 统计学方法](#_Toc686222769) 21

[2 实验结果](#_Toc686222770) 22

[2.1 大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对SKOV3-pm4细胞Rac1-GTPase活性蛋白影响](#_Toc686222771) 22

[2.2 大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对SKOV3-pm4细胞Rac1总蛋白影响](#_Toc686222772) 22

[3 讨论](#_Toc686222773) 23

[第三章 大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对卵巢癌细胞](#_Toc686222774) 24

[前 言](#_Toc686222775) 24

[1 材料和方法](#_Toc686222776) 25

[1.1 材料](#_Toc686222777) 25

[1.2 方法](#_Toc686222778) 26

[1.3 统计学方法](#_Toc686222779) 28

[2 实验结果](#_Toc686222780) 29

[2.1 大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4 的](#_Toc686222781) 29

[2.2 大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4 的](#_Toc686222782) 33

[3 讨论](#_Toc686222783) 37

[全文小结](#_Toc686222784) 38

[本研究创新之处](#_Toc686222785) 38

[1 与细胞运动相关的细胞结构与蛋白](#_Toc686222786) 39

[1.1 细胞结构](#_Toc686222787) 39

[1.2 与细胞运动相关的蛋白](#_Toc686222788) 40

[2 卵巢癌的临床治疗现状与前景](#_Toc686222789) 42

[2.1 卵巢癌的非靶向治疗](#_Toc686222790) 42

[2.2 卵巢癌的靶向治疗](#_Toc686222791) 42

[2.3 卵巢癌的中药治疗](#_Toc686222792) 43

[参考文献](#_Toc686222793) 44

[攻读学位期间发表的学术论文](#_Toc686222794) 49

# 英文缩略词

英文缩写英文全称中文全称

Rhein Rhein,4,5- dihydroxyanthraquinone

大黄酸

EGFR epidermal growth factor receptor

表皮生长因子受体

Rac1 Ras- related C3 botulinum toxin

Substrate 1

Ras相关的C3肉毒杆菌毒

素底物 1

Cdc42 Cell division cycle 42细胞分裂周期蛋白42 DAPI 4,6-diamino-2-phenyl indole 4,6-二氨基-2-苯基吲哚

PMA Phorbol- 12- myristate- 13-

acetate

佛波酯

PAK1 P21 protein (Cdc42/Rac) -

Activated kinase 1

p21活化激酶 1

LIMK1 LIM domain kinase 1人单丝氨酸蛋白激酶1 CFL Cofilin1, cofilin 人丝切蛋白

IRSp53 Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2

WAVE2 WASP family verprolin

Homologous protein2

大脑特异性血管生成抑制剂相关蛋白 2

WASP家族富含脯氨酸同源蛋白 2

1

Arp2 Actin-Related Proteins2肌动蛋白相关蛋白 2

Arp2/3 Actin-Related Proteins2/3

complex

肌动蛋白相关蛋白2/3复合体

Rho protein

Rho family of GTPases Rho蛋白

ADF actin depolymerizing factor 肌动蛋白解聚因子

h hour 小时

min minutes 分

Sec second 秒

g gram 克

ul microliter 微升

ml milliliter 毫升

L liter 升

d day 天

DAPI 4,6-diamino-2-phenyl indole 4,6-二氨基-2-苯基吲哚 PMSF Phenylmethanesulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟

TEMED N, N, N', N'-

Tetramethylethylenediamine

N, N, N', N'-四甲基乙二胺

GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase

甘油醛-3-磷酸脱氢酶

2

大黄酸调控Rac1/LIMK1/Cofilin通路与抑制卵巢癌淋巴结高转移细胞的侵袭转移关系研究

摘 要

**目的：**通过观察大黄酸对人卵巢癌细胞淋巴结定向高转移能力的亚克隆细胞（SKOV3-pm4）的运动迁移能力的抑制作用与其对细胞超微结构的改变，探讨大黄酸对卵巢癌SKOV3-pm4细胞Rac1活性蛋白和

Rac1/LIMK1/Cofilin信号通路中关键蛋白分子表达的影响。明确大黄酸对卵巢癌细胞Rac1蛋白的靶向作用，为研究干预卵巢癌转移和侵袭的提供新途径。

**方法：**利用MTT法检测不同浓度大黄酸处理卵巢癌SKOV3-pm4 细

胞的增殖作用，Transwell小室侵袭实验测定细胞的侵袭能力。采用扫描电子显微镜和激光共聚焦扫描显微镜观察不同时间和不同大黄酸浓度处理后细胞形态、超微结构及细胞骨架的改变。选择PMA为Rac1激活剂，

NSC23766为Rac1抑制剂，分别采用Rac1 Pull-down Assay和Western

Blot实验方法检测大黄酸联合抑制剂或激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4的Rac1-GTPase活性蛋白与Rac1总蛋白的影响。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western Blot实验方法检测大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对卵巢癌SKOV3-pm4细胞的Rac1/LIMK1/Cofilin信号通路及

Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2信号通路关键分子的基因与蛋白的表达水平。

**结果：**大黄酸能抑制SKOV3-pm4细胞的增殖能力，24h的半数抑制浓度（IC50）为121.24μmol·L-1。与空白对照组相比，大黄酸能抑制

3

SKOV3-pm4细胞增殖和侵袭能力（P<0.05），浓度为26.40μmol·L-1的大黄酸处理12h后，细胞形态及结构出现伪足减少、微丝断裂与分布紊乱，质膜凹凸不平、褶皱凸起减少，细胞间的间隙变宽等超微结构改变，细胞体外迁移和侵袭能力均降低。Rac1 Pull-down Assay与Western Blot实验显示：大黄酸可下调Rac1总蛋白与Rac1-GTPase活性蛋白表达，且存在浓度依

赖性；Rac1抑制剂NSC23766联合大黄酸作用，与单独使用Rac1抑制剂组比较，卵巢癌细胞的Rac1总蛋白与Rac1-GTPase活性蛋白均明显降低

（P<0.05）；Rac1激活剂PMA的作用下，Rac1总蛋白与Rac1-GTPase活性蛋白的表达均升高；而激活剂联合大黄酸作用后Rac1总蛋白与Rac1-

GTPase活性蛋白比单用Rac1激活剂PMA组表达降低（P<0.05）。qRT-

PCR和Western Blot实验显示：Rac1/LIMK1/Cofilin分子信号通路中，大黄酸、大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂联合大黄酸作用后，与空白组、单用Rac1抑制剂、单用Rac1激活剂比较，Rac1、PAK1、LIMK1

和cofilin mRNA表达降低（P<0.05），Rac1、P-PAK1、P-LIMK1和P-

cofilin蛋白水平也降低（P<0.05），但PAK1、LIMK1和cofilin的总蛋白没有明显变化；同样，Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2分子信号通路：对于大黄酸、大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂，与空白组、单用Rac1抑制剂、单用Rac1激活剂比较，IRSp53、WAVE2和Arp2 mRNA表达降低

（P<0.05），IRSp53、WAVE2和Arp2蛋白水平也降低（P<0.05），不同浓度大黄酸对上述通路蛋白表达均具有抑制作用，且呈浓度依赖性。

**结论：**大黄酸抑制具有淋巴结高转移潜能的卵巢癌细胞的迁移和侵袭

能力，其抑制作用与卵巢癌细胞的形态和超微结构的改变密切相关。大黄酸对卵巢癌细胞Rac1总蛋白与Rac1-GTPase活性蛋白具有明显的抑制作用，是一种潜在的Rac1小分子抑制剂。且Rac1/LIMK1/Cofilin及相关

Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2分子信号通路与卵巢癌细胞骨架的形成密切相

4

关，推测其机制是以Rac1为作用靶点从而影响Rac1/LIMK1/Cofilin相关信号通路实现。

关键词：大黄酸； 卵巢癌； 超微结构； 细胞骨架； 侵袭转移； Rac1

，Rac1/LIMK1/Cofilin, Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2, 信号转导

5

RHEIN REGULATES RAC1 / LIMK1 / COFILIN SIGNALING PATHWAY AND INHIBITS THE INVASION AND METASTASIS OF HUMAN OVARIAN CANCINOMA CELLS WITH DIRECTIONAL HIGH LYMPHATIC METASTASIS

Abstract

**Objective:** The aim for this study was to investigate the effects of Rhein on motility ability of ovarian cancer SKOV3-pm4 cell and to observe the change of the cell ultrastructure. Explored the relationship between the expression of key protein molecule in Rac1/LIMK1/Cofilin signaling pathway and the invasive ability of ovarian cancer SKOV3-pm4 cells. The results was the foundation for the research of Rhein mechanisms and providing new intervention methods for ovarian cancer metastasis and invasion research.

**Methods:** The cell proliferation of ovarian cancer cells with highly directional lymphatic metastasis (SKOV3-pm4) was tested by MTT assay after

6

Treated with different concentrations of Rhein. The invasive ability of cells was measured by Transwell chamber assay. The effect of Rhein on the morphology and cytoskeleton ultrastructure of ovarian cancer cells was observed by laser scanning confocal microscope and scanning electron microscope at different times and different concentrations. The PMA was selected as the Rac1 activator and NSC23766 as Rac1 inhibitors. The total protein of Rac1 and Rac1-GTPase in ovarian cancer SKOV3-pm4 was tested by Rac1 Pull-down Assay and Western Blot. The genes and protein expression level of Rac1/LIMK1/Cofilin and Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2 molecular signaling pathway were detected by qRT-PCR and Western Blot.

**Results:** Rhein inhibited proliferation ability of SKOV3-pm4 cells, the half maximal inhibitory concentration(IC50) of 24h was 121.24μmol·L-1. After treated with 26.40μmol·L-1 of Rhein, the abilities of migration and invasion of

SKOV3-PM4 cells were inhibited. The morphology and cytoskeleton ultrastructure of SKOV3-PM4 cells were changed, cellular pseudopod reduced, cell microfilament fractured and its distribution disordered, plasma membrane was uneven and cell gap widened. The results of Rac1 Pull-down Assay and Western Blot shown that Rhein can down-regulate protein expression of total Rac1 protein and Rac1-GTPase activity at a concentration-dependent manner; Rac1 inhibitors NSC23766 plus Rhein, compared with Rac1 inhibitor alone, total Rac1 protein and Rac1-GTPase reactive protein of ovarian cancer were

Significantly decreased(P<0.05). For Rac1 activator PMA, total Rac1 protein

And Rac1-GTPase activity protein were increased(P<0.05). When Rac1 activator plus Rhein, total Rac1 protein and Rac1-GTPase activity were reduced compared with Rac1 activator PMA group alone(P<0.05). The results of

7

QRT-PCR and Western Blot experiments shown that after Rhein, Rhein plus Rac1 inhibitors and Rhein plus Rac1 activators treated, compared with the control group, Rac1 inhibitors and Rac1 activator alone, the mRNA expression

Level of Rac1, PAK1, LIMK1 and cofilin decreased(P<0.05), the expression

Level of Rac1, P-PAK1, P- LIMK1 and P-cofilin proteins were also down- regulated(P<0.05), but the total protein of PAK1, LIMK1 and cofilin did not change significantly. The expression of key genes and proteins levels in Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2 molecule signaling pathway shown that after Rhein, Rhein plus Rac1 inhibitors and Rhein plus Rac1 activators treated, compared with the control group, Rac1 inhibitors and Rac1 activator alone, the mRNA expression and protein levels of IRSp53, WAVE2 and Arp2 were also decreased(P<0.05) with a dose dependent manner.

**Conclusion**: Rhein can inhibit migration and invasion of ovarian cancer cells with highly directional lymphatic metastasis, Its inhibition effect was closely associated with the changes of cell morphology and ultrastructure. Total Rac1 protein and Rac1-GTPase activity of the Rac1 protein is significantly inhibited by Rhein, Rhein is a potential Rac1 small molecule inhibitor. Rac1 / LIMK1 / Cofilin and Rac1 / IRSp53 / WAVE2 / Arp2 molecule signaling pathway is closely allied to ovarian cancer cell skeleton, Rac1 protein was the target and modulates the Rac1 / LIMK1 / Cofilin signaling pathway.

**KEY WORDS** Rhein; Ovarian cancer; Cell cytoskeleton; Cell ultrastructure; Invasion; And; Metastasis; Rac1; Rac1/LIMK1/Cofilin; Rac1/IRSp53/WAVE2

/Arp2, Signaling pathway

8

# 第一章 大黄酸对卵巢癌SKOV3-pm4细胞运动迁移能力的抑制与细胞超微结构的关系

前 言

卵巢癌（Ovarian Neoplasms）是女性生殖系统常见恶性肿瘤疾病之一，其死亡率居妇科常见恶性肿瘤疾病之首。因早期临床症状不明显，大多数患者就诊时出现远处转移。而且70%患者经手术和放化疗治疗后，在两年内复发或转移。晚期卵巢癌患者的5年生存率所占比例不足30%。卵巢癌转移和扩散方式包括直接蔓延、淋巴转移、血行转移和种植转移四种方式

[1]. 大多数晚期卵巢癌患者被发现存在主动脉旁和盆腔淋巴结转移。患者

卵巢癌患者预后不良的重要指标之一淋巴结转移是肿瘤细胞的重要生物学特性，因此研究与卵巢癌细胞侵袭、转移相关的分子靶点和寻找能有效抑制卵巢癌细胞淋巴结转移的药物，对提高晚期患者生存质量具有重要的意义。

目前临床上卵巢癌治疗方式多采用铂类与紫杉醇联合化疗标准方案。

9

虽可缓解病情，但晚期的卵巢癌复发率和死亡率仍不低，迫切需要寻找特异性强毒性低的靶向药物以提高疗效。近年来，肿瘤的靶向治疗研究快速发展，通过区别正常组织和肿瘤组织，给予针对性治疗，达到较好的临床治疗效果[2]。有文献报道赖氨大黄酸对肿瘤细胞具有靶向调控，其临床价值并得到证实。大黄酸是蒽醌类化合物，具有抗肿瘤、抗炎和泻下等药理作用。有研究发现大黄酸能诱导乳腺癌、舌癌、结肠癌和神经胶质瘤细胞凋亡，抑制细胞增殖，能在乏氧条件下可抑制肿瘤细胞新生血管生成[3]。但对于大黄酸是否能抑制肿瘤细胞的运动和迁移能力，特别是针对卵巢癌淋巴结定向转移作用机制，未见文献报道。

肿瘤细胞的运动转移与浸润离不开肿瘤细胞的一系列生理结构的参与。细胞迁移运动过程中通过在细胞迁移的前导端，局部细胞膜前伸而形成伪足，伪足通过黏附作用黏附到细胞基底部，继而使细胞骨架收缩，引起细胞位置的整体易位，最后细胞尾端脱黏附及细胞回缩一系列循环步骤促使细胞步步向目的地前行[4]。而促使细胞发生运动，还需作为运动重要组成部分细胞骨架和伪足的参与。细胞骨架参与细胞运动和物资运输，伪足作为细胞运动前进的探测器。细胞骨架作为细胞向前运动的推动器是肿瘤细胞转移和浸润的必备的条件之一。本课题组前期研究发现大黄酸对卵巢癌细胞SKOV3具有明显的生长抑制作用，在此基础上，本文进一步研究大黄酸对卵巢癌淋巴定向细胞转移和浸润中的作用，并采用扫描电子显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察细胞超微结构和骨架变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株

10

人上皮性卵巢癌细胞系（SKOV3）购于中国医学科学院肿瘤研究所，于广西医科大学医学科学实验中心传代保存。卵巢癌淋巴结定向高转移细胞系（SKOV3-pm4）为本课题组前期构建[5]。

#### 1.1.2 主要试剂及配制

##### 1.1.2.1 主要试剂

大黄酸南京朗泽医药科技有限公司

RPMI-1640培养基美国HyClone公司

胎牛血清美国Gibco公司

PBS粉北京中杉金桥公司

胰蛋白酶北京索莱宝科技有限公司

圆形玻片盐城市弘达医学器材公司

4%多聚甲醛广州晶欣有限公司

0.5% Triton X–100 BIOSHARP公司

ActinGreen™488 ReadyProbes®Reagent

美国life公司

DIPA染色剂上海碧云天公司

##### 1.1.2.2 主要试剂的配制

（1）大黄酸母液：用电子天平称取50mg大黄酸粉末，加入10mlDMSO充分溶解，即得到176.0mmol·L-1的大黄酸药物母液。经无菌滤器过滤后密封常温避光保存。

（2）不同浓度梯度的药物工作溶液：取大黄酸母液1μl稀释至100μl，该浓度为8.8mmol·L-1。取4支15ml离心管，依次编号①②③④，分别加入无血清的培养基：1000μl、1000μl、1800μl、850μl。吸取200μl、150μl浓度为8.8mmol·L-1的大黄酸母液分别加入到③④号离心管中，混合均匀。再从③号离心管中吸取1000μl含药培养基加入到②号离心管中，混匀，即

11

得到含有不同浓度梯度药物的培养基。①②③④号管的药物浓度分别为

0、8.80μmol·L-1、17.60μmol·L-1、26.40μmol·L-1.

（3）细胞培养基：取出500ml RPMI-1640培养基，加入5ml 100×青链霉素混合液，取出RPMI-1640培养基180ml，加入20ml胎牛血清，即10%血清的细胞完全培养基，封口保存。

（4）PBS缓冲液：PBS粉1包，加双蒸水至1000ml充分搅拌溶解，后加双蒸水至总体积为2000ml。在121Kpa，120℃的条件下高压蒸汽灭菌30min，保存于4℃冰箱内。

（5）0.5% Triton X-100: 取Triton X-100原液50μl，由高压好的PBS稀释至10ml，配制成0.5% Triton X-100工作浓度溶液。

#### 1.1.3 耗材和设备

细胞培养板美国康宁公司

15ml离心管美国康宁公司

细胞培养瓶美国康宁公司

细胞冻存管恒因公司

3ml一次性吸管国产

EP管、Tip头Axygen公司

0.22μm无菌滤器美国Millipore公司

恒温CO2培养箱美国Thermo Fisher Forma公司

微量移液器德国Eppendorf公司

倒置荧光显微镜日本OLYMPUS公司

无菌超净工作台美国Thermo Fisher Forma公司

回旋式能振荡器金坛市龙盛实验仪器厂

高压灭菌锅上海博讯公司

12

制冰机上海安亭科学仪器厂

超纯水系统美国Millipore公司

冰箱德国西门子公司

30L液氮冻存罐四川亚西橡塑机器有限公司

激光共聚焦显微镜日本Nikon公司

电子天平赛多利斯科学仪器有限公司

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

（1）细胞复苏：消毒超净工作台后，将实验用品紫外照射30min。于37℃恒温水浴箱中，摇晃，1~2min，迅速复苏冻存的细胞。将复苏细胞悬液转移至离心管中，加入适量完全培养基，800rpm离心3min，加入完全培养基混匀，勿左右摇晃，以免细胞不均匀贴壁生长。后在镜下观察单个，圆形，透亮细胞，细胞密度适中细胞。注意标记操作者姓名、细胞种类和复苏日期等。细胞培养37℃，体积分数为5%CO2，相对湿度90%的培养箱中。6~8h后取出细胞，观察细胞形态、贴壁情况、完全培养基颜色及是否存在细菌或真菌污染等。培养24h可更换新的培养液。

（2）细胞换液：如（1）上述步骤先将超净台及实验用品消毒后，将细胞培养瓶取出，更换培养液，弃去旧的细胞培养液。用吸管吸取PBS缓冲液，轻轻摇晃培养瓶，充分清洗贴壁的细胞，弃去废液，重复2次，加入适量含血清10%的细胞培养基，在37℃，5%CO2，相对湿度90%的培养箱中

继续培养。

（3）细胞消化和传代：如（1）上述步骤先将超净台及实验准备用品消毒后，在倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况。若细胞生长状态良好，可进行消化和传代。弃去旧的培养液，加入PBS缓冲液清洗2次，取0.5%

13

的胰酶500μl，使胰酶完全覆盖细胞，当大部分细胞在镜下出现收缩、变圆时，立即弃掉胰酶，再加入10%血清完全培养基终止。将细胞悬液转移离心管中，1000rpm，3min低速离心后弃掉上清，再加入适量含10%血清的完全培养基，混匀成单细胞悬液。将细胞分瓶，培养于37℃、5%CO2、相对湿度90%的培养箱中。

（4）细胞冻存：如（1）上述步骤先将超净台及实验准备用品消毒后，选取细胞胞质丰富、细胞轮廓清晰饱满、生长状态良好呈指数生长且无污染进行冻存保株。细胞冻存液按照培养基：甘油：血清=7: 1: 2的比例配制。取出细胞，细胞换液，胰酶消化，1000rpm离心3min，弃掉上清，吸取细胞悬液1.5ml转移至容量为2ml的细胞冻存管中，标注细胞种类、冻存者姓名、冻存日期等信息，通过常温下的细胞程序降温盒冻存，再转移至-80℃冰箱，过夜后再转移至液氮罐中，长期冻存储存。

（5）细胞计数：在实验操作前，消毒细胞计数板和盖玻片，使用时紫外照射30min。取指数生长期的细胞，胰酶消化，离心弃去上清，制成单细胞悬液。在盖玻片边缘滴下20μl细胞悬液。显微镜镜下10倍观察和统计出细胞数。细胞计数公式：细胞数/ml=（4个大方格内所有细胞数的总和）

/4×104来计算细胞的浓度，计算出的细胞密度，用于细胞的接种等其他实

验。

#### 1.2.2 四甲基偶氮唑蓝（MTT）实验

（1）接种细胞：取呈指数生长的SKOV3-pm4，换液，胰酶消化，800rpm

低速离心，取适量培养基重悬。细胞计数，将SKOV3-pm4细胞稀释成

1×105个/ ml，接种于96孔板中，每组三个复孔，每孔100μl单细胞悬液。

（2）加药处理：待细胞贴壁后，按照大黄酸药物浓度为0、17.6μmol·L-

1、35.20μmol·L-1、70.40μmol·L-1、105.60μmol·L-1、140.80μmol·L-

14

1、176.00μmol·L-1配制含药培养基，空白对照组加入无血清培养基，每个

浓度设置3个复孔和一个溶剂对照孔，溶剂对照孔加入对应药物浓度

DMSO的无血清培养基，培养24h。

（3）加MTT：每孔20μl MTT溶液，需避光，孔板于培养箱中培养3~4h。

（4）加DMSO溶解沉淀：弃去孔板内的液体，保留孔内沉淀物，各孔加入DMSO100μl，选定一个没有接种细胞的孔加入DMSO100μl作为调零孔。

（5）酶标仪检测：设置调零孔，检测波长为490nm，中速震荡15s，测定各孔的吸光度值（OD值）。

（6）结果分析：各浓度药物实验组OD值根据实验组OD值=加药实验孔

OD值-溶剂对照孔OD值公式算出。按抑制率公式抑制率=（1-实验组OD值/空白对照组OD值）×100%计算抑制率，后计算出半数抑制浓度（IC50）。并选择无毒性抑制率10%的浓度，观察大黄酸对细胞侵袭转移能力的影响。

#### 1.2.3 Transwell细胞侵袭实验

###### （1）铺胶准备：用无血清RPMI-1640按1:4比例稀释并混匀Matrigel基质胶，在上室中加入50µl稀释后的Matrigel基质胶，后置于37℃恒温箱1~2h，等胶完全凝固。

###### （2）加药处理：先将细胞SKOV3-pm4用含0、8.80μmol·L-

1、17.60μmol·L-1、26.40μmol·L-1大黄酸的无血清培养基培养24h，胰酶消化细胞，低速离心后，加入适量无血清培养基并计数。

###### （3）接种细胞：下室加入含体积分数10%胎牛血清的完全培养基，取经处理后SKOV3-pm4细胞以每孔2×104接种于上室中，设3个复孔，培养

24h。

###### （4）固定染色：取出小室后，用甲醇固定15min，自来水洗涤小室两遍，苏木素染液中染色10min，自来水轻轻冲洗3遍后置于通风处晾干，于倒

15

置显微镜下观察，统计穿过基质胶的细胞数目。

#### 1.2.4 扫描电子显微镜下观察细胞形态和超微结构

（1）细胞培养：选取呈指数生长期细胞，胰酶消化细胞离心和计数，调整细胞浓度为2×104个/mL。接种细胞于培养孔板中，放入已消毒好的圆形载玻片。将培养瓶置于37℃、5%CO2、湿度为90%的培养箱中培养24小时。

（2）实验分组：将卵巢癌细胞SKOV3-pm4分为空白组和药物组。药物组即分别加入8.80μmol·L-1，17.60μmol·L-1，26.40μmol·L-1的大黄酸，每孔同时接种两个复孔。

（3）实验方法：药物组终浓度为8.8μmol·L-1，17.60μmol·L- 1，26.40μmol·L-1大黄酸的无血清培养基，在37℃、5% CO2、相对湿度90%的培养箱孵育2h、6h、12h后，弃去培养液，换液，预冷3%戊二醛固定2h以上，再用常温PBS清洗3遍，每遍10min，后用50%酒精脱水10min，70%酒精脱水至少4h等处理，在扫描电子显微镜下观察细胞形态和细胞骨架超微结构变化。

#### 1.2.5 激光共聚焦电子显微镜下观察细胞形态和超微结构

（1）细胞培养：选取呈指数生长期细胞，胰酶消化细胞离心，并计数，调整细胞浓度为2×104个/mL。接种细胞于24孔板中，放入已消毒好的圆形载玻片，镜下观察细胞是否均匀铺在细胞壁上，培养12小时。

（2）实验分组：将卵巢癌细胞，SKOV3-pm4同时分为空白组和药物组。药物组即分别加入8.8μmol·L-1 ，17.60μmol·L-1，26.40μmol·L-1的大黄酸，

16

每孔同时接种两个复孔。

（3）药物组每孔分别加入大黄酸终浓度为8.80μmol·L-1，17.60μmol·L- 1，26.40μmol·L-1的无血清培养基，在37℃、5% CO2、相对湿度90%的培养箱孵育12h

（4）弃培养液，PBS快速清洗一遍。

（5）4%多聚甲醛固定10min。

（6）PBS清洗3次，每次10min。

（7）用0.5% Triton X-100透膜室温孵育3min。

（8）PBS清洗3次，每次10min。

（9）ActinGreen™488 ReadyProbes®Reagent标记F-actin, 室温避光孵育

120min。

（10）PBS洗涤3次，DIPA染色剂避光孵育10min后，PBS洗涤3次。

（1）封片剂封片，激光扫描共聚焦显微镜观察。

#### 1.2.6 统计学方法

采用SPSS16.0软件对结果进行分析，计量资料以*x±s*表示，采用单因素方差分析和LSD-*t*检验。P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 大黄酸对SKOV3-pm4细胞增殖能力的影响

不同浓度梯度大黄酸作用24h后检测的结果显示，在17.60μmol·L- 1～176.00μmol·L-1浓度范围内大黄酸对SKOV3-pm4细胞增殖均具有抑制作用，并且随着大黄酸浓度的增加，其抑制作用逐渐增强，呈剂量依赖性。见表1-1。大黄酸作用SKOV3-pm4细胞24h的IC50值分别为

121.24μmol·L-1，无细胞毒作用浓度IC10值为24.60μmol·L-1.

17

表1-1 MTT法测定大黄酸对SKOV3-pm4生长的抑制作用

大黄酸

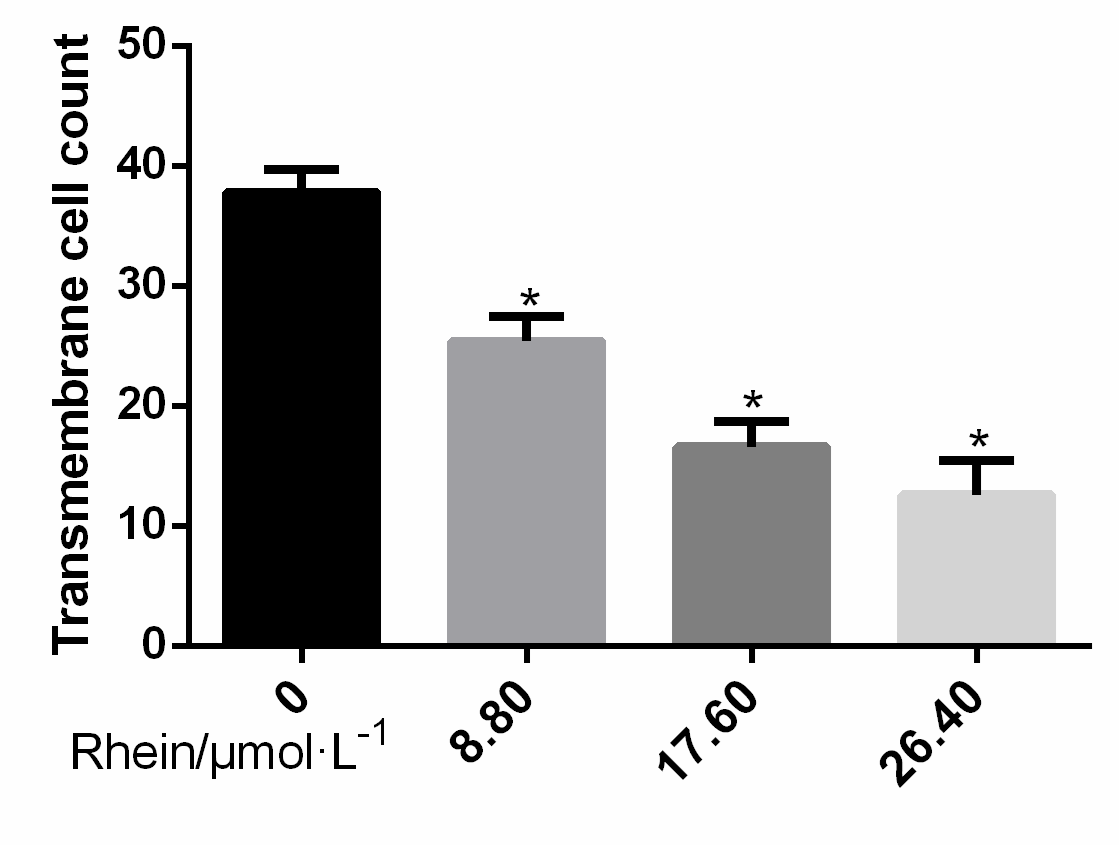
（μmol·L-1）

Table 1-1 The inhibition of Rhein on growth of SKOV3-pm4 by MTT assay

SKOV3-pm4

17.60 35.18 70.40 105.60 140.80 176.00

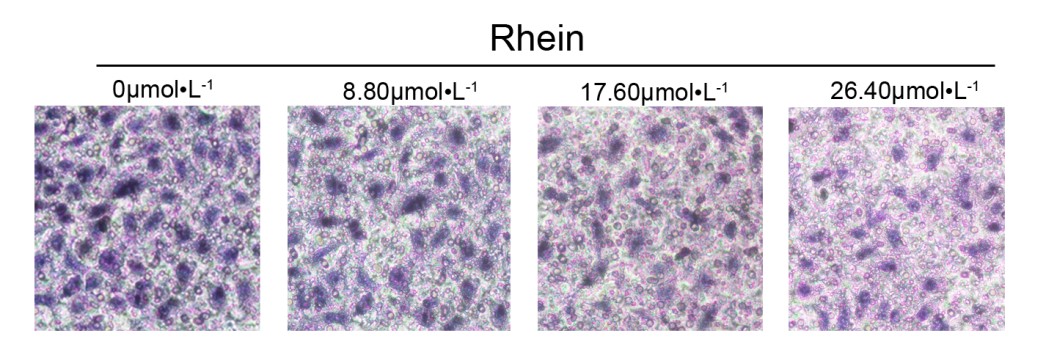
抑制率% 10.74±1.68 22.10±4.90 28.90.±4.78 31.65±1.90 81.03±1.82 87.26±3.07



### 2.2 大黄酸对SKOV3-pm4细胞侵袭能力的影响

Transwell侵袭实验检测不同浓度的大酸对卵巢癌细胞SKOV3-pm4侵袭力的影响，见图1-1A和图1-1B。与空白组相比，随着药物浓度的增高，SKOV3-pm4细胞穿过小室膜的数量逐渐减少，侵袭能力明显降低。

（A）



（B）

18

图1-1 大黄酸对卵巢癌SKOV3-pm4细胞迁移能力的影响

Fig1-1 Inhibition of invasive ability of SKOV3-pm4 cells by Rhein

Inhition of cells invasion was assessed by Matrigel-Transwell assay(200×) and cells was stained by hematoxylin, The changes of transmembrane cell count after Rhein (8.80μmol·L-1, 17.60μmol·L- 1, 26.40μmol·L-1) treatment on SKOV3-pm4 cells for indicated durations.x±s, n=3, \*P<0.05 vs control group.

### 2.3 扫描电子显微镜观察细胞形态和超微结构变化

扫描电子显微镜下观察Rhein对卵巢癌细胞SKOV3-pm4的影响如图

1-2所示，未经Rhein处理的SKOV3-pm4（红色箭头所指）细胞形态多样，表面有丰富的纤毛和片状伪足，细胞表面有具有纵横交错的皱褶，呈指状或嵴状突起。与空白组相比，浓度8.80μmol·L-1大黄酸处理2、6h的细胞纤毛和伪足变化不明显，而浓度为17.60μmol·L-1、26.40μmol·L-1大黄酸处理12h后细胞收缩明显，出现圆钝样突起，纤毛、伪足、指状或嵴状凸起均减少，细胞之间的间隙变大，出现质膜边缘凹凸不平，明显翻折现象

（白色箭头所指）。

19



图1-2 大黄酸对SKOV3–pm4细胞形态和超微结构的影响

Fig.1-2 Effect of Rhein on cell morphology and ultrastructure of SKOV3–pm4 cells(2000 X) The changes of cell morphology (2000X) after Rhein (8.80μmol·L-1,17.60μmol·L-1,26.40μmol·L-1) treatment on SKOV3–pm4 cells for indicated durations.

### 2.4 激光扫描共聚焦显微镜观察细胞骨架变化

观察SKOV3-pm4细胞经不同浓度Rhein处理12h后对细胞骨架的影响结果见图1-3。绿色荧光标志为F-actin，蓝色荧光标志为细胞核。结果如图1-3可见空白组的SKOV3-pm4细胞骨架微丝按细胞极性成束状分布，细胞质膜边缘上分布着丰富细长纤毛和片状伪足（见红色箭头处），质膜结构完整，细胞线条明显和细胞骨架稳固，绿色荧光强。随着Rhein药物浓度增高，纤毛、伪足收缩或消失，细胞骨架微丝分布紊乱，部分微丝断裂形成点状分布于胞质中（见白色箭头处），质膜边缘凹凸不平。

20



图1-3 大黄酸对SKOV3-pm4细胞细胞骨架的影响

Fig1-3 Effect of Rhein on cytoskeleton of SKOV3-pm4 cells

The changes of cell morphology and cytoskeleton(600X) after Rhein (8.80μmol·L-1, 17.60μmol·L-1,

## 3 讨论

26.40μmol·L-1) treatment on SKOV3-pm4 cells for indicated durations.

研究表明大黄酸具有抗炎、保护内皮细胞、改善细胞代谢、抑制肿瘤细胞代谢等多种药理活性。在抗肿瘤研究方面，已有不少实验研究表明大黄酸能抑制肿瘤细胞增殖，诱导肿瘤细胞凋亡。如Huang HJ等人证实乳腺癌细胞中大黄酸能诱导细胞毒性，主要是涉及细胞骨架调节，蛋白质折叠，糖酵解途径和转录控制的失调[6]。它还可通过TLR4 NF-κB通路降低脂多糖诱导肠道损伤的白细胞介素(IL) -1β，IL-6, IL-8和肿瘤坏死因子 α



21

的降低[7]。本研究表明大黄酸对卵巢癌细胞SKOV3-pm4细胞的迁移和浸润具有明显抑制作用，并呈浓度依赖性。

由于扫描电子显微镜可清晰观察细胞表面三维空间结构，激光扫描共聚焦显微镜采用抗原抗体免疫荧光反应的原理，为我们超微观察细胞形态和结构提供了便利。通常细胞依靠伪足与支撑表面的吸附与解吸附而耦连促进细胞骨架的聚合与解聚；可在伪足前沿依靠细胞骨架的不断聚合，推动胞膜的前进；靠近细胞体部位的基部通过细胞骨架的不断解聚收缩拖拉细胞体向前运动。即纤毛伪足和细胞骨架是肿瘤细胞运动的基本条件，本实验动态观察到了不同时间段大黄酸对卵巢癌细胞SKOV3-pm4细胞的影响。卵巢癌细胞由完整的细胞形态，丰富的纤毛伪足，纵横交错的皱褶，丰富的细胞骨架微丝，完整的质膜边缘，在大黄酸的影响下，转变为纤毛伪足收缩减少，皱褶减少，细胞骨架微丝断裂，质膜凹凸不平，细胞间的间隙扩大。卵巢癌细胞形态学的超微结构改变，证实大黄酸对卵巢癌细胞的抑制作用，影响了肿瘤细胞的迁移和运动能力。然而大黄酸如何调节细胞骨架的改变，促使微丝断裂，纤毛伪足减少和消失。尤其大黄酸调控卵巢癌细胞转移与侵袭是通过哪一个关键靶点，哪一条信号通路而实现的值得我们进一步研究探索。

22

# 第二章 大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂调控卵巢癌SKOV3-pm4细胞Rac1-GTPase活性研究

前 言

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一，主要的转移途径是直接蔓延及腹腔种植。而淋巴是重要的转移途径。卵巢癌淋巴转移主要方式有：

1、经卵巢淋巴管向上至腹主动脉旁淋巴结；2、经卵巢门淋巴管达髂内外淋巴结，经髂总淋巴结至腹主动脉旁淋巴结；3、经圆韧带进入髂外及腹股沟淋巴结。淋巴转移作为卵巢癌转移扩散的重要生物学特性。

肿瘤细胞的侵袭和转移过程极其复杂，不仅包括肿瘤细胞与其周围的基质和肿瘤细胞间的相互作用，还涉及许多生物分子间的相互作用，肿瘤细胞迁移是由细胞伸出纤毛伪足并与周围基质粘附而启动[8]。在此过程中，小G蛋白Rho GTP酶Ras同源物（Rho GTPase Ras homologous, Rho GTPases）尤其是Ras相关的C3肉毒素底物1（ras-related C3 botulinumtoxin substrate 1, Rac1）参与调控细胞板状伪足的形成，从而调控肿瘤细胞的迁移和侵袭[9]。Rac1能促进各种肿瘤血管生成，促进细胞增值和抑制细胞凋亡，细胞的迁移、侵袭能力，参与多条信号介导通路。有学者则提出Rac1可作为独立的肿瘤诊断标志物和生存期预期因子

[10]. Rac1在乳腺癌、结肠癌、胃癌等相关疾病中研究报道较多，而有关

Rac1对卵巢癌的迁移和运动的影响则相对较少。本课题组前期[11]采用抗体

23

芯片和iTRAQ-2D-LC-MALDI-TOF/TOF/MS方法检测SKOV3和SKOV3-

pm4细胞中分泌的蛋白，筛选出Rac1、CDC42、SPARC等34个差异蛋白，这些与卵巢癌淋巴结转移密切相关的蛋白参与MAPK signaling

pathway、VEGF signaling pathway、Cytokine-cytokine

receptorinteraction、Jak-STAT signaling pathway等蛋白通路信号转导。生物信息学分析证实Rac1为这些通路的重要调控分子，并且参与细胞骨架的调节。因此本研究将Rac1作为研究靶点，进一步探讨大黄酸与卵巢癌淋巴结转移的关系及影响。

Small GTP-binding proteins (GTPases)（小GTP结合蛋白（GTP酶））是信号转导途径的重要调节剂。GTP酶是细胞功能调节关键，它不仅参与细胞增殖和分化，而且还参与肿瘤发生和肿瘤侵袭过程[12]。GTP酶作为酶家族的一员，能结合与水解GTP。当与GDP绑定的时候，GTP酶蛋白是失活的形式。它的激活形式由调节蛋白鸟嘌呤核苷酸交换因子（GEFs）控制，能诱导GDP的释放。因为细胞内的GTP含量远远超过GDP，这导致空的核苷酸位点由GTP绑定，此时GTP酶是有活性的。另一类蛋白，

GTP酶激活蛋白（GAPs），能加快水解GTP向GDP转换，使GTP酶失活。激活的GTP酶是监控和衡量肿瘤发展的一个重要标志[13]。从非活性GDP

结合形式到GTP结合活性形式与效应蛋白相互作用和调节细胞内下游信号通路。在特定的目标蛋白质结合结构域的鉴定特异性识别的活性，特定GTP酶的GTP结合形式提供了用于基于亲和力的GTP酶激活测定的基础。

Rac1是细胞骨架调节的重要分子，作为小G蛋白家族的一员，能与

GTP/GDP结合，具有分子开关效应。Rac1与GTP酶结合呈激活形式，能进一步激活其下游信号转导通路。因此检测Rac1-GTP酶结合形式的活性可以明确大黄酸对卵巢细胞作用的机制和其对Rac1的靶向调控作用。因此，本研究将通过检测不同浓度大黄酸与联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂

24

处理后的卵巢癌细胞的Rac1总蛋白和Rac1-GTPase活性表达，揭示大黄酸在卵巢癌转移过程中对细胞细胞骨架重要分子的影响，探讨大黄酸作为

Rac1小分子抑制剂的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

人上皮性卵巢癌细胞系（SKOV3）购于中国医学科学院肿瘤研究所，于广西医科大学医学科学实验中心传代保存。卵巢癌淋巴结定向高转移细胞系（SKOV3-pm4）为本课题组前期构建。 1.1.2主要试剂与配制

##### 1.1.2.1 主要试剂

MLB裂解液南京朗泽医药科技有限公司

磷酸酶抑制剂美国Roche试剂公司

BCA蛋白浓度测定试剂盒北京碧云天试剂公司

PMSF北京碧云天试剂公司

脱脂奶粉美国BD公司

Rac1抑制剂NSC23766美国Selleck公司

Rac1激活剂PMA美国Cayman化工公司

TAE液恒因公司

0.22umPVDF膜美国Millipore公司

甲醇天津市致远化学试剂有限公司

甘氨酸北京solarbio科技有限公司

过硫酸铵（APS）北京碧云天公司

25

Tris碱北京索莱宝科技有限公司

SDS美国Sigma公司

1.5mol/lTris(pH=8.8)上海双螺旋生物科技有限公司

GAPDH鼠抗兔抗体美国Abcam公司

Rac1兔抗鼠抗体美国Millipore公司

0.5mol/lTris(pH=6.8)上海双螺旋生物科技有限公司

蛋白电泳标准Marker美国Thermo公司

TEMED美国Sigma公司

20%Tween-20北京索莱宝科技有限公司

脱脂奶粉美国BD公司

5×Loadingbuffer上样缓冲液上海碧云天试剂公司

β-巯基乙醇北京solarbio科技有限公司

100x GTPγS美国Millipore公司

100x GDPγS美国Millipore公司

##### 1.1.2.2 主要试剂的配制

（1）细胞裂解液：按照蛋白裂解液说明书RIPA裂解液：PMSF=100:1配制。吸取100μl RIPA裂解液置于一支EP管中，向其中加入1μlPMSF后吹打混匀即可，冰上备用。

（2）磷酸酶抑制剂工作液：将一片磷酸酶抑制剂溶解于1ml超纯水中，配制得到磷酸酶抑制剂储备液。

（3）MLB工作液：将原始浓度为5x MLB水用双蒸水稀释成为1x含有

10%甘油浓度的MLB工作液。每10mlMLB工作液中加入250μl磷酸酶抑制剂储备液和100μl蛋白酶抑制剂（PMSF），混匀即可。

（4）BCA蛋白浓度测定工作液：按照碧云天蛋白浓度测定试剂盒说明书配制，按A液: B液=50: 1的比例配制混匀即为工作液，现配现用。

26

（5）10%SDS: 1g SDS粉末溶于10ml双蒸水，即得到10%SDS，在管壁做好标记后置于常温下保存。若长期保存出现沉淀，水浴溶解后继续使用。

10%SDS主要用于分离胶及浓缩胶的配制。

（6）10% APS（过硫酸铵）：准确称取过硫酸铵粉末0.1g，加双蒸水1ml溶于1.5ml EP管中反复吹打至粉末完全溶解。标记溶液名称及配制日期，冰箱4℃中避光保存，现配现用。

（7）PBST溶液：取500ml PBS缓冲液置于广口瓶中，再取Tween-20

0.5ml加入其中，Tween-20为胶冻状，不易混匀需反复吹打使其混合。

PBST溶液可常温下保存。

（8）5%封闭液：准确称取4g脱脂奶粉，加80ml PBST定量至80ml，充分摇晃使脱脂奶粉完全溶解，为5%脱脂奶粉的封闭液，即配即用。

（9）电泳缓冲液：准确称取0.25ml/L甘氨酸粉末18.77g, 25mmol/L Tris3.03g, SDS 1g加纯水至1000ml，充分溶解，室温保存。

（10）转膜缓冲液：电子天平准确称取48mmol/L Tris5.8g, 39mmol/L甘氨酸粉末2.9g, SDS 0.37g, 100ml甲醇，加纯水至容量为1000ml的大量筒中，使其完全溶解，即得到1×转膜缓冲液，置于常温下保存。

（11）化学荧光发光液：取出原液（A液与B液），按A液: B液=1: 1的比例配制，取出适量A液于避光的离心管中，再吸取等量B液，迅速混合均匀后得到工作液，低温避光保存，现配现用。

（12）抗体的配制：鼠源Rac1一抗（1:500），GAPDH鼠抗兔抗体

（1:2000）

（13）SDS-PAGE试剂：10%分离胶、12%分离胶和5%的浓缩胶配制（见下表）

表 2-1 10%分离胶成分

Table 2-1 The composition of 10% separating gel

10%分离胶配方（ml）1ml 2ml 3ml 4ml

27

| ddH2O(ml) | 1.9 | 4.0 | 5.9 | 7.9 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 30%b 丙烯酰胺(ml) | 1.7 | 3.3 | 5.0 | 8.7 |
| Tris-HCL PH8.8(ml) | 1.9 | 2.5 | 3.8 | 5.0 |
| 10%SDS(μl) | 50 | 100 | 150 | 200 |
| 10%APs(μl) | 50 | 100 | 150 | 200 |
| TEMED(μl) | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 |
| 表 2-2 12%分离胶成分  Table2-2 The composition of 12% separating gel | | | | |
| 10%分离胶配方（ml） | 1ml | 2ml | 3ml | 4ml |
| ddH2O(ml) | 1.6 | 3.3 | 4.9 | 6.6 |
| 30% 丙烯酰胺(ml) | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 |
| Tris-HCL PH8.8(ml) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 |
| 10%SDS(μl) | 50 | 100 | 150 | 200 |
| 10%APs(μl) | 50 | 100 | 150 | 200 |
| TEMED(μl) | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 |
| 表 2-3 5%浓缩胶成分  Table2-3 The composition of 5% stacking gel | | | | |
| 10%分离胶配方（ml） | 1ml | 2ml | 3ml | 4ml |
| ddH2O(ml) | 0.68 | 1.40 | 2.10 | 2.7 |
| 30% 丙烯酰胺(ml) | 0.17 | 0.33 | 0.5 | 0.67 |
| Tris-HCL PH8.8(ml) | 0.13 | 0.25 | 0.38 | 0.50 |
| 10%SDS(μl) | 10 | 20 | 30 | 40 |
| 10%APs(μl) | 10 | 20 | 30 | 40 |
| TEMED(μl) | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 |
| 1.1.3 主要仪器设备 |  |  |  |  |
| 酶标仪 美国 Thermo 公司 | | | | |

低速台式离心机上海安亭科学仪器厂

Millipore超纯水系统美国Millipore公司

电子天平德国Sartorius公司

电泳仪北京六一仪器厂

Bio-rad Western Blot电转系统美国Bio-rad公司

Bio-rad扫膜设备美国Bio-rad公司

28

酶标仪美国Thermo公司

恒温金属浴杭州瑞诚仪器有限公司

制冰机日本SANYO公司

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养同第一章

#### 1.2.2 Rac1 pull-down活性检测实验

##### 1.2.2.1 Rac1 Pull-down Assay

###### （1）细胞培养：选取呈指数生长期细胞，胰酶消化细胞离心，并计数，均匀分瓶。细胞培养24小时。

###### （2）实验分组：共分8个组，其中空白组，不同浓度大黄酸组：

8.8μmol·L-1, 17.6μmol·L-1，26.40μmol·L-1, Rac1抑制剂NSC23666

12.5μmol·L-1；Rac1抑制剂NSC2366612.5μmol·L-1+大黄酸26.40μmol·L-

1, Rac1激活剂PMA 100nmol·L-1，Rac1激活剂PMA 100nmol·L-1+大黄酸26.40μmol·L-1, SKOV3-pm4细胞经上述处理后，细胞培养12小时。

###### （3）弃去培养液，PBS洗两遍，加入500μl预冷MLB裂解液，置冰上作用4-5min，用细胞刮将细胞刮下，收集至1.5ml离心管中，

1400g，5min，4℃离心，离心结束后收集上清至另一支离心管中。将所得蛋白样品保存于-20℃备用。

###### （4）BCA法测定蛋白含量

①标准曲线的绘制：取酶标板，按照上表2-4加入各试剂。

表2-4 蛋白标准曲线制作表

Table 2-4 The standard curve of protein assay

| 孔号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 蛋白标准溶液  2mg/ml（μl） | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |

29

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 超纯水（μl） | 20 | 19.5 | 19 | 18 | 16 | 14 | 12 | 10 |
| 蛋白含量 | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| （μg） |  |  |  |  |  |  |  |  |

②配制BCA工作液，根据样本数量，以100: 2的比例配制试剂A及B。

③取96孔板，每个浓度梯度设置3个复孔，每孔加入200μl BCA工作液。

④将孔板放置于37℃恒温箱中反应30min，570 nm波长下比色测定。记录吸光值，根据蛋白标准品对应的蛋白含量（μg）为横坐标和各浓度的吸光度值为纵坐标，绘制蛋白标准曲线。

⑤再根据待测样品的吸光度值比对标准曲线相应的蛋白含量（μg），再以样本的稀释比例，可算出待测样品的蛋白浓度。

###### （5）蛋白定量：用BCA法对蛋白样品进行定量，使得每500μl蛋白样品中蛋白含量为2000μg。

###### （6）Rac1 Pull-down实验的阳性和阴性对照处理：

①阳性对照：取空白组500μl蛋白裂解液加入浓度为100x GTPγS 5μl，于

30℃下孵育30min，孵育过程中要注意每5~8min重悬一次。孵育结束后加入32.5μl 1M氯化镁，混匀样品。即完成阳性对照的处理。

②阴性对照：取空白组500μl蛋白裂解液加入浓度为100x GDP 5μl，于30℃下孵育30min，孵育过程中要注意每5~8min重悬一次。孵育结束后加入32.5μl 1M氯化镁，混匀样品，即完成阴性对照的处理。

（7）样本Rac1 Pull-down实验：每500μl蛋白样品加入10μl磁珠（磁珠用前进行离心重悬），于冰上孵育1h，孵育过程中每5~8min重悬一次，孵育结束后于磁力架上选定同一孔用500μl MLB洗涤3次。弃掉上清，每管加入24μl超纯水，16μl 5Xloading buffer和2μlβ-巯基乙醇，混匀后快速离心5s，沸水浴5min，所得样本可直接进行westernblot检测，也可储存于-20℃。

#### 1.2.3 Western Blot and Detection

30

##### 1.2.3.1 蛋白免疫印迹（Western blot）实验基本操作流程：样品蛋白质的提取蛋白含量的测定蛋白质变性SDS-PAGE电泳转膜封闭一抗孵育二抗孵育凝胶成像系统分析。

##### 1.2.3.2 实验方法

（1）配制蛋白上样样本：蛋白上样量40~50μg/孔，根据蛋白浓度计算每个样品的体积，蛋白上样体积与SDS-PAGE蛋白缓冲液

（5×Loadingbuffer）比例为4: 1，余可用蛋白裂解液来调整总体积，保证总体积和总蛋白量均一致，冰上操作。

（2）蛋白变性：蛋白样本混匀后置于金属浴中，95℃加热，5min变性，常温下12000rpm离心1min即可上样。

（2）SDS-PAGE电泳：将预制胶固定，向两块玻璃板之间倒入约200ml电泳液，液面没过玻璃板，平行拔出梳齿。混匀样本，缓慢匀速地将标本加到上样孔中，Marker上样量为4~5μl。以恒压电压80V电泳。待样品达到分离胶和浓缩胶交界处或者Marker稍分开，加大电压到120V，当上样缓冲液中溴酚蓝靠近分离胶下端的边缘时，关闭电源终止电泳。

（3）转膜：中速摇晃甲醇浸泡PVDF膜5min，转膜液平衡10min，将三明治转膜夹展开，倒入转膜液。以Marker标志条带为参照，明确内参

GAPDH与目的蛋白的位置，裁取目的条带，放置在转膜三明治夹中的滤纸上，后将转膜液中PVDF膜盖在胶条上，以3层干净滤纸、聚丙烯酰氨凝胶条带、PVDF膜、3层干净滤纸、海绵垫层顺序放置。夹闭时加入转膜液，以电流150mA，时间2.5h转膜。

（4）封闭：转膜完毕，取出转有蛋白的PVDF膜，PBS缓冲液浸泡，快速震荡洗涤3次，每遍5min，洗去膜上的转膜液，再将PVDF膜浸泡封闭液中，室温下中速封闭2.5h。

（5）孵育一抗：PBST冲洗PVDF膜3次，每遍5min。按照抗体使用说

31

明书的稀释抗体，将目的一抗和GAPDH用封闭液稀释成工作液。每种工作液均配制8ml置于50ml离心管中。清洗后的PVDF膜转移到一抗稀释液中，蛋白面均向下，浸于液面之下，低速孵育4℃过夜。（6）孵育二抗：次日取出PDVF膜，用PBST快速洗涤3次，每次10min，按照抗体说明书上的稀释比例用PBST溶液稀释辣根过氧化物酶标记的二抗，配制成二抗工作液，室温中速孵育2h。

（7）扫膜显影检测：PBST快速震荡洗涤3次，每次5min。打开Bio-rad扫膜检测设备与软件，设置好各参数后，将PVDF膜放置于检测台上，加入ECL化学发光剂（A液与B液1:1比例混匀）与膜反应，运行软件扫膜检测，凝胶图像处理系统观察并分析结果。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS16.0软件对实验结果数据进行分析，计量资料以均数±标准差（x±s）表示，组间比较用方差分析，*P*<0.05为差异有统计学意义。Western blot实验结果灰度值采用Image Lab软件进行测量分析。

## 2 实验结果

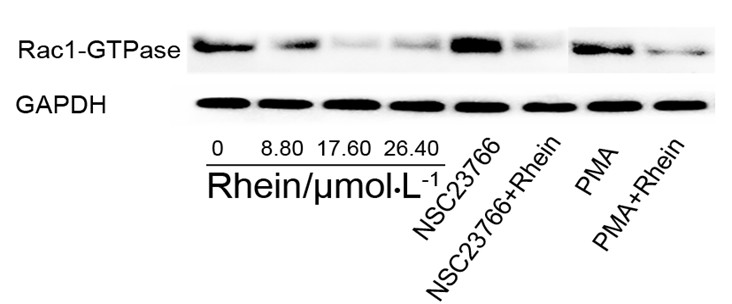
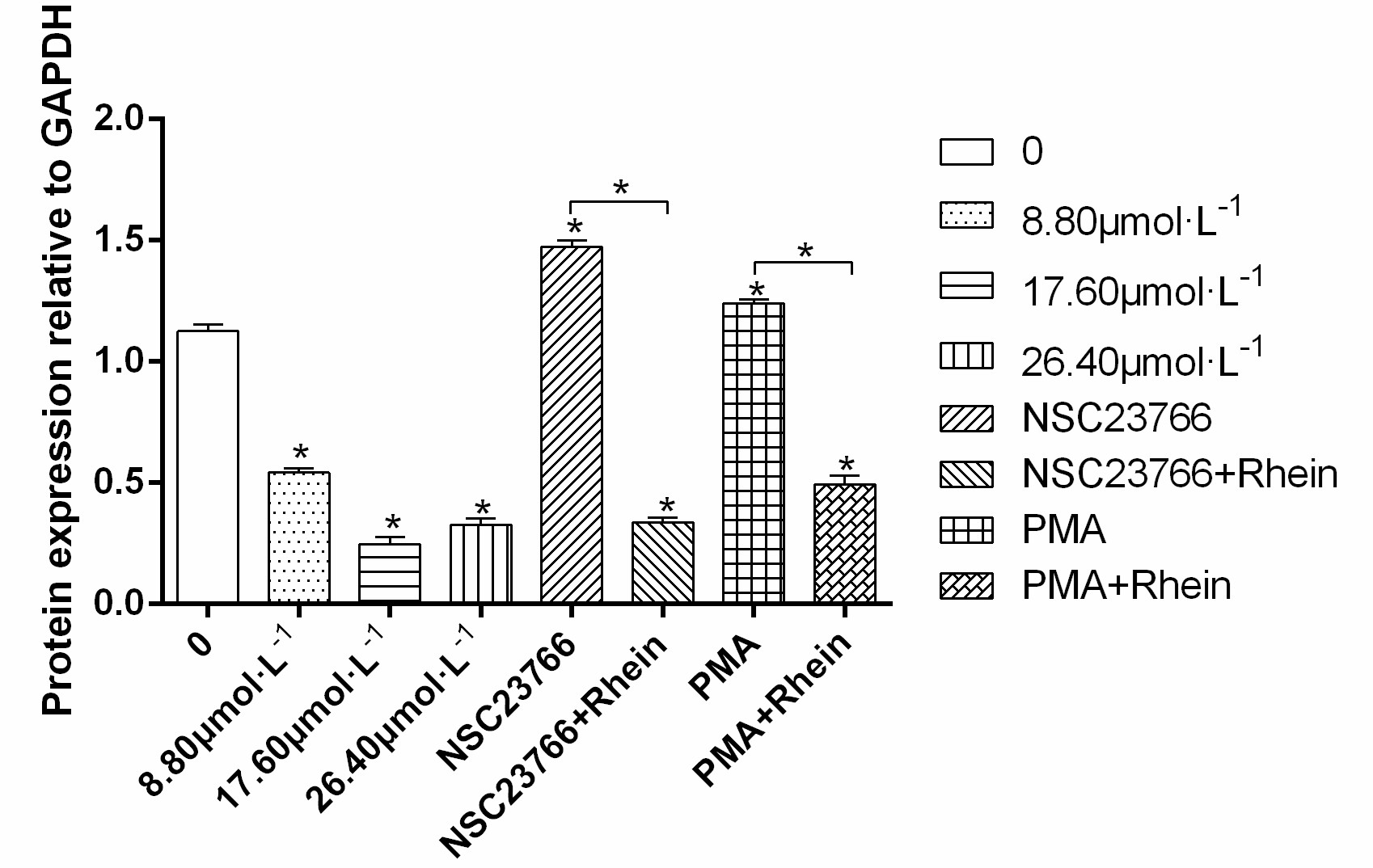
### 2.1 大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对SKOV3-pm4细胞Rac1-GTPase活性蛋白影响

检测Rac1-GTPase活性蛋白结果如图2-1（A、B），可见SKOV3-pm4细胞Rac1-GTPase活性表达：大黄酸处理下的SKOV3-pm4细胞的Rac1- GTPase活性蛋白表达逐渐下降且在浓度为17.60μmol·L-1和26.40μmol·L-1降低最为明显（P<0.05）；且在Rac1抑制剂NSC23766与大黄酸协同作用下，比单用Rac1抑制剂组，Rac1-GTPase活性蛋白表达明显降低；Rac1激活剂PMA的作用下，Rac1-GTPase升高明显，而激活剂与大黄酸共同

32

作用细胞比单用Rac1激活剂Rac1-GTPase降低（P<0.05）。

(A)



(B)

图

2-1

Western Blot检测SKOV3-pm4细胞中Rac1-GTPase活性的表达

Fig2-1 Expression of active Rac1-GTPase protein in SKOV3-pm4 cells

The changes of protein after Rhein (8.80,17.60,26.40μmol·L-1), inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L-1) and Rhein (26.40μmol·L-1) plus Rac1 inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L-1), Rac1 activator (PMA 100nmol·L- 1) and Rhein (26.40μmol·L-1) plus Rac1 activator (PMA 100nmol·L-1) treatment in SKOV3-pm4 cells for indicated durations. Intensity of Rac1 and Rac1-GTPase protein were standardized to that of GAPDH respectively, \* P<0.05 vs control group, NSC23766 vs Rhein +NSC23766, PMA vs PMA+ Rhein.

33

34



### 2.2 大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对SKOV3-pm4细胞Rac1总蛋白影响

检测Rac1总蛋白结果如图2-2，结果显示，大黄酸处理后SKOV3-

pm4细胞的Rac1总蛋白表达逐渐下降且在浓度为17.60μmol·L-1和26.40μmol·L-1降低明显（P<0.05）；而在Rac1抑制剂NSC23766与大黄酸协同作用下，比单用Rac1抑制剂组，Rac1总蛋白表达降低；Rac1激活剂

PMA的作用下，Rac1总蛋白升高明显，而激活剂与大黄酸共同作用细胞比单用Rac1激活剂PMA, Rac1总蛋白降低（P<0.05）。

（A）

（B

）

图2-2 Western Blot检测SKOV3-pm4细胞中Rac1总蛋白表达

Fig2-2 Expression of Rac1 in SKOV3-pm4 cells

The changes of protein after Rhein (8.80,17.60,26.40μmol·L-1), inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L-1) and Rhein (26.40μmol·L-1) plus Rac1 inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L-1), Rac1 activator (PMA 100nmol·L- 1) and Rhein (26.40μmol·L-1) plus Rac1 activator (PMA 100nmol·L-1) treatment in SKOV3-pm4 cells for indicated durations. Intensity of Rac1 and Rac1-GTPase protein were standardized to that of GAPDH respectively, \* P<0.05 vs control group, NSC23766 vs Rhein +NSC23766, PMA vs PMA+ Rhein.

## 3 讨论

细胞运动是肿瘤细胞浸润和转移的关键环节，细胞骨架重组、极性化、囊泡运输等复杂的反应共同促进细胞迁移运动。而受多种信号分子的调节细胞骨架的重组过程是细胞发生运动的基础。Rho家族小G蛋白作为Ras超家族重要分支之一，包括Rac、CDC42、Rnd。它们在肿瘤中高表达，通过细胞极化性的改变、细胞骨架重组、细胞内外信号的转导这些方面参与细胞的迁移与侵袭[14]。通过分子间信号传导激活多条信号路径，引起骨架重排，细胞极性的改变，促使肿瘤的异常增殖、恶性转型、侵袭和转移与肿瘤血管生成。深入探讨Rho GTPases家族在肿瘤生长和运动中的作用可能

为抑制肿瘤细胞的运动与迁移提供新的策略。

35

Rho GTPases中的Rho、Rac、CDC42参与联系细胞表面受体与细胞肌动蛋白和细胞骨架的形成。Rho的激活调控细胞膜受体和细胞骨架之间的信号途径转，促使细胞产生应力纤维与局部黏着斑；CDC42的激活可以引起细胞产生丝状伪足；Rac的激活可以使细胞产生板状伪足与膜褶皱样运动[3]。

Rho GTP酶，存在与GTP或GDP结合的高亲和力位点，在与活性GTP结合激活形式和无活性GDP结合形式之间循环，当细胞受到各种因素的刺激后，Rho结合的形式由GDP转换为GTP，Rho分子中的GTP酶活化，并与下游特殊的效应分子相互作用引起各种细胞内反应，导致效应分子的活化影响细胞运动。其中研究最多的是涉及actin细胞骨架的重组。而Rac1作为调控脂类代谢，细胞形态，细胞黏附、增殖，膜运输、内皮细胞连接和细胞周期的分子开关，可影响细胞凋亡、调节蛋白和转录因子的活性[15]。

Rho GTP酶在维持细胞的形态、增殖、黏附和调控细胞的生长周期中的重要作用，其表达高低与肿瘤的恶性程度密切相关。因此以Rho小G蛋白及其效应蛋白的抗肿瘤作用正被大量深入研究。而目前研发Rho小G蛋白的抗肿瘤作用药物研究主要策略是：（1）寻找特异的Rho小G蛋白的调控蛋白和下游效应蛋白抑制剂；(2) Rho小G蛋白翻译后异戊烯化修饰抑制剂；（3）小分子RNA干扰技术[16]。由于RhoA、CDC42、Rac参与大量的细胞功能调控，直接抑制它们的功能会引起机体显著的细胞毒性，并能导致机体产生各种不良反应。因此，使用小分子抑制剂抑制其调控蛋白与下游的效应蛋白更有实际的临床应用价值。这类抑制剂可以与激酶蛋白竞争ATP从而阻断蛋白激酶的活性。上述研究结果提示我们：采用细胞模型研究不同Rho

小G蛋白的特异化功能，高通量地筛选特异的Rho小G蛋白信号通路抑制剂，同时，将传统的抗癌药物与Rho小G蛋白信号通路抑制剂联合用药可能改进或增强癌症治疗的效果；确定某一个Rho小G蛋白或某些Rho小G蛋白的组

36

合作为抗癌药物分子靶标。本研究选取Rac1作为细胞骨架调控通路的起始，研究它的抑制或者激活状态下，Rac1-GTPase酶活性的变化，从而明确

Rac1激活和抑制与细胞迁移和侵袭的关系。

课题组前期采用分子对接MOE软件，对大黄酸、NSC23766分别与

Rac1蛋白进行了模拟对接，结果发现，大黄酸与Rac1具有良好的亲和力。结合能△G分别为-5.013Kcal/mol和-2.958Kcal/mol，亲和力大黄酸优于

NSC23766。从本实验结果可以看出，大黄酸能下调Rac1蛋白酶活性，并优于NSC23766。与Rac1抑制剂联合作用下，Rac1-GTPase下调明显，提示大黄酸可能是Rac1小分子抑制剂。这也为我们下一步研究大黄酸调控Rac1引导的信号分子通路奠定了良好的实验基础。而本实验中发现SKOV3-pm4在抑制剂NSC23766的作用下Rac1-GTPase表达增高，可能原因是Rac1-

GTPase的非特异性结合，或者NSC23766激活其他蛋白信号途径引起Rac1-

GTPase的表达，有待进一步研究证实。

# 第三章 大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对卵巢癌细胞

37

Rac1/LIMK1/Cofilin分子信号通路调控作用

前 言

细胞骨架重组是肿瘤细胞转移的关键步骤。肌动蛋白组成的微丝骨架是大多数细胞运动的基础。而多种原因引起微丝细胞骨架动态变化的信号通路机制正被深入研究。Rac1，作为一个小G蛋白Rho家族被称为膜皱裂的关键调节因子，引起的肌动蛋白骨架重排，参与肿瘤细胞的转移。

多项研究表明，Rho小G蛋白家族是细胞骨架调控上游最为重要的蛋白分子。细胞迁移过程中，Rho家族小G蛋白Rac下游的效应子PAK1和PAK4分别对LIMK1第508位和LIMK2第505位苏氨酸片段的磷酸化引起下游

Cofilin（CFL）自身磷酸化位点Ser3的磷酸化而发挥作用，从而影响微丝的聚合和解聚，导致细胞骨架、伪足和纤毛的运动的改变[17-18]；而

Rac1、Arp2/3复合体、IRSp53、WAVE2以及cofilin共同协调作用调控细胞骨架actin（肌动蛋白）聚合。作为Rac1的下游效应蛋白，

IRSp53，WAVE2和Arp2蛋白，能调节actin细胞骨架和膜重塑。IRSp53可作为适配器蛋白让Rac1和WAVE2结合；WAVE2可以通过IRSp53激活

Arp2/3复合体，诱导肌动蛋白的分支和板状伪足形成[19-20]。其中，cofilin能驱动actin微丝解聚和激活的Arp2/3复合体促进已形成的actin丝成核产生分支，诱导actin分枝微丝网络的形成[21]。Rac1/LIMK1/Cofilin信号通路促使actin的解聚与聚合；Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2信号通路介导的actin的聚合并形成由actin构成的网状结构和片状伪足，从而完成了细胞信号从

Rac至细胞骨架的传递。两者共同促使肌动蛋白网络的形成和细胞骨架信号的传导。

在第二章实验中，我们可看到大黄酸明显抑制Rac1-GTPase活性表达，

38

且与Rac1抑制剂联合作用下，Rac1-GTPase活性更明显下调。

Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2两条蛋白通路（如图3-1）参与肿瘤细胞的迁移与浸润的机制研究还有待深入探索。信号通路中的相关基因蛋白分子的作用以及大黄酸与相关蛋白的相互作用的机理还尚未十分明确。本研究通过检测大黄酸对卵巢癌细胞Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2两条蛋白通路上基因蛋白表达的影响，探讨大黄酸在卵巢癌转移和运动中的对细胞骨架及运动能力的影响，阐明卵巢癌转移发生发展的机制。



39

图3-1 Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2信号传导通路图

Fig3-1 Rac1/LIMK1/Cofilin and Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2 Signaling pathway

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株

人上皮性卵巢癌细胞系（SKOV3）购于中国医学科学院肿瘤研究所，于广西医科大学医学科学实验中心传代保存。卵巢癌淋巴结定向高转移细胞系（SKOV3-pm4）为本课题组前期构建。

#### 1.1.2 主要试剂及配制

##### 1.1.2.1 主要试剂

兔多克隆Phospho-cofilin（Ser3）抗体美国Cell Signaling公司鼠单克隆抗体LIMK1美国Abcam公司

兔多克隆PAK1美国Abcam公司兔多克隆PAK1（phospho T212）美国Abcam公司兔多克隆cofilin抗体美国Abcam公司

GAPDH内对照抗体美国Abcam公司兔多克隆抗体LIMK1（phospho T508）美国Abcam公司

兔多克隆WAVE2抗体美国Cell Signaling公司

兔多克隆Arp2抗体美国Cell Signaling公司

鼠单克隆IRSp53抗体美国Abcam公司

逆转录试剂盒Roche公司

TRIzol细胞裂解液美国Invitrogen公司

FastStart Universal SYBR Green Master Roche公司

##### 1.1.2.2 主要试剂的配制

40

1）1.5%琼脂糖凝胶配制：琼脂糖0.75g，1×TAE50ml，微波炉加热至沸腾，冷却至50℃左右，加入10mg/mlEB液2.5ul混匀。

2）Western blot主要试剂的配制详见第二章。抗体的稀释比例：以Rac1(1:250)、cofilin(1:250)、P-cofilin(1:200)、LIMK1(1:500)、P-LIMK1(1: 100)、PAK1(1: 500)、P-PAK1(1: 250)、Arp2(1:500)、IRSp53(1:500)、WAVE2（1:500）或GAPDH一抗（1: 6000）

#### 1.1.3 主要仪器设备

普通PCR仪美国Thermo公司

ABI7300实时荧光定量PCR仪美国ABI公司核酸微量检测仪美国Thermo公司Western blot主要仪器设备见第二章

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养同第一章

#### 1.2.2 实时荧光定量PCR反应（qRT-PCR）检测SKOV3-pm4细胞

Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2分子信号通路基因的表达水平

##### 1.2.2.1 从细胞中提取RNA

（1）TRIzol细胞裂解液、异丙醇、氯仿、EP管、75%乙醇等置于冰上预冷。

（2）弃掉细胞培养瓶中的培养基，细胞换液后加入1ml TRIzol细胞裂解液，冰上放置5~10min。

（3）将瓶中液体吸入至1.5mlEP管中，加入200μl氯仿后剧烈震荡15s，后置于冰上3min。

（4）4℃，12000rpm低温高速离心20min。样品分3层，吸出上层无色水

41

相500ul置于EP管中。

（5）重复（3）~（4）一次，提取更高纯度的RNA.

（6）加入预冷的异丙醇500μl，冰上放置10min，4℃，12000rpm离心15min，弃掉上清，底部白色沉淀即为RNA。

（7）加入75%乙醇1ml洗涤沉淀物，4℃，12000rpm离心5min，弃掉上清。

（8）冰上晾置5~10min，自然干燥RNA沉淀物，加入预冷50μlDEPC水，反复吹打，放置10min，置于-80℃冰箱长期保存。

（9）取1μlRNA样品溶液，用NanoDropND-2000微量核酸检测仪测定

260nm和280nm吸光度值，并通过计算A260/A280的比值检测RNA样品质量是否合格，比值1.8~2.0提示合格。

（10）取上述RNA样品5μl，加1μl 6×Loadingbuffer电泳缓冲液，混匀后加样到1%琼脂糖凝胶电泳中，恒压100V，20min，后用PCR凝胶检测仪检测，可见5s、18s、28s三条带，且28s条带亮度在18s条带2倍以上。说明RNA纯度和完整性较好。

##### 1.2.2.2 cDNA合成

###### （1）冰上操作，总RNA和逆转录试剂盒中各试剂稍微离心。

###### （2）逆转录反应体系如下：

总RNA 1μg

随机六聚寡核苷酸引物2μl

锚定寡核苷酸（dT）18引物1μl

DEPC水（PCR级）加至总体积为13μl

###### （3）PCR仪中65℃加热10min之后立即放入冰浴中变性。

###### （4）再按照下列步骤添加剩余组分

Protector RNase 0.5μl

42

Inhibitor(40U/μl)

5×逆转录buffer 4μl

逆转录酶（20 U/μl）0.5μl

dNTP(10mM) 2μl

###### （5）PCR仪运行25℃10min和50℃，60min反应。

###### （6）80℃加热5min灭活逆转录酶后，得到稳定的cDNA产物，-20℃保存。

##### 1.2.2.3 引物的设计与合成

###### （1）设计引物：利用GenBank数据库中人类

Rac1、PAK1、LIMK1、cofilin、WAVE2、IRSp53、Arp2、GAPDH基因的序列号，用oligo7.0软件进行引物设计，引物交给由深圳华大基因公司合成。

###### （2）各引物序列如下，见表3-1.

表3-1 RT-PCR引物序列及产物长度

Table 3-1 The primer sequences of Real-time PCR

| 基因 | 引物系列 | 长度（bp） |
| --- | --- | --- |
| Rac1 | 上游：5'—ATGTCCGTGCAAAGTGGTATC—3' | 249 |
|  | 下游：5'—CTCGGATCGCTTCGTCAAACA—3' |  |
| LIMK1 | 上游：5'—ACTGCGGGCACTGCTACTA—3' | 129 |
|  | 下游：5'—GCTTGCCATGAGATGAGGCT—3' |  |
| PAK1 | 上游：5'—CAACTCGGGACGTGGCTAC—3' | 81 |
|  | 下游：5'—CAGTATTCCGGGTCAAAGCAT—3' |  |
| cofilin | 上游：5'—TACGCCACCTTTGTCAAGATG—3' | 163 |
|  | 下游：5'—CCTTGGAGCTGGCATAAATCAT—3' |  |
| IRSp53 | 上游：5'—TGGAGCAGTTCAACCCTAGC—3' | 86 |
|  | 下游：5'—GGCTGCATACGTCACACCT—3' |  |
| WAVE2 | 上游：5'—CTCGGGTAAGCTCCCTTGC—3' | 109 |
|  | 下游：5'—GCTTTTCGGGTGTTGATTCCTT—3' |  |
| Arp2 | 上游：5'—CACCTGTGGGACTACACATTTG—3' | 94 |
|  | 下游：5'—TGGTTGGGTTCATAGGAGGTTC—3' |  |
| GAPDH | 上游：5'—CTGGGCTACACTGAGCACC—3' | 101 |
|  | 下游：5'—AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG—3' |  |

43

##### 1.2.2.4 实时荧光定量PCR反应

（1）每个样品的目的基因和GAPDH基因均设置3个复孔，在同一块反应板上每个基因均设置不加模板cDNA的阴性对照孔。设立空白对照即不含模板的反应体系。实时荧光定量PCR反应体系如下：

模板cDNA 1μl

上游引物0.2μl

下游引物0.2μl

ROX 5μl

DEPC水3.6μl

体系总体积10μl

（3）反应条件：一、变性，95℃，10min，1个循环；二、退火，

95℃，30s，三、延伸，60℃，1min，40个循环。

（4）结果分析：定量方法采用相对定量比较域值法进行分析，目的基因相对表达量按照2-△△Ct法公式计算：以GAPDH为内参，△△Ct=（待测组目的基因平均Ct值－待测组内参基因平均Ct值）－（对照组目的基因平均

Ct值－对照组内参基因平均Ct值），后计算目的基因的相对表达水平比率

2-△△Ct。

#### 1.2.3 Western Blot

实验方法同第二章

### 1.3 统计学方法

采用SPSS16.0软件对实验结果数据进行分析，计量资料以均数±标准差（x±s）表示，组间比较用方差分析，*P*<0.05为差异有统计学意义。

44

## 2 实验结果

### 2.1 大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4 的

Rac1/LIMK1/Cofilin信号传导通路影响

#### 2.1.1 大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4 的

Rac1/LIMK1/Cofilin信号传导通路中基因的表达水平影响

图3-2为不同基因的溶解曲线和扩增曲线。图3-3中大黄酸明显下调

Rac1、LIMK1、PAK1、cofilin mRNA的表达（P<0.05）；单用Rac1激活剂，Rac1、LIMK1、PAK1、cofilin mRNA表达上调；单用抑制剂，

Rac1、LIMK1和cofilin mRNA的表达下调（P<0.05），而PAK1 mRNA无明显改变。大黄酸联合抑制剂，Rac1、LIMK1和cofilin mRNA的表达明显下调；联合激活剂，通路上相关基因表达下

调（P<0.05）。

45



46

47



图 3-2 不同基因的溶解曲线与扩增曲线

Fig3-2 Disssolution and amplification curve of different genes

48



图 3-3 Rac1/LIMK1/Cofilin信号传导通路中基因的表达水平影响

Fig3-3 Expression level of Rac1/LIMK1/Cofilin Signaling pathway gene

The changes of mRNA level after Rhein (8.80,17.60,26.40μmol·L-1), inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L- 1) and Rhein (26.40μmol·L-1) plus Rac1 inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L-1), Rac1 activator (PMA 100nmol·L-1) and Rhein (26.40μmol·L-1) plus Rac1 activator (PMA 100nmol·L-1) treatment in SKOV3-pm4 cells for indicated durations. \* P<0.05 vs control group, NSC23766 vs Rhein +NSC23766, PMA vs PMA+ Rhein.

#### 2.1.2 大黄酸联合Rac1抑制剂和激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4 的

Rac1/LIMK1/Cofilin信号传导通路中蛋白的表达影响

49

结果见图3-4(1A、1B, 2A、2B, 3A、3B):大黄酸明显下调

Rac1、P-PAK1、P-LIMK1、P-cofilin蛋白表达，具有剂量依赖性

（P<0.05），但PAK1、LIMK1、cofilin总蛋白表达无明显改变；单用Rac1激活剂，Rac1、P-LIMK1、P-PAK1、P-cofilin蛋白表达上调；单用抑制剂， Rac1、P-LIMK1、P-PAK1、P-cofilin蛋白表达下调（P<0.05）；大黄酸联合抑制剂，Rac1、P-PAK1、P-LIMK1、P-cofilin蛋白下调明显，但总的PAK1、LIMK1、cofilin蛋白表达无明显改变；联合激活剂，通路上

Rac1与相关磷酸化蛋白下调（P<0.05）。

 （1A）

（1B）



50

51

（2A）



（2B

）

（3A）



（3B）



图 3-4 Rac1/LIMK1/Cofilin信号传导通路中蛋白的表达水平影响

Fig3-4 Expression level of Rac1/LIMK1/Cofilin Signaling pathway protein

### 2.2 大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4 的

Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2信号传导通路影响

#### 2.2.1 大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4

的Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2信号传导通路中基因的表达水平影响图3-5为相关基因的扩增与溶解曲线。结果如图3-

6: Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2信号传导通路中基因的表达：大黄酸下调

IRSp53、WAVE2、Arp2 mRNA，具有剂量依赖性（P<0.05）；单用激活剂，

IRSp53、WAVE2、Arp2 mRNA表达上调；单用抑制剂，WAVE2、Arp2

52

53

mRNA表达下调（P<0.05），其中IRSp53 mRNA表达无明显差异；大黄酸联合抑制剂，IRSp53、WAVE2、Arp2 mRNA表达下调明显；联合激活剂，通路上各基因表达下调（P<0.05）。



54



图3-5 不同基因的溶解曲线与扩增曲线

Fig3-5 Disssolution and amplification curve of different genes



55

图 3-6 Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2信号传导通路中基因的表达水平影响

Fig3-6 Expression level of Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2 Signaling pathway gene

The changes of protein level after Rhein (8.80,17.60,26.40μmol·L-1), inhibitor (NSC23766 12.50μmol·L-1) and Rhein (26.40μmol·L-1) plus Rac1 inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L-1), Rac1 activator (PMA 100nmol·L-1) and Rhein (26.40μmol·L- 1) plus Rac1 activator (PMA 100nmol·L-1) treatment in SKOV3-pm4 cells for indicated durations. \* P<0.05 vs control group, NSC23766 vs Rhein +NSC23766, PMA vs PMA+ Rhein.

#### 2.2.2 大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂对卵巢癌细胞SKOV3-pm4

的Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2信号传导通路中蛋白的表达影响

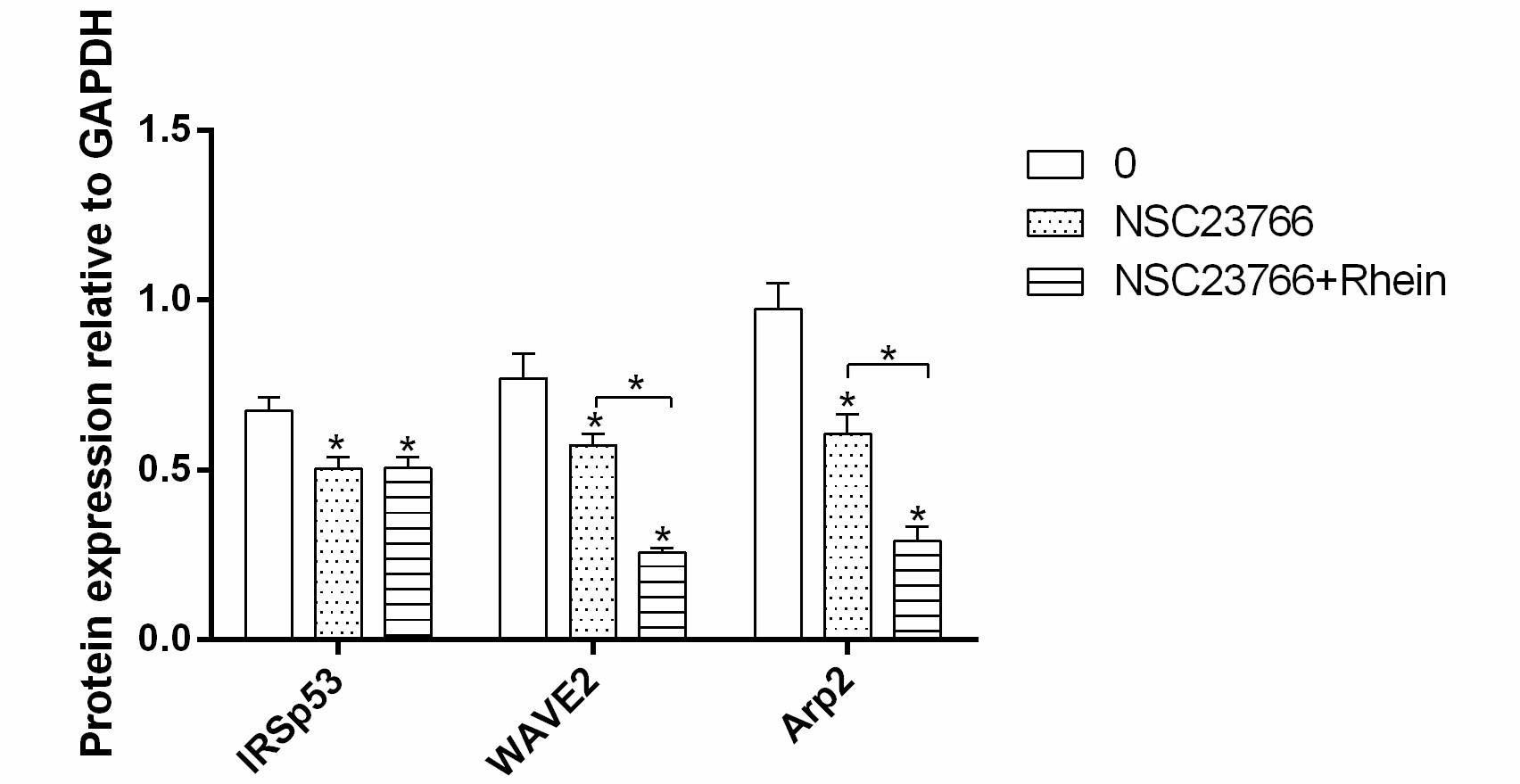
结果见图3-7（1A、1B, 2A、2B, 3A、3B）：大黄酸下调

IRSp53、WAVE2、Arp2蛋白表达，具有剂量依赖性（P<0.05）；单用激活剂，IRSp53、WAVE2、Arp2蛋白表达上调；单用抑制剂，

WAVE2、Arp2、IRSp53蛋白表达下调（P<0.05）；大黄酸联合抑制剂，

IRSp53、WAVE2、Arp2蛋白表达下调明显；联合激活剂，通路上各蛋白

56



表达下调，基因与蛋白表达水平变化趋势基本一致（P<0.05）。

（1A）



（1B）

（2A）



（2

B)

57

（3A）



（3B）

58



图3-8 大黄酸对卵巢癌SKOV3-pm4细胞Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2信号通路影响

Fig3-8 Protein expression level of Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2 signaling pathway related protein

The changes of protein level after Rhein (8.80,17.60,26.40μmol·L-1), inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L-1) and Rhein (26.40μmol·L-1) plus Rac1 inhibitor (NSC23766 12.5μmol·L-1), Rac1 activator (PMA 100nmol·L-1) and Rhein (26.40μmol·L- 1) plus Rac1 activator (PMA 100nmol·L-1) treatment in SKOV3-pm4 cells for indicated durations. \* P<0.05 vs control group, NSC23766 vs Rhein +NSC23766, PMA vs PMA+ Rhein. (\*P<0.05)

59

## 3 讨论

恶性肿瘤的发生、发展是生物分子之间相互作用多靶点多环节调控的结果。卵巢癌转移牵涉到不同的分子异常机制，不同的分子机制的卵巢癌表现不同组织病理学类型[21]。根据不同亚型肿瘤分子病理，从复杂信号通路中发现更多关键分子靶点，针对关键分子靶点筛选特异性强、靶向性高的药物，有利于实现卵巢癌个体化治疗和靶向性治疗。

肿瘤细胞的转移机制牵涉到细胞运动中蛋白分子相互作用和细胞骨架结构改变的协同调节。细胞中微丝重排、伪足和纤毛伸出前进是细胞迁移和浸润的先决条件。而调节细胞运动的蛋白分子研究中，Rho家族小G蛋白中的Rho、Rac、CDC42都参与肌动蛋白细胞骨架的形成[6]。Rho主要在迁移细胞的中部和尾部发挥功能，负责细胞尾部粘附的释放和细胞体的收缩。

Rac的主要负责促进微丝的聚合产生细胞前进的推动力。Rho GTPases可通过以下三条不同的信号通路调控cofilin、capping蛋白、Arp2/3复合体等蛋白分子参与细胞骨架形成与运动[22]。①Rho和Rac/CDC42可分别通过其下游靶分子ROCK (Rho associated coiled coil forming protein kinase, Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶)和PAK使LIMK磷酸化，进而磷酸化cofilin并使之失活，最终抑制actin微丝的解聚。②Rac还可通过4, 5二磷酸磷脂酰肌醇(PtdIns (4,5) P2)与capping蛋白结合来抑制capping蛋白的加帽作用从而促进

actin聚合[23]。③Rac与IRsp53相互作用，通过IRsp53的SH3区与WAVE关联，促使Arp2/3复合体激活，最终引起actin分支成核，促使细胞向前伸展的板状伪足形成，为细胞迁移提供向前运动的牵拉力[24]。

Rho通过ROCK (Rho associated kinase)使LIMK磷酸化和Rac和CDC42通过磷酸化它们共同的下游分子PAK使LIMK ( LIM Kinase)磷酸化，而磷酸化的LIMK能使cofilin位点ser3磷酸化，导致cofilin失活，释放ADP-G-

actin，cofilin解聚F-actin的功能被抑制；另外，Rac1和CDC42分别通过

60

WAVE ( a WASP family protein)和WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein )激活Arp2/3复合体，促使微丝分支。Rac与IRsp53相互作用，通过

IRsp53的SH3区与WAVE关联，促使Arp2/3复合体激活，最终引起actin分支成核，actin微丝网络形成，促使细胞向前伸展的板状伪足形成，为细胞迁移提供向前运动的牵拉力[25-27]。其中IRsp53的CRIB序列(CDC42/rac interactive binding motif)可与活化的CDC42与结合，促进IRsp53的SH3区与Mena蛋白结合，引起丝状伪足的形成[28]。

本实验对Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2两条信号传导通路研究发现，大黄酸能抑制卵巢癌细胞SKOV3-pm4的

Rac1、IRSp53、WAVE2、Arp2和PAK1、LIMK1、Cofilin基因相对表达表达量，且Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2两条信号传导通路相关通路的蛋白也明显降低，基因与蛋白水平的表达一致，由此表明大黄酸在卵巢细胞迁移和运动中起到一定作用。Rac1作为两条通路的上游分子，影响细胞骨架和细胞运动，实验结果也进一步证实，

Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2两条信号传导通路相关通路共同影响细胞骨架的构成，进而影响细胞的迁移和侵袭。研究以Rac1作为肿瘤细胞增殖的关键分子，通过抑制或激活Rac1活性表达，进而影响其下游信号通路分子的表达。其中联合Rac1抑制剂，上述分子基因和蛋白水平表达都降低，除IRSp53 mRNA相对表达增高；而联合使用Rac1激活剂，两条信号传导通路基因和蛋白水平表达都明显低于单用Rac1激活剂。表明

Rac1能显著影响两条通路信号的传导，Rac1可能成为影响肿瘤细胞运动迁移中Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/WAVE2/Arp2两条信号传导通路的靶点分子。而大黄酸则可以充当Rac1的小分子抑制剂，影响下游相关信号通路的传导，调控细胞骨架微丝的聚合和解聚，从而引起细胞运动的改变。

61

本研究表明大黄酸影响卵巢癌细胞迁移与浸润能力，可以通过降低Rac1-GTPase活性表达，影响下游相关蛋白通路表达，并引发相关的连锁反应，抑制细胞向前运动，降低肿瘤细胞的转移，而抑制卵巢癌的远处转移。大黄酸可作为Rac1靶点分子的小分子抑制剂用于抗卵巢癌药物筛选的先导化合物。

肿瘤的侵袭转移涉及多条信号通路传导和分子蛋白参与，本研究仅是探讨针对Rac1为靶点的相关两条信号通路研究，Rac1上下游其他蛋白分子的机制研究和这些信号通路的药物研究仍需丰富。利用动物模型进一步证实大黄酸对Rac1涉及的信号通路研究的调控作用，将为大黄酸及其衍生物的抗肿瘤药物的开发，和寻找新型的抑制肿瘤侵袭转移药物奠定基础。

# 全文小结

1、首次使用扫描电子显微镜和激光共聚焦免疫荧光显微镜观察到大黄酸对卵巢癌细胞形态和超微结构的影响。

2、大黄酸对卵巢癌细胞运动有着明显的抑制作用，能减少细胞纤毛，片状伪足形成，促使细胞微丝骨架断裂，质膜翻折凹凸不平，抑制细胞运动和迁移能力。它可通过抑制肿瘤细胞转移和侵袭靶点分子Rac1-GTPase活性表达调控Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2分子信号通路影响卵巢癌的运动能力。

3、通过研究调节细胞骨架和细胞运动能力的Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2信号通路机制及大黄酸联合Rac1抑制剂和Rac1激活剂对该信号通路作用，证实大黄酸能抑制卵

62

巢癌细胞运动能力，其可作为Rac1小分子抑制剂的潜力。

# 本研究创新之处

首次研究Rac1/LIMK1/Cofilin和Rac1/IRSp53/ WAVE2/Arp2信号通路与大黄酸抑制卵巢癌淋巴结高转移细胞侵润转移的关系，明确Rac1作为调控细胞运动迁移关键蛋白和作用靶点是本研究的创新之处。这些蛋白靶点确证，对于建立抗肿瘤转移药物的筛选模型、先导化合物的发现提供一个新的平台。

63

综述

细胞运动迁移的分子机制与卵巢癌的治疗现状

## 1 与细胞运动相关的细胞结构与蛋白

### 1.1 细胞结构

细胞含有胞核、质膜、线粒体细胞骨架、溶酶体等细胞器。不同的细胞器具有不同的功能和结构特点，但这些细胞器在结构及功能上相互协调，密切联系。细胞通过迁移的前端局部细胞膜出现前伸形成伪足，细胞伪足在基底部分通过黏附结构黏附；细胞骨架收缩整体易位；细胞尾端脱黏附及回缩四个步骤向前运动迁移。每一个步骤都包含着细胞骨架的动态变化，

64

而细胞骨架作为细胞运动重要的参与结构，不仅构成细胞结构功能，且参与细胞的运动和物质运输等。骨架活动和信号转导异常导致肿瘤细胞迁移速率明显高于正常细胞。

细胞骨架按成分可由微丝系统、微管系统和中间纤维系统构成。微丝骨架系统和微管骨架系统负责细胞运动和物质运输，中间纤维则参与细胞核的定位等。除此之外微丝上有众多微丝结合蛋白( actin-binding proteins, ABPs)，这些结合蛋白参与微丝加固切割、成帽成网和运动，影响actin微丝的伸缩和动力学变化。它的活化能促使肌动蛋白丝网络结构的组装和重组[29]。

微丝系统是细胞骨架的主要成分之一，由actin分子螺旋状聚合成的纤丝（肌动蛋白丝）组成，是真核细胞中含量最丰富的一种蛋白复合体。通常在细胞内以管状束或网络的动态变化形式存在。actin是构成微丝的基本成分。生理状态下，actin以纤维状肌动蛋白(F-actin )和球状肌动蛋白（G-

actin）两种形式存在。早期研究微丝结合肌球蛋白后呈箭头状形态，人为的把微丝地分为尖端（pointed end）和刺端（barbed end）。barbed end称为正端，因其组装速度较pointed end快；而pointed end则被称为负端

[30]. Actin聚合和解聚的生化特性以及G-actin的极性是大多数细胞运动的基

础。微丝的barbed end对ATP结合的G-actin，具有高亲和力，G-actin一般为

ATP结合形式，如此ATP结合的G-actin可以源源不断地结合到barbed end，形成纤维状肌动蛋白（F-actin）。F-actin延长的过程中，结合的ATP可被水解为ADP和磷酸，而ADP-actin与微丝pointed end的亲和力下降，易从pointed end脱落下来。随着actin微丝的聚合，F-actin pointed end解离后的G-actin呈ADP结合状态，体系中的G-actin浓度下降到临界浓度。ADP 结

合的G-actin在Profilin的帮助下解离后迅速进行核苷酸ADP和ATP的交换[31]。

ABPs包括ADF/cofilin家族、Arp2/3复合体、Profilin等多种微丝结合蛋

65

白。其中ADF/cofilin家族蛋白能够与微丝barbed end结合，提高G-actin的解离速率，ADF/cofilin还能够对F-actin进行剪切产生更多的actin聚合位点，促进微丝的组装。处于正在迁移的细胞的前端的ADF/cofilin，提供游离G-

actin降解已存在的微丝和产生新的微丝，活化的cofilin可以加速微丝pointed end的ADP-G-actin结合解离，而微丝细胞骨架滚动循环的限速步骤恰恰是微丝pointed end的G-actin解离。微丝pointed end的G-actin解离的加速提高了G-actin-ATP复合体的浓度，高浓度的G-actin-ATP复合体平衡了pointed end的快速解聚又可以促进barbed end的快速生长。因而cofilin从整体上加快细胞运动的速度促进了细胞骨架滚动循环，它还具有去分支作用，可和Arp2 /3复合物竞争actin，对其进行抑制。而Rac调节的LIMK酶能使

cofilin磷酸化灭活[32]。

### 1.2 与细胞运动相关的蛋白

Rho蛋白（Rho GTPases）属于小G蛋白超家族成员，人类的Rho小G蛋白家族包含20个成员，分别属于

Rho、Cdc42、Rac、Rnd、Rif/RhoD、RhoBTB、RhoH和Wrch这8个不同的亚家族[33]。Rho GTPases是Rho超家族中的一类小分子的GTP水解酶，可以在与GTP结合的激活形式和与GDP结合的非激活形式相互转换。

Rho GTPases通过复杂的分子信号通路控制真核细胞形态发生、分裂、细胞极性和细胞运动等最基本的生物功能。它能通过调节细胞骨架蛋白和细胞粘着斑的重新排列，影响细胞的运动和极化，控制着微丝的组装。人类的Rho小G蛋白家族发现的成员中，RhoA、Rac和Cdc42的功能机制研究最多。早期认为CDC42-WASP-Arp2/3途径影响线状伪足形成，后来的实验证据不支持这一信号通路的作用。在成纤维细胞的线状伪足中，检测不到

Arp2/3复合体的存在；敲除WASP基因并没有影响线状伪足的形成。线状伪足的形成可能是由CDC42引起的其它信号途径而实现的。新近发现的

66

文

CDC42的下游信号formin可能积极参与了线状伪足的形成，formin定位于线状伪足的尖端[34]。

真核细胞内广泛表达主要在Rac亚家族中的Rac1，它的过表达可引起细胞伸展，激活形式Rac1可引起细胞产生板状伪足膜褶皱样运动。Rac1的激活途径有两种：一是DOCK180（一种新的鸟嘌呤核苷酸交换因子）激活

Rac1，DOCK180通过Crk相关底物等蛋白使Rac1活化；另一通路是通过

PI(3,4,5) P3对富含Db1癌基因同源结构域的鸟嘌呤核苷酸交换因子作用从而激活Rac1，活化的Rac1反过来作用于磷酯酰肌醇3-激酶，形成一条正反馈信号通路。如此活化的Rac1影响下游信号分子，从而调节调节细胞前缘片状伪足丝状肌动蛋白的聚合，通过加强细胞间的信号转导促进细胞骨架的构建和促进细胞间的黏附，从而进一步促使肿瘤细胞的增殖[35]。

p21活化激酶( p21-activated kinase, PAKs)是Rac和CDC42的一类效应蛋白质，是类进化保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，可以通过GTP酶依赖或非GTP酶依赖的信号通路中生长因子及其他胞外信号活化，发挥多种生物学效应，是参与细胞骨架重排、细胞凋亡和肿瘤增殖等方面重要分子

[36]. PAKs活化由细胞外信号通过酪氨酸激酶受体或G蛋白偶联受体转导至

细胞内，通过G蛋白依赖或非依赖的途径激活。PAKs分为

PAK1, PAK2，PAK3(classⅠ)和PAK4，PAK5，PAK6(classⅡ，classⅡ不依赖Rac1活化)。PAKs激活BAD/Bcl-2信号通路；PAKs能活化Ras/Raf

/MeK /ERK通路的引起激酶级联反应；PAKs介导细胞迁移与侵袭是通过

Rac1以LIMKS为靶点磷酸化cofilin；PAKs还影响肿瘤血管再生发生、细胞代谢等其它过程。PAK1的过表达能导致各种肿瘤细胞的侵袭和转移，尤其在乳腺癌、卵巢癌和胃癌作用明显。PAK1参与细胞迁移与侵袭中，

PAK1通过磷酸化丝氨酸激酶LIMK-1/2（PAKs并不能直接通过Rac1调节

cofilin，需在增加LIMK活力扩大cofilin切割回应和cofilin依赖末端产物），

67

促进细胞板状伪足、丝状伪足和细胞膜褶皱的形成，促进细胞运动，调节肌动蛋白细胞骨架动力学，参与细胞骨架重构、细胞运动、细胞黏附和肿瘤恶性进展。一方面，磷酸化的LIMK通过磷酸化cofilin的Ser3位点，使其失去与肌动蛋白结合的能力，从而抑制了肌动蛋白微丝解聚；另一方面，

PAK1调节磷脂酶slingshot活性可抑制cofilin的磷酸化，使得肌动蛋白微丝解离[37]。PAK1还可通过对细丝蛋白、丝切蛋白、Arp2/3 (actin related

protein2/3）复合体调节亚单位P41-ARC和肌球蛋白ⅡA等效应蛋白的调节来控制细胞骨架重构。其中PAK1通过结合并磷酸化Arp2/3复合物中的调节亚单位p41-Arc调节肌动蛋白分支纤维网络的形成，进而介导细胞迁移。

人类LIM激酶( LIM kinase, LIMK)共发现2个亚系，即LIMK1和

LIMK2 [38]. LIMKS是研究最多的酶，LIMK1和LIMK2是通过Thr508和

Thr505磷酸化激活，可激活大量酶，包括

ROCK，PAK1，PAK2，PAK4，MRCKa和MAPK-激活酶2。研究证实

LIMK1 在前列腺癌、乳腺癌等恶性肿瘤的细胞及组织中呈过表达和或活性异常增强[39]。细胞质与细胞核之间穿梭的LIMK1，主要是参与细胞质中肌动蛋白的细胞骨架的组装，Rho等蛋白可激活磷酸酶Rho或是PAK等，使其活化LIMK，可直接磷酸化Cofilin蛋白的Ser3使其失活，从而逆转Cofilin诱导的肌动蛋白解聚[40]。研究者们发现LIMK1不但能调控肌动蛋白聚合，而且能调控长春新碱、紫杉醇等肿瘤化疗药物作用靶点微管的重排[41]。

Cofilin属于ADF(actin depolymerizing factor) /cofilin家族，

ADF/cofilin首先是从猪脑中分离出来，随后从酵母和哺乳动物中发现所有真核细胞中至少具有一个ADF/cofilin。最先研究表明Cofilin以1: 1摩尔比绑定F-actin或者G-actin并依赖PH值改变解聚F-actin，参与细胞骨架运动。随着研究深入，发现cofilin具有核定位信号序列和能易位到细胞核中与actin参与应答各种应激，能在细胞分裂，细胞胞吞作用及胚胎组

68

织的发展中起到重要的作用。以及cofilin参与局部缺血，氧化或渗透胁迫以及组织再生等病理情况。并能从肿瘤细胞转化的初始过程，肿瘤细胞转移过程中增强细胞活力和肿瘤细胞分裂三个方面调控肿瘤的进展

[42]. ADF/cofilin家族含有三个亚型。非肌源性cofilin[n-cofilin或cofilin- 1(CFL-1)]，肌源性特异型cofilin[m-cofilin or cofilin-2(CFL-2)]，和ADF(actin-depolymerizing factor)。cofilin的分子量为19kD，在进化上高度保守，主要讨论cofilin1. Cofilin在细胞当中存在两种方式，一是非磷酸化状态的cofilin（激活），另一种是磷酸化的cofilin（失活）。cofilin（指非磷酸化状态的cofilin）和磷酸化的cofilin分布在细胞的不同区域，cofilin分布主要发现在运动和迁移的突触当中，如能动的上皮细胞

的片状伪足和浸润肿瘤的浸润伪足。而磷酸化的cofilin均匀分布于胞质中，除了细胞勘探前缘。cofilin也在胞核当中发现，它能与F-actin形成杂聚物，研究家们认为这种状态下的cofilin并不参与快速actin动力学和细胞运动

中调节cofilin的活力。cofilin是控制actin运动的关键分子，具有解聚和

切割的双重功能。cofilin能解开F-actin，通过F-actin分解机制切开F-actin，形成更小细片F-actin，缩短全长的剩余actin微丝，能使一定数量的actin

增加。Actin刺端如果没有加帽蛋白覆盖，那么F-actin碎片聚合刺端，促使形成增强型actin聚合网络。低浓度的G-actin能促发cofilin切割actin聚合网络的形成和cofilin通过改善actin解聚来增加G-actin浓度，来稳定生理G-actin水平。此外cofilin从旧的actin微丝上产生分支分离Arp2/3 复

合体，还支持Arp2/3复合体分支成核[43]。Cofilin可通过Ser3的去磷酸化、

PtdIns(4,5) P2的水解和cortactin调节。LIMK1和LIMK2和TESK1 和

TESK2可在体内cofilin位点上Ser3的磷酸化。cofilin的调节关键氨基酸是Asp122和His133, Asp122在质膜上结合

PtdIns（4,5）P2，PtdIns（4,5）P2能通过磷脂酶C（PLC）的水解作用形

69

成脂醇-1, 4, 5-三磷酸盐（IP3）和甘油二酯，释放cofilin，导致位点上激活突触和细胞极性引起F-actin微丝切割；cortactin能够通过分子的N末端多个内部串联重复序列结合F-actin，并且被认为通过存在于该分子的C-末端富含脯氨酸和SH3结构域来链接微纤丝到细胞膜。Cortactin能通过刺激

Arp2/3复合体使actin微丝分枝成核和通过cofilin抑制actin微丝切割和调节信号通路[44-45]. cofilin和与actin聚合和解聚之间的平衡，且这平衡还依赖其他actin调节蛋白，比如AIP1，MENA，RHOC，

CAP，coronin，gelsolin的调节和影响[46]。

肌动蛋白相关蛋白Arp2/3复合物(Arp2/3)是一个稳定的椭球体状复合体，分子量为220 KDa，由进化上保守的7个亚基组成，包括

ArpC1、ArpC2、ArpC3、ArpC4和ArpC5五个附属亚基和两个肌动蛋白相关蛋白Arp2和Arp3[47]。结合F-actin的babredend的一侧的Arp2/3复合体存在于细胞膜的波动边缘，Arp2/3复合体具有acitn结构上的同源性，能促使

acitn成核，产生了高度分支的F-actin分支，这些分支相互作用形成树突状网络结构，对细胞迁移运动至关重要。Arp 2/3复合体可在数秒内组装微丝，介导板状伪足( lamellipodia)中微丝聚合。细胞中内源性Arp2/3复合体的激活因子是Wiskott-Aldrich Syndrome Proteins（WASP）家族成员，而

WASP本身又可以被小G蛋白激活。如此，细胞外刺激信号通过作用于一系列受体引起小G蛋白的激活，促使WASP和Arp2/3的激活[48]。WASP羧基端可以持续活化Arp2/3复合体，而其它的结构域是多种信号分子的靶位点。Arp2 /3复合体促使新的微丝枝杈生长，介导微丝聚合，为肿瘤细胞的侵润性特性提供更适合的环境。

BAR蛋白质家族包括IRSp53(insulin recptor tyrosine kinase substrate p53, BAIAP2)，MIM(missing in metastasis), Abbal (actin–bunding protein with BAIAP2 homology1), IRTKS(insulin receptor tyrosine kinase substrate，

70

又称为BAI-associated protein2-like 2, BAIAP2L2） 共有五个编码基因含有

I-BAR和根据有无SH3结构域区分为：IRSp53亚家族（包括

IRSp53、IRTKS和FLJ22582）和MIM亚家族（包括MIM和Abbal）[49-

52]. I-BAR蛋白质家族具有结合肌动蛋白、细胞膜和小GTP酶的特点，其中IRSp53已被定性为链接的Rho家族的衔接蛋白GTP酶，如Rac，对细胞骨架的重组。IRSp53作为Rac和WAVE2之间至关重要的“联络员”：既可以以氮端的RCB区域与活化的Rac相结合，还可以通过其SH3结构域与WAVE2 PRD 区域内的特异性序列结和使得IRSp53与Rho家族GTP酶结合到I-BAR等功能域，使活化的I-BAR蛋白质家族成员激活WAVE2蛋白质从而引发Arp2/3复合物介导的肌动蛋白成核和聚合反应，从而完成细胞膜变形、形成细胞膜突起结构、长生伪足等生理特性[53]。

WASP家族（Wiskott-Aldrich syndrome protein family, WASP family）是一种新型肌动蛋白调节蛋白，它的缺失使细胞在结构、迁移和侵袭运动等方面都可收到影响。WASP家族包括神经组织来源的N-

WASP、WASP蛋白和WAVE蛋白，它们根据同源结构的不同又被划分为两个亚家族：WASP亚家族（WASP、NWASP）和WAVE亚家族(WAVE1(WASP family verprolinhomologous

proteinl，WAVEl）、WAVE2、WAVE3）。它们的表达具有组织特异性。

NWASP主要表达于神经系统、WASP主要表达于造血系统，WAVE1和

WAVE3在脑组织中高表达和WAVE2在人组织细胞中广泛表达[54-

55]. WASP基因编码的WASP蛋白是Rho GTP酶下游区的一个效应器，其中WAVE2调节actin的聚合与细胞骨架的重排，参与细胞信号通路的转导，促进片状伪足的形成和细胞迁移。WASP家族介导Rac、CDC42等信号分子的效应来激活Arp2/3复合物，促进actin在现有actin的刺端或侧方发生聚合，也可在actin重新成核的基础上促进其聚合，进而调节actin聚合及

71

细胞骨架重排：一方面，WASP和NWASP可由CDC42和PI(4, 5) P2的作用下被激活，进而激活Arp2/3复合物，促进actin的聚合和丝状伪足；作为

Rac的下游效应物的WAVE2不能直接与Rac结合，而是通过形成Rac- IRSp53-WAVE2复合物，细胞外的信号随之由膜受体传递至WAVE2并使其活化，进而激活A rp2/3复合物同时启动Arp2/3复合物促进肌动蛋白组装，完成细胞信号从Rac到细胞骨架的传递，介导片状伪足的形成，参与肌动蛋白的聚合及细胞骨架重组的调控，调节细胞迁移、增殖等过程。研究认为WAVE2作为Rac下游的激活机制主要有：Rac-IRSp53-WAVE2复合物模式、WAVE2-Abi1-Nap1-PIR121复合物模式、WAVE2-Abi1-Nap1-Sra-1复

合物模式的三种激活模式，上述提到IRSp53作为Rac和WAVE2的联络员[56]，通过介导的肌动蛋白的聚合并形成由肌动蛋白丝(F-actin)构成的网状结构

和片状伪足，完成Rac至细胞骨架的传递细胞信号。Rac介导的片状伪足形成的主要通路可能是Rac-IRSp53-WAVE2复合物模式[57]。

## 2 卵巢癌的临床治疗现状与前景

卵巢癌是目前女性最常见的生殖性系统恶性肿瘤之一，其发病率仅次于宫颈癌与子宫内膜癌。但因其发病隐匿、早期症状不明显与缺乏特异性，可被确诊的患者只占四分之一。而70%以上的患者确诊时已为临床晚期

（FIGOⅢ-Ⅳ期），并伴有远处转移，手术常不能完全切除。由于卵巢癌高发病率与死亡率、早期发现难、易远处转移和缺乏手术指针和治疗效果不佳，已对女性身体健康造成严重的威胁。

卵巢癌的治疗方式有手术、化疗、放疗、化放疗联合、免疫治疗和生物治疗等和中医治疗指口服方剂、中成药、敷用药、局部贴针灸以及食疗。

### 2.1 卵巢癌的非靶向治疗

72

目前卵巢癌最常用的治疗方案为肿瘤减灭术+以铂类为基础的药物联合化疗。而首选的国际公认一线化疗方案为铂类（顺铂/卡铂）联合紫杉醇治疗（TP/TC方案）。虽然大部分患者对以铂类为基础的一线化疗方案敏感，但晚期卵巢癌患者的复发率却达70%以上。其中大部分患者在一线化疗后出现继发性铂类耐药，导致复发性卵巢癌患者预后极差。而临床上针对复发性卵巢癌患者的治疗主要采用姑息性治疗。铂类耐药复发性卵巢癌患者应用的化疗药物主要有紫杉醇、拓扑替康、吉西他滨、聚乙二醇多柔比星脂质体和依托泊苷，因其与铂类化合物联合无交叉耐药性[58]。而姑息性治疗目的是减轻患者临床症状，提高患者生存质量和延长患者生存时间。现如今卵巢癌治疗最大的障碍是其原发性或继发性铂类耐药的产生和耐药引起的复发性卵巢癌的治疗，近年来探索铂类耐药治疗卵巢癌新方案，已成为治疗该类疾病的新趋势。

内分泌治疗中，研究证实对于手术、各种化疗方案无效的顽固性卵巢癌或对化疗药物不能耐受的患者，促性腺激素释放激素联合顺

铂治疗方案的总体生存率、5年生存率均较单纯顺铂治疗提高[59]，可作为补救措施。乳腺癌内分泌治疗中雌激素或孕激素阳性是乳腺癌用药重要指标，但对卵巢癌的内分泌治疗价值尚未确定。证据显示雌激素能影响卵巢癌细胞增殖。临床研究评估雌激素受体拮抗剂如他莫昔芬及芳香化酶抑制剂在卵巢癌中的治疗价值具有指导意义[51]。

基因治疗中采用脂质体、腺病毒和反转录病毒载体系统的基因治疗，有研究使用脂质体对卵巢癌细胞系进行p53基因转染，并联合使用顺铂，显著抑制了癌细胞的增殖能力[60]。

卵巢肿瘤免疫治疗的首选是树突细胞疫苗，以树突细胞为基础的肿瘤疫苗是目前刺激抗原特异性细胞免疫反应的最有效方法，并在多种抗肿瘤实验中取得较好效果[61]。

73

### 2.2 卵巢癌的靶向治疗

借助分子生物学实验技术的靶向治疗研究的新思路，研究肿瘤治疗的特异性与有效性逐渐成为目前研究热点。肿瘤分子靶向治疗与细胞毒化疗药治疗、激素治疗和免疫治疗共同构成了现代肿瘤药物治疗的主要治疗手段。肿瘤分子靶向治疗是在细胞分子水平上，针对目的肿瘤相关分子设计针对的治疗药物，药物能与目的肿瘤因子特异性结合，阻断、封闭或延缓肿瘤发生发展过程中关键作用的生长因子或激素从而下调该受体的表达或下游基因的活化，有效干预该标志性分子并调控与肿瘤发生发展密切相关的信号转导通路，达到程序化逆转肿瘤细胞分化与增殖的能力，抑制肿瘤生长或转移，或者间接抑制靶向肿瘤新生血管生成，使肿瘤血管细胞缺血坏死凋亡，达到靶向治疗的目的[62]。

近来临床治疗中应用成熟的肿瘤分子靶向治疗，主要是肺癌、大肠癌和乳腺癌治疗。目前卵巢癌主要的靶向分子药物研究有：1）与血管生成抑制相关的肿瘤分子靶向药物：靶向血管内皮生长因子(VEGF, vascular endothelial growth factor)的药物：贝伐单抗(bevacizumab)与阿柏西普

（zivaflibercept）和靶向VEGFR的药物索拉菲尼(sorafenib)。受体通路抑制剂贝伐单抗不仅通过与VEGF竞争性结合相应受体，阻断VEGF经由VEGF受体1进行的信号转导，抑制肿瘤内皮细胞增殖及新生血管生成；还能结合所有VEGF亚型，抑制新生血管生成，与其他化疗药物联合应用治疗

NSCLC、转移性结直肠癌、转移性肾癌和神经源性肿瘤等

[63]. zivaflibercept是一种由VEGF和VEGFR结合的片段和IgG1的Fc段融合得到重组的融合蛋白。作为一个可溶性的受体，是针对VEGF合成的一种伪装受体，可与VEGF-A、VEGF-B及胎盘生长因子等配体结合发挥肿瘤抑制作用但不具备VEGF的功能，能抑制新生血管形成与使残存的异常

74

肿瘤血管正常化与可减轻肿瘤负荷及减少腹水的作用[64]。Sorafenib是首个口服的小分子酪氨酸激酶抑制剂，通过抑制VEGF受体3以及血小板源性生长因子受体β（PDGFR-β）的酪氨酸激酶活性，可抑制Ras/Raf/丝裂原活化蛋白激酶激酶/细胞外信号调节激酶(Ras-Raf-MEK-ERK)信号转导通路，阻断肿瘤细胞增殖和肿瘤血管生成而抑制肿瘤生长[65]。2)抗表皮生长因子受体( epidermal growth factor receptor, EGFR)通路抑制剂：EGFR家族包括EGFR (HER1/ErbB-1)、ErbB-2 (HER2/neu)、ErbB-3(HER-3)和ErbB-4 (HER-4) 4个结构相似的酪氨酸激酶受体。当与配体如表皮生长因子和转化生长因子α结合后，受体蛋白可以形成同型/异型二聚体，发生自磷酸化，激活下游包括PI3K-Akt-mTOR和Ras-Raf-MAPK等信号通路[66]。这些信号通路的激活参与调控细胞生长、分裂和分化，从而介导细胞分化、生存和迁移侵袭等一系列细胞过程。多数卵巢癌患者存在EGFR及配体的异常表达和少数存在EGFR基因扩增，且疾病进展和患者死亡率增高与

ErbB1、HER2的过表达密切相关[67]。而目前的研究较多的代表药物有抗

EGFR1的西妥昔单抗（cetuximab）、抗HER2的曲妥珠单抗

（trastuzumab）、马妥珠单抗(matuzumab)和帕妥珠单抗（pertuzumab）。

Cetuximab[可与正常细胞和多种肿瘤细胞表面的转化生长因子](http://baike.baidu.com/view/521684.htm)α（TGF-α）等EGFR特异性结合，并竞争性阻断EGFR和其他配体[68]，抑制EGFR结合

的酪氨酸激酶（TK[），阻断细胞内信号转导途径](http://baike.baidu.com/view/3852735.htm)，从而抑制癌细胞的增殖，诱导肿瘤细胞的凋亡，减少血管内皮[生长因子](http://baike.baidu.com/view/553300.htm)和[基质金属蛋白酶](http://baike.baidu.com/view/598774.htm)的产生

[69]；matuzumab是与EGFR具有高亲和力的人源化免疫球蛋白G1单克隆抗

体，由于细胞Fc受体可以识别免疫球蛋白G1的Fc部分，并且由此推测，

matuzumab可通过触发抗体依赖性细胞毒作用而使过表达EGFR的肿瘤细胞凋亡[70]；pertuzumab对肿瘤组织HER2/HER3表达之比高者多重治疗失败的卵巢癌有很好的耐受性可显著延长无进展生存期（PFS）[71]。3）与细胞

75

膜特异性抗原相关的分子靶向药物CA125单克隆抗体，CA125主要通过形成抗原抗体复合物启动经典免疫应答反应，抑制卵巢癌生长。它是一种细胞表面糖蛋白抗原，在卵巢癌患者血清中有不同程度地升高。多项Ⅱ期临床试验研究表明单药CA125单克隆抗体治疗卵巢癌的疗效与晚期卵巢癌患者一线治疗后的维持治疗无显著疗效[72]。

而肿瘤的靶向分子治疗牵涉到许多分子信号通路的转导，多种信号转导通路的异常表达与肿瘤生长、肿瘤血管新生和肿瘤侵袭、转移及肿瘤化疗耐药机制等特性密切相关。比如PI3K/Akt/mTOR信号通路、

Raf/MEK/MAPK信号通路和蛋白酶体抑制剂等信号通路相关分子调节。

1）PI3K/Akt/mTOR信号转导通路中PI3K通过调节亚基与这些分子结合而被募集到质膜，并由催化亚基催化PI生成PIP3. PIP3进一步激活Akt和mTOR，对各种肿瘤细胞的增殖、新生肿瘤血管形成、肿瘤细胞的转移以及肿瘤对药物的耐药机制发挥重要作用[73]。以PI3K（吉利德（idelalisib，

Zydelig)）、AKT抑制剂MK2206替西罗莫司（Temsirolimus）和

mTOR（西罗莫司(temsirolimus, Torisel)与依维莫司

（everolimus, Afinitor））为靶点的抗癌药物研究是近年研究的热点。

Zydelig已被FDA批准用于慢性淋巴细胞白血病和滤泡型B细胞非霍奇金淋巴瘤等肿瘤的治疗，是第1个批准上市的PI3Kδ抑制剂[72]。针对mTOR位点的药物Torisel和everolimus，其可以降低缺氧诱导因子和VEGF的产生，从而具有抑制肿瘤新生血管的作用。因此Torisel和everolimus分别在2007年和

2009年被批准用于晚期肾癌的治疗。在正常卵巢组织与卵巢癌组织的区别在于卵巢癌组织中能检测到mTOR的过表达或PI3K/Akt/mTOR信号转导通路的激活，所以卵巢癌的发展与PI3K/Akt/mTOR信号转导通路有着密切联系。Weberpals等人发现，人卵巢癌细胞系SKOV3应用特异性PI3K-Akt抑制剂LY294002和wortmannin可协同增加紫杉醇诱导的凋亡效力

76

[74].2）EGFR的酪氨酸激酶抑制剂EGFR介导

Ras/Raf/MEK/MAPK（Ras/Raf/丝裂原活化蛋白激酶激酶/丝裂原活化蛋白激酶途径）、PI3K/PKC/IKK（磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶C/IkB激酶）途径、JAK/STAT（JAK激酶/信号转导转录活化因子）途径。近来针对这些途径的靶向治疗药物正不断进入临床试验阶段。

肿瘤的小分子抑制剂的使用，肿瘤治疗中很难通过某种单一的手段来有效抑制肿瘤细胞的侵润转移。抑制肿瘤细胞侵袭和转移，阻断肿瘤迁移运动的多种途径和多个环节是目前研究热点。如何控制肿瘤细胞的迁移和浸润是治疗肿瘤的关键问题之一。Rho小G蛋白家族成员及其调控蛋白和下游效应蛋白是开发抗癌药物的潜在靶点。因其参与细胞运动的多个方面阻碍肿瘤发生发展的进程，其中通过促使细胞控制的异常增殖的能力、促进凋亡和抑制肿瘤细胞的组织浸润与扩散等。传统的抗癌化疗药物，在使用的过程中会出现耐药性，大大降低疾病的治愈率。因此，联合用药和研发新药是今后抗癌化疗药物的发展趋势。

目前研究最多的Rac1抑制剂主要是NSC23766，它是Rac1少数的直接抑制剂，能与Rac1结合，阻止其被Rho鸟苷酸交换因子(Rho GEFs)激活；它们分别作用于Rho GTP酶信号通路的不同层面，发挥各自的作用。它能有效调节细胞骨架中的Rac GTPase功能和细胞周期，细胞生长，粘附，迁

移和基因转录等许多细胞功能。Rac1通过小鼠卵巢STAT3定向Jagged1处理，

GDF9和BMP15转录的调节促进原始卵泡形成，NSC23766明显抑制其形成

[75]. NSC23766明显抑制Rac1表达进而下调精氨酸ADP-核糖基转移1表达

抑制大肠癌的生长和增殖[76][。而宁少雄](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%ae%81%e5%b0%91%e9%9b%84&amp;code=32964383%3B32964384%3B08442181%3B24068440%3B17604821%3B08434228%3B)等人通过观察Rac1抑制剂

NSC23766探讨Rac1在盐敏感性高血压肾脏损害中可能的作用证实Rac1可能是通过TGF-β1通路的介导参与盐敏感性高血压大鼠的肾脏损害过程[77]。王筱霞等人发现Rac1抑制剂NSC33766可通过上调肾小球内肾病蛋白水平，

77

改善足细胞骨架的方式，对糖尿病肾脏损伤具有保护作用[78]。饶军研究发现结直肠癌细胞系HCT116经外源性药物浓度为75μmol·L-1的Rac1抑制剂NSC23766，明显下调具有影响转移能力和成瘤能力的神经轴突导向分子

SEMA3F产生LGR5、β-Catenin、Nanog、Oct4、Sox2及GTP-Rac1的表达水平的降低从而抑制结直肠癌细胞的转移潜能及体内成瘤能力[79]。而采用

Rac1抑制剂对卵巢癌淋巴结定向细胞的迁移运动能力的影响，有利于我们分析转移机制的信号通路和药物研究。

### 2.3 卵巢癌的中药治疗

尽管铂类抗肿瘤药物取得了巨大的成功，但同时也存在很多临床应用的障碍，如无靶向性、易产生毒副作用、耐药性或交叉耐药性等问题。卵巢癌属中医的“癥遐”、“积聚”、“肠覃”范畴，目前卵巢癌中药辅助用药有：柴胡疏肝理气；四君子汤加减以健脾化湿，解毒散结；杞菊地黄汤加减以养阴清热，滋补肝肾；沙参麦冬汤养阴清热，生津润燥。在术后及放、化疗过程中配合中医药治疗能扶助正气，保护脾胃功能，提高机体免疫力，还能降低化疗带来的毒副反应，减少并发症，提高生活质量及生存期[80-81]。

这些中药都来源于天然的自然植物，而从自然植物提取的有效成分抗肿瘤治疗已成为国内外药学研究者的热点研究课题。目前，临床上已经筛选出20多种植物来源的抗肿瘤药物。包括喜树碱类药物、紫杉醇类药物和鬼臼毒素类药物。喜树碱为DNA拓扑异构酶1抑制剂，

通过与DNA拓扑异构酶1-DNA可裂解复合物可逆性结合，形成喜树碱-

DNA拓扑异构酶1-DNA三元复合物，促进可裂解复合物的稳定，形成

“路障”，抑制复制叉的进程，从而导致细胞死亡。而因构效关系产生的衍生物更具有临床应用前景，临床上喜树碱衍生物包括伊立替康、拓扑替康、贝洛替康等，其中贝洛替康、拓扑替康已为卵巢癌的临床用药[82]。

78

紫杉醇是一种从短叶红豆杉的树皮中提取的植物类抗癌药，主要

能够促进微管蛋白合成、抑制微管解聚，从而将癌细胞阻滞在G期或M期，达到阻碍癌细胞分裂和增殖的目的[83]。

鬼臼毒素本身具有干扰细胞分裂，促进肿瘤细胞凋亡。而鬼臼毒素C、E环修饰的衍生物依托泊苷和替尼泊苷，具有高抗肿瘤活性，已美国FDA

批准上市，广泛用于睾丸癌、白血病、淋巴癌、NSCLC等的临床治疗[84]。由于植物来源的抗肿瘤药物的作用机制独特，抗癌疗效显著，已在临

床应用上逐步占据主导地位。但是这些药物也存在选择性差，易产生毒副作用及耐药性，甚至杀死正常细胞等问题[85]。因此，在从天然产物中寻找安全、经济和高选择性的抗癌活性物的基础上，对这些植物来源的化合物进行结构修饰，以获得低毒性、高活性的抗肿瘤候选新药，尤为重要。大黄酸( Rhein,4,5-dihydroxyanthraquinone)为蒽醌类化合物衍生物的单体，主要分布于蓼科植物中的大黄、虎杖、何首乌等多种传统中药。Rhein是从上述药物分离提纯的主要有效成分之一，它含有一个羧基和两个羟基，极性较强，具有生物还原性质。近来多项研究表明Rhein具有抗炎、保肝抗纤维化、抗肿瘤等多种药理活性作用，特别在研究糖尿病肾病与抗肿瘤药物治疗中，其药理作用机制不断深入探索，为大黄酸衍生物的药用活性研发奠定了良好的基础[86]。

在动物模型实验中发现Rhein能通过抑制大鼠转化生长因子β1和降低结缔组织因子活性，减轻肝脏炎症反应，保护肝细胞，抑制肝纤维化

[87]；Rhein能正负调节细胞基质金属蛋白酶（MMP），可参与与T细胞增

值或细胞因子介导疾病的预防抗炎治疗；Rhein诱发人前体脂肪细胞内

Ca2+活动，从而诱导转录因子CHOP的表达上调，抑制细胞的分化与增值

[88]；郑敬民等人则利用基因芯片发现了1个新的糖尿病肾病相关基因

mdnr411，且验证Rhein能诱导mdnr411基因的表达，这可能是Rhein治疗糖

79

尿病肾病的分子相关机制之一[89]。

Rhein能抑制肺癌、结肠癌和乳腺癌细胞等多种肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞的凋亡，其相关机制可能与抑制肿瘤细胞的细胞增殖和影响能量代谢有关[7, 90-91]. Rhein抑制RAS-RAF-MEK-ERK信号通路中表皮生长因子受体家族EGFR和HER－2的酪氨酸激酶磷酸化，抑制肿瘤细胞增殖

[92]. Rhein可显著下调鼻咽癌细胞基质金属蛋白酶MMP-9、血管内皮生长

因子VEGF、生长因子受体结合蛋白-2(GRB-2)、ROS和SOS-1的表达，抑制鼻咽癌细胞的转化和转移；Rhein还可通过减少人舌癌SCC-4细胞尿激酶型纤溶酶原激活物（u-PA）和细胞基质金属蛋白酶MMP-2、MMP -9的表达，从而抑制细胞转移及入侵。而由Rhein结构修饰而成的赖氨大黄酸，不仅可通过HER-2/NF-KB/p53/p21通路有效抑制人卵巢癌SKOV-3细胞和乳腺癌SK-Br-3细胞的增殖，且通过影响表皮生长因子受体的磷酸化和

MAPK信号通路抑制人乳腺癌细胞SK-Br-3、MCF-7和MDA-MB-231的增殖[93]，且研究结果表明赖氨大黄酸有望成为肿瘤临床辅助化疗药物。

综上所述，肿瘤的迁移与侵袭与细胞自我调控有着密切且复杂的关系。其中细胞骨架的重排，片状伪足的形成，细胞信号由Rac至细胞骨架的传递在肿瘤的转移浸润中发挥着重要的作用。细胞骨架形成、细胞运动结构和蛋白分子，在肿瘤运动中起到不可或缺的作用。大量研究表明大黄酸抑制乳腺癌、肺癌和卵巢癌等恶性肿瘤细胞侵袭转移的能力。因其作用机制复杂，并对其如何参与肿瘤细胞运动的过程机制目前还有待深入探索。且大黄酸对不同肿瘤抑制与调控的能力及作用存在差异。因此，对大黄酸抑制卵巢癌运动机制深入研究有利于揭示肿瘤转移发展的具体机制和大黄酸的药理作用，为卵巢癌治疗方案提供多方面的思路和实验依据。

80

参考文献

[1] 谢一泓, SPARC基因过表达对卵巢癌淋巴结高转移细胞生物学特性的影响[T], 广西医科大学, 2015.

[2] 董兵, 朱毅敏. 癌症分子靶向治疗的研究现状[J].癌症, 2010(03): 370-375.

[3] 杨娜, 隋峰, 李沧海, etc. 大黄酸对Caco-2细胞多药耐药蛋白转运体表达的影响[J]*.* 中国实验方剂学杂志, 2011(09): 133-136.

[4] 邓璐林, 张吉翔. 细胞接触性抑制运动的研究进展[J]*.* 中国细胞生物学学报, 2011(11): 1278-1283.

[5] 阮和云, 黎丹戎, 李力, etc. 卵巢上皮性癌淋巴道定向高转移细胞系的建立及其生物学特性的鉴定[J]*.* 中华妇产科杂志, 2007(07): 482-486.

[6] Huang, H. J. Lin, C. C. Chou, H. C, etc. Proteomic analysis of rhein- induced cyt: ER stress mediates cell death in breast cancer cells[J]*.* Mol Biosyst, 2014. 10(12): 3086-100.

[7] Zhang, K. Jiao, X. F. Li, J. X, etc. Rhein inhibits lipopolysaccharide-

81

Induced intestinal injury during sepsis by blocking the toll-like receptor 4 nuclear factor-kappaB pathway[J]*.* Mol Med Rep, 2015. 12(3):4415-21.

[8] 曹文枫, 孙保存. Rho蛋白与细胞骨架调节的细胞运动[J]*.* 中国肿瘤临

床, 2009(14):835-837.

[9] 宋厚盼, 陈昫, 李茹柳. Rho鸟苷三磷酸酶调节细胞迁移中细胞骨架结构的研究进展[J]*.* 广州中医药大学学报, 2013(02): 275-280.

[10] Marei, H., A. Carpy, B. Macek*,* etc*.* Proteomic Analysis of Rac1 Signalling Regulation by Guanine Nucleotide Exchange Factors[J]*.* Cell Cycle, 2016: 0.

[11] 张新颖, 人淋巴管内皮细胞对卵巢癌淋巴结定向高转移细胞分泌蛋白

的影响及候选蛋白的分析与验证[T], 广西医科大学,2014.

[12] 王萱怡, 刘延庆. Rho信号通路与肿瘤侵袭[J]*.* 中国临床药理学与治疗学, 2016(01): 99-102.

[13] 刘明, 黄瑞华, 毕锋. Rho GTPases与肿瘤[J]*.* 中国生物化学与分子生物学报, 2015(04): 367-372.

[14] Lin, Y. and Y. Zheng. Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery[J]*.* Expert Opin Drug Discov, 2015. 10(9): 991-1010.

[15] 章硕, 姜浩, 苏琦. Rac1与肿瘤的研究进展[J]*.* 国际病理科学与临床

杂志, 2011(05):410-414.

[16] 曹雪敏, 刘祎, 勿呢尔*,* etc. Rho小G蛋白信号通路在癌细胞生物学中的多样功能*.* 中国细胞生物学学报, 2015(06): 879-885.

[17] Tang, W., P. Cai, W. Huo*,* etc. Suppressive action of miRNAs to ARP2/3 complex reduces cell migration and proliferation via RAC isoforms in Hirschsprung disease[J]*.* J Cell Mol Med, 2016.

[18] Zhou, T., C. H. Wang, H. Yan, etc. Inhibition of the Rac1-WAVE2-Arp2/3

82

Signaling pathway promotes radiosensitivity via downregulation of cofilin-1 in U251 human glioma cells[J]*.* Mol Med Rep, 2016.

[19] Abe, T., D. Yamazaki, S. Murakami*,* etc. The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in Drosophila mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway[J]*.* Development, 2014. 141(24): 4716-28.

[20] Marchesin, V., G. Montagnac and P. Chavrier. ARF6 promotes the formation of Rac1 and WAVE-dependent ventral F-actin rosettes in breast cancer cells in response to epidermal growth factor[J]*.* PLoS One, 2015. 10(3): e0121747.

[21] Ramalingam, P. Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer[J]*.* Oncology (Williston Park), 2016. 30(2): 166-76.

[22] Bravo-Cordero, J. J., M. A. Magalhaes, R. J. Eddy*,* etc*.* Functions of cofilin in cell locomotion and invasion[J]*.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. 14(7): 405-15.

[23] 彭小春, 魏蕾. Rho GTPases与肿瘤生长和转移[J]*.* 长江大学学报(自

科版), 2006(12):340-343.

[24] Tolias, K. F., J. H. Hartwig, H. Ishihara*,* etc. Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly[J]*.* Curr Biol, 2000. 10(3): 153-6.

[25] 陈燕萍, 鲁翔. I-BAR结构域蛋白质家族[J]*.* 生命的化学, 2011(06): 891-895.

[26] 苏小娟, 王思洋, 霍永旭, etc. Arp2/3复合体在细胞运动以及肿瘤转移中机制的研究进展*.* 四川生理科学杂志[J], 2015(01): 31-34.83

[27] 张利军, 魏蕾. WAVE2与细胞骨架的研究进展[J]*.* 武汉大学学报(医学版), 2005(05): 678-682.

[28] Krugmann, S., I. Jordens, K. Gevaert*,* etc. Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53: Mena complex[J]*.* Curr Biol, 2001. 11(21): 1645-55.

[29] 唐孝威, 刘国琴. 细胞运动的研究[J]*.* 世界科技研究与发展, 2000(05): 7-

15.

[30] 苗龙. 细胞运动、细胞迁移与细胞骨架研究进展[J]*.* 生物物理学报, 2007(04): 281-289.

[31] Dustin, M. L. and J. Muller. CELL SIGNALING. Liquidity in immune cell signaling[J]*.* Science, 2016. 352(6285): 516-7.

[32] Jessick, V. J., M. Xie, A. N. Pearson*,* etc. Investigating the role of the actin regulating complex ARP2/3 in rapid ischemic tolerance induced neuro- protection[J]*.* Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2013. 5(4): 216-27.

[33] Vlahou, G. and F. Rivero. Rho GTPase signaling in Dictyostelium discoideum: insights from the genome[J]*.* Eur J Cell Biol, 2006. 85(9- 10): 947-59.

[34] Peng, J., B. J. Wallar, A. Flanders*,* etc. Disruption of the Diaphanous- related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42[J]*.* Curr Biol, 2003. 13(7): 534-45.

[35] 王玉珍, 姜慧卿, 扈彩霞. Rho信号转导通路与细胞迁移[J]*.* 医学综述,

2006(11):651-653.

[36] 陆雯, 万小平. p21激活激酶在肿瘤中的作用及其靶向治疗[J]*.* 肿瘤, 2012(08): 654-658.

[37] Soosairajah, J., S. Maiti, O. Wiggan*,* etc*.* Interplay between components of

84

A novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin[J]*.* EMBO J, 2005. 24(3):473-86.

[38] 王红, 王岩. LIMK1与恶性肿瘤的研究现状[J]*.* 吉林医学,

2012(07):1466-1468.

[39] Delorme, V., M. Machacek, C. DerMardirossian*,* etc. Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks[J]*.* Dev Cell, 2007. 13(5): 646- 62.

[40] Vlecken, D. H. and C. P. Bagowski. LIMK1 and LIMK2 are important for metastatic behavior and tumor cell-induced angiogenesis of pancreatic cancer cells[J]*.* Zebrafish, 2009. 6(4): 433-9.

[41] Gorovoy, M., J. Niu, O. Bernard*,* etc. LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells[J]*.* J Biol Chem, 2005. 280(28): 26533-42.

[42] Van Troys, M., L. Huyck, S. Leyman*,* etc. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation[J]*.* Eur J Cell Biol, 2008. 87(8-9): 649-67.

[43] Bernstein, B. W. and J. R. Bamburg. ADF/cofilin: a functional node in cell biology[J]*.* Trends Cell Biol, 2010. 20(4): 187-95.

[44] Bugyi, B. and M. F. Carlier. Control of actin filament treadmilling in cell motility[J]*.* Annu Rev Biophys, 2010. 39: 449-70.

[45] Mizuno, K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation[J]*.* Cell Signal, 2013. 25(2): 457- 69.

[46] Mikati, M. A., D. Breitsprecher, S. Jansen*,* etc. Coronin Enhances Actin Filament Severing by Recruiting Cofilin to Filament Sides and Altering

85

F-Actin Conformation[J]*.* J Mol Biol, 2015. 427(19):3137-47.

[47] Robinson, R. C., K. Turbedsky, D. A. Kaiser*,* etc. Crystal structure of Arp2/3 complex[J]*.* Science, 2001. 294(5547): 1679-84.

[48] Smith, B. A., K. Daugherty-Clarke, B. L. Goode*,* etc. Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex revealed by single- molecule imaging[J]*.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(4): 1285-90.

[49] Miki, H. and T. Takenawa. WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac[J]*.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. 293(1): 93-9.

[50] Miki, H., H. Yamaguchi, S. Suetsugu*,* etc. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling[J]*.* Nature, 2000. 408(6813): 732-5.

[51] Takenawa, T. and H. Miki. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement[J]*.* J Cell Sci, 2001. 114(10): 1801-9.

[52] Yamagishi, A., M. Masuda, T. Ohki*,* etc. A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein[J]*.* J Biol Chem, 2004. 279(15): 14929-36.

[53] Funato, Y., T. Terabayashi, N. Suenaga*, etc.* IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness[J]*.* Cancer Res, 2004. 64(15): 5237-44.

[54] Suetsugu, S., H. Miki and T. Takenawa. Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex*.* Biochem Biophys Res Commun[J],

86

1999. 260(1):296-302.

[55] Thomas, A., C. Mariani-Floderer, M. R. Lopez-Huertas*,* et c*.* Involvement of the Rac1-IRSp53-Wave2-Arp2/3 Signaling Pathway in HIV-1 Gag Particle Release in CD4 T Cells[J]*.* J Virol, 2015. 89(16): 8162-81.

[56] Iwaya, K., K. Oikawa, S. Semba*,* etc*.* Correlation between liver metastasis of the colocalization of actin-related protein 2 and 3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma[J]*.* Cancer Sci, 2007. 98(7): 992-9.

[57] 邱毓琪, 易村犍. 铂类耐药卵巢癌治疗的研究进展[J]*.* 医学综述,

2015(03):437-440.

[58] 王丹, 惠宁. 促性腺激素释放激素类似物在卵巢癌治疗中的应用[J]*.* 第二军医大学学报, 2008(09): 1102-1105.

[59] Del Mastro, L., G. Rossi, M. Lambertini*,* etc. New insights on the role of luteinizing hormone releasing hormone agonists in premenopausal early breast cancer patients[J]*.* Cancer Treat Rev, 2016. 42: 18-23.

[60] 刘云, 杜成, 刘文超. 卵巢癌治疗新进展[J]*.* 现代肿瘤医学,

2015(04):553-556.

[61] 廖永玲, 孙江川, 常淑芳. 超声微泡携带基因治疗卵巢癌的研究进展[J]*.* 现代妇产科进展, 2009(07): 545-547.

[62] 胡宏祥, 王学清, 张华*,* etc. 分子靶向抗肿瘤药物的作用机制及临床研究进展[J]*.* 药学学报, 2015(10): 1232-1239.

[63] Ferrara, N., K. J. Hillan, H. P. Gerber*,* etc. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer[J]*.* Nat Rev Drug Discov, 2004. 3(5): 391-400.

[64] Leamon, C. P., C. D. Lovejoy and B. Nguyen. Patient selection and targeted treatment in the management of platinum-resistant ovarian

87

Cancer[J]*.* Pharmgenomics Pers Med, 2013. 6:113-25.

[65] Bodnar, L., M. Gornas and C. Szczylik. Sorafenib as a third line therapy in patients with epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer[J]: a phase II study*.* Gynecol Oncol, 2011. 123(1): 33-6.

[66] Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities[J]*.* Eur J Cancer, 2001. 37 Suppl 4: S3-8.

[67] Bull Phelps, S. L., J. O. Schorge, M. J. Peyton*,* etc. Implications of EGFR inhibition in ovarian cancer cell proliferation[J]*.* Gynecol Oncol, 2008. 109(3): 411-7.

[68] Douillard, J. Y., K. S. Oliner, S. Siena*,* etc. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer[J]*.* N Engl J Med, 2013. 369(11): 1023-34.

[69] Heyerdahl, H., C. Krogh, J. Borrebaek*,* etc. Treatment of HER2-expressing breast cancer and ovarian cancer cells with alpha particle-emitting 227Th- trastuzumab[J]*.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011. 79(2): 563-70.

[70] Gyorffy, B. and R. Schafer. Biomarkers downstream of RAS: a search for robust transcriptional targets[J]*.* Curr Cancer Drug Targets, 2010. 10(8): 858-68.

[71] Schilder, R. J., H. B. Pathak, A. E. Lokshin*,* etc. Phase II trial of single agent cetuximab in patients with persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma with the potential for dose escalation to rash[J]*.* Gynecol Oncol, 2009. 113(1): 21-7.

[72] 俞弋, 徐丛剑. 卵巢癌靶向治疗的研究进展[J]*.* 国际妇产科学杂志,

2012(02):152-157.

88

[73] Fruman, D. A. and L. C. Cantley. Idelalisib--a PI3Kdelta inhibitor for B- cell cancers[J]*.* N Engl J Med, 2014. 370(11): 1061-2.

[74] Weberpals, J. I., M. Koti and J. A. Squire. Targeting genetic and epigenetic alterations in the treatment of serous ovarian cancer[J]*.* Cancer Genet, 2011. 204(10): 525-35.

[75] Zhao, L., X. Du, K. Huang*,* etc. Rac1 modulates the formation of primordial follicles by facilitating STAT3-directed Jagged1, GDF9 and BMP15 transcription in mice[J]*.* Sci Rep, 2016. 6: 23972.

[76] Tang, Y., M. Li, Y. L. Wang*,* etc*.* ART1 promotes starvation-induced autophagy: a possible protective role in the development of colon carcinoma[J]*.* Am J Cancer Res, 2015. 5(2): 498-513.

[77] 宁少雄, 尚志星, 邵珊*,* etc*.* Rac1抑制剂对盐敏感性高血压肾损害大鼠

转化生长因子β\_1及Ⅲ型胶原表达的影响[J]*.*中华高血压杂志, 2015(04):349-353.

[78] 王筱霞, 陈玉强, 汪年松*,* etc*.* Rac1抑制剂上调糖尿病小鼠肾小球

nephrin的表达*.* 中国中西医结合肾病杂志[J], 2010(07):592-594+660.

[79] 饶军, SEMA3F通过抑制Rac1调节结直肠癌细胞干性的机制及临床病理学意义[T], 第三军医大学, 2015.

[80] 刘睿, 刘新敏. 中医药治疗卵巢癌进展[J]*.* 河北中医, 2012(12): 1906- 1908.

[81] 杨洋博君, 李舒, 陈蓉. 中医药治疗卵巢癌研究新进展[J]*.* 辽宁中医药

大学学报, 2014(05):121-124.

[82] Li, Q. Y., Y. G. Zu, R. Z. Shi*,* etc*.* Review camptothecin: current perspectives[J]*.* Curr Med Chem, 2006. 13(17): 2021-39.

[83] 曹丽荣, 王鸿梅, 李军. 植物来源抗肿瘤药物药理机制、不良反应与临

89

床应用[J]*.* 药学研究, 2013(09):539-542.

[84] 王超磊, 孙炳峰, 姚和权*,* etc. 植物来源的抗肿瘤药物研究进展[J]*.* 药学进展, 2011(05): 193-202.

[85] 曹明哲, 季宇彬, 辛国松*,* etc. 天然植物中生物碱类抗肿瘤药物研究进展[J]*.* 亚太传统医药, 2015(07): 59-61.

[86] 苏华, 冷静, 王曙东*,* etc. 大黄酸及其偶联物药理活性的研究进展[J]*.* 中国药业, 2011(15): 92-94.

[87] 刘凯, 郑海生, 李应东. 大黄酸的药理作用研究述略[J]*.* 中医药学刊, 2004(09): 1732-1734.

[88] Tamura, T., N. Kosaka, J. Ishiwa*,* etc.*.* Rhein, an active metabolite of diacerein, down-regulates the production of pro-matrix metalloproteinases-1, -3, -9 and -13 and up-regulates the production of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cultured rabbit articular chondrocytes[J]*.* Osteoarthritis Cartilage, 2001. 9(3): 257-63.

[89] 郑敬民, 刘志红, 张鑫*,* etc. 一个糖尿病肾病相关新基因的筛选、克隆和

序列分析[J]*.* 生物化学与生物物理进展, 2004(01):47-53.

[90] Fernand VE, Losso JN, Truax RE, etc. Rhein inhibits angiogenesis and the viability of hormone-dependent and -independent cancer cells under normoxic or hypoxic conditions in vitro[J]*.* Chem Biol Interact, 2011. 192(3): 220-32.

[91] Lai WW, Yang JS, Lai KC, etc. Rhein induced apoptosis through the endoplasmic reticulum stress, caspase- and mitochondria-dependent pathways in SCC-4 human tongue squamous cancer cells[J]*.* In Vivo, 2009. 23(2): 309-16.

[92] 林雅军, 甄永苏. 大黄酸对肿瘤细胞EGFR和HER-2靶点的作用及其

90

作用机制[J]*.* 癌症进展, 2008(03):338.

[93] Lin, Y. J., Y. Z. Zhen, B. Y. Shang*,* etc*.* Rhein lysinate suppresses the growth of tumor cells and increases the anti-tumor activity of Taxol in mice[J]*.* Am J Chin Med, 2009. 37(5): 923-31.

致 谢

时光如梭，三年研究生学习生活时光转眼即逝，而在校期间学习的很多方面都将成为我步入社会的养分，激励我继续前行。借此学位论文即将完稿之际，向所有给予我鼓励和支持我的人们，献上我诚挚的感谢。

首先，感谢我的导师黎丹戎教授，她慈母般给予我在攻读硕士期间的所遇到各种问题的关心和帮助。老师倾注大量心血和精力，教会我如何分析问题和解决问题的能力，并采用前沿的科研方法让我正确认识科研。老

91

师渊博的专业知识、严谨的科研思维、独到的学术眼光、端正的治学态度以及崇高的人格魅力深深的感染着我，让我在研究生学习期间获益匪浅。谨向我的导师表达我炙热的感谢和崇高的敬意。

这里也特别感谢，在课题设计和实验过程期间帮我良多的李力教授、王琪教授、张玮老师、尹富强老师、钟艳平老师、苏节老师。感谢他们在实验每一步实施和当我遇到的问题时，以他们严谨的科研态度、清晰灵活的思路和广博的知识帮我克服一个又一个困难。他们认真负责指正与批评，促使我不断认识到自己的不足和加强自我完善，使我在科研领域迅速成长。感谢你们对我无微不至的关心和对我的鼓励及肯定！

感谢肿瘤医院化疗科和放疗科老师们的悉心教导和帮助！感谢邹靖师姐、陈佳师姐、梁振鑫师兄，给我关心和帮助！

特别感谢我的李鸿师兄、谢一鸿师姐、李梦迪师姐和莫春燕师姐，感谢他们在我对科研懵懂无知的时刻，耐心认真的指导和帮助我。没有你们的支持，我的课题研究不会进展的如此顺利！

感谢和我并肩作战的2013级同学们：谢谢刘红梅、王凌、杨浩洁、王春苗、覃贵慧等。谢谢你们陪伴和鼓励，与你们共渡的三年时光，永远值得追忆。感谢周国梅、彭政、毛燕南、齐亚鹏、潘智育和骆敏等师弟师妹的支持和帮助；感谢我的旧时同窗对我鼓励和帮助！

感谢我的室友夏宇、黄姗、蒋锦梅、张嘉珍以及好友毛塞兰，邓玲燕等给予我的支持和帮助。

最要感谢我的父母，是他们对我无限鼓励和鼎力支持，让我拥有追逐梦想的力量和勇气，才让我走到了今天。感谢他们的爱和支持！

同时向百忙之中抽出时间评审和指正的专家教授及参加答辩的各位老师致以诚挚的感谢！

最后谢谢所有的人，是你们让我的世界更为广阔！

92

谢谢！

# 攻读学位期间发表的学术论文

唐敏，李鸿，周国梅*，*etc.大黄酸调控Rac1/LIMK1/cofilin信号通路抑制卵巢癌细胞运动与侵袭[J]*.* 中国药理学通报，2016(03)：366-372.

93