



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 Q28

U D C 601

密 级 公开

博士学位论文

CD147-Annexin A2 相互作用调控
肿瘤细胞运动的分子机制研究

崔洪勇

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 生物学

二级学科(专业) 细胞生物学

研 究 方 向 肿瘤细胞运动

指 导 教 师 陈志南教授(院士)

培 养 单 位 基础部细胞生物学教研室

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，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，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。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了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	5
ABSTRACT	7
前 言	10
文献回顾	12
正 文	27
第一部分 CD147 与 ANNEXIN A2 的相互作用	27
1 材料	27
2 方法	32
3 结果	43
4 讨论	49
第二部分 CD147 调控 ANNEXIN A2 磷酸化的分子机制研究	51
1 材料	51
2 方法	54
3 结果	60
4 讨论	66
第三部分 P-ANNEXIN A2 调控肿瘤细胞运动的分子机制研究	68
1 材料	68
2 方法	72
3 结果	75
4 讨论	86
小 结	89
参考文献	90
附 录	105
个人简历和研究成果	106

致 谢107

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Arp2/3	Actin-related protein 2/3 complex	肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体
ATCC	American type culture collection	美国模式培养物集存库
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
BCA	Bicinchoninic acid	二喹啉甲酸
BDNF	Brain derived neurotrophic factor	脑源性神经营养因子
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
Co-IP	Co-Immunoprecipitation	免疫共沉淀
DAB	3, 3'-diaminobenzidine	3, 3'-二氨基联苯胺
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	4', 6-二脒基-2-苯基吲哚
DEPC	Diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DHR-1	DOCK homology region-1	DOCK 同源区域 1
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDAC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Hydrochloride	乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺
EGFR	Epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体

EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮-间充质转换
FAK	Focal adhesion kinase	黏着斑激酶
FRET	Fluorescence resonance energy transfer	荧光共振能量转移
GAP	GTPase-activating protein	GTP 酶激活蛋白
GAPDH	Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
GDI	Rho-specific guanine nucleotide dissociation inhibitor	Rho 特异性鸟苷酸解离抑制因子
GDP	Guanosine diphosphate	二磷酸鸟苷
GEF	Guanine nucleotide exchange factor	鸟苷酸交换因子
GEO	Gene expression omnibus	基因表达综合数据库
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GPCR	G Protein Coupled Receptor	G 蛋白偶联受体
GTP	Guanosine triphosphate	三磷酸鸟苷
h	hour	小时
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞肝癌
HGF	Hepatocyte growth factor	肝细胞生长因子
HRP	Horse reddish peroxidase	辣根过氧化物酶
IGF	Insulin-like growth factor	胰岛素样生长因子
IPTG	Isopropyl- β -d-thiogalactoside	异丙基- β -d-硫代半乳糖苷
JCRB	Japanese Collection of Research Bioresources	日本研究生物资源集存库
Ka	Association rate	结合速率
Kan	Kanamycin	卡那霉素
Kd	Dissociation rate	解离速率

KD	Affinity constant	亲和常数
LPA	Lysophosphatidic acid	溶血磷脂酸
MAT	Mesenchymal-amoeboid transition	间充质-阿米巴样运动转换
MCT1	Monocarboxylate transporter 1	单羧酸转运蛋白-1
min	minute	分钟
MMP	Matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBP	Presenilin binding partner	早老素结合分子
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCC	Pearson's correlation coefficient	皮尔逊相关系数
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PDB	Protein data bank	蛋白质数据库
PDGF	Platelet derived growth factor	血小板源性生长因子
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-kinase	磷脂酰肌醇-3-羟激酶
PKC	Protein kinase C	蛋白激酶 C
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PTK	Protein tyrosine kinase	蛋白酪氨酸激酶
PTP	Protein tyrosine phosphatase	蛋白酪氨酸磷酸酶
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
RNA	Ribose nucleic acid	核糖核酸
ROCK	Rho-associated kinase	Rho 相关激酶

SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基磺酸钠
sec	second	秒
Ser	Serine	丝氨酸
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
SPR	Surface plasmon resonance	表面等离子共振
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimide	N-羟基琥珀酰亚胺
Tet	Tetracycline	四环素
TGF- β	Transforming growth factor beta	转化生长因子- β
Tyr	Tyrosine	酪氨酸
UVB	Ultraviolet B	中波紫外线
V	Volt	伏特
Val	Valine	缬氨酸
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein	威斯科特-奥尔德里奇综合征 蛋白家族
WIRS	WRC interacting receptor sequence	WRC 相互作用受体序列
WRC	WAVE regulatory complex	WAVE 调控复合物

CD147-Annexin A2 相互作用调控肿瘤细胞运动的 分子机制研究

博士研究生：崔洪勇

导 师：陈志南 教授

辅 导 教 师：蒋建利 教授

第四军医大学基础部细胞生物学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（31371405 和 81201774）

中文摘要

侵袭和转移是肿瘤的主要特征，也是恶性肿瘤致死的主要原因^[1]。细胞运动在肿瘤侵袭转移过程中发挥重要作用，细胞运动调控的分子机制研究一直是肿瘤生物学研究的热点。研究发现 CD147 和 Annexin A2 都参与了肿瘤细胞肌动蛋白骨架重排，是调控肿瘤细胞运动的重要分子。我们前期的工作发现 CD147 通过调控 Annexin A2 活化的 RhoA 信号通路参与了肝癌细胞运动的调控，在此基础上本课题进行了进一步的探讨。

本课题主要包括三个部分：

第一部分，CD147 与 Annexin A2 相互作用的研究。

我们应用免疫共沉淀和质谱联用的方法，发现 Annexin A2 是 CD147 可能的互作分子。基于激光共聚焦的共定位分析显示 CD147 和 Annexin A2 在肝癌和肺癌细胞中有很好的共定位。接着我们采用荧光共振能量转移实验（FRET）证实 CD147 和 Annexin A2 在活细胞中存在直接的相互作用。我们表达并纯化了 CD147 胞外段蛋白和 Annexin A2 蛋白，采用表面等离子共振技术（SPR）测定了 CD147 和 Annexin A2 相互作用的动力学参数。然后，将 CD147 截短表达，采用 His Pull-Down、FRET、

SPR 等方法明确了 CD147 胞外段能与 Annexin A2 相互作用。

第二部分，CD147 调控 Annexin A2 磷酸化的分子机制研究。

我们首先检测了 Src、CD147 对 Annexin A2 酪氨酸磷酸化的影响，我们发现 Src 激酶能磷酸化 Annexin A2，而 CD147 能负向调控 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化，这与之前的报道一致。同时过表达 Src 和 CD147，我们发现 CD147 能抑制 Src 对 Annexin A2 的磷酸化。体外激酶实验证实，CD147 胞外段蛋白和 I 结构域蛋白能够抑制 Src 对 Annexin A2 的磷酸化，而 C2 结构域蛋白则不能抑制 Src 对 Annexin A2 的磷酸化。据此，采用 FRET 实验我们进一步分析了 C2 结构域和 I 结构域与 Annexin A2 N 端结构域的结合情况，我们发现只有 I 结构域能够结合 Annexin A2 的 N 端结构域，这就提示 CD147 通过其 I 结构域与 Annexin A2 的 N 端结构域相互作用从而抑制了 Src 对 Annexin A2 的磷酸化。

第三部分，p-Annexin A2 调控肿瘤细胞运动的分子机制研究。

我们检测了 CD147 和 Annexin A2 对肿瘤细胞运动的影响，我们发现 CD147 能够通过调控 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化进而调控肿瘤细胞运动，然而其具体机制仍不明确。通过下调 Annexin A2 表达后检测 DOCK 家族 GEF 的 mRNA 表达水平，我们发现 DOCK3 表达水平显著降低。通过下调细胞内源性 Annexin A2 后回复表达野生型 Annexin A2、Annexin A2 的磷酸化位点突变体，我们发现 DOCK3 表达水平受 Annexin A2 磷酸化水平的调控。这提示 p-Annexin A2 可能通过 DOCK3 调控肿瘤细胞运动。通过检测 Rac1、RhoA 的活性及下游效应分子的表达水平，我们发现 DOCK3 是 Rac1 的 GEF，而 WAVE2 的表达水平与 DOCK3 呈负相关，且下调 DOCK3 后细胞的片状伪足形成显著增多。进一步研究证实 DOCK3 能够通过负向调控 β -catenin 信号通路进而抑制 WAVE2 的表达。应用 CD147 敲除的肝癌、结肠癌细胞系以及 CD147 稳定干涉的肺癌细胞系，我们证实了 CD147 通过 p-Annexin A2/DOCK3/ β -catenin/WAVE2 信号轴调控片状伪足形成和肿瘤细胞运动。最后我们建立了裸鼠脾脏注射转移模型，结果表明 CD147 能够促进肝癌转移，这提示 CD147 促进肿瘤细胞运动可能是其调控肝癌转移的关键分子机制之一。

关键词：CD147；Annexin A2；DOCK3；片状伪足；细胞运动；肿瘤

Molecular mechanism of CD147-Annexin A2 interaction in regulating cancer cell movement

Candidate for Doctor: Cui Hongyong

Supervisor: Chen Zhinan

Tutor: Jiang Jianli

Department of Cell Biology, School of Preclinical Medicine,

Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: the National Natural Science Foundation of China

(31371405 and 81201774)

Abstract

Invasion and metastasis are the main characteristics of tumor. The majority of deaths associated with tumor are due to the metastasis of the original tumor cells^[1]. Cell movement plays an important role in tumor invasion and metastasis. The study of tumor cell movement is the hot spot in tumor biology researches. CD147 and Annexin A2 are found to be involved in rearrangement of the actin cytoskeleton in tumor cells. Our previous work has found that CD147 regulates Annexin A2-activated RhoA signaling in hepatocellular carcinoma (HCC) cells, but the detailed molecular mechanism is far from clear. This study is composed of the following three parts.

Part I CD147 interacts directly with Annexin A2.

Using co-immunoprecipitation and mass spectrometry, Annexin A2 was identified as a potential binding partner for CD147. Colocalization analysis based on Pearson's correlation coefficient (PCC) showed that there was a high degree of colocalization between CD147 and Annexin A2 in lung cancer and HCC cells. Fluorescence resonance

energy transfer assay (FRET) demonstrated that there is a direct interaction between CD147 and Annexin A2 in living cells. We purified the extracellular portion of CD147 and Annexin A2 and characterized the kinetic binding parameters using purified proteins and surface plasmon resonance (SPR). We also truncated CD147 and demonstrated that the extracellular portion of CD147 interacts directly with Annexin A2 using His Pull-Down, FRET and SPR.

Part II CD147 regulates tyrosine phosphorylation of Annexin A2.

We first determined the effects of Src and CD147 on tyrosine phosphorylation of Annexin A2. We found that Src could phosphorylate Annexin A2 and CD147 negatively regulated tyrosine phosphorylation of Annexin A2, which was consistent with the previous results. When Src and CD147 were simultaneously overexpressed, we found that CD147 could inhibit Annexin A2 phosphorylation by Src. In vitro kinase assay showed that the extracellular portion of CD147 and I domain could inhibit Annexin A2 phosphorylation by Src, however, C2 domain showed no effect on Annexin A2 phosphorylation. We determined the interaction between these constructs using FRET and found that only I domain could interact directly with the N-terminal domain of Annexin A2. These results demonstrate that CD147 inhibits Annexin A2 phosphorylation by Src via direct interaction between its I domain and the N-terminal domain of Annexin A2.

Part III CD147 regulates tumor cell movement via p-Annexin A2.

We determined the effects of CD147 and Annexin A2 on tumor cell movement and found that CD147 might regulate tumor cell movement via regulating Annexin A2 phosphorylation. We evaluated the expression of DOCK family GEFs in cells transfected with Annexin A2 siRNA and found that DOCK3 was significantly down-regulated. Knockdown and specific rescue approaches revealed that DOCK3 expression was regulated by Annexin A2 phosphorylation, indicating that p-Annexin A2 might regulate tumor cell movement via DOCK3. DOCK3 was identified as a GEF for Rac1 and WAVE2 expression was suppressed by DOCK3. Furthermore, downregulation of DOCK3 resulted in increased lamellipodia formation and DOCK3 inhibited WAVE2 expression via

suppressing β -catenin signaling. Further studies confirmed that CD147 regulated lamellipodia formation and tumor cell movement via p-Annexin A2/DOCK3/ β -catenin/WAVE2 signaling axis in CD147 knockout HCC and colon cancer cells as well as in CD147 knockdown lung cancer cells. Cytoskeletal rearrangement and cell motility achieve dire significance during tumor metastasis. We investigated whether CD147 influenced tumor metastasis in vivo. We established an intrasplenic injection model for metastatic HCC cells and found that CD147 could promote HCC metastasis in nude mice.

Key words: CD147, Annexin A2, DOCK3, lamellipodia, cell movement, tumor

前 言

目前,我国慢性病尤其是肿瘤的疾病负担日益严重。根据《2012 中国肿瘤登记年报》,我国每年新增肿瘤病例约为 312 万例,每年因癌症死亡病例达 270 万例^[2]。恶性肿瘤已成为我国城市居民第一位的死亡原因,农村居民第二位死亡原因,在城乡居民前 10 位死因构成中分别占到 26.33%和 23.11%^[3]。在过去的几十年中,基于手术、放疗和化疗等手段的肿瘤治疗取得了令人瞩目的成绩,以靶向治疗为代表的新的肿瘤治疗手段也取得了重大突破。但是肿瘤患者的五年生存率仍不乐观,肿瘤死亡人数逐年递增,肿瘤复发和转移是肿瘤治疗的主要瓶颈。因此,研究肿瘤复发和转移的分子机制是防治肿瘤的关键。

转移是恶性肿瘤重要的生物学特性,也是导致肿瘤患者死亡的最主要原因^[1]。肿瘤的转移是一个复杂的多步骤生物学过程,细胞运动能力的改变是恶性肿瘤播散的关键环节。肿瘤细胞通过细胞-细胞间及细胞-间质间黏附重塑、肌动蛋白骨架重排以及多个信号通路的改变获得运动相关表型。尽管基于大量的实验数据,学界对肿瘤细胞运动的分子机制有了一定的认识,但是受到肿瘤的复杂性、实验方法等诸多因素的限制,对肿瘤运动、转移分子机制的研究尚待进一步深入。

CD147 是一个跨膜糖蛋白^[4],研究发现 CD147 在多种肿瘤组织中高表达,是一个癌特异性的、新型广谱的生物标志物^[5]。进一步研究发现 CD147 在肿瘤细胞运动、侵袭、代谢、血管生成、死亡抵抗等方面发挥重要作用,其表达水平与肿瘤进展、肿瘤患者预后密切相关^[6],靶向 CD147 的抗体药物取得了良好的治疗效果^[7]。

我们之前的研究发现,CD147 通过调控 Annexin A2 活化的 RhoA 信号通路参与调控肝癌细胞运动^[8],本课题在此基础上做了进一步的探索。我们证实了 CD147 和 Annexin A2 存在直接的相互作用,并明确了二者相互作用的结构域和动力学参数,这为下一步解析 CD147-Annexin A2 复合物的结构、建立二者的互作模型提供了理论依据;初步揭示了 CD147 负向调控 Annexin A2 酪氨酸磷酸化的分子机制;提出了 CD147 通过 p-Annexin A2/DOCK3/ β -catenin/WAVE2 信号轴调控肿瘤细胞片状伪足形成和运动能力的分子机制。本课题的开展进一步深化了对调控肿瘤细胞运动分子机

制的认识，也进一步丰富了靶向 CD147 的抗肿瘤治疗策略的科学依据。

文献回顾

一、细胞运动在肿瘤转移中发挥重要作用

1829年法国妇科学家 Joseph Récamiér 首次提出了“转移 (metastasis)”一词，此后研究证实转移是恶性肿瘤的重要标志，也是肿瘤致死的最主要原因^[1]。由于诊断方法的限制，多数肿瘤患者在就诊时已处于晚期；即使早期诊断的患者，在疾病早期也难以发现微小转移灶，因此研究肿瘤转移的早期事件、研发针对肿瘤细胞侵袭转移的治疗策略，对于改善肿瘤患者的预后具有重要意义。

转移是一个由依次发生、相互关联的多个步骤构成的生物学过程 (图 1): (a) 细胞转化，肿瘤生长；在肿瘤生长的早期阶段，营养供应主要依靠简单扩散。(b) 血管生成，当肿瘤直径达到 1-2mm 时，在促血管生成因子的作用下，会有大量的血管生成，形成毛细血管网。(c) 肿瘤细胞对周围间质的侵袭；肿瘤细胞容易进入薄壁的血管、淋巴管，从而进入循环系统。(d) 肿瘤细胞的播散；大多数循环肿瘤细胞都会被机体破坏，少数存活的循环肿瘤细胞会黏附到远处器官的毛细血管内皮细胞或裸露的内皮下基底膜。(e) 外渗；肿瘤细胞离开循环系统。(f) 转移灶形成；肿瘤细胞在远处器官增殖，形成转移灶^[9]。

细胞运动在许多生理和病理过程中都发挥关键作用。在胚胎发育时，原肠胚形成等形态发生过程中细胞运动不可或缺^[10]。脊椎动物胚胎发育时，神经嵴细胞通过运动到达多种组织^[11]。在免疫应答过程中也伴随着多种类型的细胞的运动^[12]。细胞运动异常是肿瘤细胞的一个重要特征^[13]，肿瘤侵袭和转移与肿瘤细胞运动能力增强、运动形式的转换密切相关。肿瘤细胞在通过细胞外基质、穿过基底膜以及进入淋巴管、血管的过程中都需要较强的运动能力。细胞运动能力改变和运动形式转换通常与细胞骨架重排、细胞间黏附变化、细胞形态改变、基质金属蛋白酶活性增加等因素相关。运动形式的转换包括 (a) 上皮-间充质转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT); (b) 间充质-阿米巴样运动转换 (mesenchymal-amoeboid transition, MAT)。

细胞运动是一个高度协调的、多步骤过程。单个细胞的运动与细胞极性、细胞突起密切相关。细胞能够在细胞外信号的作用下形成细胞极性。如在趋化因子的作

用下，小 G 蛋白（small GTPases）Rac 和 Ras 聚集在细胞前缘，活化 PI3K，导致细胞极性的形成^[14-18]。在无趋化因子存在时，间充质样运动的细胞能够在细胞内信号的作用下形成细胞极性。Rho 家族小 G 蛋白的时空分布能够调控细胞极性的形成。已有研究证实，在运动细胞的前缘，小 G 蛋白 Rac1 和 Cdc42 被活化^[19-21]。PIP3 在运动细胞前缘活化鸟苷酸交换因子（guanine exchange factor, GEF）^[22]，后者能够促进 Rac 和 Cdc42 活化^[23]。活化的 Rac 能够促进 Arp2/3 依赖的肌动蛋白纤维聚合，从而形成片状伪足^[24,25]。RhoA 则主要在运动细胞的后缘活化，增加肌动球蛋白收缩力，促进细胞后缘收缩^[26-28]。局部的 Rac1，Cdc42 和 RhoA 被抑制，会导致细胞定向运动能力减弱^[29]，并且局部的 Rac1，Cdc42 或 RhoA 缺失，会导致黏着斑形成缺陷和细胞运动能力降低^[30-32]。Yi I. Wu 等人用光激活 Rac 表达系统，证实 Rac 和 Rho 之间存在精细的时空调控^[33]。此外，微管在维持细胞极性和细胞定向运动过程中也发挥重要作用^[34]。

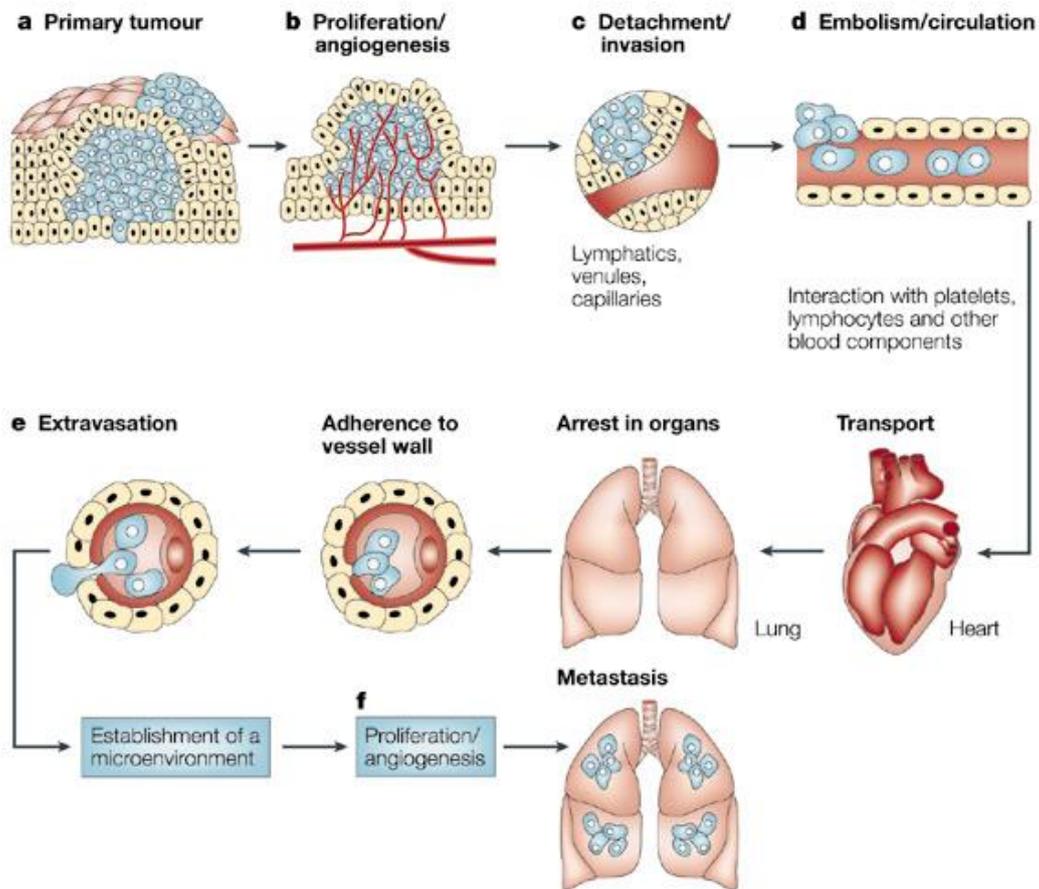


图 1 肿瘤转移的主要过程^[9]

二、细胞突起是细胞运动的重要结构基础

细胞运动时，首先会形成极性的细胞形态，细胞前缘会形成一些突起（图 2）。研究比较多的细胞突起有片状伪足（lamellipodia）、丝状伪足（filopodia）、泡状伪足（bleb）、侵袭性伪足（invadopodia）以及伪足小体（podosomes）等^[35]。这些突起的差异主要在于肌动蛋白骨架排列的方式和参与调控的分子机制不同。细胞突起是细胞运动的主要结构基础，因此细胞突起决定了细胞运动的效率和运动形式。

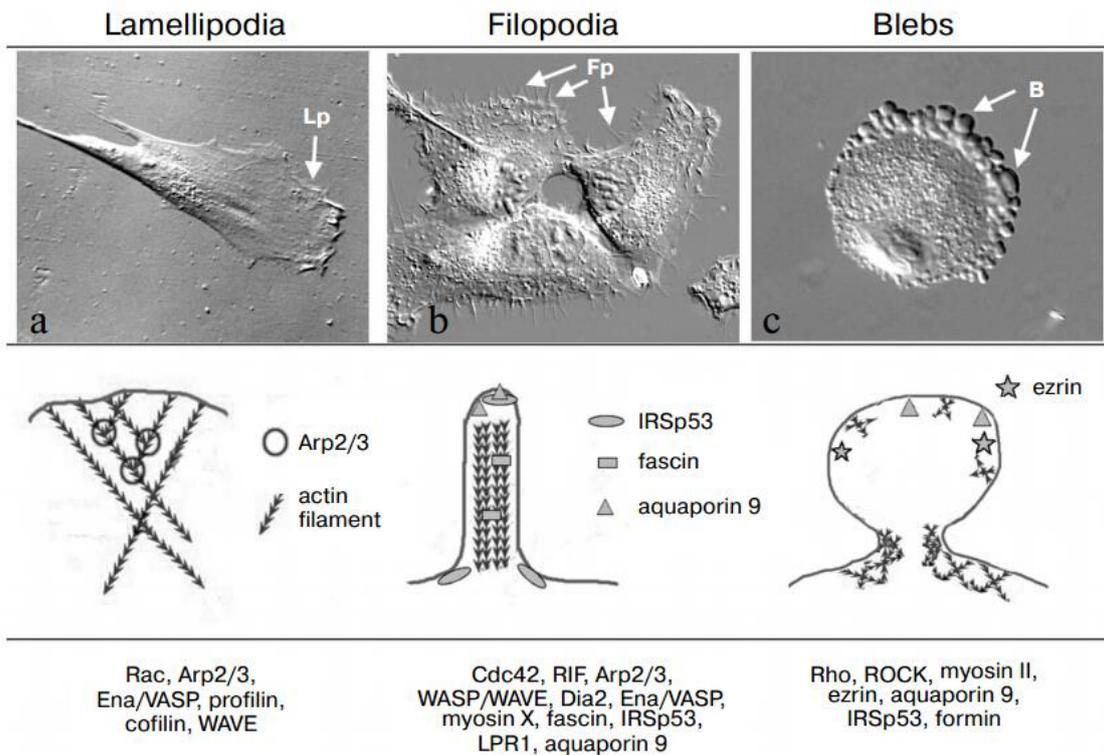


图 2 细胞突起^[36]

（一）丝状伪足

丝状伪足是一种圆柱形突起，长度可达几十微米^[37,38]。丝状伪足由 15-20 个平行的肌动蛋白纤维构成，肌动蛋白纤维丝彼此之间由肌动蛋白相关蛋白连接（如 fimbrin, fascin 等）^[39]。由于不同组织来源的细胞都可形成丝状伪足，因此丝状伪足在形状、分子组成、功能方面都有很大的差异^[40]。一般认为，丝状伪足的形成主要受小 G 蛋白 Cdc42 调控^[41]。在细胞运动过程中，丝状伪足具有感知功能，即丝状伪足能够感知周围环境中趋化物的浓度梯度，因而决定了细胞运动的方向^[42]。此外，丝状伪足也能够通过黏着斑在细胞运动中发挥直接作用^[43]。研究发现，很多分子参

与调控丝状伪足的形成。Ena/VASP 家族能够通过抑制肌动蛋白纤维正端加帽，从而促进丝状伪足形成^[44]。肌球蛋白 X 参与组成丝状伪足的其它分子如 Ena/VASP、整联蛋白（integrin）的运输^[45]。IRSp53 通过其膜结合结构域 BAR 使细胞膜卷曲从而促进丝状伪足形成^[46]。mDia2 能够促进不分枝肌动蛋白纤维成核^[47]。

（二）片状伪足

片状伪足是由肌动蛋白纤维在运动细胞前缘形成的扁平突起，其中的肌动蛋白纤维方向一致，其正端均指向胞膜^[48]。片状伪足厚度约 0.2 μ m，宽度约 2-5 μ m。采用荧光标记 G-actin 掺入的方法，研究发现掺入几分钟后，荧光信号首先出现在靠近胞膜的片状伪足边缘，稍后荧光信号才会出现在肌动蛋白纤维束^[49]，这就表明片状伪足中肌动蛋白骨架的聚合主要是片状伪足结构的重排，而不是从头聚合肌动蛋白纤维。在聚合的过程中，每个肌动蛋白纤维能够产生皮牛顿级的作用力^[50]。一般认为，使细胞前缘突出形成片状伪足的作用力主要来自于肌动蛋白聚合^[25]。片状伪足中调控肌动蛋白骨架的主要分子机制是 Arp2/3 依赖的肌动蛋白聚合^[51]。Arp2/3 复合物主要由 WASP 家族蛋白激活，尤其是定位于片状伪足的 WAVE 分子。新的肌动蛋白纤维聚合的速率主要决定于 G-actin 的浓度。Cofilin 是肌动蛋白结合蛋白中的一种，能够切断肌动蛋白纤维并结合到肌动蛋白单体上，在肌动蛋白骨架重塑中发挥重要作用^[52,53]。Profilin 能够催化 G-actin 上的 ADP 向 ATP 转化，从而活化肌动蛋白单体^[9]。

（三）泡状伪足

泡状伪足是圆形的细胞突起。之前认为泡状伪足形成是细胞凋亡的形态特征。但是研究发现，有泡状伪足形成的细胞并没有表达凋亡相关标志物也没有出现核碎裂，因此目前认为泡状伪足形成与一种特殊类型的细胞运动相关^[54,55]。这种形成圆形泡状伪足的运动形式与阿米巴原虫的运动形式相似，所以又称为阿米巴样运动^[56]。泡状伪足的形成主要与细胞内压力增高有关，如肌动球蛋白收缩等因素均可引起^[57]。泡状伪足可在整个细胞表面形成或者只在细胞的一侧形成，泡状伪足的极性分布则决定了细胞运动的方向^[58]。

三、Rho 家族小 G 蛋白是细胞运动的主要调控分子

GTP 结合蛋白（GTPases）有两种可相互转换的空间构象：结合 GTP 的活化形

式和结合 GDP 的失活形式^[59] (图 3)。GTPases 分子本身具有水解酶活性, 能够催化自身结合的 GTP 水解为 GDP 或 GMP。这种水解活性受到其它分子的调控, 如 GTP 酶激活蛋白 (GTPase-activating proteins, GAPs)。GAP 能够促进 GTP 水解, 进而促进 GTPases 失活。当 GTPases 处于结合 GDP 的失活形式时, 细胞内的鸟苷酸交换因子 (guanine exchange factor, GEF) 能够催化 GDP 转换为 GTP, 继而重新活化 GTPases。此外, Rho 特异性鸟苷酸解离抑制因子 (Rho-specific guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs) 能够结合于胞浆中失活状态的 GTPases 的 C 端, 阻止 GTPases 与胞膜结合^[60]。因此, 细胞内 GTPases 的活性转换主要受两类分子调控: 促进活化的 GEF 和促进失活的 GAP。GTPases 活化形式所占的比例对于不同的 GTPase、不同的细胞类型以及不同的微环境都有很大的差异。

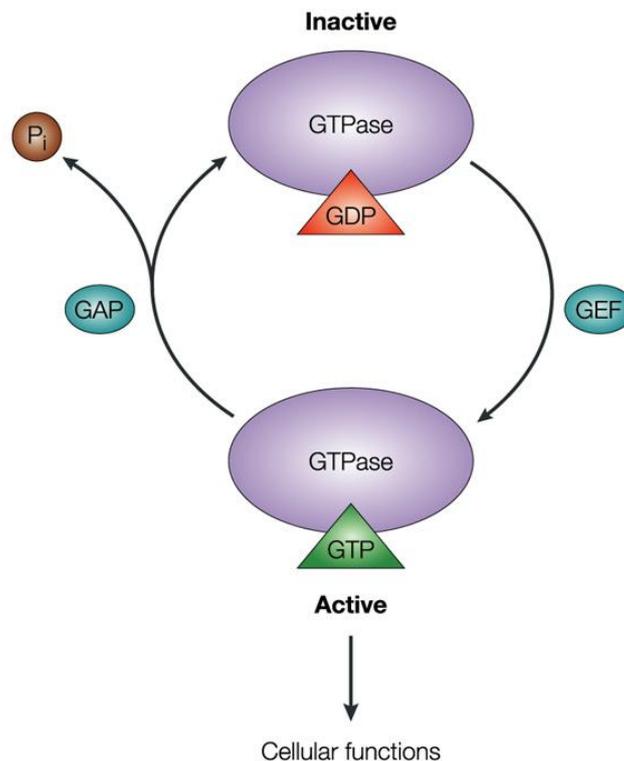


图 3 GTPases 两种功能状态的转换^[59]

细胞运动是一个复杂的动态过程, 细胞骨架需要不断重塑以实现细胞迁移、适应周围环境的变化。GTPases 不同功能状态之间的转换使其能够以一种分子开关 (molecular switch) 的形式, 在时空上精确调控信号, 这种动态调控对于实现有效的细胞运动至关重要。迄今, 已报道的 GEFs 超过 80 种、GAPs 超过 70 种^[61], 这就表

明 Rho 家族 GTPases 的活性和细胞定位调控是一种多信号参与调控的复杂网络。

Rho 家族 GTPases 参与细胞骨架重排这一概念的提出主要基于以下发现：Ridley AJ 和 Hall A 等人发现，受到 PDGF 刺激时，Rac 能促进片状伪足的形成^[62]；而在 LPA 处理时，RhoA 能促进应力纤维的形成^[63]。Nobes CD 等人发现，Cdc42 能促进丝状伪足的形成并且能够激活 Rac^[64]。Rac 通过结合于 SCAR/Wave 调控复合物（WRC）的组成分子 Sra1 和 WAVE1 上，促进 Arp2/3 激活和肌动蛋白聚集^[65]，进而促进片状伪足形成和细胞运动。RhoG 则能募集其效应分子 ELMO 结合于 DOCK 家族 GEFs，后者调控 Rac 驱动的肌动蛋白重排和细胞运动^[66]。

在细胞运动过程中，Rho 主要通过结合并活化 mDia 和 ROCK，参与肌动蛋白聚合和收缩力产生^[67]。在经典的细胞运动调控模型中，Rac 和 Cdc42 主要在运动细胞前缘活化，以促进细胞突起的形成；而 Rho 主要在细胞体和细胞后缘活化，调控肌动球蛋白产生收缩力，促进细胞后缘收缩和胞体前移^[68]（图 4）。

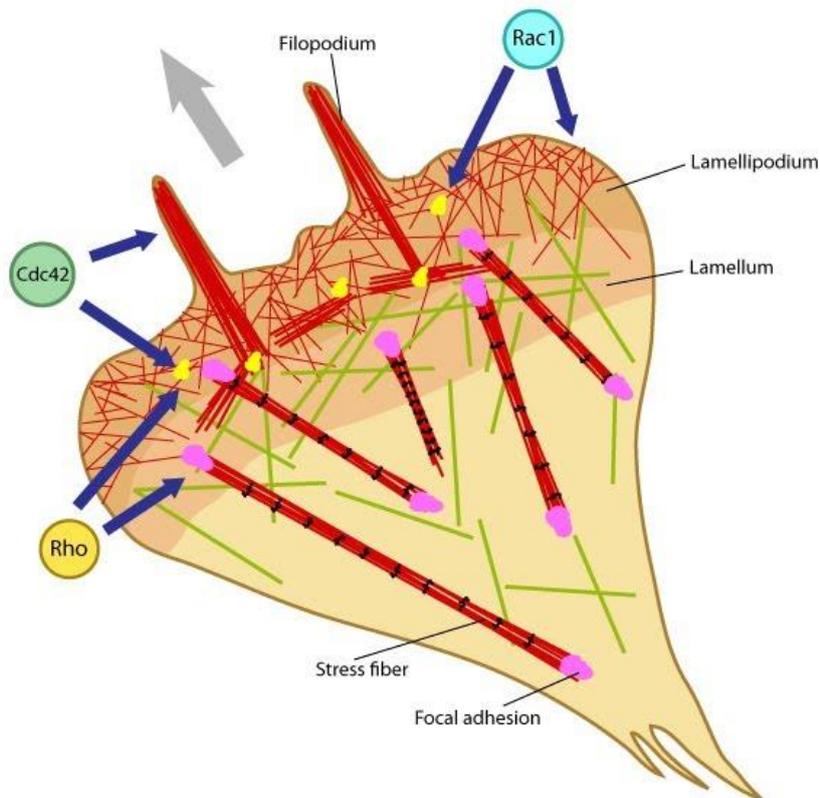


图 4 经典的 Rho GTPases 调控细胞骨架重排^[69]

之后基于 FRET 的 GTPases 活性研究发现，在细胞随机运动时，RhoA 主要在细

胞突起的边缘活化，偶尔也会在收缩的细胞尾部活化，而在胞体中活性很低。RhoA 活化也与细胞边缘皱褶形成和胞饮小泡有关，而与 PDGF 诱导的皱褶形成无关。在 PDGF 诱导细胞运动时，RhoA 在细胞突起中的活性很低^[28]。这就表明在细胞突起的形成过程中，RhoA 有多种作用模式。Matthias Machacek 等人的研究则进一步发现，RhoA 的活化与细胞前缘的突起不同步，而 Cdc42 和 Rac 则在 RhoA 活化 40s 后在 RhoA 活化带后方 2 μm 处活化^[70]（图 5）。这就表明：（1）和之前的研究结果一致^[71]，Rac1 和 RhoA 存在相互拮抗，并且这种拮抗受到严格的时空调控；（2）RhoA 在细胞突起形成的初期发挥作用，而 Rac1 和 Cdc42 则主要参与新形成突起的强化和稳定。这些研究进一步凸显出了在细胞运动过程中 Rho GTPases 介导的信号通路的复杂性以及 Rho GTPases 之间存在交互调控。

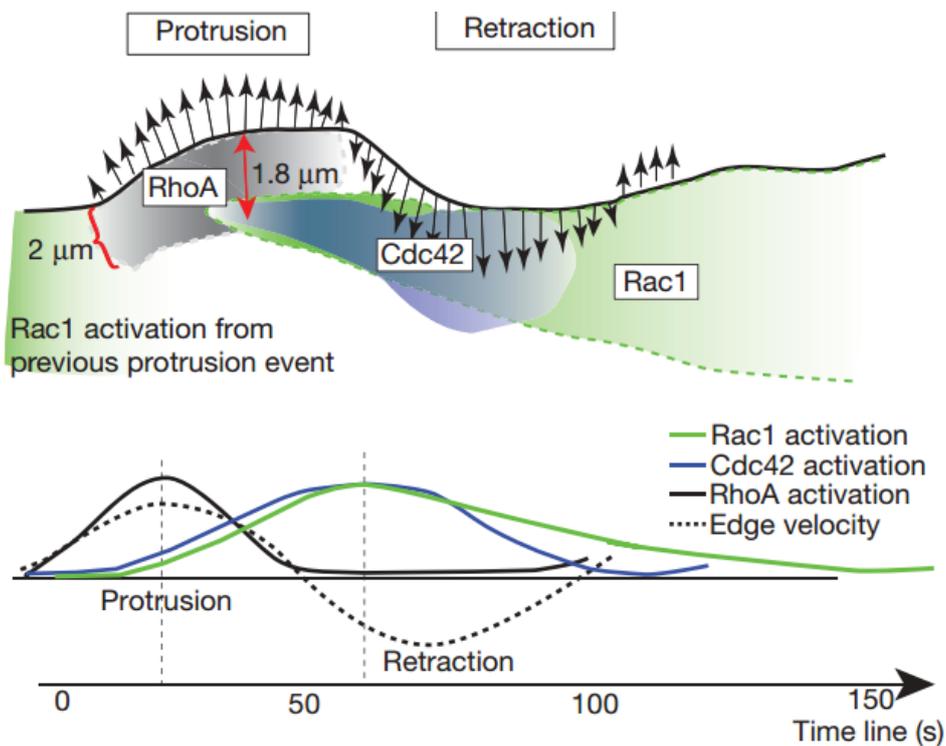


图 5 RhoA、Cdc42 和 Rac1 在突起形成过程中的时空调控^[70]

四、WAVE2 调控细胞骨架重排并与肿瘤预后密切相关

细胞运动依赖于肌动蛋白聚合形成的肌动蛋白纤维^[72]。在肌动蛋白纤维形成过程中，Arp2/3 复合物是启动肌动蛋白聚合的主要分子，它能够促进分支的肌动蛋白纤维网络的形成。Machesky 等人发现 Arp2/3 复合物本身不足以起始新的肌动蛋白纤

维的形成^[73]。之后的研究发现 Arp2/3 复合物受到威斯科特-奥尔德里奇综合征蛋白家族 (Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP) 分子的调控, 因此 WASP 家族是肌动蛋白骨架重排的关键调控分子^[74]。WASP 家族都含有一个保守的 C 端 VCA 序列, VCA 能够促进 Arp2/3 复合物的肌动蛋白成核活性 (图 6)。WASP 家族包括 WASP、N-WASP 以及 WAVE 家族^[75]。其中 WAVE 家族包括三个分子: WAVE1/SCAR1、WAVE2 和 WAVE3^[76]。WAVE 家族在所有真核细胞中都有表达^[77], 参与了细胞黏附、运动、分裂、融合等过程^[78]。在动物细胞中, WAVE 家族在胚胎发育、神经形态发生、免疫细胞活化、趋化以及肿瘤侵袭转移过程中都发挥重要作用^[79]。Kunda、Yan 等人研究发现 WAVE 家族分子在片状伪足形成中是必不可少的, 并且一般作为 Rac 的下游分子调控片状伪足形成^[80,81]。

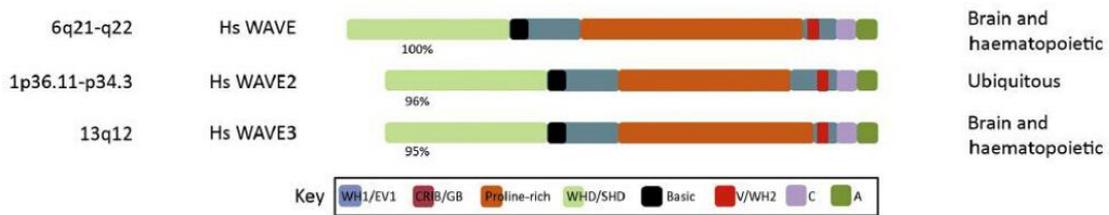


图 6 WAVE 家族结构示意图^[82]

在细胞内, WAVE 家族参与构成了一个 400kD 的五聚体即 WAVE 调控复合物 (WAVE regulatory complex, WRC)。WRC 包括 Sra1/Cyfip1、Nap1/Hem2、Abi2、HSPC300/Brick1 以及 WAVE^[83]。WRC 结构提示 WRC 中其它组分能够阻断 WAVE 的 VCA 序列与 Arp2/3 复合物的结合从而抑制 WAVE 活性^[65]。在上游信号分子的作用下, WRC 被募集到细胞膜同时解除对 WAVE 的抑制^[84]。目前已知的 WRC 的配体包括五类分子: (1) 小 G 蛋白。Rac 能直接结合 Sra1, 以别构调节的方式活化 WRC^[65]; Arf 与 Rac 共同作用促进胞膜上的 WRC 活化^[85]。(2) 磷脂分子, 包括 PIP3 等。PIP3 能促进 WRC 结合细胞膜^[86]。(3) 激酶, 包括 Abl、Cdk5、ERK 等。激酶能磷酸化 WRC, 进而调控 WRC 与其它分子的结合^[79]。(4) 脚手架蛋白, 包括 IRSp53、Toca1、WRP 等。脚手架蛋白通过其 SH3 结构域与 Abi2、WAVE1 富含脯氨酸的区域结合, 促进 WRC 结合细胞膜^[87]。(5) 含有 WRC 相互作用受体序列 (WRC interacting receptor sequence, WIRS) 的一类分子。这类分子包括 120 多个跨膜蛋白、膜相关蛋白, 如

GPCR、离子通道等。WIRS 能够结合 WRC 表面的一个保守区域，破坏这个保守区域能够导致肌动蛋白组装缺陷^[88]。

WAVE2 编码基因位于 1p36.11，在各种组织中广泛表达。Fernando HS 等人研究发现乳腺癌组织中 WAVE2 表达水平高于正常乳腺组织^[89]。Lian-Yue Yang 等人发现 WAVE2 在肝癌组织中表达上调（71/112），WAVE2 表达水平与多个肿瘤结节、包膜缺失、Edmondson-Steiner 分级、静脉入侵以及较短的中位生存期相关，并且进一步分析发现 WAVE2 表达水平可作为肝癌进展的独立预后因子^[90]。既往的研究提示，WAVE2 是 Arp2/3 复合物的重要上游调控分子，在肌动蛋白骨架重排中发挥重要作用；WAVE2 可能通过调控肿瘤细胞运动促进肝癌、乳腺癌进展，但是 WAVE2 在肿瘤组织中高表达的分子机制仍不清楚。

五、DOCK 家族 GEFs 在肿瘤细胞运动调控中发挥重要作用

DOCK 家族包括 11 个分子，分别命名为 DOCK1-DOCK11。DOCK 家族分子含有两个保守的结构域：能和脂质结合的 DHR-1（DOCK homology region-1）结构域和具有 GEF 活性的 DHR-2 结构域。根据序列同源性及结构域分布，DOCK 家族分子可进一步分为四类：DOCK-A（包括 DOCK1、DOCK2 和 DOCK5）、DOCK-B（包括 DOCK3 和 DOCK4）、DOCK-C（包括 DOCK6、DOCK7 和 DOCK8）以及 DOCK-D（包括 DOCK9、DOCK10 和 DOCK11）^[91]。一般认为，DOCK-A 和 DOCK-B 主要是 Rac GEFs，而 DOCK-D 主要是 Cdc42 GEFs^[92-95]（图 7）。DOCK 家族分子的活性及时空分布受到多个机制的调控，包括磷酸化以及其与脂质、接头蛋白、受体分子的结合等。

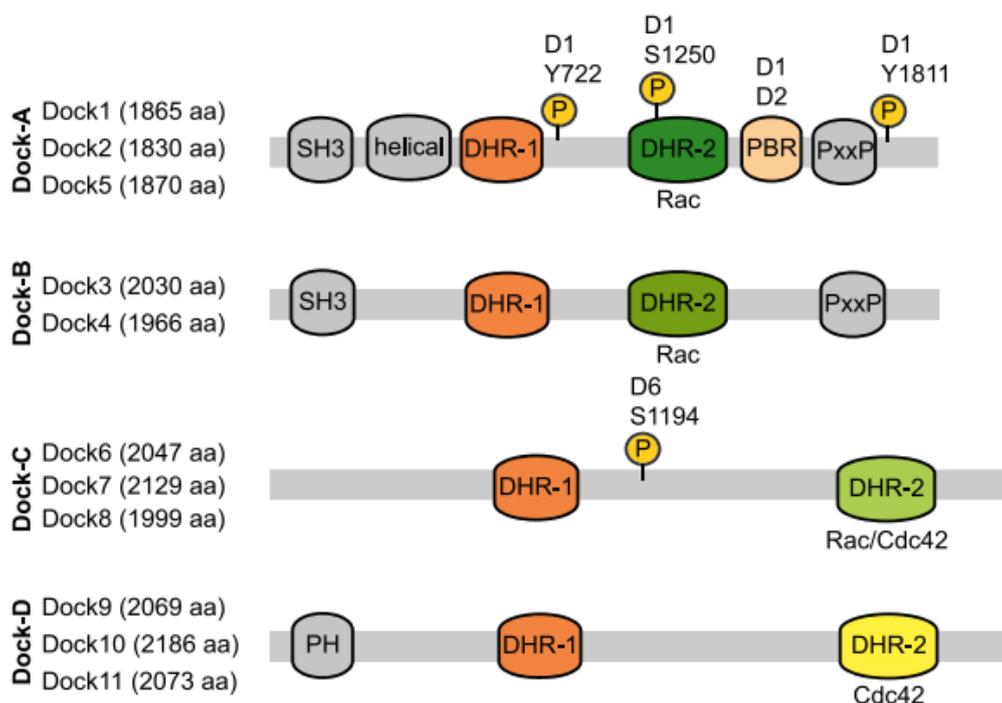


图 7 DOCK 家族 GEFs 分类及结构示意图^[96]

DOCK3 又名 MOCA (modifier of cell adhesion protein)、PBP (presenilin binding partner)。其最早是作为早老素 (presenilin) 的互作分子被发现^[97]。研究发现 DOCK3 是神经细胞死亡信号通路的重要节点分子^[98]。此外, DOCK3 能够调控肌动蛋白骨架重排和微管聚合, 在轴突延伸中发挥重要作用^[99,100]。早期的研究认为 DOCK3 特异性的表达于神经细胞, 此后的研究发现 DOCK3 在非神经细胞中也有表达。

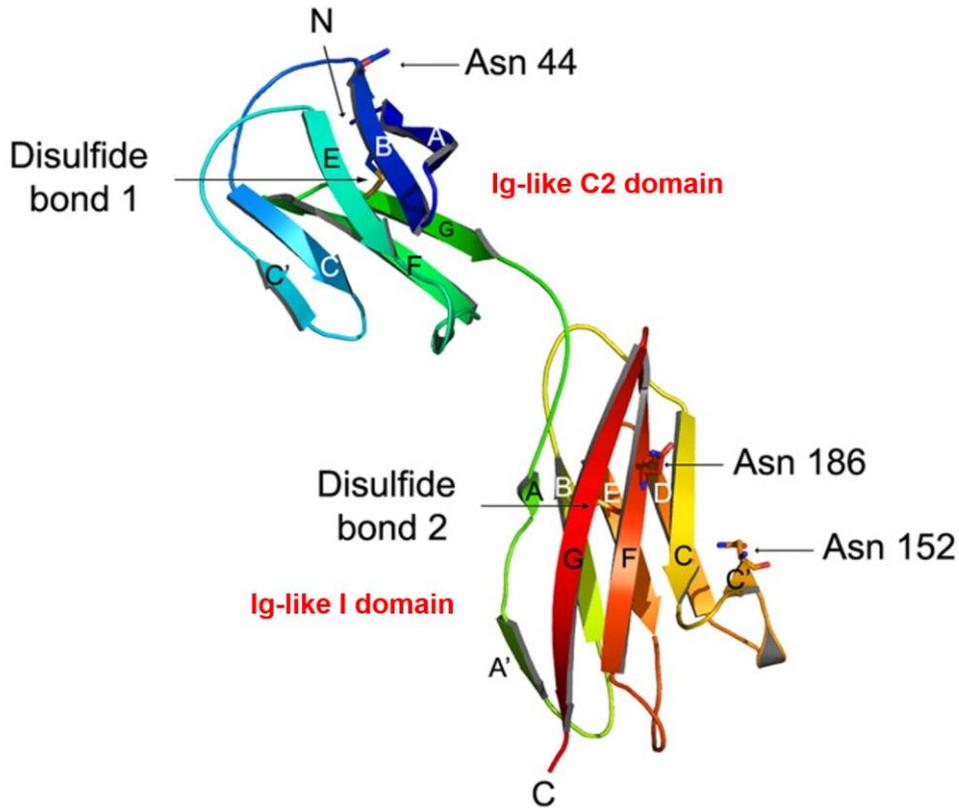
根据肿瘤细胞所处的微环境, 单个肿瘤细胞有两种运动方式: 阿米巴运动和间充质样运动^[101]。阿米巴运动的特征是: 细胞多为圆形、出泡形态, 细胞运动不依赖于蛋白酶, 需要较强的肌动球蛋白收缩力, 主要由 RhoA-ROCK 信号通路调控。但最近 Jose L. Orgaz 等人的研究发现, 多种基质金属蛋白酶也参与调控肿瘤阿米巴运动^[102]。而间充质样运动的特征是: 细胞形态变长, 主要由 Rac1 信号通路调控。这两种运动方式可相互转换, 因此在不同的微环境中, 肿瘤细胞可采取更有效的运动方式。Sanz-Moreno 等人研究了 Rho 家族小 G 蛋白调控肿瘤运动方式转换的分子机制^[103]。通过 siRNA 筛查的方法, 发现抑制 DOCK3 的表达可以阻断黑色素瘤细胞阿米巴-间充质样运动方式的转换。DOCK3 与接头蛋白 NEDD9 相互作用可以促进 Rac1 活化, 进而促进间充质样运动; 并且可以同时抑制 RhoA 活性, 进而抑制阿米巴运

动^[103]。这就表明，NEDD9/DOCK3/Rac/WAVE2 信号通路能够促进间充质样运动、抑制阿米巴运动，进而促进肿瘤侵袭和转移。Ladhani 等人研究发现 PEDF (pigment epithelium-derived factor) 可以通过上调 Rac1-GEF DOCK3、下调 Rac1-GAP ARHGAP22 促进 Rac1 活化，同时抑制 RhoA 活性，进而促进间充质样细胞运动^[104]。

E-cadherin 表达下调是 EMT 发生过程中的关键分子事件。但是，E-cadherin 下调不足以解释细胞间黏附缺失后细胞运动能力增强。WH Yang 等人研究发现，Twist1 与 BMI1 协同抑制 let-7i 的表达，引起 NEDD9 和 DOCK3 表达上调，进而导致 Rac1 活性增加、细胞呈间充质样运动^[105]。这些结果提示，DOCK3 通过调控肿瘤细胞运动在肿瘤发生发展中发挥重要作用。

六、CD147 在肿瘤细胞运动过程中发挥重要作用

CD147 是一个 I 型跨膜蛋白，属于免疫球蛋白超家族。CD147 有四个剪接异构体，通常所指的 CD147 是剪接异构体 2 (isoform 2)^[106]。CD147 全长为 269 个氨基酸，包括 21 个氨基酸的信号肽 (1-21)、185 个氨基酸的胞外段 (22-206)、24 个氨基酸的跨膜区 (207-230) 以及 39 个氨基酸的胞内段 (231-269)。编码 CD147 的基因位于 19p13.3，编码的核心蛋白为 29kDa。CD147 有三个糖基化位点 (图 8)。由于其糖基化程度的差异，在 SDS-PAGE 上 CD147 的表观分子量为 33-66kDa^[4]。原核可溶性表达的 CD147 胞外段晶体结构 (PDB: 3B5H) 显示：(1) CD147 胞外段包含两个 Ig 样结构域：N 端的 C2 结构域和靠近细胞膜的 I 结构域。C2 结构域和 I 结构域之间由 5 个氨基酸连接。(2) 在同一晶胞内，存在 4 种不同形式的二聚体，这提示 CD147 胞外段存在同性相互作用^[107]。之后的功能研究也证实，同源二聚体是 CD147 诱导 MMPs 分泌、促进肝癌侵袭的功能单位^[108]。

图 8 CD147 分子晶体结构^[107]

Sabine Riethdorf 等人筛查了 2348 例肿瘤组织（包括 129 种肿瘤）和 608 例正常组织（包括 76 种正常组织）中 CD147 的表达水平，研究发现 112 种肿瘤组织中有 CD147 表达，其中肝细胞肝癌中 CD147 阳性率为 83%、鳞状细胞癌中 CD147 阳性率为 60-100%，而正常组织中仅在增殖活跃的上皮细胞、左心室心肌细胞和脑血管内皮细胞中检测到 CD147 表达^[109]。本实验室的研究发现，CD147 在肿瘤组织中的阳性率为：肝癌（80%）、肺癌（62%）、胃癌（66%）、结肠癌（58%）^[5]。这些研究表明 CD147 在正常组织及胚胎组织中低表达，在癌组织中高表达，提示 CD147 是一个癌特异性的、广谱的肿瘤标志物。

CD147 能够诱导 MMPs 分泌，促进肿瘤侵袭和转移。早期的研究发现，CD147 阳性的肿瘤细胞及其培养上清能够诱导成纤维细胞分泌多种基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs），如 MMP1、MMP2、MMP9 等^[110,111]。因此，CD147 又被称为细胞外 MMP 诱导分子（extracellular MMP inducer, EMMPRIN）。进一步研究发现，培养上清中全长的 CD147 分子或脱落的 CD147 胞外段均可诱导 MMPs 分泌

[112-114]，并且这种诱导作用可能是由 CD147 的同性相互作用介导的^[115]。但是，成纤维细胞膜上是否存在其它的分子作为 CD147 的受体介导这一过程仍有待研究。此外，EGFR 介导的信号通路也能够诱导肿瘤细胞表达 CD147^[116]。细胞外基质的降解是肿瘤细胞发生侵袭和转移的前提，肿瘤细胞中过表达 CD147 能够上调 MMPs 表达，促进肿瘤细胞生长和转移^[117,118]。但是 CD147 诱导 MMPs 表达的分子机制仍然有待明确。

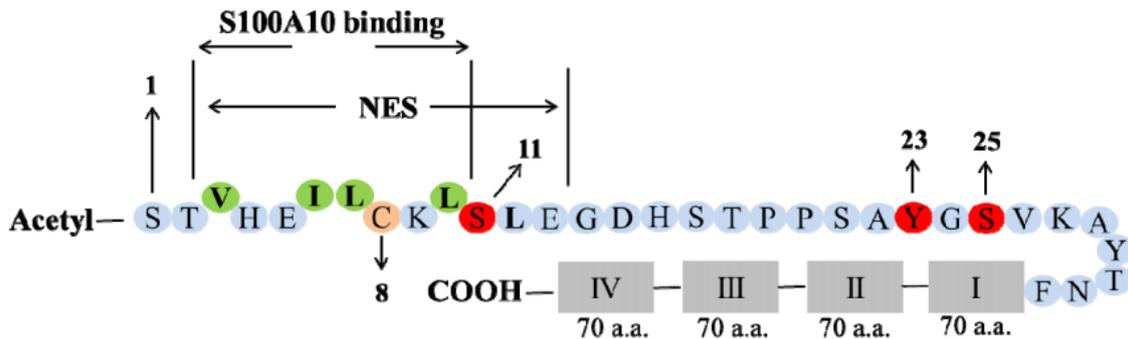
在肿瘤发生发展过程中，CD147 与其它分子相互作用调控肿瘤的发生和发展。目前已知的 CD147 互作分子包括 MCT1、integrin- β 1、亲环素、泛素 C 等。研究发现 MCT1 能够下调 CD147 的蛋白质表达，但并不影响 CD147 转录。MCT1 和 CD147 的相互作用参与调控乳酸转运和细胞增殖^[119]。在黑色素瘤细胞中，CD147 和亲环素相互作用调节 Ca^{2+} 信号通路和 MMPs 活性^[120]。CD147 和 IGF-1 之间的正反馈环路能够诱导血管生成^[121]。我们之前的研究发现，CD147 和 Annexin A2 在肝癌细胞中存在共定位和共沉淀，并且能够促进肿瘤细胞运动和侵袭^[122]。CD44 和 CD147 的相互作用与乳腺癌和前列腺癌的进展相关^[123,124]。此外，研究也发现 CD147 和 CD44s 在胰腺癌细胞中存在共定位和相互作用，能够促进 pSTAT3 介导的胰腺癌进展^[125]。

CD147 单抗能够抑制 MMP2、MMP9 的表达，抑制肝癌细胞侵袭；此外还能通过抑制 FAK、PI3K、Akt、Girdin 的磷酸化引起细胞骨架重排，抑制肝癌细胞运动^[126]。CD147 参与了 vinculin 介导的黏着斑形成，能够通过促进 Arp2/3 在细胞前缘的定位，进而促进片状伪足的形成^[127]。Haining Zhu 等人研究发现，降低前列腺癌细胞 CD147 表达水平，能够减少丝状伪足的形成，但是细胞间黏附增强^[128]。Kathryn D. Curtin 等人研究发现，CD147 通过与 integrin 相互作用促进昆虫细胞骨架重排、片状伪足形成^[129]。G. Daniel Grass 等人研究发现上调 CD147 表达能够引起 MMP14 表达水平增高，并且可以诱导乳腺上皮细胞形成侵袭性伪足样细胞突起，提示 CD147 能够调控侵袭性伪足的形成和活性^[130]。Huiyun Xu 等人研究发现，CD147 能够通过 ERK1/2 信号通路调控肝癌细胞 FAK 表达水平及应力纤维的重排^[131]。CD147 能够与 Annexin A2 相互作用进而调控 RhoA 和 Rac1 信号通路，在单个肿瘤细胞运动形式转换的过程中发挥重要作用^[8]。此外，近期有研究发现，CD147 可以通过 FAK/Src/STAT3/DOCK3/Rac1 信号通路调控肝癌细胞间充质样细胞运动，促进肝癌细

胞运动和转移^[132]。以上结果提示：(1) CD147 参与调控肿瘤细胞运动是其促进肿瘤进展的重要机制；(2) CD147 调控肿瘤细胞运动的互作分子、促进片状伪足形成的分子机制等仍有待明确。

七、Annexin A2 参与肿瘤细胞运动调控

Annexin A2 是一个钙依赖的磷脂结合蛋白，其分子量为 36kDa，故又名 p36 蛋白^[133]。Annexin A2 在真核细胞中普遍表达，且高度保守，其主要定位于细胞膜^[134]和细胞浆，有很少的一部分定位于细胞核中^[135]。Annexin A2 主要由两部分构成：高变的 N 端结构域和保守的 C 端核心结构域。N 端结构域含有翻译后修饰的位点，同时也参与蛋白质互作。C 端结构域含有钙离子、磷脂、肝素、DNA 及 F-actin 的结合位点^[136]（图 9）。Susobhan Das 等人应用酵母双杂交系统在前列腺癌中发现 STAT6 是 Annexin A2 的互作分子，在 IL-4 处理时，Annexin A2 能够稳定胞浆中的 p-STAT6 水平，并且促进其入核^[131]。



Val3、Ile6、Leu7、Leu10——S100A10 结合的疏水氨基酸

Ser11——PKC 磷酸化位点

Tyr23——pp60Src 磷酸化位点

Ser25——PKC 磷酸化位点

图 9 Annexin A2 结构示意图^[137]

磷酸化是一种重要的翻译后修饰，参与调控蛋白质的活性和功能。多种生长因子如 PDGF、HGF 及 IGF 等都能引起 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化。烟碱刺激肾上腺细胞引起 PKC 活化，则导致 Annexin A2 Ser25 磷酸化和钙离子依赖的细胞外泌

[138,139]。早期的研究发现，在活细胞及体外溶液反应体系中，pp60vSrc 能够磷酸化 Annexin A2^[140-142]，且其磷酸化位点是 Tyr23^[143]。Tyr23 磷酸化的 Annexin A2 在低钙离子条件下与磷脂载体的结合能力降低，抑制了其与 F-actin 的结合^[144]。而钙离子依赖的蛋白激酶 C (cPKC) 能够磷酸化 Annexin A2 N 端的丝氨酸 Ser25^[145]，Annexin A2 的 Ser25 磷酸化抑制了其聚合磷脂载体的能力，但不影响其结合于磷脂载体^[146]。PKC 对 Annexin A2 N 端 Ser11 的磷酸化则导致 Annexin A2 与 S100A10 的结合能力降低^[147]，并引起 Annexin A2-S100A10 复合物解聚^[148]。Deora 等人研究发现热应激引起的 Annexin A2 向细胞膜转位依赖于其与 S100A10 的结合且 Tyr23 存在磷酸化修饰^[149]。之后的研究也证实了 Tyr23 磷酸化在 Annexin A2 参与的 cofilin 依赖的肌动蛋白骨架重排中发挥重要作用^[150]。Lei Zheng 等人在胰腺癌裸鼠模型中发现 Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化对于 Rho 介导的 EMT 过程是必需的^[151]。这些研究就提示 Tyr23 磷酸化对于 Annexin A2 参与调控细胞骨架重排、EMT 至关重要。本实验室的研究进一步证实，Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化可以调控肝癌细胞 RhoA 依赖的阿米巴样运动，并且 CD147 可以负向调控 Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化，进而抑制肝癌细胞阿米巴样运动^[8]。但是，Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化是如何调控 RhoA 信号通路的以及 CD147 负向调控 Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化的分子机制仍有待明确。

正文

第一部分 CD147 与 Annexin A2 的相互作用

CD147 在肿瘤发生发展中发挥重要作用。已有研究表明，CD147 参与调控肿瘤细胞骨架重排以及肿瘤细胞运动形式转换。但是，CD147 调控肿瘤细胞运动的互作分子仍然有待明确。本部分应用免疫共沉淀和质谱联用的方法，发现 Annexin A2 是 CD147 可能的互作分子。之后，将 CD147 截短表达，采用 Pull-Down、FRET、SPR 等方法明确了 CD147 与 Annexin A2 相互作用的结构域，并确定了其相互作用的动力学参数。

1 材料

1.1 细胞系

人肝癌细胞系 SMMC-7721，人胚肾细胞系 HEK293，源自中科院生化细胞所细胞库；人肝癌细胞系 HuH-7，源自日本 JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) 细胞库；人肝癌细胞系 HepG2、人肺癌细胞系 A549，源自美国 ATCC (American Type Culture Collection) 细胞库。

1.2 菌株

大肠杆菌 Origami B (DE3)、DH5 α 系本实验室保存。

1.3 主要仪器设备

超净台 (吴江市净化设备总厂)

CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Fisher)

细胞培养离心机 (Eppendorf)

倒置显微镜 (Olympus)

恒温水浴箱 (北京市医疗设备总厂)

制冰机 (SANYO)
恒温摇床 (上海天呈实验仪器制造有限公司)
高速低温离心机 (Sigma)
Image Station 4000MM 化学发光成像系统 (KODAK)
Gel Doc™ EZ 凝胶成像系统 (Bio-Rad)
移液器 (Eppendorf)
超声波细胞破碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)
PCR 仪 (Bio-Rad)
立式超低温冰箱 (Thermo Fisher)
电泳槽和电泳仪 (Bio-Rad)
实时荧光定量 PCR 仪 (Agilent)
AKTA 蛋白质层析纯化系统 (GE)
A1 激光共聚焦显微镜 (Nikon)
倒置荧光显微镜 (Olympus)
ProteOn XPR36 蛋白质相互作用工作站 (Bio-Rad)
LTQ-Orbitrap XL 离子阱-轨道阱组合型高分辨质谱仪 (Thermo Fisher)
NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher)
DELTA 320 pH 计 (METTLER TOLEDO)
分光光度计 (Perkin Elmer)
电子天平 (Sartorius AG)
超纯水机 (Millipore)

1.4 主要试剂和耗材

免疫共沉淀试剂盒 (Pierce)
IPTG (Merck)
PMSF (杭州华安生物技术有限公司)
氨苄青霉素 (北京鼎国生物技术有限公司)
卡那霉素 (北京鼎国生物技术有限公司)
四环素 (北京鼎国生物技术有限公司)

HisTrap 蛋白纯化预装柱 (GE)
Superdex 75 凝胶柱 (GE)
PD-10 脱盐柱 (GE)
超滤离心管 (Millipore)
青链霉素 (Sigma)
胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司)
RPMI-1640 培养基 (Sigma)
DMEM 培养基 (Sigma)
胰酶细胞消化液 (Sigma)
RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司)
磷酸酶抑制剂 Cocktail (Roche)
BCA 蛋白定量分析试剂盒 (Pierce)
预染彩虹蛋白 Marker (NEB)
PVDF 膜 (Millipore)
BeyoECL Plus 荧光检测试剂 (上海碧云天生物技术有限公司)
质粒提取试剂盒 (Omega Bio-Tek)
PCR 产物回收试剂盒 (Omega Bio-Tek)
DNA 切胶回收试剂盒 (Omega Bio-Tek)
TRIzol (Invitrogen)
primeSTAR 高保真 DNA 聚合酶 (TaKaRa)
PrimeScript 反转录试剂盒 (TaKaRa)
SYBR Premix 荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa)
DNA 限制性内切酶、连接酶 (NEB)
 β -巯基乙醇 (Sigma)
普通化学试剂 (Sigma)
His Pull-Down 试剂盒 (Pierce)
用于质谱的银染试剂盒 (Pierce)
抗 His 标签抗体 (北京康为世纪生物科技有限公司)

抗人 CD147 抗体（本实验室制备）
抗人 CD147 抗体（Santa Cruz）
抗人 Annexin A2 抗体（Santa Cruz）
DAPI（Biotium）
Alex Fluor 594 标记羊抗鼠二抗（Pierce）
Dylight 488 标记羊抗兔二抗（Pierce）
HRP 标记羊抗鼠二抗（Pierce）
激光共聚焦培养皿（NEST）
Lipofectamine 2000 转染试剂（Invitrogen）
引物（华大基因）
细胞培养板（Corning）
Countess 细胞计数板（Invitrogen）

1.5 主要缓冲液

HisTrap 结合缓冲液

NaCl 29.22g

Na₂HPO₄ 2.84g

咪唑 1.36g

加入约 800ml 去离子水，充分搅拌溶解，将 pH 调至 7.4，定容至 1L。

HisTrap 洗脱缓冲液

NaCl 29.22g

Na₂HPO₄ 2.84g

咪唑 20.4g

加入约 800ml 去离子水，充分搅拌溶解，将 pH 调至 7.4，定容至 1L。

10×PBS

NaCl 80g

KCl 2g

Na₂HPO₄ 14.2g

KH₂PO₄ 2.7g

加入约 800ml 去离子水，充分搅拌溶解，将 pH 调至 7.4，定容至 1L。

LB 培养基

NaCl 10g

胰蛋白胨 10g

酵母提取物 5g

加入约 800ml 去离子水，充分搅拌溶解，定容至 1L。

5×Tris-Glycine 电泳缓冲液

Tris base 15.1g

甘氨酸 94g

SDS 5g

加入约 800ml 去离子水，充分搅拌溶解，定容至 1L。

5×SDS-PAGE 上样缓冲液

1M Tris-HCl (pH6.8) 1.25ml

甘油 2.5ml

SDS 0.5g

溴酚蓝 10mg

充分搅拌溶解，定容至 5ml。

1×转膜缓冲液

甘氨酸 14.4g

Tris base 3.03g

加入约 800ml 去离子水，充分搅拌溶解

加入 100ml 甲醇，定容至 1L。

10×TBS 缓冲液

NaCl 80g

KCl 2g

Tris base 30g

加入约 800ml 去离子水，充分搅拌溶解，将 pH 调至 7.4，定容至 1L。

TBST 缓冲液

10×TBS 缓冲液 100ml

Tween-20 0.5ml

加入约 800ml 去离子水，充分搅拌溶解，定容至 1L。

考马斯亮蓝染色液

考马斯亮蓝 R-250 1g

异丙醇 250ml

冰醋酸 100ml

去离子水 650ml

搅拌溶解后，用滤纸过滤除去颗粒物。

考马斯亮蓝染色脱色液

醋酸 100ml

甲醇 200ml

去离子水 700ml

2 方法

2.1 细胞培养

人肝癌细胞系 SMMC-7721、人肺癌细胞系 A549 培养于 RPMI-1640 培养基，人肝癌细胞系 HuH-7、HepG2 培养于 DMED 培养基。培养基中均加入 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素。细胞均置于 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养。根据细胞生长速度，每 2-3 天换一次培养基。

2.2 免疫共沉淀

1) 交联抗体

- A. 将 AminoLink 偶联树脂和试剂从冰箱中取出，平衡至室温。
- B. 用超纯水稀释交联缓冲液。
- C. 轻轻摇晃 AminoLink 偶联树脂，使其重悬。将 200 μ l 枪头剪短后吸取 20 μ l 悬液至离心柱中。1000g 离心 1min，弃穿过液。
- D. 用 200 μ l 的 1×交联缓冲液洗树脂，1000g 离心 1min，弃穿过液。

- E.** 用滤纸吸除离心柱底部多余的液体，插入底塞。
 - F.** 用超纯水、20×交联缓冲液，将 20μg 抗体的体积调整至 200μl。
 - G.** 将 3μl 氰基硼氢化钠溶液加入 200μl 的反应体系中。
 - H.** 室温旋转孵育 2h。
 - I.** 卸下底塞，拧松顶盖，1000g 离心 1min，保留穿过液做抗体交联效率分析。
 - J.** 加入 200μl 的 1×交联缓冲液，1000g 离心 1min，弃穿过液。重复此操作一次。
 - K.** 加入 200μl 淬灭缓冲液，1000g 离心 1min，弃穿过液。
 - L.** 用滤纸吸除离心柱底部多余的液体，插入底塞。加入 200μl 淬灭缓冲液，加入 3μl 氰基硼氢化钠溶液。轻轻混匀，室温孵育 15min。
 - M.** 卸下底塞，拧松顶盖，1000g 离心 1min，弃穿过液。
 - N.** 加入 200μl 的 1×交联缓冲液，1000g 离心 1min，弃穿过液。重复此操作一次。
 - O.** 加入 150μl 洗涤缓冲液，1000g 离心 1min，弃穿过液。重复此操作六次。
- 2) 裂解细胞**
- A.** 取对数生长期细胞，消化后，1000rpm 离心 5min 以沉淀细胞。加入 1ml PBS 轻轻重悬，1000rpm 离心 5min 再次沉淀细胞。
 - B.** 加入预冷的 IP 裂解/洗涤缓冲液，加入蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂，充分重悬细胞。
 - C.** 将细胞裂解液冰上放置 10min 并定期混匀，预冷离心机至 4℃。
 - D.** 13000g 4℃离心 10min，轻轻吸取上清至 EP 管中，进行 BCA 蛋白定量。
- 3) 预处理细胞裂解液**
- A.** 加入 100μl 的 1×交联缓冲液，1000g 离心 1min，弃穿过液。
 - B.** 轻轻重悬对照琼脂糖树脂，每 mg 的细胞裂解液中加入 80μl 的对照琼脂糖树脂。
 - C.** 4℃旋转孵育 1h。
 - D.** 1000g 离心 1min，保留穿过液。
- 4) 免疫共沉淀**

- A. 加入 200 μ l 的 IP 裂解/洗涤缓冲液, 1000g 离心 1min, 弃穿过液。重复此操作一次。
- B. 用滤纸吸除离心柱底部多余的液体, 插入底塞。加入经过预处理的细胞裂解液。4 $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜。
- C. 卸下底塞, 拧松顶盖, 1000g 离心 1min, 保留穿过液做后续分析。
- D. 加入 200 μ l 的 IP 裂解/洗涤缓冲液, 1000g 离心 1min, 弃穿过液。重复操作两次。
- E. 加入 100 μ l 的 1 \times 条件缓冲液, 1000g 离心 1min, 保留穿过液, 用 NanoDrop2000 检测蛋白浓度。

5) 洗脱

- A. 加入 10 μ l 洗脱缓冲液, 1000g 离心 1min, 保留穿过液。
- B. 加入 50 μ l 洗脱缓冲液, 室温孵育 5min, 1000g 离心 1min, 保留穿过液并记作 E1。可重复此操作两次, 穿过液分别记作 E2、E3。

6) 树脂再生和存储

- A. 加入 100 μ l 的 1 \times 交联缓冲液, 1000g 离心 1min, 弃穿过液。重复此操作一次。
- B. 插入底塞, 加入 200 μ l 的 1 \times 交联缓冲液, 盖紧顶盖, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 CD147 胞外段原核表达载体构建

1) 引物设计

Forward: 5'-ATATCTCGAGGGTGGCTGCGCACGCG-3'

Reverse: 5'-ATATGCCCATATGGCTGCCGGCACAGTC-3'

下划线为酶切位点, CTCGAG-Xho I, CATATG-Nde I

2) 采用 primeSTAR 高保真酶, 扩增 CD147 胞外段, 反应体系如下

Template	1 μ l
Primer-F	1 μ l
Primer-R	1 μ l
5 \times buffer	10 μ l
dNTP	4 μ l

Double-distilled H ₂ O	32.5μl
primeSTAR	0.5μl

PCR 反应条件设置如下:

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	98℃	30sec
2	30	98℃	10sec
		60℃	10sec
		72℃	1min
3	1	72℃	5min
4	1	4℃	∞

- 3) 切胶回收 PCR 产物。
- 4) Xho I / Nde I 双酶切 PCR 产物及载体 pET21a (+), 切胶回收酶切产物。
- 5) 采用 T4 DNA 连接酶连接 DNA 片段和载体。连接反应中, 片段: 载体=5: 1 (摩尔比)。
- 6) 转化 Origami B (DE3) 感受态细菌, 涂布 Amp⁺/Kan⁺/Tet⁺琼脂糖平板, 37℃培养过夜。
- 7) 随机挑取克隆培养过夜, 菌液 PCR 鉴定, 鉴定结果正确者送测序。

2.4 His 标签融合蛋白的表达和纯化

- 1) 接种 5μl Origami B (DE3) 菌液至 5ml Amp⁺/Kan⁺/Tet⁺ LB 培养基中, 37℃振荡培养过夜。
- 2) 转接 5ml 培养过夜的 Origami B (DE3) 菌液至 500ml Amp⁺/Kan⁺/Tet⁺ LB 培养基中, 37℃振荡培养约 6~7h 后 (OD₆₀₀ ≈ 0.6), 加入 500μl 1M IPTG, 22℃振荡培养过夜。
- 3) 4500rpm 离心 20min 收集菌体, HisTrap 结合缓冲液洗涤一次, -80℃冻存。
- 4) 冰上融解菌泥, 加入 30ml 含 1mM PMSF 的 HisTrap 结合缓冲液, 充分振荡重悬菌体。
- 5) 冰浴超声裂菌, 超声条件: 200w, 5s/10s, 30 分钟。

- 6) 12000g 4℃离心 15min, 取出上清。
- 7) 采用 AKTA 蛋白质层析纯化系统, 用 HisTrap 预装柱进行蛋白纯化, 流速 1ml/min, 洗脱峰用 SDS-PAGE 鉴定组分和纯度。
- 8) 将目标洗脱峰经 PD-10 脱盐柱脱盐后, 用超滤管浓缩至 1ml, 过 Superdex 75 凝胶柱, 流速 1ml/min。用 SDS-PAGE 鉴定蛋白峰组分和纯度。

2.5 His Pull-Down 实验

1) 偶联标签蛋白 (诱饵)

- A. 将琼脂糖微珠重悬后, 吸取 50 μ l 悬液至吸附柱。
- B. 加入 400 μ l wash solution, 重悬, 1250g 离心 30sec。重复平衡吸附柱 4 次。
- C. 加入 250 μ g 已纯化的标签蛋白。
- D. 4℃旋转孵育 2h。
- E. 1250g 离心 30sec。
- F. 加入 400 μ l wash solution, 颠倒重悬, 1250g 离心 30sec。重复洗 6 次。

2) 准备靶蛋白 (猎物)

- A. 消化细胞, 500g 离心 5min, 弃培养上清。
- B. 加入 5ml TBS, 重悬细胞。
- C. 500g 离心 5min, 弃上清。
- D. 每克细胞加入 2.5ml 裂解液, 充分重悬细胞。
- E. 冰置 30min。
- F. 12000g 离心 5min, 取上清。
- G. 加入 4M 咪唑, 使其终浓度为 20mM。

3) 捕获靶蛋白

- A. 将包含有靶蛋白的细胞裂解液加入吸附柱。
- B. 4℃旋转孵育过夜。
- C. 1250g 离心 30sec。
- D. 加入 400 μ l wash solution, 颠倒重悬, 1250g 离心 30sec。重复洗 6 次。

4) 洗脱

- A. 配制咪唑浓度为 300mM 的洗脱液。

- B. 加入 250 μ l 洗脱液，旋转孵育 5min。
- C. 1250g 离心 1min。
- D. 通过 Western blot 或银染，检测洗脱液成分。

2.6 银染

- 1) 用去离子水洗 SDS-PAGE 凝胶两次，每次 5min。
- 2) 加入固定液，室温孵育 15min。换新鲜固定液，室温再次孵育 15min。
- 3) 加入乙醇洗液，洗两次，每次 5min。
- 4) 加入激活剂工作液，室温孵育 1min。
- 5) 加入增强剂工作液，室温孵育 5min。
- 6) 用去离子水洗 SDS-PAGE 凝胶两次，每次 20sec。
- 7) 加入显影剂工作液室温孵育 2-3min。
- 8) 加入终止液结束显影。
- 9) 加入醋酸孵育 10min。

2.7 Western blot

- 1) 样品处理
 - A. 使用添加有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞，冰置 30min。
 - B. 12000g 4 $^{\circ}$ C 离心 15min。
 - C. 取上清，置于冰上。
 - D. 为了使上样量一致，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定样品浓度。
 - E. 根据样品浓度，用细胞裂解液将各样品浓度调为一致。
 - F. 加入 5 \times 上样缓冲液，沸水浴 5min。
- 2) 上样与电泳
 - A. 电泳程序设定：90V 恒压 40min；120V 恒压 100min。
 - B. 使用预染蛋白质 Marker 8 μ l，便于观察电泳情况和转膜效果。
- 3) 转膜
 - A. 根据目的蛋白分子量大小，参照预染蛋白质 Marker 条带，裁剪 SDS-PAGE 凝胶。
 - B. 按照 PVDF 膜使用说明书，制作转膜装置。

- C. 采用冰浴 100V 恒压转膜，根据目的蛋白分子量确定合适的转膜时间。
- 4) 封闭
- A. 用 TBST 缓冲液、脱脂奶粉配制 5% 封闭液。
- B. 将 PVDF 膜浸入封闭液中，室温孵育 1h。
- 5) 孵育一抗
- A. 根据抗体说明书，选用适当的比例用 TBST 缓冲液稀释一抗。
- B. 将稀释好的一抗敷在 PVDF 膜上，4℃ 孵育过夜。
- C. 吸除一抗，用 TBST 缓冲液洗 PVDF 膜 4 次，每次 5min。
- 6) 孵育二抗
- A. 根据抗体说明书，选用适当的比例用 TBST 缓冲液稀释二抗。
- B. 将稀释好的二抗敷在 PVDF 膜上，室温孵育 1h。
- C. 吸除二抗，用 TBST 缓冲液洗 PVDF 膜 4 次，每次 5min。
- 7) 荧光检测
- A. 根据 BeyoECL Plus 荧光检测试剂说明书，配制发光液。
- B. 应用化学发光成像系统，选择合适的曝光时间，检测荧光信号。

2.8 免疫荧光染色

- 1) 细胞爬片
- A. 将 100 μ l 10 μ g/ml 的 fibronectin 铺到激光共聚焦培养皿的玻璃底面上，在 37℃ 细胞培养箱中放置 1h。
- B. 消化对数生长期细胞并计数，将细胞密度调至 2 \times 10⁵/ml。
- C. 将 50 μ l 细胞悬液滴到铺有 fibronectin 的激光共聚焦培养皿玻璃底面上。
- D. 培养过夜。
- 2) 吸除培养基，轻轻加入 1ml PBS，涮洗 3 次。吸除 PBS 后，加入 200 μ l 4% 多聚甲醛，室温固定 15min。
- 3) 吸除多聚甲醛，轻轻加入 1ml PBS，置于摇床上洗 3 次，每次 5min。吸除 PBS 后，加入 0.2% Triton-X100，室温放置 2min。
- 4) 吸除 Triton-X100，轻轻加入 1ml PBS，涮洗 3 次。吸除 PBS 后，加入 200 μ l 1% BSA，室温封闭 1h。

- 5) 吸除 BSA，加入用 1% BSA 稀释的一抗，4℃ 孵育过夜。
- 6) 吸除一抗，轻轻加入 1ml PBS，置于摇床上洗 3 次，每次 5min。吸除 PBS 后，加入用 1% BSA 稀释的荧光二抗和 DAPI，避光，室温孵育 1h。
- 7) 吸除荧光二抗后，轻轻加入 1ml PBS，置于摇床上洗 3 次，每次 5min。最后于激光共聚焦显微镜下观察。

2.9 CD147 分段真核表达载体的构建

1) 引物设计

A. C2 结构域+跨膜区+胞内段

Forward: 5'-CAGAGGGCGGCCAGGAGCTGGATGTTGG-3'

Reverse: 5'-CCAACATCCAGCTCCTGGCCGCCCTCTG-3'

B. I 结构域+跨膜区+胞内段

Forward: 5'-CGGAGCCTCCGGGGTGAAGGCTGTGA-3'

Reverse: 5'-TCACAGCCTTCACCCCGGAGGCTCCG-3'

C. 跨膜区+胞内段

Forward: 5'-GAGCCTCCGGGCTGGCCGCCCT-3'

Reverse: 5'-AGGGCGGCCAGCCCGGAGGCTC-3'

2) 反应体系

10×QuikChange reaction buffer	1.25μl
ddH ₂ O	8.5μl
QuikSolution	0.25μl
CD147-pEGFP-N1	0.5μl
Primer-F	0.5μl
Primer-R	0.5μl
dNTP mix	0.5μl
QuikChange enzyme	0.5μl

反应条件设置如下：

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	30sec
2	30	95°C	30sec
		55°C	1min
		65°C	5min
3	1	4°C	∞

- 3) 反应完毕后，在反应体系中加入 0.5 μ l Dpn I 内切酶，37°C 反应 5min。
- 4) 转化 DH5 α 感受态细菌，涂布 Kan⁺琼脂糖平板，37°C 培养过夜。
- 5) 随机挑取克隆培养过夜，送测序。

2.10 Annexin A2 分段真核表达载体的构建

1) 引物设计

A. N 端结构域

Forward: 5'-CCGCTCGAGATGTCTACTGTTCACGAAA-3'

Reverse: 5'-AATGGATCCGCGAGTATAGGCTTTGACAGACC-3'

B. C 端结构域

Forward: 5'-CCGCTCGAGATGAACTTTGATGCTGAGCGGGA-3'

Reverse: 5'-AATGGATCCGCGTCATCTCCACCACACA-3'

下划线为酶切位点，CTCGAG-Xho I，GGATCC-BamH I

2) 反应体系

cDNA	1 μ l
Primer-F	1 μ l
Primer-R	1 μ l
5 \times buffer	10 μ l
dNTP	4 μ l
Double-distilled H ₂ O	32.5 μ l
primeSTAR	0.5 μ l

反应条件设置如下

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	98℃	30sec
2	30	98℃	10sec
		60℃	10sec
		72℃	10sec/1min [#]
3	1	72℃	5min
4	1	4℃	∞

[#]N 端结构域延伸时间为 10sec，C 端结构域延伸时间为 1min。

- 3) 切胶回收 PCR 产物。3
- 4) Xho I / BamH I 双酶切 PCR 产物及载体 pDsRed-N1，切胶回收酶切产物。
- 5) 采用 T4 DNA 连接酶连接 DNA 片段和载体。连接反应中，片段：载体=5：1（摩尔比）。
- 6) 转化 DH5 α 感受态细菌，涂布 Kan⁺琼脂糖平板，37℃培养过夜。
- 7) 随机挑取克隆培养过夜，菌液 PCR 鉴定，鉴定结果正确者送测序。

2.11 荧光共振能量转移实验

- 1) 消化对数生长期的 HEK293 细胞，计数 2×10^5 个细胞种于 24 孔板中，种 4 个孔。培养过夜。
- 2) 待细胞汇合度为 80%时，将 RPMI-1640 培养基、待测分子的荧光蛋白融合表达载体（此处以 CD147-GFP、Annexin A2-DsRed 为例）、阳性对照载体（GFP-DsRed 串联表达）和转染试剂 Lipofectamine 2000，分别按以下 4 个方案混合：
 - A. Donor only: RPMI-1640 100 μ l + Lipofectamine 2000 2 μ l + CD147-GFP 1 μ g
 - B. Acceptor only: RPMI-1640 100 μ l + Lipofectamine 2000 2 μ l + Annexin A2-DsRed 1 μ g
 - C. FRET: RPMI-1640 100 μ l + Lipofectamine 2000 2 μ l + CD147-GFP 0.5 μ g + Annexin A2-DsRed 0.5 μ g
 - D. Positive control: RPMI-1640 100 μ l + Lipofectamine 2000 2 μ l + GFP-DsRed 1 μ g
- 3) 将上述混合液室温孵育 15min，同时吸除 24 孔板中的完全培养基，加入 200 μ l

RPMI-1640 培养基。

- 4) 室温孵育 15min 后, 将上述混合液分别加入 24 孔板中。放入细胞培养箱中, 继续培养。
- 5) 6h 后, 吸除培养基, 加入 500 μ l 完全培养基, 继续培养 18h。
- 6) 消化细胞, 计数 2×10^4 个细胞种于激光共聚焦培养皿的玻璃底面上, 继续培养 16h。
- 7) 更换培养基, 于倒置荧光显微镜下观察荧光蛋白表达情况。
- 8) 设置共聚焦显微镜工作程序如下:
 - A. Donor only: 488nm 激发-515nm 接收 (Dd)、488nm 激发-585nm 接收 (Da)
 - B. Acceptor only: 488nm 激发-515nm 接收 (Dd)、543nm 激发-585nm 接收 (Aa)
- 9) 将上述所得 4 张图片分别输入 NIS-Elements 软件, 计算得到 CoA 和 CoB。
- 10) 保持以上所有参数设置不变, 对阳性对照组和 FRET 组分别进行拍摄, 得到 Dd、Aa 和 Da。
- 11) 将上述三张图片 (Dd、Aa、Da) 分别代入软件, 经过计算、校正后, 得到 FRET 图像。

2.12 表面等离子共振实验

- 1) 将 GLC 芯片平衡至室温, 依次使用 0.5% SDS, 100 mM HCl 以及 50 mM NaOH 预处理芯片, 每种溶液进样 60sec, 流速 25 μ l/min。
- 2) 使用 40mM EDAC 和 10mM Sulfo-NHS 活化芯片, 进样 5min, 流速 25 μ l/min。
- 3) 配制 50 μ g/ml 的 Ligand 蛋白溶液, 缓冲体系为 10mM 醋酸钠, pH 为 5.5, 纵向进样 6min, 流速 25 μ l/min。50 μ g/ml 的 BSA 溶液作为对照采用同样的方法操作。
- 4) 采用 1M 乙醇胺溶液封闭活化的羧基, 纵向进样 3min, 流速 25 μ l/min。
- 5) 采用 PBS 溶液冲洗, 直至基线平稳。
- 6) 倍比稀释 Analyte 蛋白, 缓冲体系为 TBS-T (0.05% Tween-20)。Analyte 蛋白横向进样 3min, 流速 50 μ l/min。TBS-T 溶液作为对照采用同样的方法操作。
- 7) 解离时间设置为 12min。应用 ProteOn Manager 软件、采用朗缪尔模型 (Langmuir Model) 计算结合速率、解离速率。

2.13 统计分析

实验数据以均数±标准差表示，统计学处理采用 GraphPad Prism 5 软件，两个样本均数间差异采用 t 检验，多个样本均数间差异采用方差分析。

3 结果

3.1 CD147 相互作用分子的筛选

已有研究表明，与其它分子相互作用是 CD147 调控肿瘤发生和发展的重要分子机制。为了明确 CD147 调控肿瘤细胞运动过程中的互作分子，我们采用免疫共沉淀的方法富集肝癌细胞系 HuH-7 中 CD147 的互作分子，而后对免疫共沉淀的最终洗脱液应用线性离子阱液质联用质谱进行分析，得到相应的肽序列标签。通过搜索数据库进而得到在 HuH-7 细胞中 CD147 的互作分子。通过比对三次实验结果，我们发现 Annexin A2 很可能是 CD147 在肝癌细胞中的互作分子（表 1）。

表 1 质谱分析所得的 Annexin A2 肽序列标签

Sequence	Protein Accessions	AnxA2 sequence:
SALSGHLETVILGLLK	IPI:IPI00455315.4	MSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKAYT
RAEDGSVIDYELIDQD AR	IPI:IPI00455315.4	NFDAERDALNIETAIKTKGVDEVTIVNILTNR
SALSGHLETVILGLLK	IPI:IPI00455315.4	SNAQRQDIAFAYQRRTKKELASALKSALSGH LETVILGLLKTPAQYDASELKASMKGLGTD
GLGTDEDSLIEIICSR	IPI:IPI00455315.4	EDSLIEIICSR TNQELQEINRVYKEMYKTDLE
AEDGSVIDYELIDQDA R	IPI:IPI00455315.4	KDIISDTSGDFRKL MVALAKGRAEDGSVID YELIDQARDLYDAGVKRKGTDVPKWISIM
GLGTDEDSLIEIICSR	IPI:IPI00455315.4	TERSVPHLQKVFDRYKSYSPYDML SIRKEV
SLYYYIQQDTK	IPI:IPI00455315.4	KGDLENAFLNLVQCIQNKPLYFADRLYDSMK
DALNIETAIK	IPI:IPI00455315.4	GKGTRDKVLIRIMVSRSEVDMLKIRSEFKRK YGKSLYYIQQDTKGDYQKALLYLCGGDD

3.2 CD147 与 Annexin A2 在多种肿瘤细胞中存在共定位

由于质谱结果已经提示，CD147 与 Annexin A2 可能存在相互作用，因此，我们检测了 CD147 与 Annexin A2 在肝癌细胞系 HuH-7、HepG2、SMMC-7721 及肺癌细胞系 A549 中的定位情况。如图 1.1 所示，与之前的研究结果相一致^[152]，CD147 与 Annexin A2 在肝癌细胞系 HuH-7、HepG2、SMMC-7721 及肺癌细胞系 A549 中均存在共定位。基于共定位系数的 Pearson 相关性分析显示（图 1.2），CD147 与 Annexin A2 在细胞内确实存在共定位分布。

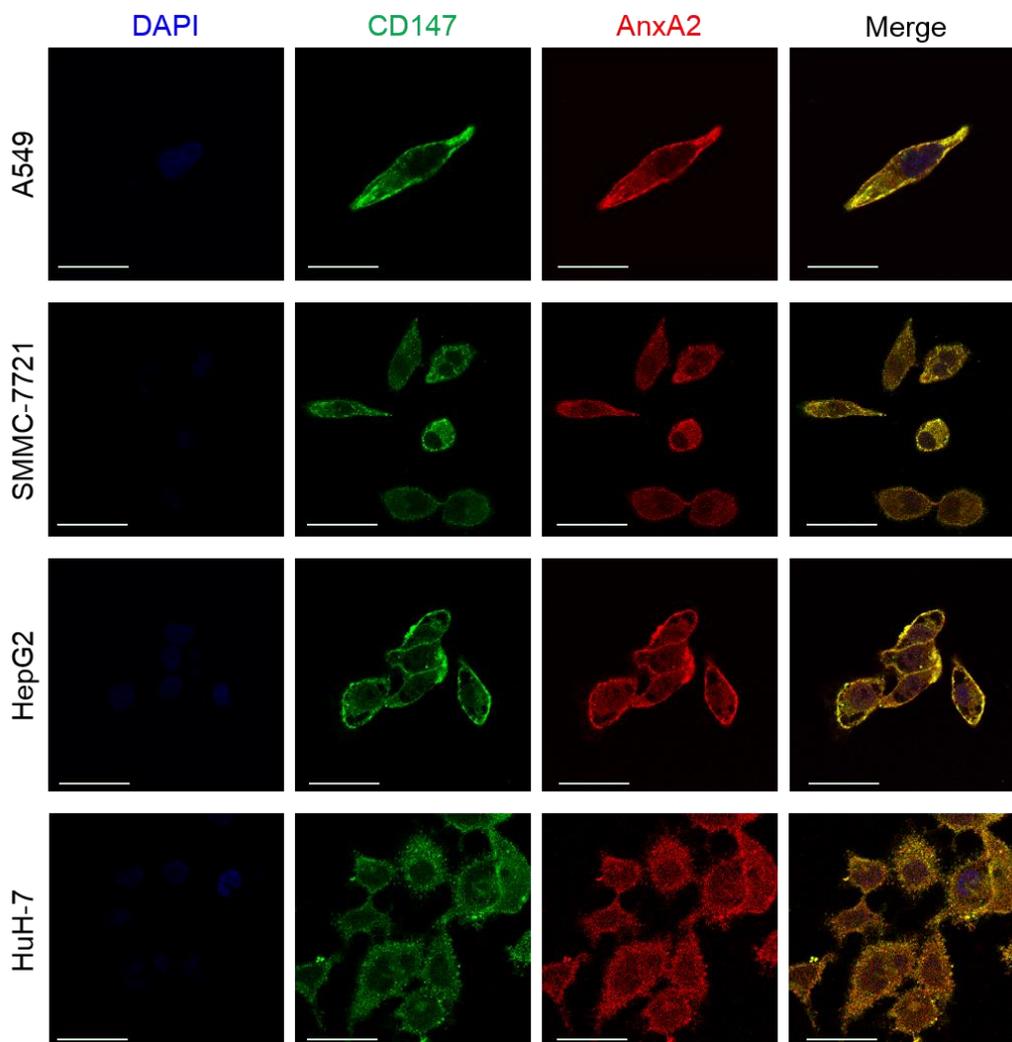


图 1.1 CD147 与 Annexin A2 在多种肿瘤细胞中存在共定位

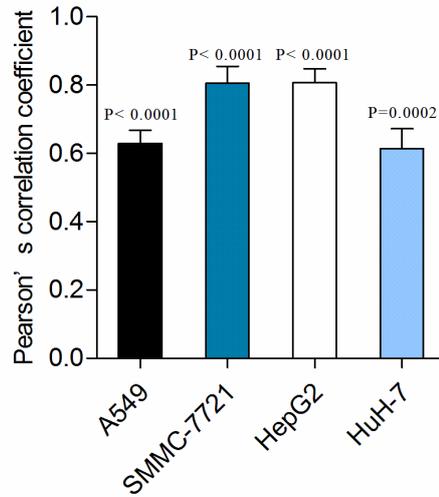


图 1.2 CD147 与 Annexin A2 的共定位分析

3.3 CD147 胞外段能够与 Annexin A2 相互作用

CD147 是一个跨膜蛋白，之前的研究提示 CD147 胞外段能够与多个分子相互作用^[153,154]，因此我们猜测 CD147 与 Annexin A2 的相互作用主要是由其胞外段介导的。首先，我们构建了 CD147 胞外段原核表达载体，表达并纯化了 CD147 胞外段 His 标签融合蛋白。而后采用 His Pull-Down 的方法，检测了 CD147 胞外段蛋白与三株肝癌细胞裂解液中 Annexin A2 的相互作用。结果显示（图 1.3），CD147 胞外段蛋白能够与 Annexin A2 相互作用。同样的，我们构建了 Annexin A2 的原核表达载体，表达并纯化了 Annexin A2 His 标签融合蛋白。而后采用 His Pull-Down 的方法，检测了 Annexin A2 蛋白与三株肝癌细胞裂解液中 CD147 的相互作用，结果显示（图 1.4），Annexin A2 能够与 CD147 相互作用。

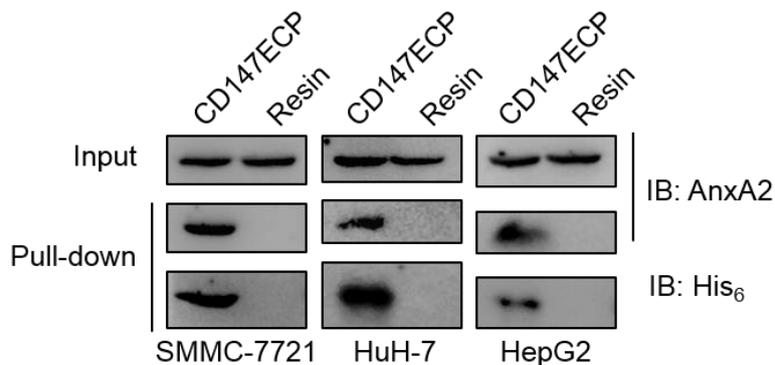


图 1.3 CD147 胞外段蛋白与三株肝癌细胞裂解液中 Annexin A2 的相互作用

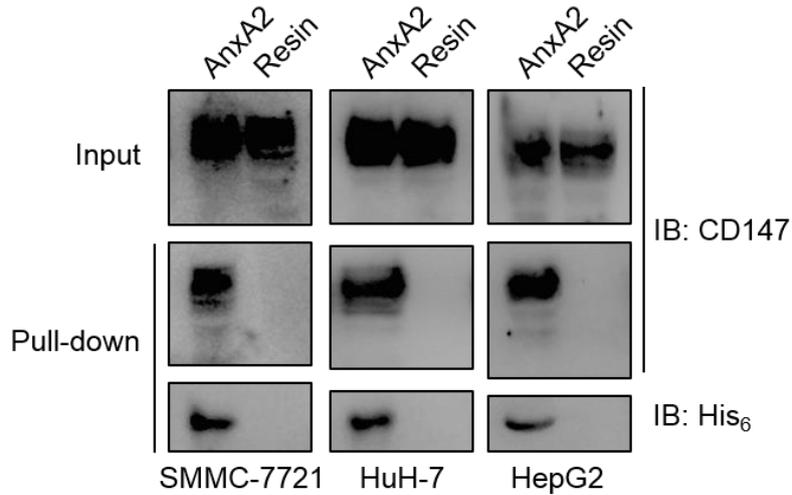


图 1.4 Annexin A2 蛋白与三株肝癌细胞裂解液中 CD147 的相互作用

免疫共沉淀、His Pull-Down 等方法是采用细胞裂解液来检测蛋白质之间的相互作用，由于细胞结构已经被破坏，因此可能会出现假阳性结果，并且难以判断两个分子是否存在直接的相互作用。荧光共振能量转移实验可以检测两个分子在活细胞内的相互作用情况，并且只有当两个分子之间的距离在 1-10nm 范围内时才会发生荧光共振能量转移现象，因此可以很好的解决这两个问题^[155]。适用于荧光共振能量转移实验的荧光蛋白对有 CFP/YFP^[156]、EGFP/DsRed^[157]、CFP/DsRed^[158]等很多种，我们选用 EGFP/DsRed 荧光蛋白对，将 EGFP 与 CD147 融合表达，将 DsRed 与 Annexin A2 融合表达。如图 1.5 A，阴性对照组中，EGFP 蛋白和 DsRed 蛋白在细胞内广泛分布，但没有产生荧光共振能量转移现象。阳性对照组中 EGFP-DsRed 融合蛋白在细胞内弥漫分布，并且产生了广泛的荧光共振能量转移现象（图 1.5 B）。CD147-EGFP 融合蛋白主要分布在细胞膜上，少量分布于细胞浆中；Annexin A2-DsRed 融合蛋白主要分布在细胞膜和细胞浆中，二者在细胞膜和细胞浆中产生了荧光共振能量转移现象（图 1.5 C），这表明 CD147 和 Annexin A2 在活细胞中能够发生直接的相互作用。

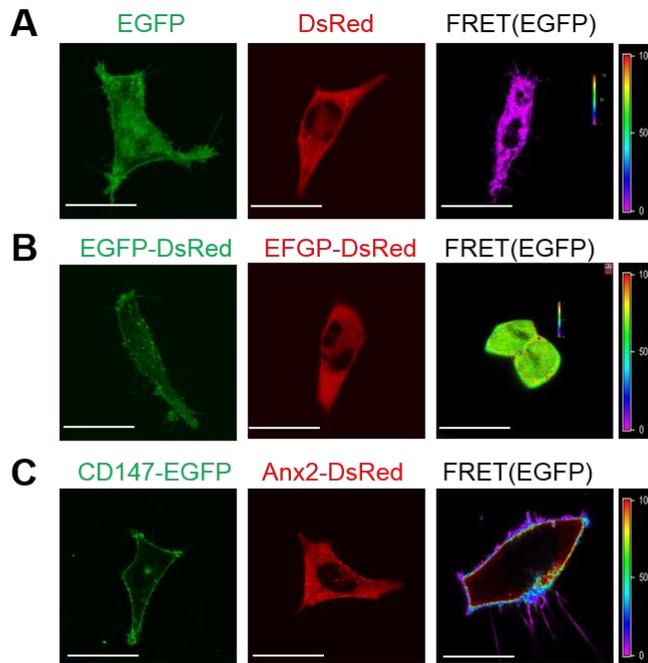


图 1.5 FRET 检测 CD147 与 Annexin A2 在活细胞中的相互作用

由于荧光共振能量转移实验已经表明 CD147 和 Annexin A2 存在直接的相互作用，接下来我们应用基于表面等离子共振技术的蛋白质相互作用工作站，测定了 CD147 和 Annexin A2 相互作用的动力学参数。结果显示（图 1.6），纯化的 CD147 胞外段蛋白和纯化的 Annexin A2 蛋白在缓冲液中能够发生相互作用，其结合速率（ K_a ）为 $2.31 \pm 0.27 \times 10^4$ 1/Ms，解离速率（ K_d ）为 1.14 ± 0.12 1/s。

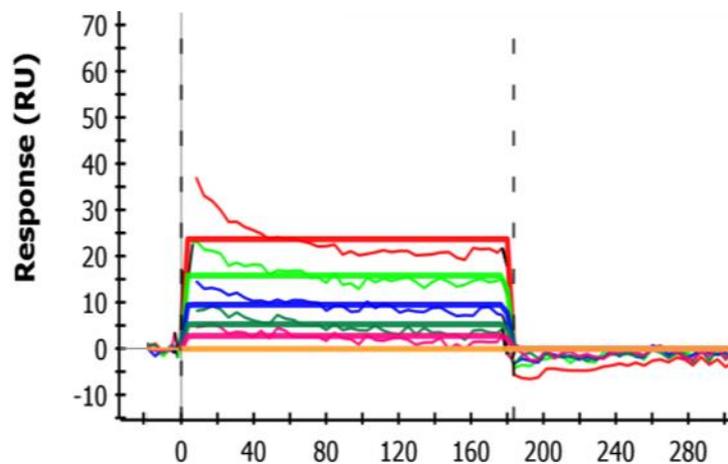


图 1.6 应用 SPR 测定 CD147 和 Annexin A2 相互作用的动力学参数

3.4 CD147 胞外两个 Ig 样结构域均能与 Annexin A2 结合

CD147 胞外段包含两个 Ig 样结构域：N 端的 C2 结构域和靠近细胞膜的 I 结构域。之前的实验已经证实了 CD147 胞外段介导 CD147 与 Annexin A2 的相互作用，我们将 CD147 胞外段进行截短表达，分别构建了 C2-EGFP、I-EGFP、胞外段缺失的 CD147 (Δ ECP-EGFP) 真核表达载体 (图 1.7 A)，荧光共振能量转移实验表明 C2 结构域和 I 结构域都能够结合 Annexin A2，而 CD147 跨膜区和胞内段不能与 Annexin A2 相互作用 (图 1.7 B)。

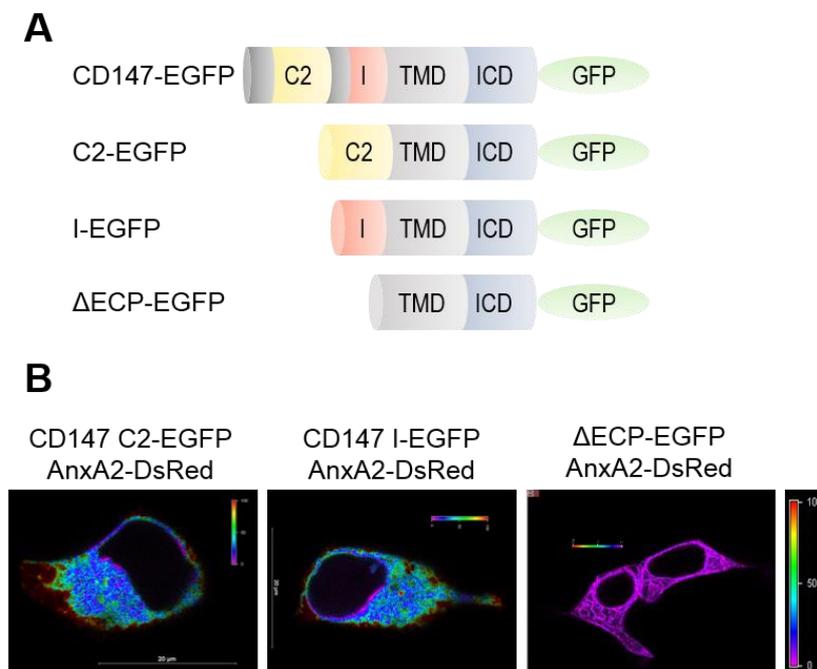


图 1.7 FRET 检测 CD147 C2 结构域、I 结构域与 Annexin A2 的相互作用

而接下来，我们分别表达并纯化了 C2 结构域和 I 结构域 His 标签融合蛋白，SPR 结果 (图 1.8 A-B) 和 His Pull-Down 结果 (图 1.8 C) 均表明 CD147 胞外两个 Ig 样结构域都能够结合 Annexin A2。

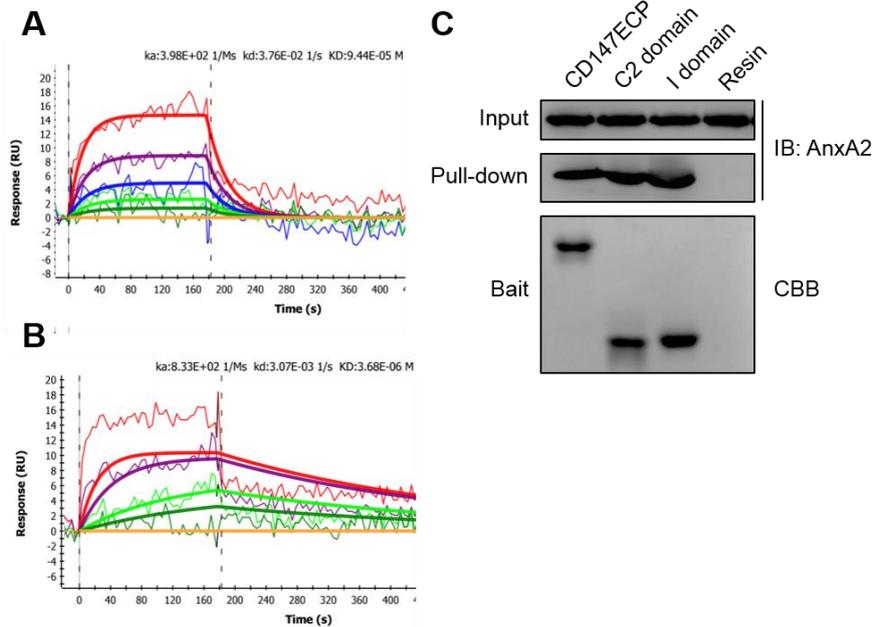


图 1.8 采用 SPR (A-B) 和 His Pull-Down 实验 (C) 检测 CD147 胞外段结构域与 Annexin A2 的相互作用

4 讨论

蛋白质是生命过程的真正执行者，与其它分子相互作用是蛋白质发挥生物学功能的重要分子机制。既往的研究表明，CD147 可以和多个分子相互作用，在炎症、肿瘤等多个生理、病理过程中发挥重要功能。本实验室及其他实验室的研究都提示，CD147 参与调控肿瘤细胞运动^[159-162]、能够调节黏着斑和细胞伪足的形成^[127,130,163,164]，并且参与调控肿瘤细胞运动形式的转换^[8]。

本课题的第一部分是要通过免疫共沉淀-质谱联用的方法寻找 CD147 调控肿瘤细胞运动过程中的互作分子。质谱数据提示 Annexin A2 很可能是 CD147 的互作分子，并且该结果具有很好的重复性。此外，质谱数据也提示 CD147 可能还存在其它的互作分子，这需要进一步的研究验证。本课题聚焦 CD147 与 Annexin A2 的相互作用，其它潜在的互作分子以及相关功能的研究暂不列入本课题的研究范畴。

本实验室之前的研究发现，CD147 和 Annexin A2 在调控肿瘤细胞运动形式转换中存在共定位和共沉淀^[8]，但是二者是否存在直接的相互作用，以及参与相互作用的结构域仍有待明确。本研究通过激光共聚焦显微镜共定位分析，发现 CD147 和 Annexin A2 在肝癌、肺癌细胞中都存在共定位，这与之前在肝癌细胞中的研究结果

一致，并且提示 CD147 和 Annexin A2 的相互作用在包括肝癌、肺癌在内的多种肿瘤组织中可能都存在。进一步的分析发现，CD147 和 Annexin A2 在活细胞内存在直接的相互作用，并且二者相互作用的动力学参数也符合蛋白质弱相互作用的一般规律^[165]。由于 CD147 和 Annexin A2 都包含多个结构域，本课题采用截短表达的方法进一步明确了介导二者相互作用的结构域，研究发现 CD147 的两个胞外结构域都能与 Annexin A2 结合。由于 Annexin A2 的 N 端结构域存在磷酸化位点，这提示 CD147 与 Annexin A2 N 端结构域的结合可能会影响激酶对 Annexin A2 的磷酸化，进而调控肿瘤细胞运动。此外，本课题建立了 Annexin A2 的可溶性原核表达方法和纯化策略，这为后续的 CD147-Annexin A2 复合物的结构解析创造了条件。

第二部分 CD147 调控 Annexin A2 磷酸化的分子机制研究

蛋白质翻译后修饰是调节蛋白质功能的关键步骤之一，是细胞内信号调控网络的重要节点。磷酸化修饰是蛋白质最重要、也是最常见的翻译后修饰之一，是一种普遍存在的生命活动调节方式，在信号转导过程中发挥重要作用^[166]。Annexin A2 最早被发现是作为 v-Src 的主要底物，其磷酸化位点是 23 位的酪氨酸（Tyr23）残基^[143,167,168]。Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化修饰参与细胞运动调控和细胞骨架重排。作为 Src 的经典底物，c-Src 能够磷酸化 Annexin A2^[169]；并且 CD147 能够促进 c-Src Tyr416 的磷酸化，上调 c-Src 的活性^[170,171]，这就提示 CD147 可能通过上调 c-Src 活性进而促进 Annexin A2 的磷酸化。然而，赵蒲等人的工作发现 CD147 的表达水平与 Annexin A2 的磷酸化水平呈负相关^[8]，那么 CD147 是如何负向调控 Annexin A2 磷酸化的？这些看似矛盾的研究发现背后隐藏着怎样的分子机制呢？本课题第二部分将着重探讨 CD147 调控 Annexin A2 磷酸化的分子机制。

1 材料

1.1 细胞系

人肝癌细胞系 SMMC-7721，源自中科院生化细胞所细胞库。人肝癌细胞系 HuH-7，源自日本 JCRB（Japanese Collection of Research Bioresources）细胞库。敲除 CD147 的 SMMC-7721 细胞系（K7721）系本实验室构建^[172]。

1.2 主要仪器设备

超净台（吴江市净化设备总厂）

CO₂ 细胞培养箱（Thermo Fisher）

细胞培养离心机（Eppendorf）

倒置显微镜（Olympus）

恒温水浴箱（北京市医疗设备总厂）

制冰机 (SANYO)
恒温摇床 (上海天呈实验仪器制造有限公司)
高速低温离心机 (Sigma)
Image Station 4000MM 化学发光成像系统 (KODAK)
移液器 (Eppendorf)
超声波细胞破碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)
立式超低温冰箱 (Thermo Fisher)
电泳槽和电泳仪 (Bio-Rad)
AKTA 蛋白质层析纯化系统 (GE)
NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher)
DELTA 320 pH 计 (METTLER TOLEDO)
分光光度计 (Perkin Elmer)
电子天平 (Sartorius AG)
超纯水机 (Millipore)

1.3 主要试剂和耗材

IPTG (Merck)
PMSF (杭州华安生物技术有限公司)
氨苄霉素 (北京鼎国生物技术有限公司)
卡那霉素 (北京鼎国生物技术有限公司)
四环素 (北京鼎国生物技术有限公司)
HisTrap 蛋白纯化预装柱 (GE)
Superdex 75 凝胶柱 (GE)
PD-10 脱盐柱 (GE)
超滤离心管 (Millipore)
青链霉素 (Sigma)
胎牛血清 (浙江天杭生物技术有限公司)
RPMI-1640 培养基 (Sigma)
DMEM 培养基 (Sigma)

Src 抑制剂 Src I-1 (Sigma)
Src 蛋白 (Millipore)
siRNA (上海吉玛制药技术有限公司)
DTT (TAKARA)
ATP (NEB)
胰酶细胞消化液 (Sigma)
RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司)
磷酸酶抑制剂 Cocktail (Roche)
BCA 蛋白定量分析试剂盒 (Pierce)
预染彩虹蛋白 Marker (NEB)
PVDF 膜 (Millipore)
BeyoECL Plus 荧光检测试剂 (上海碧云天生物技术有限公司)
质粒提取试剂盒 (Omega Bio-Tek)
PCR 产物回收试剂盒 (Omega Bio-Tek)
DNA 切胶回收试剂盒 (Omega Bio-Tek)
TRIzol (Invitrogen)
primeSTAR 高保真 DNA 聚合酶 (TaKaRa)
PrimeScript 反转录试剂盒 (TaKaRa)
QuikChange 定点突变试剂盒 (Stratagene)
DNA 限制性内切酶、连接酶 (NEB)
 β -巯基乙醇 (Sigma)
HistostainTM-Plus Kits 免疫组织化学染色试剂盒 (Invitrogen)
普通化学试剂 (Sigma)
抗 His 标签抗体 (北京康为世纪生物科技有限公司)
抗人 CD147 抗体 (本实验室制备)
抗人 CD147 抗体 (Santa Cruz)
抗人 Annexin A2 抗体 (Santa Cruz)
抗人 p-Annexin A2 抗体 (Santa Cruz)
抗人 Tubulin 抗体 (本实验室制备)

抗人 Src 抗体 (CST)
抗人 p-Src 抗体 (CST)
HRP 标记羊抗鼠二抗
Lipofectamine 2000 转染试剂 (Invitrogen)
引物 (华大基因)
细胞培养板 (Corning)
Countess 细胞计数板 (Invitrogen)

1.4 主要缓冲液

10×体外激酶实验缓冲液

HEPES 11.915g

MgCl₂ 6H₂O 1.016g

NaCl 8.766g

加入 80ml 去离子水, 搅拌充分溶解后, 调 pH 为 7.8, 定容至 100ml。

0.01M 柠檬酸钠缓冲液

柠檬酸三钠 3g

柠檬酸 0.4g

加入 800ml 去离子水, 搅拌充分溶解后, 调 pH 为 6.0, 定容至 1L。

其余缓冲液同前。

2 方法

2.1 细胞培养

细胞培养方法同前。

2.2 细胞总 RNA 提取

- 1) 消化对数生长期细胞, 种于六孔板, 5×10^5 个细胞/孔, 继续培养 12h。
- 2) 吸除培养基, 每孔加入 1ml TRIzol, 用 1ml 移液器反复吹打至液体澄清, 而后移至 1.5ml EP 管中, 室温放置 5min。预冷离心机至 4℃ 备用。
- 3) 每 1ml TRIzol 加入 0.2ml 氯仿。振荡 15sec, 使其充分混匀。室温放置 2min。
- 4) 4℃, 12000g 离心 15min。

- 5) 离心后混合物分为三层：上层为无色的水样层（RNA 存在于上层）；膜状的中间层（DNA 存在于中间层）；下层为粉红色的苯酚-氯仿层（蛋白存在于下层）。小心吸取 80% 体积的上层液体（约 400 μ l）至 1.5ml EP 管中。
- 6) 加入等体积的异丙醇（约 400 μ l），振荡混匀，室温放置 10min。
- 7) 4 $^{\circ}$ C，12000g 离心 10min。
- 8) 管底可见白色沉淀，小心吸除上清，加入 1ml 冰预冷的 75% 乙醇（用 DEPC 水配制）。振荡混匀。
- 9) 4 $^{\circ}$ C，7500g 离心 5min。
- 10) 小心吸除上清，开盖室温放置 10min。
- 11) 加入 100 μ l DEPC 水，55 $^{\circ}$ C 孵育 5min 使其充分溶解。
- 12) 应用 NanoDrop2000 定量。-80 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 反转录

1) 反应体系

5 \times PrimeScript Buffer	4 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μ l
Oligo dT Primer (50 μ M)	1 μ l
Random 6 mers (100 μ M)	1 μ l
total RNA	1 μ g
RNase Free dH ₂ O	补至 20 μ l

2) 反应条件

37 $^{\circ}$ C	30min
85 $^{\circ}$ C	5sec
4 $^{\circ}$ C	∞

2.4 Src 真核表达载体的构建

1) 引物设计

Forward: 5'-AGAATTCATGGGTAGCAACAAGAGCAAGCCCAAG-3'

Reverse: 5'-ATACTCGAGCTAGAGGTTCTCCCCGGGCT-3'

下划线为酶切位点，GAATTC-EcoR I，CTCGAG-Xho I

2) 采用 primeSTAR 高保真酶，扩增 Src 编码区，反应体系如下

Template	1μl
Primer-F	1μl
Primer-R	1μl
5×buffer	10μl
dNTP	4μl
Double-distilled H ₂ O	32.5μl
primeSTAR	0.5μl

PCR 反应条件设置如下

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	98℃	30sec
2	30	98℃	10sec
		60℃	10sec
		72℃	2min
3	1	72℃	5min
4	1	4℃	∞

- 3) 切胶回收 PCR 产物。
- 4) EcoR I / Xho I 双酶切 PCR 产物及载体 pcDNA3.1(+), 切胶回收酶切产物。
- 5) 采用 T4 DNA 连接酶连接 DNA 片段和载体。连接反应中，片段：载体=5：1（摩尔比）。
- 6) 转化 DH5α 感受态细菌，涂布 Amp⁺琼脂糖平板，37℃培养过夜。
- 7) 随机挑取克隆培养过夜，菌液 PCR 鉴定，鉴定结果正确者送测序。

2.5 Src 突变体 SrcY530F 真核表达载体的构建

1) 引物设计

Forward: 5'-CCACCGAGCCCCAGTTCCAGCCCCG-3'

Reverse: 5'-CGGGCTGGAAGTGGGGCTCGGTGG-3'

2) 反应体系

10×QuikChange reaction buffer	1.25μl
ddH ₂ O	8.5μl
QuikSolution	0.25μl
Src-pcDNA3.1	0.5μl
Primer-F	0.5μl
Primer-R	0.5μl
dNTP mix	0.5μl
QuikChange enzyme	0.5μl

反应条件设置如下

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95℃	30sec
2	30	95℃	30sec
		55℃	1min
		65℃	7min
3	1	4℃	∞

- 3) 反应完毕后，在反应体系中加入 0.5μl Dpn I 内切酶，37℃反应 5min。
- 4) 转化 DH5α 感受态细菌，涂布 Amp⁺琼脂糖平板，37℃培养过夜。
- 5) 随机挑取克隆培养过夜，送测序。

2.6 siRNA 干涉

- 1) CD147 siRNA 序列^[131,173]:

5'-GUUCUUCGUGAGUCCUCtt-3'

3'-dTdTCAAGAAGCACUCAAGGAG-5'

Control siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司提供。

每 OD siRNA 加入 125μl DEPC 水稀释，-20℃保存备用。

- 2) 消化对数生长期细胞，种于六孔板，5×10⁵ 个细胞/孔，继续培养 12h。
- 3) 取 siRNA、RPMI-1640 培养基、Lipofectamine 2000，按以下比例混合：
RPMI-1640 培养基 500μl

siRNA 5 μ l

Lipofectamine 2000 10 μ l

轻轻混匀后，室温孵育 15min。

- 4) 取出六孔板，吸除培养基，加入 1ml RPMI-1640 培养基。逐滴加入转染混合液，轻轻摇匀。继续培养 6h。
- 5) 吸除培养基，加入 2.5ml 完全培养基，继续培养 42h。

2.7 体外激酶实验

1) 反应体系

10 \times 体外激酶实验缓冲液	2 μ l
10mM ATP	2 μ l
10mM DTT	2 μ l
100mM 正钒酸钠	0.2 μ l
Src 激酶蛋白	0~60ng
Annexin A2 蛋白	1 μ g
去离子水	体积补至 20 μ l

2) 反应条件

30 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

- 3) 反应结束后，加入 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液结束反应。

2.8 免疫组织化学染色

1) 烤片

将石蜡切片在 60 $^{\circ}$ C 恒温箱中烘烤过夜。

2) 脱蜡

将石蜡切片在二甲苯中浸泡 15min;

更换二甲苯，浸泡 15min;

更换二甲苯，浸泡 15min。

3) 水化

将石蜡切片在 100% 乙醇中浸泡 5min;

更换 100% 乙醇，浸泡 5min;

更换 95%乙醇, 浸泡 5min;

更换 95%乙醇, 浸泡 5min;

更换 90%乙醇, 浸泡 2min;

更换 90%乙醇, 浸泡 2min;

更换 80%乙醇, 浸泡 2min;

更换 80%乙醇, 浸泡 2min;

更换 70%乙醇, 浸泡 2min;

更换 70%乙醇, 浸泡 2min;

更换去离子水, 浸泡 2min;

更换去离子水, 浸泡 2min。

4) 修复

将石蜡切片置于高压锅中, 加入柠檬酸-柠檬酸钠修复缓冲液, 加热至沸腾。待压力锅上汽后持续 2min。

5) 阻断内源性过氧化物酶

待修复液自然冷却至室温后, 滴加 3% H_2O_2 (30% H_2O_2 : 80% CH_3OH : dd H_2O = 1: 8: 1), 室温孵育 10min。

6) 封闭非特异性位点

A. 用去离子水洗 3min;

B. 用 PBS 洗两次, 每次 3min;

C. 滴加动物血清, 室温孵育 20min。

7) 滴加一抗, 室温孵育 120min。

8) 用 PBS 洗三次, 每次 5min。

9) 滴加二抗, 室温孵育 40min。

10) 用 PBS 洗三次, 每次 5min。

11) 加入 50 μ l DAB 工作液, 观察显色情况 (1-10min), 适时自来水冲洗。

12) 苏木精复染 3-10min, 之后用 1%盐酸/75%乙醇浸泡片刻。

13) 流水冲洗后, 依次经 70%、85%、95%、100%乙醇脱水, 各浓度分别作用 3min; 之后用二甲苯浸泡, 作用两次, 每次 5min。

14) 封片。

2.9 统计分析

实验数据以均数±标准差表示，统计学处理采用 GraphPad Prism 5 软件，两个样本均数间差异采用 t 检验，多个样本均数间差异采用方差分析。

3 结果

3.1 Src 促进 Annexin A2 磷酸化

Annexin A2 是 Src 激酶的经典底物，首先我们验证了在肿瘤细胞系中 Src 对 Annexin A2 磷酸化水平的影响。如图 2.1 A 所示，加入 Src 激酶特异性的抑制剂 Src I-1 处理后，Src 激酶活性水平显著下调，Annexin A2 的磷酸化水平显著低于溶剂对照组，表明在肿瘤细胞中 Src 激酶能够磷酸化 Annexin A2，Src 激酶活性水平直接决定 Annexin A2 的磷酸化水平。接着我们检测了 CD147 表达水平对 Annexin A2 磷酸化水平的影响。用 siRNA 干涉 CD147 后，CD147 的表达水平和 Src 的磷酸化水平显著下调，而 Annexin A2 的磷酸化水平显著上调（图 2.1 B）。这表明 CD147 能够正向调控 Src 激酶的活性水平，而 CD147 表达水平与 Annexin A2 的磷酸化水平呈负相关，这和既往的研究结果一致。

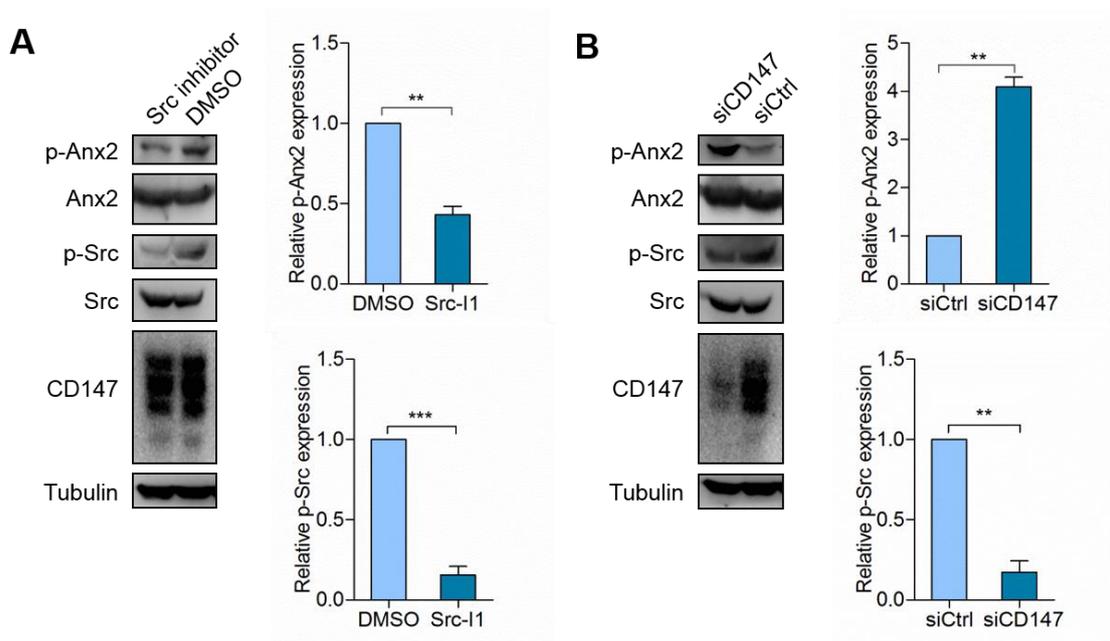


图 2.1 Src I-1 处理 (A)、干涉 CD147 (B) 对 Annexin A2 磷酸化的影响

3.2 CD147 能够抑制 Src 激酶对 Annexin A2 的磷酸化

而后，我们构建了 Src 激酶、Src 激酶活性突变体 SrcY530F 及 CD147 的真核表达载体，将其单独转染或共转染肝癌细胞。结果发现与对照组相比，过表达 Src 或 SrcY530F 都会引起 Annexin A2 的磷酸化水平上调，其中过表达 SrcY530F 组上调幅度最高；过表达 CD147 后 Annexin A2 磷酸化水平下调。而当 Src 或 SrcY530F 与 CD147 共转染时，与单转染组相比，Annexin A2 的磷酸化水平有所下调，这就提示 CD147 能够抑制 Src 激酶对 Annexin A2 的磷酸化。

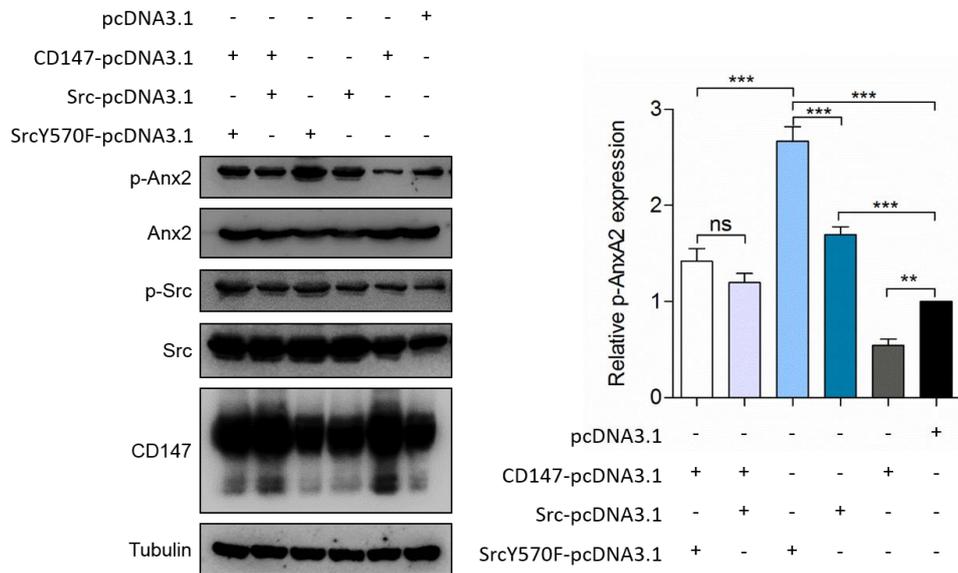


图 2.2 CD147 抑制 Src 对 Annexin A2 的磷酸化

胰岛素可以激活细胞内酪氨酸激酶。用胰岛素分别处理肝癌细胞 SMMC-7721、敲除 CD147 的 SMMC-7721 细胞 (K7721)。结果如图 2.3 所示，胰岛素处理可引起 Src 激酶活性水平升高，并且 SMMC-7721 细胞中 Src 激酶活性水平要高于 K7721。胰岛素处理也引起 Annexin A2 磷酸化水平显著升高，并且 K7721 中 Annexin A2 磷酸化水平升高幅度要显著高于 SMMC-7721 细胞，这些结果提示 CD147 能够部分抑制胰岛素活化的酪氨酸激酶对 Annexin A2 的磷酸化。

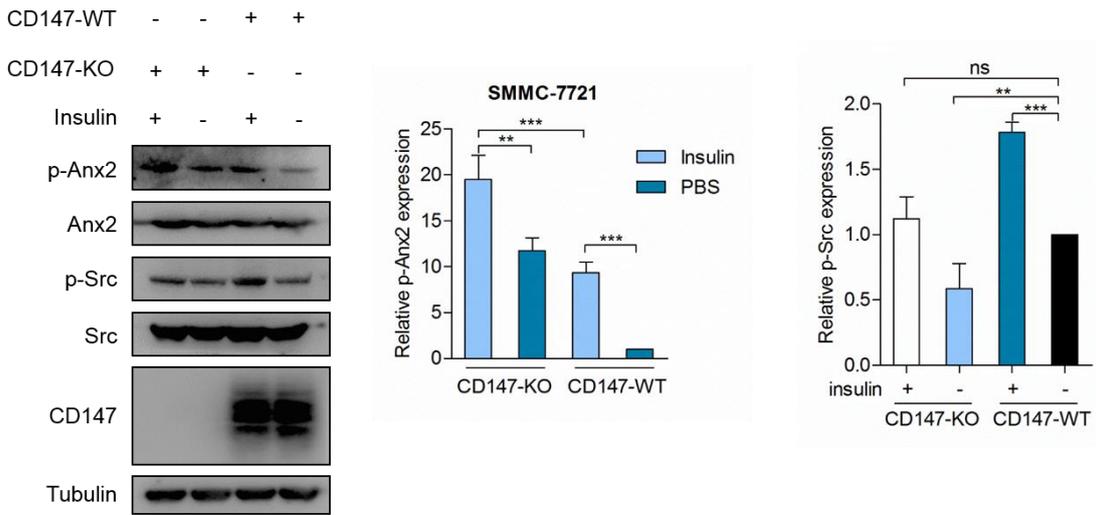


图 2.3 CD147 能够部分抑制胰岛素活化的酪氨酸激酶对 Annexin A2 的磷酸化

以上结果证实,CD147 表达水平与 Annexin A2 的磷酸化水平呈负相关,且 CD147 能够抑制酪氨酸激酶对 Annexin A2 的磷酸化。接下来,我们检测了肝癌组织样本中 CD147 和 Annexin A2 的磷酸化水平(图 2.4)。结果如表 2.1 所示,在 24 例肝癌组织中 CD147 的阳性率为 83.3% (20/24), p-Annexin A2 的阳性率为 12.5% (3/24), 卡方检验 $p=0.002$, Pearson 相关系数 $R=-0.845$ 。

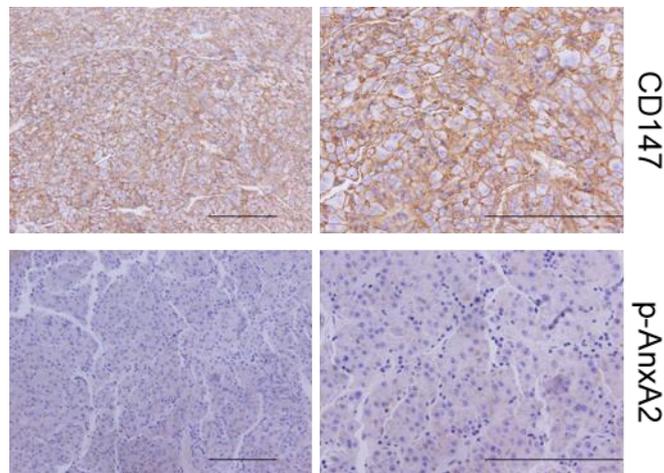


图 2.4 肝癌组织 CD147、p-Annexin A2 免疫组织化学染色

Table 2.1 IHC staining for CD147 and p-Annexin A2 of human liver cancers

IHC staining	CD147 ⁻	CD147 ⁺
p-Annexin A2 ⁻	1	20
p-Annexin A2 ⁺	3	0
Total	4	20

3.3 CD147 与 Annexin A2 相互作用抑制 Src 激酶对 Annexin A2 的磷酸化

第一部分实验证实 CD147 可以结合 Annexin A2 的 N 端结构域, 而 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化位点也位于 N 端结构域, 那么我们猜测 CD147 是否通过结合 Annexin A2 的 N 端结构域进而抑制 Src 激酶对 Annexin A2 的磷酸化。为了排除细胞内其它因素如激酶、磷酸酶及相关分子的影响, 我们建立了体外激酶反应体系。当 Src 激酶为 60ng, 底物 Annexin A2 为 1 μ g, 反应 1h 时, p-Annexin A2 有明显的条带, 因此在后续的实验中选择这个反应条件(图 2.5 A)。接着, 我们在上述实验体系中加入 CD147 胞外段纯蛋白, 随着 CD147 胞外段纯蛋白的加入量增加, p-Annexin A2 的量减少(图 2.5 B), 这证明 CD147 能够抑制 Src 对 Annexin A2 的磷酸化。由于我们已经证明 CD147 胞外段的两个结构域都可以和 Annexin A2 结合, 那么究竟是哪一个结构域介导了 CD147 对 Annexin A2 磷酸化的抑制作用? 我们分别表达并纯化了 CD147 胞外段的两个结构域(图 2.5 C), 将 CD147 胞外段蛋白、C2 结构域蛋白、I 结构域蛋白分别加入到反应体系中, 我们发现与加入 CD147 胞外段蛋白相比, 加入 I 结构域蛋白有 50% 的降低, 而加入 C2 结构域蛋白则没有降低(图 2.5 D), 这提示 CD147 胞外段的 I 结构域介导了其对 Annexin A2 磷酸化的抑制作用。那么 CD147 的 I 结构域和 Annexin A2 的 N 端结构域之间是否存在直接的相互作用呢? 采用 FRET 实验, 我们发现在活细胞中 CD147 的 I 结构域和 Annexin A2 的 N 端结构域之间存在直接的相互作用(图 2.6 A), 而 CD147 的 C2 结构域不能结合 Annexin A2 的 N 端结构域(图 2.6 B)。结合体外激酶实验结果, 这就提示 I 结构域对于 CD147 负向调控 Annexin A2 酪氨酸磷酸化是必需的, 但是 C2 结构域在这个过程中也发挥了一定的作用。

既往的研究发现, Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化能够抑制 Annexin A2 与 F-actin 的

结合^[174]。本研究发现 CD147 能够抑制 Annexin A2 的磷酸化, 那么 CD147 是否也会影响 Annexin A2 与 F-actin 的结合呢? 如图 2.7 所示, 在肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞中 Annexin A2 能够与 F-actin 共沉淀, 但在敲除 CD147 的 K7721 细胞中 Annexin A2 与 F-actin 的结合能力降低, 提示非磷酸化的 Annexin A2 与 F-actin 的结合能力更强, 并且 CD147 能够促进 Annexin A2 与 F-actin 的结合。

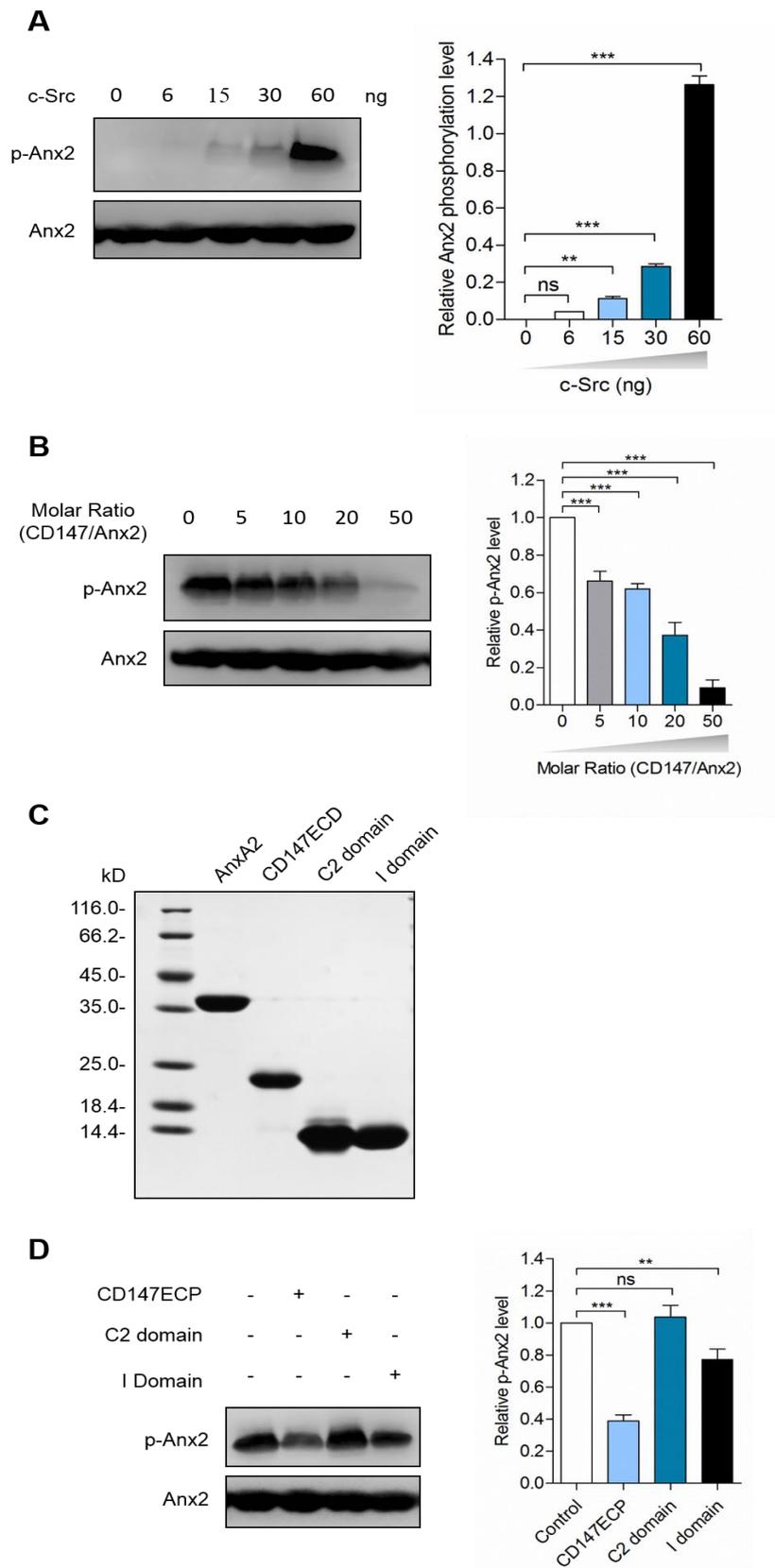


图 2.5 CD147 结合 Annexin A2 的 N 端结构域

抑制 Src 激酶对 Annexin A2 的磷酸化

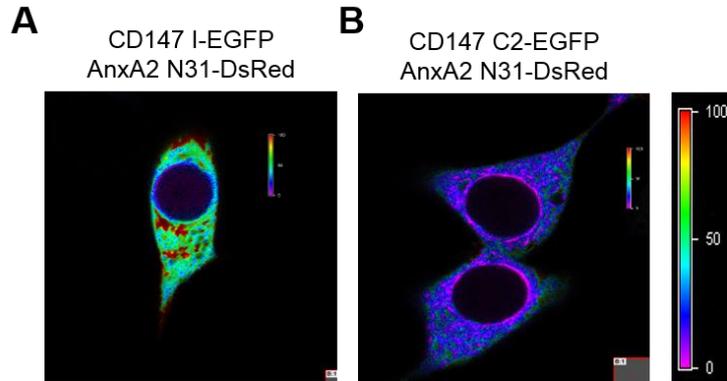


图 2.6 FRET 分析 CD147 胞外结构域与 Annexin A2 N 端结构域的相互作用

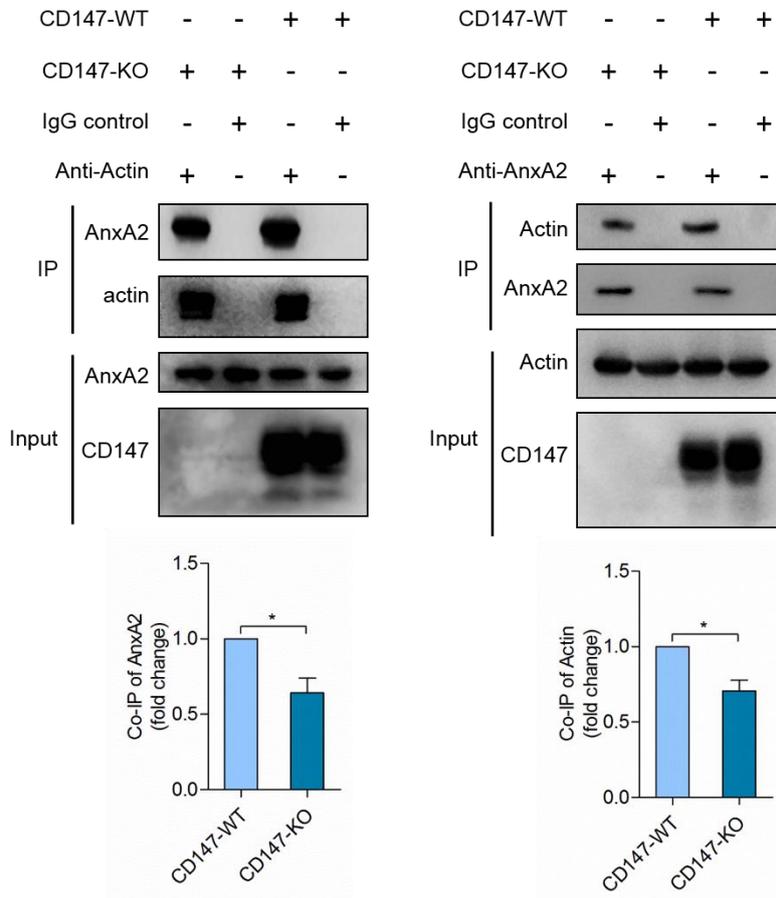


图 2.7 CD147 促进 Annexin A2 与 F-actin 的结合

4 讨论

Annexin A2 是作为 v-Src 的主要底物被发现的^[175]。Annexin A2 的 N 端结构域含

有多个磷酸化位点。Ser25 能被 PKC 磷酸化^[176]。Ser11 能被 PKA 磷酸化，Ser11 磷酸化能促进假性血友病因子释放，钙调神经磷酸酶样磷酸酶（calcineurin-like phosphatase）能使其去磷酸化^[177]。Tyr23 能被 Src 激酶磷酸化^[143]，Hubaishy 等人研究发现，Tyr23 磷酸化能抑制 Annexin A2 与 F-actin 的结合，提示 Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化可能负向调控 Annexin A2 的功能，非磷酸化的 Annexin A2 可能是其活性形式^[174]。之后的研究发现，Tyr23 磷酸化在调控 cofilin 依赖的肌动蛋白稳态中发挥关键作用^[150]。我们的研究发现，CD147 的 I 结构域能直接结合 Annexin A2 的 N 端结构域，体外激酶实验证实 CD147 胞外段蛋白或 I 结构域蛋白能够抑制 Src 激酶对 Annexin A2 的磷酸化，这就提示 CD147 对 Annexin A2 磷酸化的负向调控可能是通过 I 结构域直接结合 Annexin A2 的 N 端结构域来实现的。

蛋白质酪氨酸的可逆磷酸化修饰是真核生物的一种重要的分子调控机制。蛋白酪氨酸磷酸酶（protein tyrosine phosphatase, PTP）与蛋白酪氨酸激酶（protein tyrosine kinase, PTK）共同维持着蛋白酪氨酸磷酸化修饰的动态平衡。本课题前期发现在肿瘤细胞系及肿瘤组织样本中 CD147 表达水平与 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化水平呈负相关，并且 CD147 能够负向调控 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化。考虑到 CD147 既非蛋白酪氨酸激酶也非蛋白酪氨酸磷酸酶，那么 CD147 可能通过抑制到蛋白酪氨酸激酶的活性或者抑制蛋白酪氨酸激酶与底物（Annexin A2）的结合，进而抑制 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化；CD147 也可能通过提高蛋白酪氨酸磷酸酶的活性或者促进蛋白酪氨酸磷酸酶与 Annexin A2 的结合，进而促进 Annexin A2 的酪氨酸去磷酸化，降低 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化水平。Annexin A2 是 Src 激酶的经典底物，而 CD147 能上调 Src 激酶活性，因此 CD147 不大可能通过抑制蛋白酪氨酸激酶活性进而抑制 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化。我们发现 CD147 能够结合 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化位点所在的 N 端结构域，并且体外激酶实验也证实 Src 激酶能磷酸化 Annexin A2，而 CD147 能抑制 Src 激酶对 Annexin A2 的磷酸化，这就提示 CD147 很可能通过抑制 Src 与 Annexin A2 的结合，进而抑制 Annexin A2 的酪氨酸磷酸化。但是由于目前这一推论仍缺少直接的实验证据，因此解析 CD147-Annexin A2 复合物的结构、建立 Src、Annexin A2、CD147 的互作模型将有助于阐明这一问题。蛋白酪氨酸磷酸酶在蛋白质的酪氨酸去磷酸化调控中发挥举足轻重的作用，因此寻找受 CD147 正向调控的蛋白酪氨酸磷酸酶也可能是阐明这一问题的另一途径。

第三部分 p-Annexin A2 调控肿瘤细胞运动的 分子机制研究

Rho 家族小 G 蛋白在细胞运动过程中发挥重要作用，是细胞运动调控的关键节点分子。其功能状态主要包括结合 GTP 的活性形式和结合 GDP 的失活形式。而 Rho 家族小 G 蛋白的功能状态主要受 GEF 和 GAP 的调控。细胞突起如片状伪足等是细胞运动的重要结构基础。之前的研究发现 Annexin A2 的磷酸化参与调控肿瘤细胞肌动蛋白骨架重排、细胞突起形成及细胞运动。进一步研究指出 Annexin A2 磷酸化与 RhoA 活性呈正相关并参与调控肿瘤细胞运动形式的转换，但是 Annexin A2 磷酸化究竟是如何调控肌动蛋白骨架重排、细胞突起形成及细胞运动的仍不清楚。本课题第三部分将着重研究 p-Annexin A2 调控 GEF 及细胞突起的分子机制，以期阐明 CD147 通过调控 Annexin A2 磷酸化，进而调控肿瘤细胞运动的分子机制。

1 材料

1.1 细胞系

人肝癌细胞系 SMMC-7721 源自中科院生化细胞所细胞库；人肝癌细胞系 HuH-7，源自日本 JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) 细胞库；人肝癌细胞系 HepG2、人结肠癌细胞系 HCT-8，源自美国 ATCC (American Type Culture Collection) 细胞库。敲除 CD147 的 SMMC-7721 细胞系(K7721)系本实验室构建^[178]。敲除 CD147 的 HuH-7 细胞系 (K-HuH-7)、HCT-8 细胞系 (K-HCT-8) 由我室委托北京百奥赛图基因生物技术有限公司构建。以下细胞系均由我室构建：HuH-7 shA2 为稳定干涉 Annexin A2 的 HuH-7 细胞系；HuH-7 shA2+GFP 为表达 EGFP 的 HuH-7 shA2 细胞系；HuH-7 shA2+WT 为回复表达野生型 Annexin A2-EGFP 的 HuH-7 shA2 细胞系；HuH-7 shA2+T1 为回复表达突变体 Annexin A2 Y23F-EGFP 的 HuH-7 shA2 细胞系；HuH-7 shA2+T2 为回复表达突变体 Annexin A2 Y23E-EGFP 的 HuH-7 shA2 细胞系。

1.2 实验动物

BALB/c-nu 裸鼠由第四军医大学实验动物中心提供。

1.3 主要仪器设备

超净台（吴江市净化设备总厂）

CO₂ 细胞培养箱（Thermo Fisher）

细胞培养离心机（Eppendorf）

倒置显微镜（Olympus）

恒温水浴箱（北京市医疗设备总厂）

制冰机（SANYO）

脱色摇床（其林贝尔仪器制造有限公司）

Gel Doc™ EZ 凝胶成像系统（Bio-Rad）

实时荧光定量 PCR 仪（Agilent）

普通 PCR 仪（Bio-Rad）

高速低温离心机（Sigma）

A1 激光共聚焦显微镜（Nikon）

倒置荧光显微镜（Olympus）

Image Station 4000MM 化学发光成像系统（KODAK）

移液器（Eppendorf）

立式超低温冰箱（Thermo Fisher）

电泳槽和电泳仪（Bio-Rad）

NanoDrop 2000 超微量分光光度计（Thermo Fisher）

DELTA 320 pH 计（METTLER TOLEDO）

分光光度计（Perkin Elmer）

电子天平（Sartorius AG）

超纯水机（Millipore）

1.4 主要试剂和耗材

PMSF（杭州华安生物技术有限公司）

氨苄霉素（北京鼎国生物技术有限公司）

卡那霉素（北京鼎国生物技术有限公司）
青链霉素（Sigma）
胎牛血清（浙江天杭生物科技有限公司）
RPMI-1640 培养基（Sigma）
DMEM 培养基（Sigma）
胰酶细胞消化液（Sigma）
RIPA 裂解液（上海碧云天生物技术有限公司）
磷酸酶抑制剂 Cocktail（Roche）
BCA 蛋白定量分析试剂盒（Pierce）
预染彩虹蛋白 Marker（NEB）
PVDF 膜（Millipore）
BeyoECL Plus 荧光检测试剂（上海碧云天生物技术有限公司）
免疫共沉淀试剂盒（Pierce）
质粒提取试剂盒（Omega Bio-Tek）
PCR 产物回收试剂盒（Omega Bio-Tek）
DNA 切胶回收试剂盒（Omega Bio-Tek）
TRIzol（Invitrogen）
primeSTAR 高保真 DNA 聚合酶（TaKaRa）
PrimeScript 反转录试剂盒（TaKaRa）
SYBR Premix 荧光定量 PCR 试剂盒（TaKaRa）
DNA 限制性内切酶、连接酶（NEB）
 β -巯基乙醇（Sigma）
普通化学试剂（Sigma）
HistostainTM-Plus Kits 免疫组织化学染色试剂盒（Invitrogen）
抗人 CD147 抗体（本实验室制备）
抗人 CD147 抗体（Santa Cruz）
抗人 Annexin A2 抗体（Santa Cruz）
抗人 p-Annexin A2 抗体（Santa Cruz）

抗人 Tubulin 抗体（本实验室制备）
抗人 Src 抗体（CST）
抗人 p-Src 抗体（CST）
抗人 Rac1 抗体（Cytoskeleton）
抗人 RhoA 抗体（Santa Cruz）
抗人 DOCK3 抗体（Biorbyt）
抗人 mlc-2 抗体（CST）
抗人 p-mlc2 抗体（CST）
抗人 WAVE2 抗体（Santa Cruz）
抗人 β -catenin 抗体（CST）
抗人 actin 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司）
Alex Fluor 594 标记羊抗鼠二抗（Pierce）
Dylight 488 标记羊抗兔二抗（Pierce）
HRP 标记羊抗鼠二抗（Pierce）
DAPI（Biotium）
鬼笔环肽（Invitrogen）
激光共聚焦培养皿（NEST）
siRNA（上海吉玛制药技术有限公司）
Lipofectamine 2000 转染试剂（Invitrogen）
引物（华大基因）
细胞培养板（Corning）
Countess 细胞计数板（Invitrogen）
RhoA biosensor（Addgene）
Rac1 biosensor（Yeshiva 大学 Louis Hodgson 教授馈赠）
Annexin A2 慢病毒干涉载体（上海吉凯基因化学技术有限公司）

2 方法

2.1 细胞划痕实验

- 1) 消化对数生长期细胞，计数后种于 12 孔板， 4×10^5 个细胞/孔。继续培养 12 小时。
- 2) 用 10 微升枪头划痕，换无血清培养基。于倒置显微镜下拍照，此时划痕宽度计作 D_0 。
- 3) 用无血清培养基继续培养 24 小时。
- 4) 于倒置显微镜下拍照，此时划痕宽度计作 D_{24} 。
- 5) 细胞运动距离为 $D_0 - D_{24}$ 。

2.2 实时荧光定量 PCR

1) 引物设计

DOCK1	Forward	5'-ACCGAGGTTACACGTTACGAA-3'
DOCK1	Reverse	5'-TCGGAGTGTCGTGGTGACTT-3'
DOCK2	Forward	5'-AGCACAAAATGTTACAGGGCA-3'
DOCK2	Reverse	5'-AGCACAAAATGTTACAGGGCA-3'
DOCK3	Forward	5'-TATGCAGCTTTCGAGGATCTGT-3'
DOCK3	Reverse	5'-GCCCATTCCTGTAGAGTTGCT-3'
DOCK4	Forward	5'-GGATACCTACGGAGCACGAG-3'
DOCK4	Reverse	5'-AGCCATCACACTTCTCCAGG-3'
DOCK5	Forward	5'-CTGTAGCAGCCTTAGTCGCC-3'
DOCK5	Reverse	5'-GCAAGGAGAGCTCCACATCT-3'
DOCK6	Forward	5'-TGTATGATGTGCGGGAGAAAA-3'
DOCK6	Reverse	5'-AGGGGTAGGTCACAGAGAAGA-3'
DOCK7	Forward	5'-TGGGCCTGTAGTATCTTTGACT-3'
DOCK7	Reverse	5'-TCTTCCTCATCTGGTGATGGAT-3'
DOCK8	Forward	5'-ACGCGCCGTGTA ACTGTGAA-3'
DOCK8	Reverse	5'-CCCCGAGCTCCTGGGCAA-3'

DOCK9	Forward	5'-GCTTCCGAACAAAGTGGTCAA-3'
DOCK9	Reverse	5'-GCCATGCTTGGTGATCCCA-3'
DOCK10	Forward	5'-CCGTATGCCTTTTGCTTGGG-3'
DOCK10	Reverse	5'-GCTTATTCTGTCGGCCCTTCT-3'
DOCK11	Forward	5'-AGAGGCTGCGATGTGTTATGT-3'
DOCK11	Reverse	5'-CTCATAAATTGGAACGATCAACT-3'
WAVE2	Forward	5'-CTTTCAGCCATCCGTCAAGG-3'
WAVE2	Reverse	5'-AATCGGACCAGTCGTCCTCA-3'
Annexin A2	Forward	5'-GAGGATGGCTCTGTCATTGATT-3'
Annexin A2	Reverse	5'-CTGGTAGTCGCCCTTAGTGTCT-3'
CD147	Forward	5'-ACTCCTCACCTGCTCCTTGA
CD147	Reverse	5'-GCCTCCATGTTTCAGGTTCTC
GAPDH	Forward	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
GAPDH	Reverse	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

2) 反应体系

cDNA	1μl
Primer-F	0.5μl
Primer-R	0.5μl
SYBR	10μl
Double-distilled H ₂ O	8μl

3) 反应条件

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	10min
2	40	95°C	30sec
		55°C	1min
		72°C	1min
3	1	95°C	1min
		55°C	30sec
		95°C	30sec

4) 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达的相对变化。

2.3 Annexin A2 RNAi-resistant 表达载体的构建

1) 引物设计

Forward:

5'-CAAAGCCTATACTAACTTTGATGCTGAGCGAGACGCACTTAATATCGAAA
CAGCCATCAAGACCAAAGGTGTGGAT-3'

Reverse:

5'-ATCCACACCTTTGGTCTTGATGGCTGTTTCGATATTAAGTGCGTCTCGCTC
AGCATCAAAGTTAGTATAGGCTTTG-3'

2) 反应体系

10×QuikChange reaction buffer	1.25μl
ddH ₂ O	8.5μl
QuikSolution	0.25μl
Annexin A2-pEGFP-N1	0.5μl
Primer-F	0.5μl
Primer-R	0.5μl
dNTP mix	0.5μl
QuikChange enzyme	0.5μl

3) 反应条件

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95℃	30sec
2	30	95℃	30sec
		55℃	1min
		65℃	6min
3	1	4℃	∞

- 4) 反应完毕后，在反应体系中加入 0.5 μ l Dpn I 内切酶，37℃反应 5min。
- 5) 转化 DH5 α 感受态细菌，涂布 Kan⁺琼脂糖平板，37℃培养过夜。
- 6) 随机挑取克隆培养过夜，送测序。

2.4 裸鼠脾脏注射转移模型

- 1) 裸鼠称重，随机分为两组：SMMC-7721 组和 K7721 组。每组 8 只。
- 2) 1% 戊巴比妥钠麻醉，40mg/kg。术野皮肤用碘伏消毒。裸鼠左上腹斜切口约 10mm，将脾脏从腹腔中轻轻拨出少许，用 1ml 注射器将 SMMC-7721 细胞或 K7721 细胞缓慢注射入脾脏中，每只注射 100 μ l 细胞悬液 (2×10^6 /只)。注射完成后用棉球压迫止血，而后将脾脏轻轻送回原位。逐层缝合伤口。
- 3) 术后 8 周处死裸鼠，开腹测量肝脏转移情况，并计数转移灶的数目。

2.5 统计分析

实验数据以均数 \pm 标准差表示，统计学处理采用 GraphPad Prism 5 软件，两个样本均数间差异采用 t 检验，多个样本均数间差异采用方差分析。

3 结果

3.1 CD147 可能通过调控 Annexin A2 磷酸化进而调控肿瘤细胞运动

首先我们分别检测了干涉 CD147 和干涉 Annexin A2 对肿瘤细胞运动能力的影响 (图 3.1)。结果显示下调 CD147 后，肿瘤细胞的运动能力降低，而下调 Annexin A2 后肿瘤细胞的运动能力增强。由于 CD147 负向调控 Annexin A2 的磷酸化，那么 Annexin A2 是否介导了 CD147 对肿瘤细胞运动的调控呢？于是接下来，我们检测了

同时下调 CD147 和 Annexin A2 对肿瘤细胞运动能力的影响。结果表明,同时下调 CD147 和 Annexin A2 后,肿瘤细胞的运动能力大于干涉 CD147 组,但小于干涉 Annexin A2 组,这提示 CD147 可能通过调控 Annexin A2 磷酸化进而调控肿瘤细胞运动。

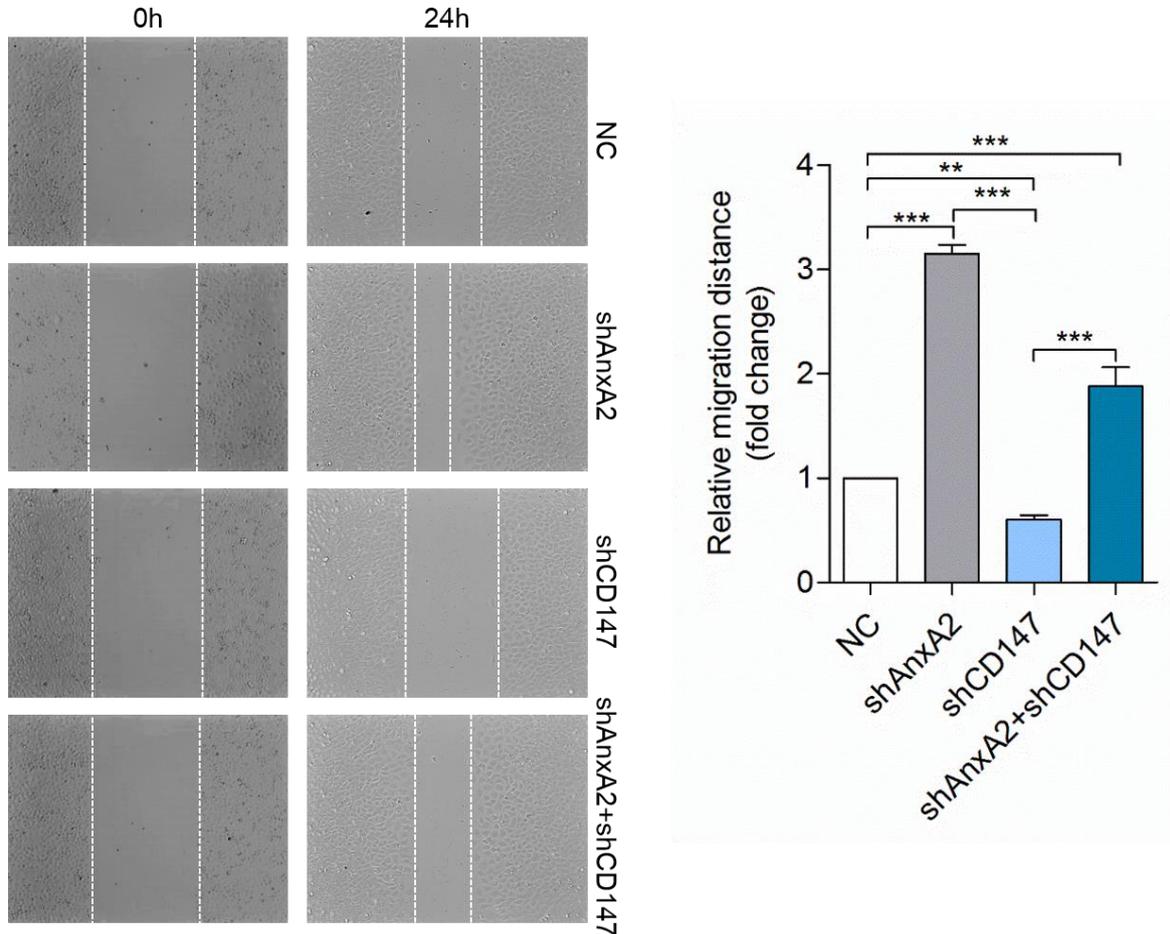


图 3.1 干涉 Annexin A2 和/或干涉 CD147 对肿瘤细胞运动的影响

3.2 磷酸化的 Annexin A2 调控 DOCK3 表达

Rho 家族小 G 蛋白在细胞运动过程中发挥重要作用,其活性主要受 GEF 和 GAP 的调控。DOCK 家族 GEF 是肿瘤细胞运动过程中的关键调控分子^[179]。我们设计了 DOCK 家族 11 个分子的实时荧光定量 PCR 引物,下调 Annexin A2 后检测了这 11 个分子的表达情况。结果表明干涉 Annexin A2 后,DOCK3 的 mRNA 水平显著下调(图 3.2 A)。而后,我们用 Western blot 检测了 DOCK3 的蛋白水平,结果显示干涉 Annexin A2 后 DOCK3 的蛋白水平也显著下调,这证明 Annexin A2 能够调控 DOCK3

的表达（图 3.2 B）。

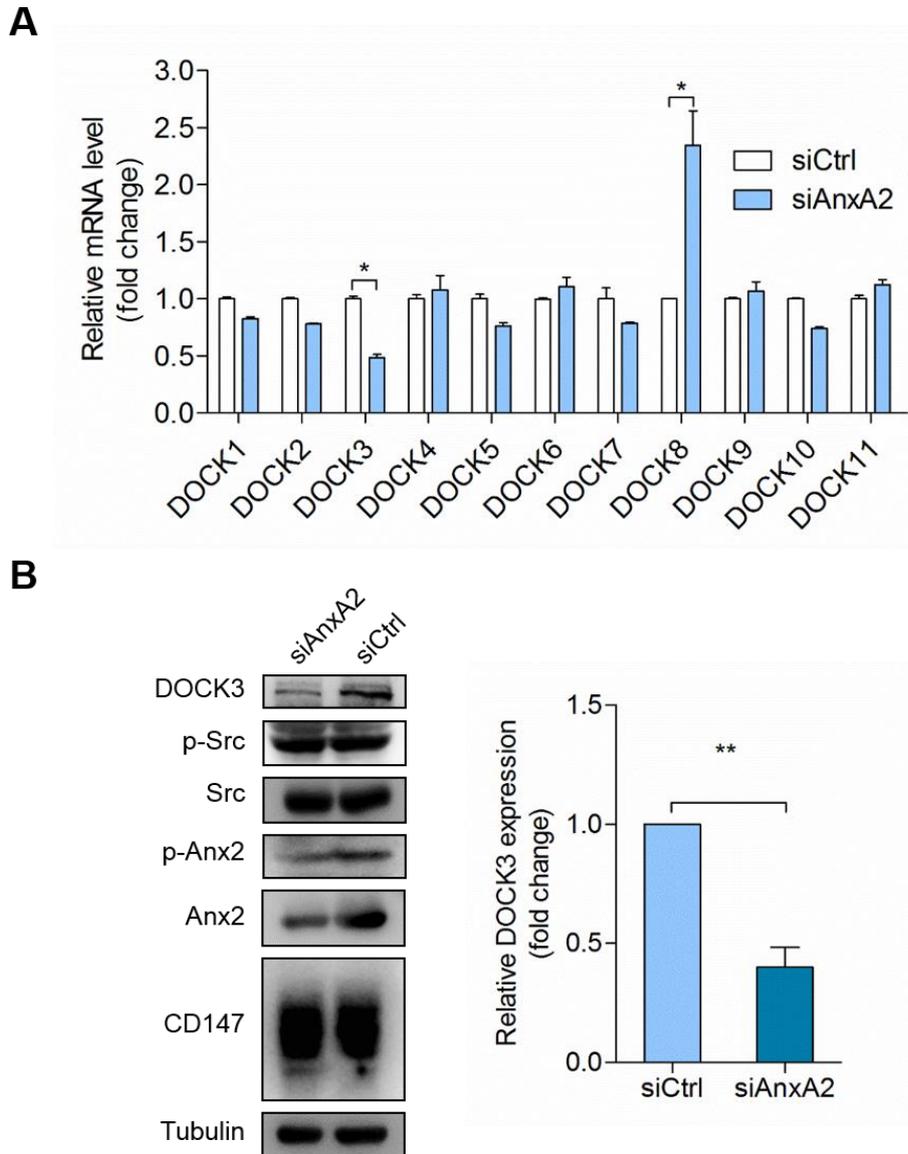


图 3.2 干涉 Annexin A2 对 DOCK 家族分子表达水平的影响

为了进一步明确 Annexin A2 对 DOCK3 的调控，我们构建了 Annexin A2 稳定干涉细胞系 HuH-7 shAnxA2。而后对 shRNA 识别的序列进行同义突变（图 3.3 A），构建了 RNAi resistant Annexin A2 表达载体（RES）。如图 3.3 B，将 RES 转染细胞，我们发现共转染 shRNA 和野生型 Annexin A2 表达载体（WT）后，仅有很少量的荧光，表明 WT 的表达被抑制，也就提示 shRNA 可以有效沉默细胞内源性 Annexin A2 的表达；而共转染 shRNA 和 RES 后，与单转染 RES 相比，RES 的表达没有被抑制，这提示在沉默细胞内源性 Annexin A2 的表达后，RES 可以有效回复 Annexin A2 的表

达。

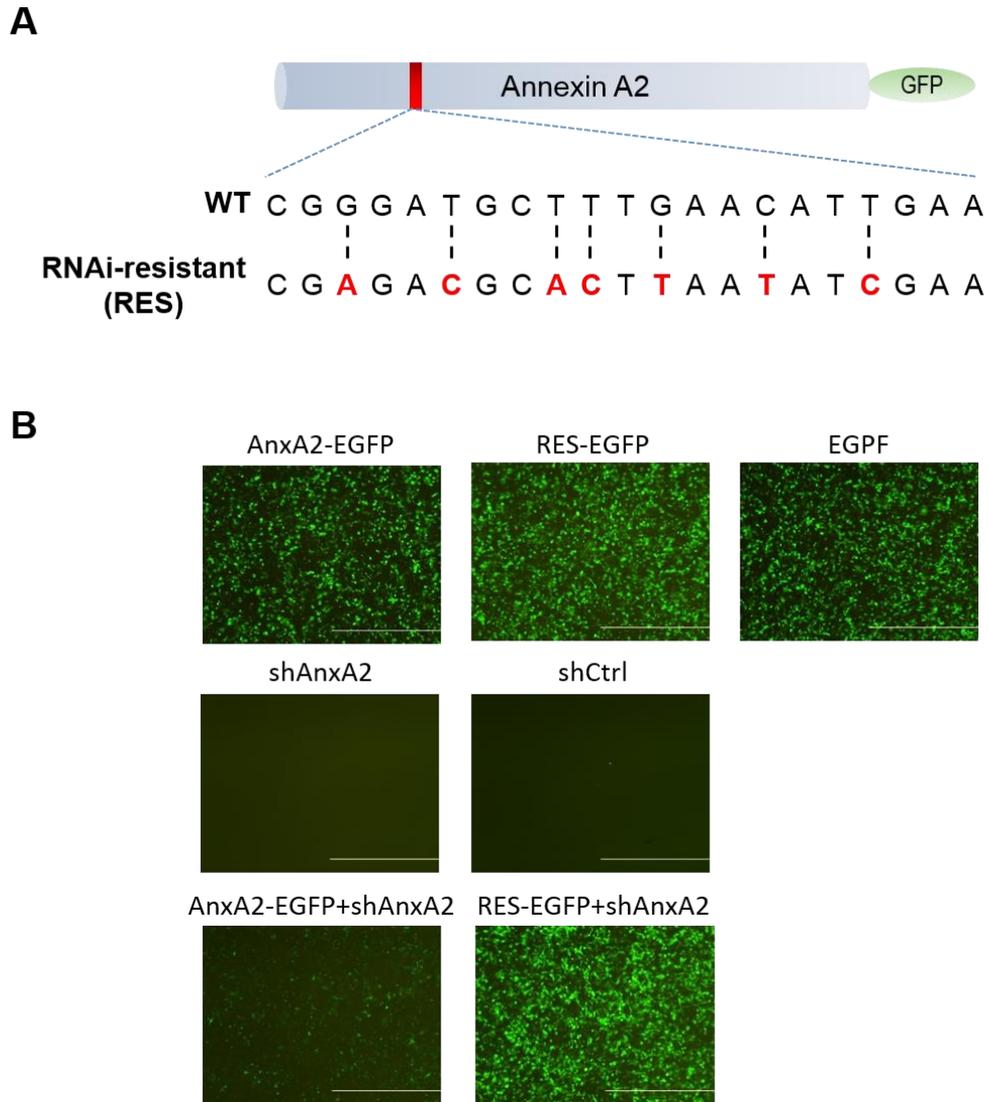


图 3.3 构建 RNAi resistant Annexin A2 表达载体

为了明确 Annexin A2 磷酸化对 DOCK3 的调控作用，我们将 RES 的酪氨酸磷酸化位点 Tyr23 分别突变为 Phe (T1)、Glu (T2)，并在 Annexin A2 稳定干扰细胞系 HuH-7 shAnxA2 的基础上，构建了稳定回复 WT、T1、T2 的细胞系。结果如图 3.4 所示，干扰 Annexin A2 后 DOCK3 的表达水平下调，这与瞬时干扰时结果一致。在 HuH-7 shAnxA2 细胞中，回复表达 RES 后 DOCK3 的表达也得以回复；回复表达 Y23F 突变体后，DOCK3 的表达水平不能回复；而部分回复模拟磷酸化的 Y23E 突变体(T2)后，DOCK3 的表达水平显著上调。这些结果证明 Annexin A2 对 DOCK3 的调控与其磷酸化修饰密切相关，只有磷酸化的 Annexin A2 才能够上调 DOCK3 的表达。

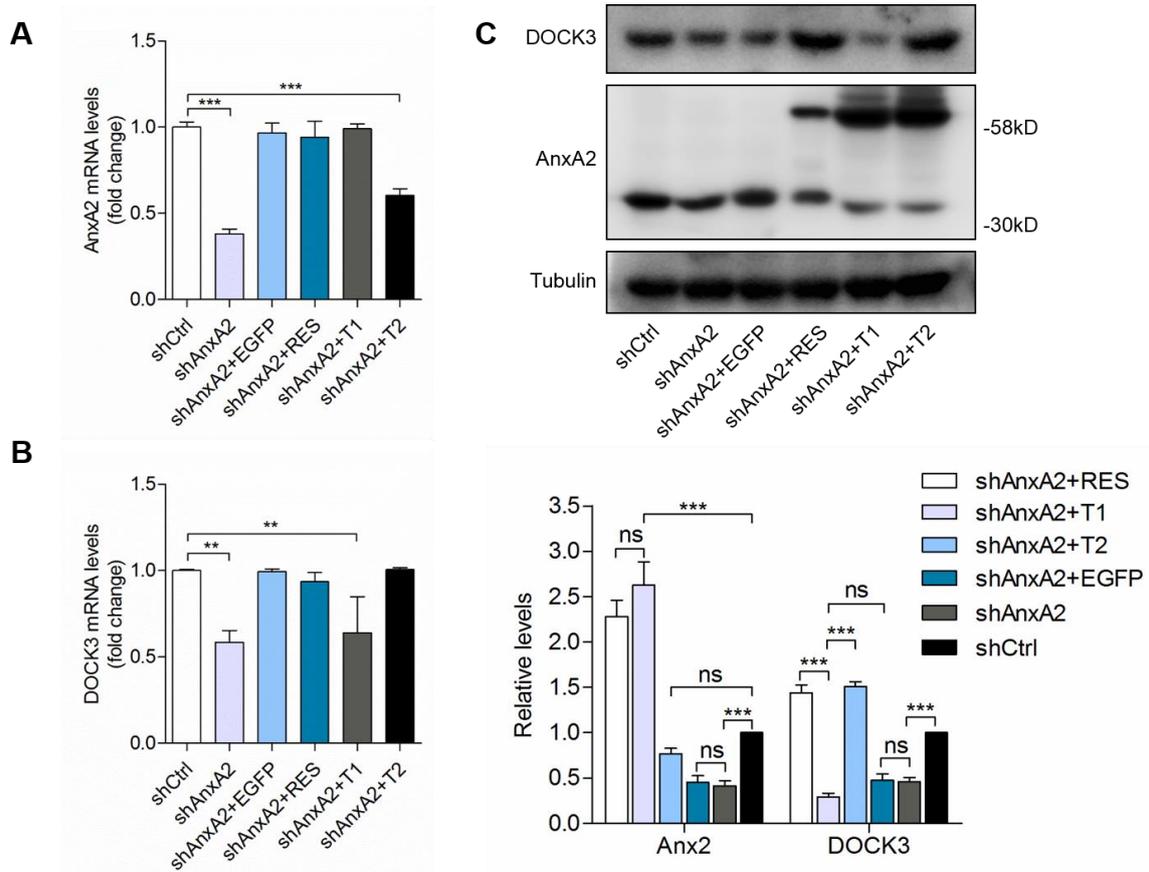


图 3.4 Annexin A2 磷酸化对 DOCK3 的调控作用

3.3 Annexin A2 通过 DOCK3 调控细胞运动

上面的研究提示 DOCK3 可能参与了 Annexin A2 对细胞运动的调控，接下来我们检测了 DOCK3 对细胞运动的影响。我们发现干涉 DOCK3 后，肝癌细胞的运动能力增强（图 3.5 A）。为了进一步明确 DOCK3 是否介导了 Annexin A2 对细胞运动的调控，我们在过表达 Annexin A2 的同时下调 DOCK3 的表达。结果如图 3.5 B 所示，过表达 Annexin A2 后细胞运动能力降低，而同时干涉 DOCK3 后，Annexin A2 过表达对细胞运动能力的影响被消除，这表明 DOCK3 参与介导了 Annexin A2 对细胞运动的调控。

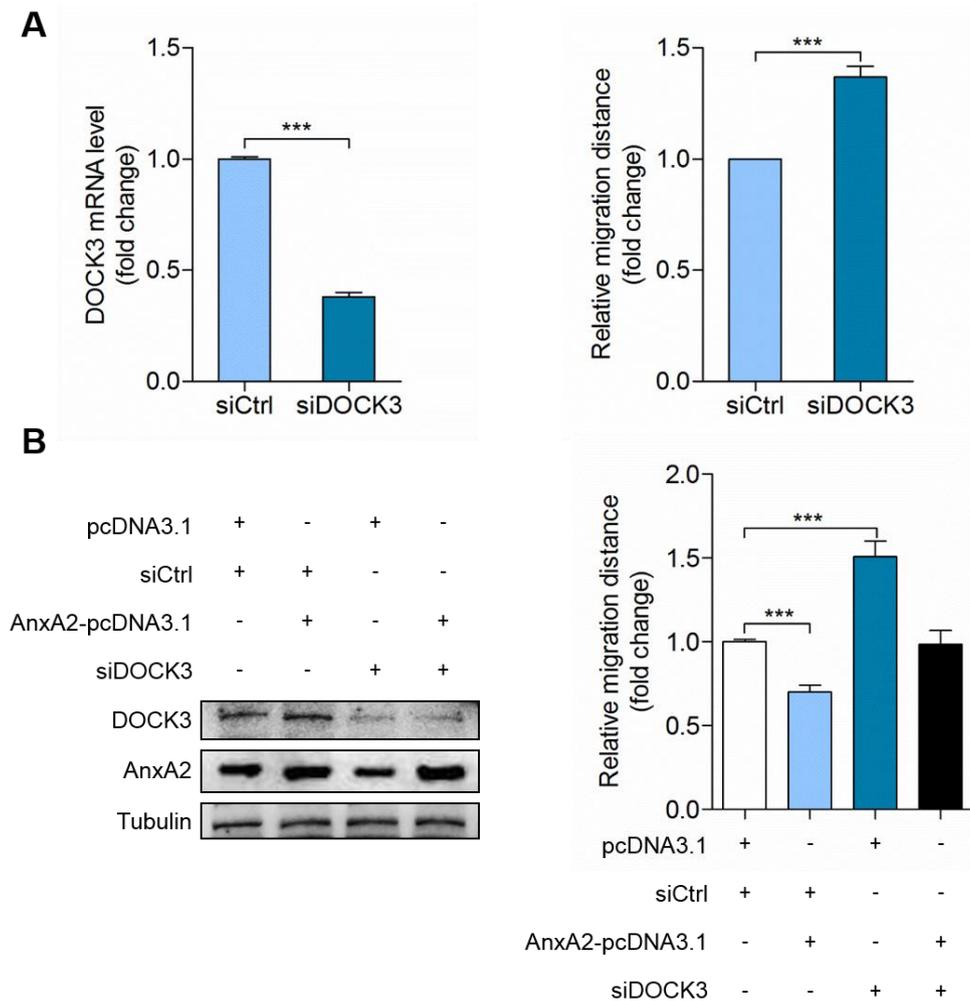


图 3.5 Annexin A2 通过 DOCK3 调控细胞运动

3.4 DOCK3 抑制 WAVE2 表达和片状伪足形成

由于 DOCK 家族分子是一类重要的 GEF，因此我们猜测 DOCK3 调控细胞运动主要依赖其 GEF 活性。首先，我们检测了干涉 DOCK3 后，Rac1 和 RhoA 活性的变化，如图 3.6 A 所示，干涉 DOCK3 后 RhoA 活性没有显著变化，而 Rac1 活性降低，这提示 DOCK3 可能是 Rac1 的 GEF。免疫共沉淀实验证明 DOCK3 可以与 Rac1 共沉淀，而与 RhoA 没有明显的共沉淀（图 3.6 B），这进一步证实 DOCK3 是 Rac1 的 GEF。

接下来我们检测了干涉 DOCK3 对 Rac1、RhoA 下游效应分子的影响。我们发现干涉 DOCK3 后，RhoA 信号通路下游效应分子 p-mlc2 水平升高（图 3.7 A 和 E），而 Rac1 信号通路下游效应分子 WAVE2 表达水平也显著升高（图 3.7 B-C）。由于 Rac1

和 RhoA 信号通路存在相互抑制^[33,103], 干涉 DOCK3 引起 Rac1 活性下调, 进而导致 RhoA 信号通路活化、p-mlc2 水平升高。既往研究认为, WAVE2 作为 Rac1 信号通路下游分子, 当下调 Rac1 活性时会引起 WAVE2 表达水平降低^[103], 而我们发现干涉 DOCK3 后 WAVE2 表达上调, 在肺癌细胞系 A549 中也得到了同样的结果(图 3.7 D), 这提示 DOCK3 对 WAVE2 的调控可能并不依赖于其 GEF 活性。为了进一步证实 DOCK3 对 WAVE2 的调控, 我们检测了干涉 DOCK3 后 WAVE2 在细胞内的定位。免疫荧光染色发现干涉 DOCK3 后, WAVE2 表达水平增高且主要分布于细胞膜上(图 3.7 F)。由于 WAVE2 在片状伪足形成中发挥关键作用, 因此我们检测了干涉 DOCK3 后细胞 F-actin 的分布, 结果提示干涉 DOCK3 后片状伪足显著增加(图 3.7 G)。由于在细胞运动过程中, 肌动蛋白骨架重排是动态变化的, 因此我们采用激光共聚焦活细胞成像系统, 检测了干涉 DOCK3 对细胞随机运动过程中片状伪足形成的影响, 如图 3.7 H 所示, 不存在趋化因子浓度梯度时, 细胞运动表现为随机运动, 可以看到干涉 DOCK3 后细胞片状伪足形成明显增多(如白色箭头所示), 并且片状伪足的面积明显增大, 这就提示 DOCK3 在抑制 WAVE2 表达的同时, 也抑制了片状伪足的形成。

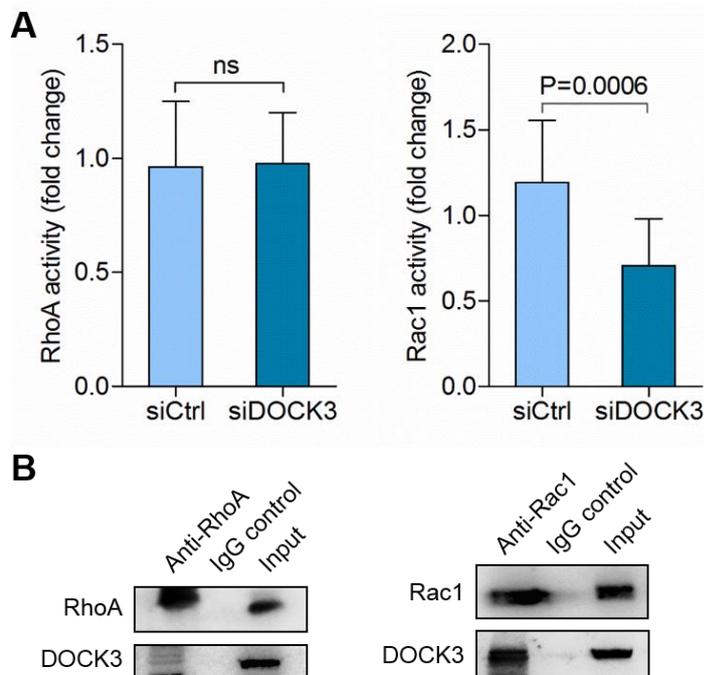


图 3.6 DOCK3 是 Rac1 的 GEF

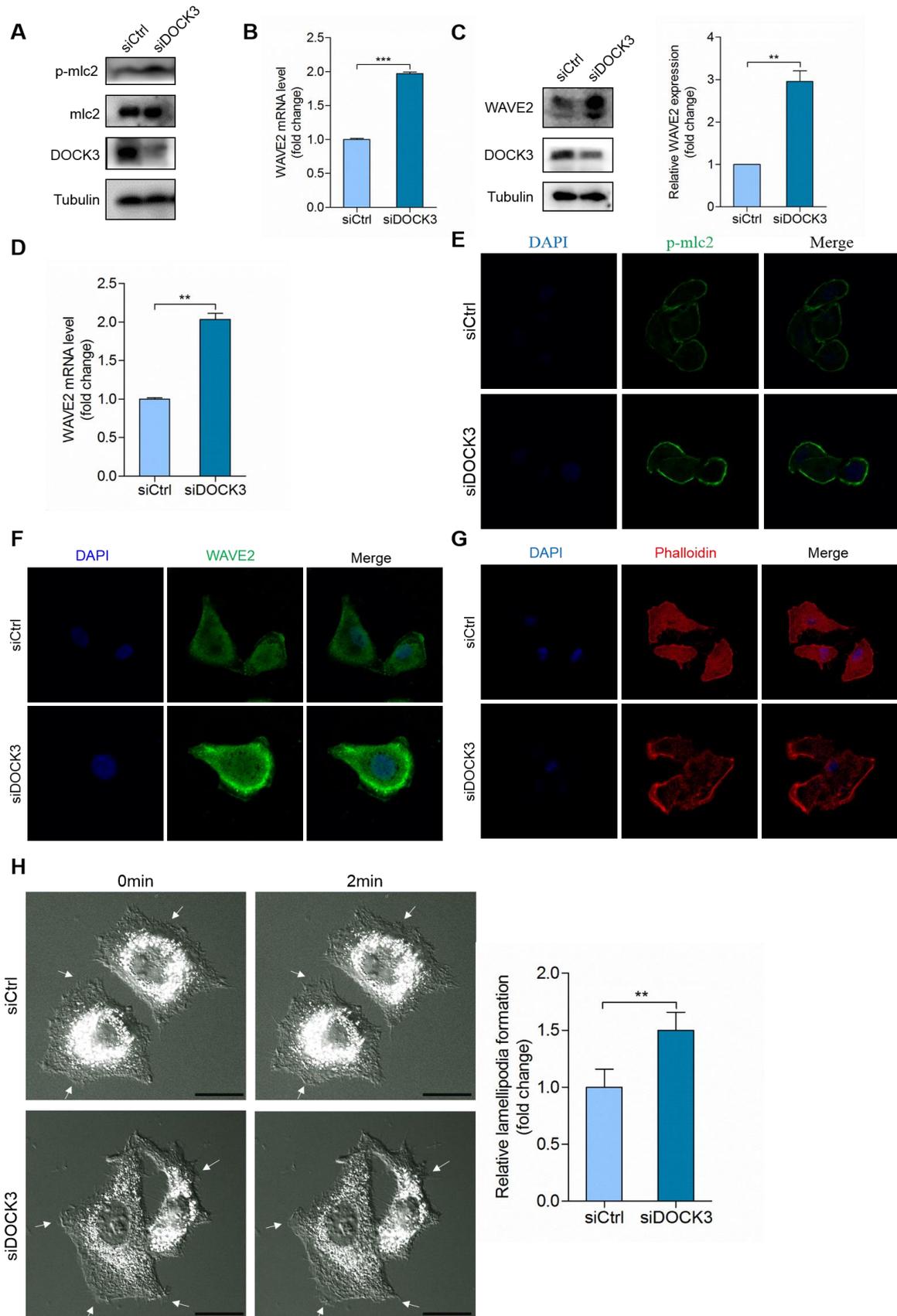


图 3.7 DOCK3 抑制 WAVE2 表达和片状伪足形成

3.5 DOCK3 通过 β -catenin 信号通路调控 WAVE2 的表达

Elanite Caspi 等人发现在结肠癌细胞中 DOCK3 能够与 β -catenin 形成复合物，抑制 β -catenin 入核，进而抑制基因转录^[180]。我们猜测 DOCK3 是否通过抑制 β -catenin 信号通路进而抑制 WAVE2 的表达。免疫荧光染色发现干涉 DOCK3 后，核内的 β -catenin 显著增加，这提示在肝癌细胞中 DOCK3 也能够抑制 β -catenin 入核(图 3.8)。接下来我们检测了 β -catenin 对 WAVE2 表达水平的影响。我们发现在肝癌细胞系 HuH-7 或 HepG2 中干涉 β -catenin 后，WAVE2 的表达水平也显著下调；并且过表达 β -catenin 活性突变体 β -cateninS33Y 后，WAVE2 的表达水平显著上调，这就提示 β -catenin 信号通路参与调控 WAVE2 表达。以上结果证明 DOCK3 能够通过抑制 β -catenin 信号通路进而负向调控 WAVE2 的表达。

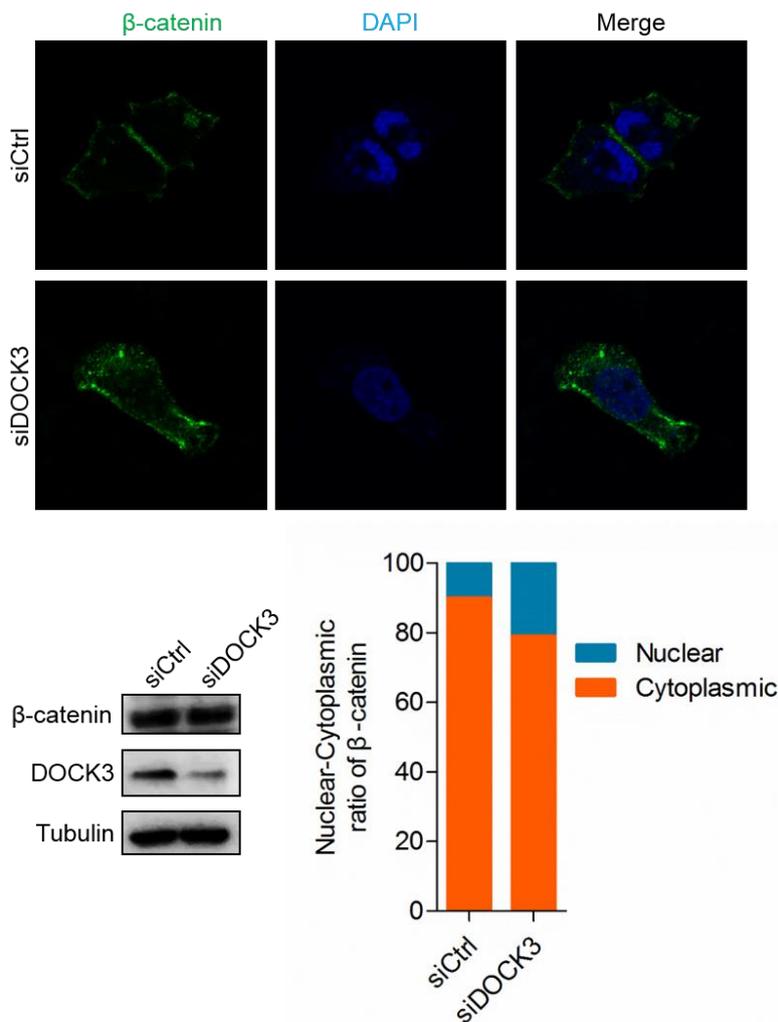


图 3.8 DOCK3 负向调控 β -catenin 入核

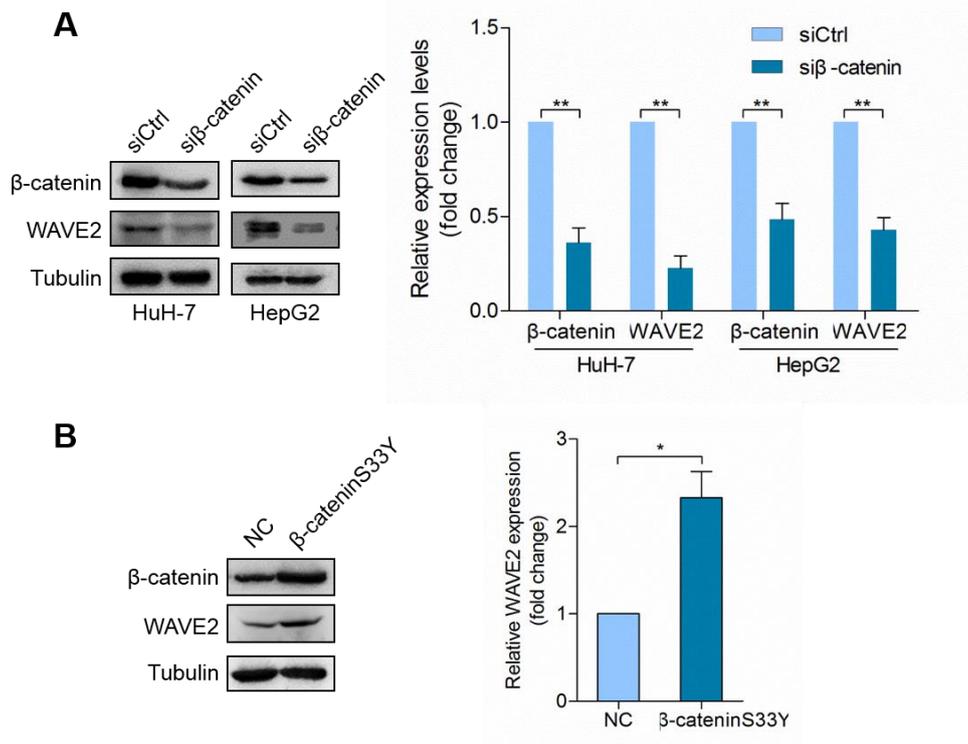


图 3.9 β -catenin 促进 WAVE2 表达

3.6 CD147 通过 p-Annexin A2 调控 DOCK3、WAVE2 的表达

通过以上的研究我们发现 Annexin A2 磷酸化能够调控 DOCK3 的表达,而 CD147 能够负向调控 Annexin A2 的磷酸化,那么 CD147 是否能够调控 DOCK3 的表达呢?如图 3.10 A-B 所示,我们检测了三株 CD147 敲除肿瘤细胞系中 DOCK3 的表达水平。结果表明,敲除肝癌细胞系 SMMC-7721、HuH-7 和结肠癌细胞系 HCT-8 中的 CD147 后,Annexin A2 磷酸化水平、DOCK3 表达水平均上调,同时 Src 磷酸化水平、WAVE2 表达水平均下调。类似的,肺癌细胞系 A549 中稳定干涉 CD147 后,Annexin A2 磷酸化水平、DOCK3 表达水平上调,同时 Src 磷酸化水平、WAVE2 表达水平下调。这些结果提示 p-Annexin A2 介导了 CD147 对 DOCK3、WAVE2 的调控,并且这种调控关系在多种肿瘤细胞系中均成立。

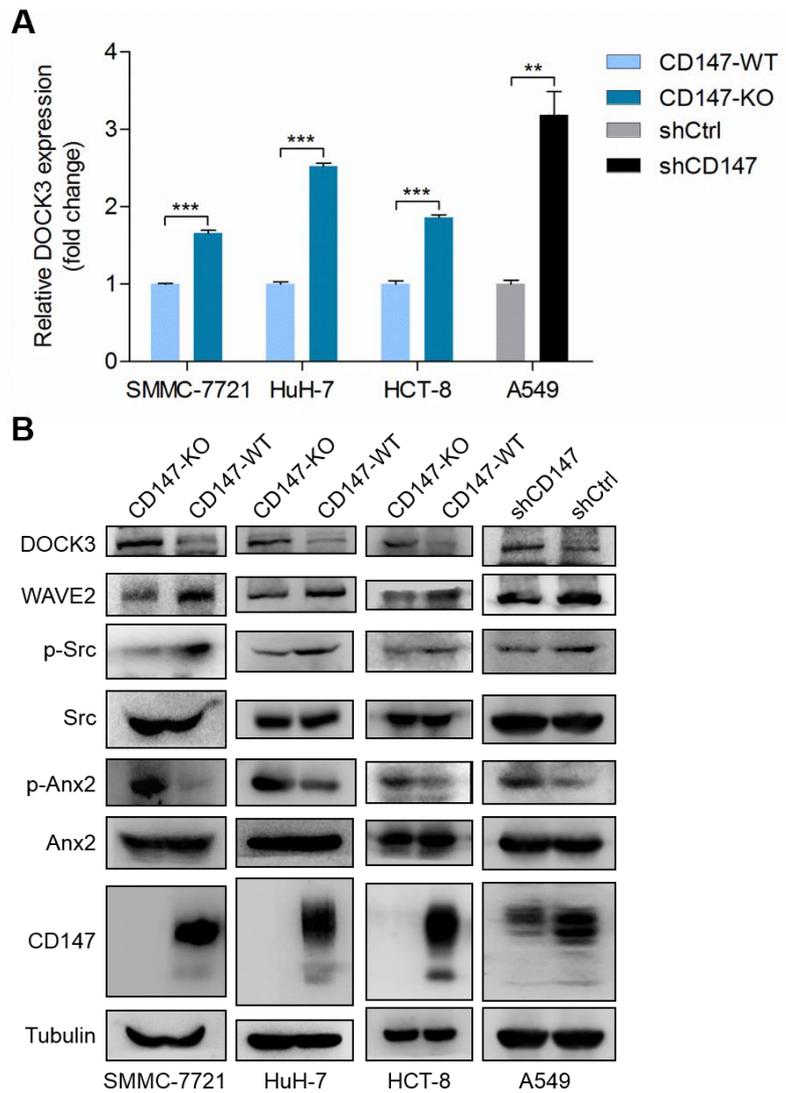


图 3.10 CD147 通过 p-Annexin A2 调控 DOCK3、WAVE2 的表达

3.7 CD147 促进肝癌细胞转移

细胞迁移在肿瘤转移过程中发挥重要作用，运动能力是决定肿瘤转移能力的关键因素之一。我们已经在细胞水平证实 CD147 能够通过 DOCK3、WAVE2 促进片状伪足形成进而促进肿瘤细胞运动，因此接下来我们建立了裸鼠脾脏注射转移模型^[181]，检测 CD147 敲除对肝癌细胞转移能力的影响。结果显示，敲除 CD147 后肝癌细胞的转移能力显著降低，并且免疫组织化学染色也进一步证实 CD147 表达水平与 DOCK3 呈负相关、与 WAVE2 呈正相关（图 3.11，表 2）。

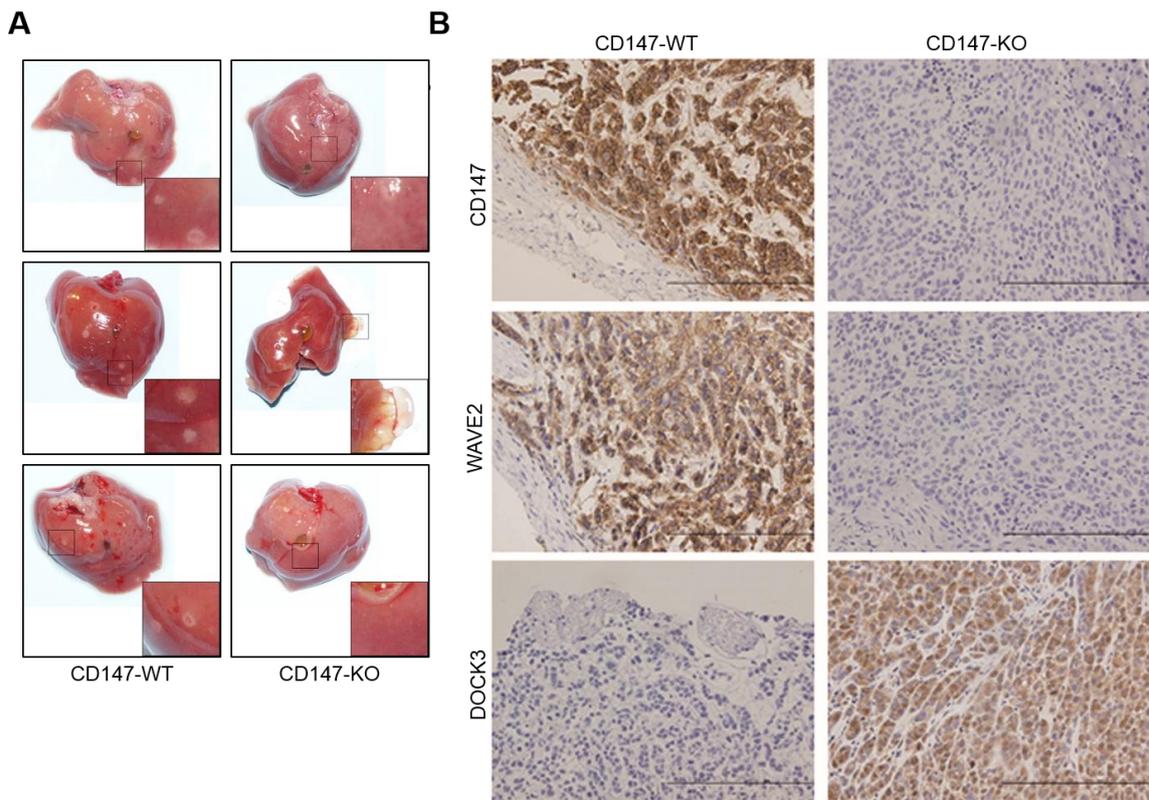


图 3.11 CD147 促进肝癌细胞转移

Table 2. Number of mice with metastasis in each group.

No. Metastasis in Each Mouse	CD147-WT, n (%)	CD147-KO, n (%)*
<50	2 (25%)	7 (87.5%)
>50	6 (75%)	1 (12.5%)
Total	8	8

4 讨论

Annexin A2 在生理、病理过程中有很多重要的功能，参与细胞骨架重排是其中的一个。既往研究发现 Annexin A2 的 N 端结构域酪氨酸磷酸化对其调控细胞骨架重排至关重要，并且这种调控主要是由 RhoA 介导的^[8,150,182]。这就提示 Annexin A2 调控细胞骨架重排主要是作为 RhoA 的上游调控分子来实现的，但是 Annexin A2 是否能够调控 Rac1 的活性目前仍不清楚。

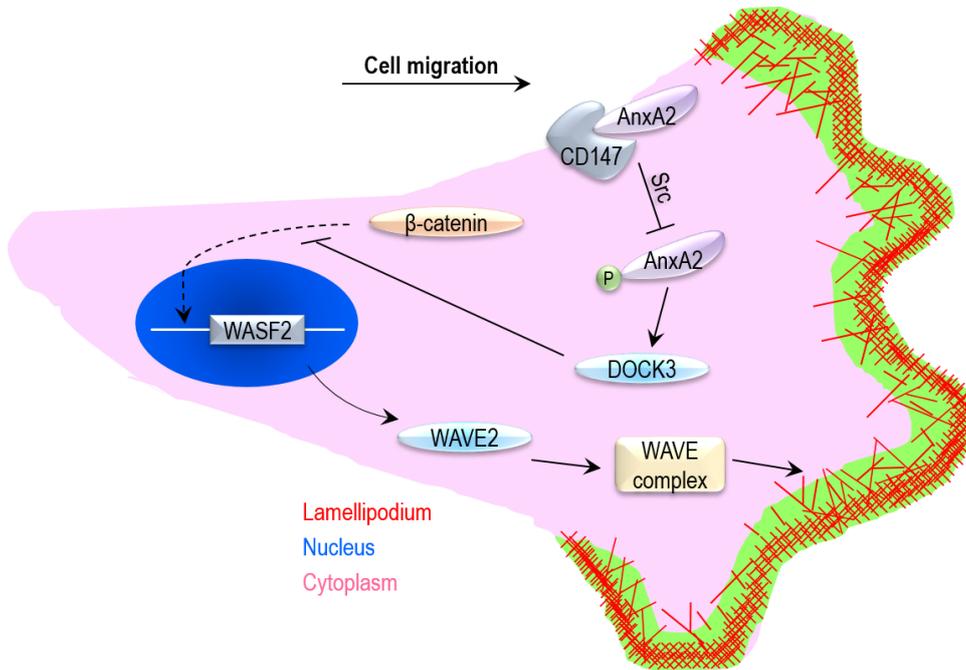
多个实验室报道 Annexin A2 能够调控细胞运动，但是 Annexin A2 在细胞运动调控中的作用仍然存在争议。Wei Zhao 等研究发现 Annexin A2 能结合盘状结构域受体 2 (DDR-2)，促进成纤维样滑膜细胞运动和侵袭^[183]。Carl R. Rankin 等人发现 Annexin A2 能够通过调节 $\beta 1$ integrin 内化，促进肠上皮细胞运动^[184]。Meena Sharma 等人研究发现 Annexin A2 通过调节纤溶酶生成，促进乳腺癌细胞运动^[185]。Tatenhorst L 等人发现干涉 Annexin A2 能抑制神经胶质瘤细胞运动^[186]。Chung CY 等人发现在牛内皮细胞 GM7373 中，TNfnA-D 通过其受体 Annexin A2 促进细胞运动，而抗 Annexin A2 抗体能阻断这一过程^[187]。然而，Jun-Wei Liu 等人研究发现 Annexin A2 在正常前列腺上皮细胞中表达，但在前列腺癌细胞中表达水平降低或缺失，并且 Annexin A2 能够抑制前列腺癌细胞的运动，提示 Annexin A2 是前列腺癌细胞运动的抑制因子^[188]。Curtis Balch 和 John R. Dedman 发现 Annexin A2 能显著抑制 Lewis 肺癌细胞的运动，抗 Annexin A2 抗体处理能提高 Lewis 肺癌细胞的运动能力^[189]。Hironao Nakayama 等人发现 Annexin A2 负向调控原代角化细胞的运动，并且抑制 UVB 诱导的 EGFR 磷酸化^[190]。我们的研究发现在肝癌细胞中干涉 Annexin A2 后，肝癌细胞的运动能力显著增强。这些结果提示 Annexin A2 的表达水平和对细胞运动的调控功能存在组织差异，这可能与 Annexin A2 在不同组织、不同细胞中的调控机制存在差异有关。

DOCK3 最早被发现是作为早老素的互作分子^[97]。随后的研究发现 DOCK3 是神经细胞死亡信号的主要整合分子，DOCK3 敲除后导致轴突变性、丝切蛋白 (Cofilin) 磷酸化水平降低以及 Rac1 信号通路改变^[98,191]。Kazuhiko Namekata 等人发现，DOCK3 能够结合并活化 Rac1，进而导致 JNK 活化，引起细胞骨架重排和形态改变；脑源神经生长因子 (BDNF) 能募集 DOCK3/WAVE1 复合物至胞膜，DOCK3 活化 Rac1 引起轴突生长，而 DOCK3 则以磷酸化依赖的方式从 WAVE 复合物解离；DOCK3 能够结合 GSK-3 β 并导致 GSK-3 β 失活，引起非磷酸化形式的 CRMP-2 增加，进而导致轴突分支和微管蛋白聚合^[99,100,192]。Sanz-Moreno 等人研究发现，DOCK3 能够通过促进 Rac1 活化进而促进间充质样细胞运动^[103]。这些研究提示 DOCK3 对细胞骨架重排的调控主要依赖其 GEF 活性，通过促进 Rac1 活化进而调控细胞骨架重排。我们研究发现 DOCK3 是一个受 Annexin A2 磷酸化调控的 RacGEF，因此我们猜测 Annexin A2 磷酸化可能通过 DOCK3 活化 Rac1 信号通路，进而调控细胞骨架重排。我们发现在肝癌细胞中 DOCK3 能够和 Rac1 共沉淀，干涉 DOCK3 后 Rac1 活性降低，这和既往

的报道一致。WAVE2 是 Rac1 信号通路下游的效应分子^[193,194]，然而在肝癌、肺癌及结肠癌等多个肿瘤细胞系中，干涉 DOCK3 后 WAVE2 的转录水平和蛋白表达水平均升高，这提示 DOCK3 对 WAVE2 的调控不依赖于其 GEF 活性及 Rac 信号通路。进一步的研究我们发现，DOCK3 能够通过负向调控 β -catenin 进而抑制 WAVE2 的表达，这就证明 DOCK3 对 WAVE2 的调控可能通过 β -catenin 信号通路。

CD147 在肿瘤进展过程中发挥重要作用，包括促进肿瘤黏附、运动、侵袭和转移^[173,195]。CD147 与 integrin $\alpha 3\beta 1$ 和 $\alpha 6\beta 1$ 相互作用促进其活化，引起 FAK 和 Paxillin 磷酸化水平上调，导致细胞骨架重排和细胞形态改变^[153,196,197]。有研究发现 CD147 是 Slug 的靶基因，能够通过 TGF- β 信号通路促进 EMT，导致细胞发生间充质样改变^[181]，这也提示 CD147 参与调控细胞骨架重排和形态改变。此外，CD147 也能通过调控 Annexin A2 激活的 RhoA 信号通路和 integrin-FAK-PI3K/PIP3 激活的 Rac1 信号通路促进细胞运动^[8]。最近我们的研究发现 CD147 能够通过 FAK/Src/DOCK8 促进 Rac1 活化，进而促进间充质样细胞运动^[132]。本研究发现 CD147 通过与 Annexin A2 结合并调控 p-Annexin A2/DOCK3/ β -catenin/WAVE2 信号通路促进肿瘤细胞片状伪足形成，进而上调肿瘤运动和转移能力。所有这些结果提示 CD147 能够在多个层面、通过多个分子机制调控肿瘤细胞运动和转移，靶向 CD147 的抗肿瘤治疗可能是有效抑制肿瘤运动和转移的重要策略。

小 结



CD147 调控片状伪足形成和细胞运动的分子机制示意图

1、CD147 和 Annexin A2 在肝癌、肺癌等肿瘤细胞中存在共定位，CD147 的 I 结构域与 Annexin A2 的 N 端结构域在活细胞中能够直接相互作用。

2、CD147 表达水平与 Annexin A2 的 Tyr23 磷酸化水平呈负相关。CD147 通过其胞外段的 I 结构域与 Annexin A2 的 N 端结构域直接相互作用抑制了 Src 激酶对 Annexin A2 Tyr23 的磷酸化。

3、Annexin A2 Tyr23 磷酸化调控 DOCK3 的表达。DOCK3 通过抑制 β -catenin 入核进而负向调控 WAVE2 的表达。WAVE2 表达水平升高能促进片状伪足形成和细胞运动。CD147 通过 p-Anneixn A2/DOCK3/ β -catenin/WAVE2 信号轴调控肿瘤细胞运动。

参考文献

- [1] Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5), 646-674
- [2] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 郑荣寿, 邹小农, 赵平, 吴良有, 李光琳, 赫捷. (2014) 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡. *中国肿瘤* **23**(1), 4-13
- [3] 国家卫生和计划生育委员会. (2014) *2014 中国卫生和计划生育统计年鉴*, 中国协和医科大学出版社
- [4] Yu, X. L., Jiang, J. L., Li, L., Feng, Q., Xu, J., and Chen, Z. N. (2006) The glycosylation characteristic of hepatoma-associated antigen HAb18G/CD147 in human hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* **38**(11), 1939-1945
- [5] Li, Y., Xu, J., Chen, L., Zhong, W. D., Zhang, Z., Mi, L., Zhang, Y., Liao, C. G., Bian, H. J., Jiang, J. L., Yang, X. M., Li, X. Y., Fan, C. M., Zhu, P., Fu, L., and Chen, Z. N. (2009) HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection. *Histopathology* **54**(6), 677-687
- [6] Weidle, U. H., Scheuer, W., Eggle, D., Klostermann, S., and Stockinger, H. (2010) Cancer-related issues of CD147. *Cancer Genomics Proteomics* **7**(3), 157-169
- [7] Chen, Z. N., Mi, L., Xu, J., Song, F., Zhang, Q., Zhang, Z., Xing, J. L., Bian, H. J., Jiang, J. L., Wang, X. H., Shang, P., Qian, A. R., Zhang, S. H., Li, L., Li, Y., Feng, Q., Yu, X. L., Feng, Y., Yang, X. M., Tian, R., Wu, Z. B., Leng, N., Mo, T. S., Kuang, A. R., Tan, T. Z., Li, Y. C., Liang, D. R., Lu, W. S., Miao, J., Xu, G. H., Zhang, Z. H., Nan, K. J., Han, J., Liu, Q. G., Zhang, H. X., and Zhu, P. (2006) Targeting radioimmunotherapy of hepatocellular carcinoma with iodine (131I) metuximab injection: clinical phase I/II trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**(2), 435-444
- [8] Zhao, P., Zhang, W., Wang, S. J., Yu, X. L., Tang, J., Huang, W., Li, Y., Cui, H. Y., Guo, Y. S., Tavernier, J., Zhang, S. H., Jiang, J. L., and Chen, Z. N. (2011) HAb18G/CD147 promotes cell motility by regulating annexin II-activated RhoA and Rac1 signaling pathways in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **54**(6), 2012-2024
- [9] Fidler, I. J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**(6), 453-458
- [10] Kelleher, J. F., Atkinson, S. J., and Pollard, T. D. (1995) Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol* **131**(2), 385-397
- [11] Locascio, A., and Nieto, M. A. (2001) Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev* **11**(4), 464-469
- [12] Luster, A. D., Alon, R., and von Andrian, U. H. (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* **6**(12), 1182-1190

- [13] Wang, W., Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Segall, J. E., and Condeelis, J. S. (2005) Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol* **15(3)**, 138-145
- [14] Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., and Bourne, H. R. (2003) Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* **160(3)**, 375-385
- [15] Sasaki, A. T., Chun, C., Takeda, K., and Firtel, R. A. (2004) Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement. *J Cell Biol* **167(3)**, 505-518
- [16] Van Haastert, P. J., and Devreotes, P. N. (2004) Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5(8)**, 626-634
- [17] Charest, P. G., and Firtel, R. A. (2007) Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J* **401(2)**, 377-390
- [18] Vorotnikov, A. V. (2011) Chemotaxis: movement, direction, control. *Biochemistry (Mosc)* **76(13)**, 1528-1555
- [19] Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S., and Hahn, K. M. (2000) Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* **290(5490)**, 333-337
- [20] Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2002) Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* **22(18)**, 6582-6591
- [21] Schlunck, G., Damke, H., Kiosses, W. B., Rusk, N., Symons, M. H., Waterman-Storer, C. M., Schmid, S. L., and Schwartz, M. A. (2004) Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Mol Biol Cell* **15(1)**, 256-267
- [22] Haugh, J. M., Codazzi, F., Teruel, M., and Meyer, T. (2000) Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *J Cell Biol* **151(6)**, 1269-1280
- [23] Cote, J. F., Motoyama, A. B., Bush, J. A., and Vuori, K. (2005) A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P3-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol* **7(8)**, 797-807
- [24] Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 545-576
- [25] Pollard, T. D. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 451-477
- [26] Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302(5651)**, 1704-1709
- [27] Burridge, K., and Doughman, R. (2006) Front and back by Rho and Rac. *Nat Cell Biol* **8(8)**, 781-782
- [28] Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L., and Hahn, K. M. (2006) Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* **440(7087)**, 1069-1072
- [29] Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa,

- Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., and Bourne, H. R. (2003) Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* **114**(2), 201-214
- [30] van Hennik, P. B., ten Klooster, J. P., Halstead, J. R., Voermans, C., Anthony, E. C., Divecha, N., and Hordijk, P. L. (2003) The C-terminal domain of Rac1 contains two motifs that control targeting and signaling specificity. *J Biol Chem* **278**(40), 39166-39175
- [31] ten Klooster, J. P., Jaffer, Z. M., Chernoff, J., and Hordijk, P. L. (2006) Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* **172**(5), 759-769
- [32] Bass, M. D., Roach, K. A., Morgan, M. R., Mostafavi-Pour, Z., Schoen, T., Muramatsu, T., Mayer, U., Ballestrem, C., Spatz, J. P., and Humphries, M. J. (2007) Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J Cell Biol* **177**(3), 527-538
- [33] Wu, Y. I., Frey, D., Lungu, O. I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., and Hahn, K. M. (2009) A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* **461**(7260), 104-108
- [34] Kaverina, I., and Straube, A. (2011) Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin Cell Dev Biol* **22**(9), 968-974
- [35] Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., and Block, M. R. (2009) Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci* **122**(Pt 17), 3037-3049
- [36] Alexandrova, A. Y. (2014) Plasticity of tumor cell migration: acquisition of new properties or return to the past? *Biochemistry (Mosc)* **79**(9), 947-963
- [37] Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M., and Borisy, G. G. (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* **160**(3), 409-421
- [38] Yang, C., Czech, L., Gerboth, S., Kojima, S., Scita, G., and Svitkina, T. (2007) Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol* **5**(11), 2624-2645
- [39] Mattila, P. K., and Lappalainen, P. (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(6), 446-454
- [40] Yang, C., and Svitkina, T. (2011) Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins. *Cell Adh Migr* **5**(5), 402-408
- [41] Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**(1), 23-32
- [42] Zheng, J. Q., Wan, J. J., and Poo, M. M. (1996) Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J Neurosci* **16**(3), 1140-1149
- [43] Grabham, P. W., Foley, M., Umeojiako, A., and Goldberg, D. J. (2000) Nerve growth factor stimulates coupling of beta1 integrin to distinct transport mechanisms in the filopodia of growth cones. *J Cell Sci* **113** (Pt 17), 3003-3012
- [44] Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G.

- A., Maly, I. V., Chaga, O. Y., Cooper, J. A., Borisy, G. G., and Gertler, F. B. (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* **109(4)**, 509-521
- [45] Tokuo, H., and Ikebe, M. (2004) Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia. *Biochem Biophys Res Commun* **319(1)**, 214-220
- [46] Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitkina, T., and Borisy, G. G. (2006) Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol* **174(6)**, 863-875
- [47] Mellor, H. (2010) The role of formins in filopodia formation. *Biochim Biophys Acta* **1803(2)**, 191-200
- [48] Small, J. V., Isenberg, G., and Celis, J. E. (1978) Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature* **272(5654)**, 638-639
- [49] Chan, K. T., Cortesio, C. L., and Huttenlocher, A. (2009) FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J Cell Biol* **185(2)**, 357-370
- [50] Kovar, D. R., and Pollard, T. D. (2004) Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101(41)**, 14725-14730
- [51] Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112(4)**, 453-465
- [52] Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2005) Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci* **96(7)**, 379-386
- [53] Stradal, T. E., and Scita, G. (2006) Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18(1)**, 4-10
- [54] Charras, G., and Paluch, E. (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9(9)**, 730-736
- [55] Laser-Azogui, A., Diamant-Levi, T., Israeli, S., Roytman, Y., and Tsarfaty, I. (2014) Met-induced membrane blebbing leads to amoeboid cell motility and invasion. *Oncogene* **33(14)**, 1788-1798
- [56] Yoshida, K., and Soldati, T. (2006) Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci* **119(Pt 18)**, 3833-3844
- [57] Maugis, B., Brugues, J., Nassoy, P., Guillen, N., Sens, P., and Amblard, F. (2010) Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility. *J Cell Sci* **123(Pt 22)**, 3884-3892
- [58] Lorentzen, A., Bamber, J., Sadok, A., Elson-Schwab, I., and Marshall, C. J. (2011) An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells. *J Cell Sci* **124(Pt 8)**, 1256-1267
- [59] Taylor, G. A., Feng, C. G., and Sher, A. (2004) p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* **4(2)**, 100-109
- [60] Cook, D. R., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2014) Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **33(31)**, 4021-4035
- [61] Hall, A. (2012) Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* **40(6)**, 1378-1382
- [62] Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992)

- The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70(3)**, 401-410
- [63] Ridley, A. J., and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70(3)**, 389-399
- [64] Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81(1)**, 53-62
- [65] Chen, Z., Borek, D., Padrick, S. B., Gomez, T. S., Metlagel, Z., Ismail, A. M., Umetani, J., Billadeau, D. D., Otwinowski, Z., and Rosen, M. K. (2010) Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* **468(7323)**, 533-538
- [66] Katoh, H., and Negishi, M. (2003) RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* **424(6947)**, 461-464
- [67] Narumiya, S., Tanji, M., and Ishizaki, T. (2009) Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28(1-2)**, 65-76
- [68] O'Connor, K., and Chen, M. (2013) Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* **4(3)**, 141-147
- [69] contributors, M. (2014) Rho GTPases regulate adhesion dynamics and cytoskeletal reorganization during motility. In MBInfo Wiki
- [70] Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M., and Danuser, G. (2009) Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461(7260)**, 99-103
- [71] Yamaguchi, Y., Katoh, H., Yasui, H., Mori, K., and Negishi, M. (2001) RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **276(22)**, 18977-18983
- [72] Pollard, T. D. (2003) The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* **422(6933)**, 741-745
- [73] Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., and Pollard, T. D. (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96(7)**, 3739-3744
- [74] Millard, T. H., Sharp, S. J., and Machesky, L. M. (2004) Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* **380(Pt 1)**, 1-17
- [75] Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (2002) Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **51(3)**, 113-122
- [76] Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1999) Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun* **260(1)**, 296-302
- [77] Campellone, K. G., and Welch, M. D. (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11(4)**, 237-251
- [78] Pollitt, A. Y., and Insall, R. H. (2009) WASP and SCAR/WAVE proteins: the

- drivers of actin assembly. *J Cell Sci* **122**(Pt 15), 2575-2578
- [79] Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1), 37-48
- [80] Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V., and Baum, B. (2003) Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol* **13**(21), 1867-1875
- [81] Yan, C., Martinez-Quiles, N., Eden, S., Shibata, T., Takeshima, F., Shinkura, R., Fujiwara, Y., Bronson, R., Snapper, S. B., Kirschner, M. W., Geha, R., Rosen, F. S., and Alt, F. W. (2003) WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *EMBO J* **22**(14), 3602-3612
- [82] Lane, J., Martin, T., Weeks, H. P., and Jiang, W. G. (2014) Structure and role of WASP and WAVE in Rho GTPase signalling in cancer. *Cancer Genomics Proteomics* **11**(3), 155-165
- [83] Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W. (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**(6899), 790-793
- [84] Padrick, S. B., and Rosen, M. K. (2010) Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. *Annu Rev Biochem* **79**, 707-735
- [85] Koronakis, V., Hume, P. J., Humphreys, D., Liu, T., Horning, O., Jensen, O. N., and McGhie, E. J. (2011) WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(35), 14449-14454
- [86] Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2004) PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol* **6**(5), 420-426
- [87] Lebensohn, A. M., and Kirschner, M. W. (2009) Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell* **36**(3), 512-524
- [88] Chen, B., Brinkmann, K., Chen, Z., Pak, C. W., Liao, Y., Shi, S., Henry, L., Grishin, N. V., Bogdan, S., and Rosen, M. K. (2014) The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* **156**(1-2), 195-207
- [89] Fernando, H. S., Davies, S. R., Chhabra, A., Watkins, G., Douglas-Jones, A., Kynaston, H., Mansel, R. E., and Jiang, W. G. (2007) Expression of the WASP verprolin-homologues (WAVE members) in human breast cancer. *Oncology* **73**(5-6), 376-383
- [90] Yang, L. Y., Tao, Y. M., Ou, D. P., Wang, W., Chang, Z. G., and Wu, F. (2006) Increased expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein 2 correlated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**(19), 5673-5679
- [91] Cote, J. F., and Vuori, K. (2007) GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol* **17**(8), 383-393
- [92] Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A., and Marshall, C. J. (2008) DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr Biol* **18**(19), 1456-1465
- [93] Hiramoto-Yamaki, N., Takeuchi, S., Ueda, S., Harada, K., Fujimoto, S., Negishi,

- M., and Katoh, H. (2010) Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *J Cell Biol* **190**(3), 461-477
- [94] Vives, V., Laurin, M., Cres, G., Larrousse, P., Morichaud, Z., Noel, D., Cote, J. F., and Blangy, A. (2011) The Rac1 exchange factor Dock5 is essential for bone resorption by osteoclasts. *J Bone Miner Res* **26**(5), 1099-1110
- [95] Xiao, L., Hu, C., Yang, W., Guo, D., Li, C., Shen, W., Liu, X., Aijun, H., Dan, W., and He, C. (2013) NMDA receptor couples Rac1-GEF Tiam1 to direct oligodendrocyte precursor cell migration. *Glia* **61**(12), 2078-2099
- [96] Laurin, M., and Cote, J. F. (2014) Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. *Genes Dev* **28**(6), 533-547
- [97] Kashiwa, A., Yoshida, H., Lee, S., Paladino, T., Liu, Y., Chen, Q., Dargusch, R., Schubert, D., and Kimura, H. (2000) Isolation and characterization of novel presenilin binding protein. *J Neurochem* **75**(1), 109-116
- [98] Tachi, N., Hashimoto, Y., and Matsuoka, M. (2012) MOCA is an integrator of the neuronal death signals that are activated by familial Alzheimer's disease-related mutants of amyloid beta precursor protein and presenilins. *Biochem J* **442**(2), 413-422
- [99] Namekata, K., Harada, C., Taya, C., Guo, X., Kimura, H., Parada, L. F., and Harada, T. (2010) Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(16), 7586-7591
- [100] Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kimura, A., Kittaka, D., Watanabe, H., and Harada, T. (2012) Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3beta-mediated microtubule assembly. *J Neurosci* **32**(1), 264-274
- [101] Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G., and Chiarugi, P. (2013) Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett* **341**(1), 80-96
- [102] Orgaz, J. L., Pandya, P., Dalmeida, R., Karagiannis, P., Sanchez-Laorden, B., Viros, A., Albregues, J., Nestle, F. O., Ridley, A. J., Gaggioli, C., Marais, R., Karagiannis, S. N., and Sanz-Moreno, V. (2014) Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration. *Nat Commun* **5**, doi:10.1038/ncomms5255
- [103] Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C. J. (2008) Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **135**(3), 510-523
- [104] Ladhani, O., Sanchez-Martinez, C., Orgaz, J. L., Jimenez, B., and Volpert, O. V. (2011) Pigment epithelium-derived factor blocks tumor extravasation by suppressing amoeboid morphology and mesenchymal proteolysis. *Neoplasia* **13**(7), 633-642
- [105] Yang, W. H., Lan, H. Y., Huang, C. H., Tai, S. K., Tzeng, C. H., Kao, S. Y., Wu, K. J., Hung, M. C., and Yang, M. H. (2012) RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration. *Nat Cell Biol* **14**(4), 366-374
- [106] Liao, C. G., Kong, L. M., Song, F., Xing, J. L., Wang, L. X., Sun, Z. J., Tang, H., Yao, H., Zhang, Y., Wang, L., Wang, Y., Yang, X. M., Li, Y., and Chen, Z. N. (2011)

- Characterization of basigin isoforms and the inhibitory function of basigin-3 in human hepatocellular carcinoma proliferation and invasion. *Mol Cell Biol* **31**(13), 2591-2604
- [107] Yu, X. L., Hu, T., Du, J. M., Ding, J. P., Yang, X. M., Zhang, J., Yang, B., Shen, X., Zhang, Z., Zhong, W. D., Wen, N., Jiang, H., Zhu, P., and Chen, Z. N. (2008) Crystal structure of HAb18G/CD147: implications for immunoglobulin superfamily homophilic adhesion. *J Biol Chem* **283**(26), 18056-18065
- [108] Cui, H. Y., Guo, T., Wang, S. J., Zhao, P., Dong, Z. S., Zhang, Y., Jiang, J. L., Chen, Z. N., and Yu, X. L. (2012) Dimerization is essential for HAb18G/CD147 promoting tumor invasion via MAPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **419**(3), 517-522
- [109] Riethdorf, S., Reimers, N., Assmann, V., Kornfeld, J. W., Terracciano, L., Sauter, G., and Pantel, K. (2006) High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* **119**(8), 1800-1810
- [110] Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S., and Biswas, C. (1993) Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* **53**(13), 3154-3158
- [111] Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H., and Nabeshima, K. (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* **55**(2), 434-439
- [112] Li, R., Huang, L., Guo, H., and Toole, B. P. (2001) Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts. *J Cell Physiol* **186**(3), 371-379
- [113] Taylor, P. M., Woodfield, R. J., Hodgkin, M. N., Pettitt, T. R., Martin, A., Kerr, D. J., and Wakelam, M. J. (2002) Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway. *Oncogene* **21**(37), 5765-5772
- [114] Egawa, N., Koshikawa, N., Tomari, T., Nabeshima, K., Isobe, T., and Seiki, M. (2006) Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells. *J Biol Chem* **281**(49), 37576-37585
- [115] Sun, J., and Hemler, M. E. (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* **61**(5), 2276-2281
- [116] Menashi, S., Serova, M., Ma, L., Vignot, S., Mourah, S., and Calvo, F. (2003) Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res* **63**(22), 7575-7580
- [117] Huang, Y., Jiang, J., Dou, K., and Chen, Z. (2005) HAb18G/CD147 enhances the secretion of matrix metalloproteinases (MMP) via cGMP/NO-sensitive capacitative calcium entry (CCE) and accordingly attenuates adhesion ability of fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **84**(1), 59-73

- [118] Zhou, J., Zhu, P., Jiang, J. L., Zhang, Q., Wu, Z. B., Yao, X. Y., Tang, H., Lu, N., Yang, Y., and Chen, Z. N. (2005) Involvement of CD147 in overexpression of MMP-2 and MMP-9 and enhancement of invasive potential of PMA-differentiated THP-1. *BMC Cell Biol* **6(1)**, doi:10.1186/1471-2121-6-25
- [119] Walters, D. K., Arendt, B. K., and Jelinek, D. F. (2013) CD147 regulates the expression of MCT1 and lactate export in multiple myeloma cells. *Cell Cycle* **12(19)**, 3175-3183
- [120] Long, T., Su, J., Tang, W., Luo, Z., Liu, S., Liu, Z., Zhou, H., Qi, M., Zeng, W., Zhang, J., and Chen, X. (2013) A novel interaction between calcium-modulating cyclophilin ligand and Basigin regulates calcium signaling and matrix metalloproteinase activities in human melanoma cells. *Cancer Lett* **339(1)**, 93-101
- [121] Chen, Y., Gou, X., Ke, X., Cui, H., and Chen, Z. (2012) Human tumor cells induce angiogenesis through positive feedback between CD147 and insulin-like growth factor-I. *PLoS One* **7(7)**, e40965
- [122] Zhang, W., Zhao, P., Xu, X. L., Cai, L., Song, Z. S., Cao, D. Y., Tao, K. S., Zhou, W. P., Chen, Z. N., and Dou, K. F. (2013) Annexin A2 promotes the migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells in vitro by regulating the shedding of CD147-harboring microvesicles from tumor cells. *PLoS One* **8(8)**, e67268
- [123] Grass, G. D., Tolliver, L. B., Bratoeva, M., and Toole, B. P. (2013) CD147, CD44, and the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway cooperate to regulate breast epithelial cell invasiveness. *J Biol Chem* **288(36)**, 26089-26104
- [124] Hao, J., Madigan, M. C., Khatri, A., Power, C. A., Hung, T. T., Beretov, J., Chang, L., Xiao, W., Cozzi, P. J., Graham, P. H., Kearsley, J. H., and Li, Y. (2012) In vitro and in vivo prostate cancer metastasis and chemoresistance can be modulated by expression of either CD44 or CD147. *PLoS One* **7(8)**, e40716
- [125] Li, L., Tang, W., Wu, X., Karnak, D., Meng, X., Thompson, R., Hao, X., Li, Y., Qiao, X. T., Lin, J., Fuchs, J., Simeone, D. M., Chen, Z. N., Lawrence, T. S., and Xu, L. (2013) HAb18G/CD147 promotes pSTAT3-mediated pancreatic cancer development via CD44s. *Clin Cancer Res* **19(24)**, 6703-6715
- [126] Wang, Y., Yuan, L., Yang, X. M., Wei, D., Wang, B., Sun, X. X., Feng, F., Nan, G., Wang, Y., Chen, Z. N., and Bian, H. (2015) A chimeric antibody targeting CD147 inhibits hepatocellular carcinoma cell motility via FAK-PI3K-Akt-Girdin signaling pathway. *Clin Exp Metastasis* **32(1)**, 39-53
- [127] Liang, Q., Han, Q., Huang, W., Nan, G., Xu, B. Q., Jiang, J. L., and Chen, Z. N. (2014) HAb18G/CD147 regulates vinculin-mediated focal adhesion and cytoskeleton organization in cultured human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* **9(7)**, e102496
- [128] Zhu, H., Zhao, J., Zhu, B., Collazo, J., Gal, J., Shi, P., Liu, L., Strom, A. L., Lu, X., McCann, R. O., Toborek, M., and Kyprianou, N. (2012) EMMPRIN regulates cytoskeleton reorganization and cell adhesion in prostate cancer. *Prostate* **72(1)**, 72-81
- [129] Curtin, K. D., Meinertzhagen, I. A., and Wyman, R. J. (2005) Basigin

- (EMMPRIN/CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture. *J Cell Sci* **118(Pt 12)**, 2649-2660
- [130] Grass, G. D., Bratoeva, M., and Toole, B. P. (2012) Regulation of invadopodia formation and activity by CD147. *J Cell Sci* **125(Pt 3)**, 777-788
- [131] Xu, H. Y., Qian, A. R., Shang, P., Xu, J., Kong, L. M., Bian, H. J., and Chen, Z. N. (2007) siRNA targeted against HAb18G/CD147 inhibits MMP-2 secretion, actin and FAK expression in hepatocellular carcinoma cell line via ERK1/2 pathway. *Cancer Lett* **247(2)**, 336-344
- [132] Wang, S. J., Cui, H. Y., Liu, Y. M., Zhao, P., Zhang, Y., Fu, Z. G., Chen, Z. N., and Jiang, J. L. (2015) CD147 promotes Src-dependent activation of Rac1 signaling through STAT3/DOCK8 during the motility of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* **6(1)**, 243-257
- [133] Gerke, V., and Moss, S. E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82(2)**, 331-371
- [134] Courtneidge, S., Ralston, R., Alitalo, K., and Bishop, J. M. (1983) Subcellular location of an abundant substrate (p36) for tyrosine-specific protein kinases. *Mol Cell Biol* **3(3)**, 340-350
- [135] Eberhard, D. A., Karns, L. R., VandenBerg, S. R., and Creutz, C. E. (2001) Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* **114(Pt 17)**, 3155-3166
- [136] Roth, D., Morgan, A., and Burgoyne, R. D. (1993) Identification of a key domain in annexin and 14-3-3 proteins that stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* **320(3)**, 207-210
- [137] Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R., and Waisman, D. (2013) Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* **14(3)**, 6259-6305
- [138] Delouche, B., Pradel, L. A., and Henry, J. P. (1997) Phosphorylation by protein kinase C of annexin 2 in chromaffin cells stimulated by nicotine. *J Neurochem* **68(4)**, 1720-1727
- [139] Sarafian, T., Pradel, L. A., Henry, J. P., Aunis, D., and Bader, M. F. (1991) The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* **114(6)**, 1135-1147
- [140] Erikson, E., and Erikson, R. L. (1980) Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus-transforming gene product. *Cell* **21(3)**, 829-836
- [141] Cheng, Y. S., and Chen, L. B. (1981) Detection of phosphotyrosine-containing 34,000-dalton protein in the framework of cells transformed with Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78(4)**, 2388-2392
- [142] Radke, K., and Martin, G. S. (1980) Transformation by Rous sarcoma virus: effects of src-gene expression on the synthesis and phosphorylation of cellular polypeptides. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **44(Pt 2)**, 975-982
- [143] Glenney, J. R., Jr., and Tack, B. F. (1985) Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82(23)**, 7884-7888

- [144] Babiychuk, E. B., and Draeger, A. (2000) Annexins in cell membrane dynamics. Ca²⁺-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* **150**(5), 1113-1124
- [145] Menke, M., Gerke, V., and Steinem, C. (2005) Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* **44**(46), 15296-15303
- [146] Johnstone, S. A., Hubaishy, I., and Waisman, D. M. (1992) Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *J Biol Chem* **267**(36), 25976-25981
- [147] Johnsson, N., Marriott, G., and Weber, K. (1988) p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphipathic helix. *EMBO J* **7**(8), 2435-2442
- [148] Jost, M., and Gerke, V. (1996) Mapping of a regulatory important site for protein kinase C phosphorylation in the N-terminal domain of annexin II. *Biochim Biophys Acta* **1313**(3), 283-289
- [149] Deora, A. B., Kreitzer, G., Jacovina, A. T., and Hajjar, K. A. (2004) An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem* **279**(42), 43411-43418
- [150] de Graauw, M., Tijdens, I., Smeets, M. B., Hensbergen, P. J., Deelder, A. M., and van de Water, B. (2008) Annexin A2 phosphorylation mediates cell scattering and branching morphogenesis via cofilin Activation. *Mol Cell Biol* **28**(3), 1029-1040
- [151] Zheng, L., Foley, K., Huang, L., Leubner, A., Mo, G., Olinio, K., Edil, B. H., Mizuma, M., Sharma, R., Le, D. T., Anders, R. A., Illei, P. B., Van Eyk, J. E., Maitra, A., Laheru, D., and Jaffee, E. M. (2011) Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer. *PLoS One* **6**(4), e19390
- [152] Zhao, P., Zhang, W., Tang, J., Ma, X. K., Dai, J. Y., Li, Y., Jiang, J. L., Zhang, S. H., and Chen, Z. N. (2010) Annexin II promotes invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells in vitro via its interaction with HAb18G/CD147. *Cancer Sci* **101**(2), 387-395
- [153] Li, Y., Wu, J., Song, F., Tang, J., Wang, S. J., Yu, X. L., Chen, Z. N., and Jiang, J. L. (2012) Extracellular membrane-proximal domain of HAb18G/CD147 binds to metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) motif of integrin beta1 to modulate malignant properties of hepatoma cells. *J Biol Chem* **287**(7), 4759-4772
- [154] Song, F., Zhang, X., Ren, X. B., Zhu, P., Xu, J., Wang, L., Li, Y. F., Zhong, N., Ru, Q., Zhang, D. W., Jiang, J. L., Xia, B., and Chen, Z. N. (2011) Cyclophilin A (CyPA) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl cis-trans isomerase activity: direct binding between CyPA and the ectodomain of CD147. *J Biol Chem* **286**(10), 8197-8203
- [155] Vogel, S. S., van der Meer, B. W., and Blank, P. S. (2014) Estimating the distance separating fluorescent protein FRET pairs. *Methods* **66**(2), 131-138
- [156] Bozza, W. P., Di, X., Takeda, K., Rivera Rosado, L. A., Pariser, S., and Zhang, B. (2014) The use of a stably expressed FRET biosensor for determining the potency of cancer drugs. *PLoS One* **9**(9), e107010

- [157] Yadav, R. B., Burgos, P., Parker, A. W., Iadevaia, V., Proud, C. G., Allen, R. A., O'Connell, J. P., Jeshtadi, A., Stubbs, C. D., and Botchway, S. W. (2013) mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging. *BMC Cell Biol* **14**(3), doi:10.1186/1471-2121-14-3
- [158] Liu, R., Ren, D., Liu, Y., Deng, Y., Sun, B., Zhang, Q., and Guo, X. (2011) Biosensors of DsRed as FRET partner with CFP or GFP for quantitatively imaging induced activation of Rac, Cdc42 in living cells. *Mol Imaging Biol* **13**(3), 424-431
- [159] Liang, Q., Xiong, H., Gao, G., Xiong, K., Wang, X., Zhao, Z., Zhang, H., and Li, Y. (2005) Inhibition of basigin expression in glioblastoma cell line via antisense RNA reduces tumor cell invasion and angiogenesis. *Cancer Biol Ther* **4**(7), 759-762
- [160] Hanata, K., Yamaguchi, N., Yoshikawa, K., Mezaki, Y., Miura, M., Suzuki, S., Senoo, H., and Ishikawa, K. (2007) Soluble EMMPRIN (extra-cellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates the migration of HEP-2 human laryngeal carcinoma cells, accompanied by increased MMP-2 production in fibroblasts. *Arch Histol Cytol* **70**(5), 267-277
- [161] Sidhu, S. S., Nawroth, R., Retz, M., Lemjabbar-Alaoui, H., Dasari, V., and Basbaum, C. (2010) EMMPRIN regulates the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway, a potential role in accelerating lung tumorigenesis. *Oncogene* **29**(29), 4145-4156
- [162] Nakamura, K., Kodama, J., Hongo, A., and Hiramatsu, Y. (2012) Role of emmprin in endometrial cancer. *BMC Cancer* **12**(191), doi: 10.1186/1471-2407-12-191
- [163] Qian, A. R., Zhang, W., Cao, J. P., Yang, P. F., Gao, X., Wang, Z., Xu, H. Y., Weng, Y. Y., and Shang, P. (2008) Downregulation of CD147 expression alters cytoskeleton architecture and inhibits gelatinase production and SAPK pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* **27**(50), doi:10.1186/1756-9966-27-50
- [164] Nishibaba, R., Higashi, Y., Su, J., Furukawa, T., Kawai, K., and Kanekura, T. (2012) CD147-targeting siRNA inhibits cell-matrix adhesion of human malignant melanoma cells by phosphorylating focal adhesion kinase. *J Dermatol* **39**(1), 63-67
- [165] Wright, G. J. (2009) Signal initiation in biological systems: the properties and detection of transient extracellular protein interactions. *Mol Biosyst* **5**(12), 1405-1412
- [166] 梁前进, 王鹏程, 白燕荣. (2012) 蛋白质磷酸化修饰研究进展. *科技导报* **30**(31), 73-79
- [167] Saris, C. J., Tack, B. F., Kristensen, T., Glenney, J. R., Jr., and Hunter, T. (1986) The cDNA sequence for the protein-tyrosine kinase substrate p36 (calpactin I heavy chain) reveals a multidomain protein with internal repeats. *Cell* **46**(2), 201-212
- [168] Glenney, J. R., Jr. (1985) Phosphorylation of p36 in vitro with pp60src. Regulation by Ca²⁺ and phospholipid. *FEBS Lett* **192**(1), 79-82
- [169] Spijkers-Hagelstein, J. A., Mimoso Pinhancos, S., Schneider, P., Pieters, R., and Stam, R. W. (2013) Src kinase-induced phosphorylation of annexin A2 mediates

- glucocorticoid resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **27(5)**, 1063-1071
- [170] Wang, S. J., Cui, H. Y., Liu, Y. M., Zhao, P., Zhang, Y., Fu, Z. G., Chen, Z. N., and Jiang, J. L. (2015) CD147 promotes Src-dependent activation of Rac1 signaling through STAT3/DOCK8 during the motility of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* **6(1)**, 243-257
- [171] Tang, J., Guo, Y. S., Zhang, Y., Yu, X. L., Li, L., Huang, W., Li, Y., Chen, B., Jiang, J. L., and Chen, Z. N. (2012) CD147 induces UPR to inhibit apoptosis and chemosensitivity by increasing the transcription of Bip in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ* **19(11)**, 1779-1790
- [172] Li, H. W., Yang, X. M., Tang, J., Wang, S. J., Chen, Z. N., and Jiang, J. L. (2015) Effects of HAb18G/CD147 Knockout on Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro Using a Novel Zinc-Finger Nuclease-Targeted Gene Knockout Approach. *Cell Biochem Biophys* **71(2)**, 881-890
- [173] Xu, J., Xu, H. Y., Zhang, Q., Song, F., Jiang, J. L., Yang, X. M., Mi, L., Wen, N., Tian, R., Wang, L., Yao, H., Feng, Q., Zhang, Y., Xing, J. L., Zhu, P., and Chen, Z. N. (2007) HAb18G/CD147 functions in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res* **5(6)**, 605-614
- [174] Hubaishy, I., Jones, P. G., Bjorge, J., Bellagamba, C., Fitzpatrick, S., Fujita, D. J., and Waisman, D. M. (1995) Modulation of annexin II tetramer by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* **34(44)**, 14527-14534
- [175] Radke, K., and Martin, G. S. (1979) Transformation by Rous sarcoma virus: effects of src gene expression on the synthesis and phosphorylation of cellular polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76(10)**, 5212-5216
- [176] Khanna, N. C., Tokuda, M., Chong, S. M., and Waisman, D. M. (1986) Phosphorylation of p36 in vitro by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **137(1)**, 397-403
- [177] Brandherm, I., Disse, J., Zeuschner, D., and Gerke, V. (2013) cAMP-induced secretion of endothelial von Willebrand factor is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation switch in annexin A2. *Blood* **122(6)**, 1042-1051
- [178] Li, H. W., Yang, X. M., Tang, J., Wang, S. J., Chen, Z. N., and Jiang, J. L. (2015) Effects of HAb18G/CD147 knockout on hepatocellular carcinoma cells in vitro using a novel zinc-finger nuclease-targeted gene knockout approach. *Cell Biochem Biophys* **71(2)**, 881-890
- [179] Gadea, G., and Blangy, A. (2014) Dock-family exchange factors in cell migration and disease. *Eur J Cell Biol* **93(10-12)**, 466-477
- [180] Caspi, E., and Rosin-Arbesfeld, R. (2008) A novel functional screen in human cells identifies MOCA as a negative regulator of Wnt signaling. *Mol Biol Cell* **19(11)**, 4660-4674
- [181] Wu, J., Ru, N. Y., Zhang, Y., Li, Y., Wei, D., Ren, Z., Huang, X. F., Chen, Z. N., and Bian, H. (2011) HAb18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF-beta signaling and is transcriptionally regulated by Slug. *Oncogene*

- 30(43)**, 4410-4427
- [182] Rescher, U., Ludwig, C., Konietzko, V., Kharitononkov, A., and Gerke, V. (2008) Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *J Cell Sci* **121(Pt 13)**, 2177-2185
- [183] Zhao, W., Zhang, C., Shi, M., Zhang, J., Li, M., Xue, X., Zhang, Z., Shu, Z., Zhu, J., Mu, N., Li, W., Hao, Q., Wang, Z., Gong, L., Zhang, W., and Zhang, Y. (2014) The discoidin domain receptor 2/annexin A2/matrix metalloproteinase 13 loop promotes joint destruction in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol* **66(9)**, 2355-2367
- [184] Rankin, C. R., Hilgarth, R. S., Leoni, G., Kwon, M., Den Beste, K. A., Parkos, C. A., and Nusrat, A. (2013) Annexin A2 regulates beta1 integrin internalization and intestinal epithelial cell migration. *J Biol Chem* **288(21)**, 15229-15239
- [185] Sharma, M., Ownbey, R. T., and Sharma, M. C. (2010) Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. *Exp Mol Pathol* **88(2)**, 278-286
- [186] Tatenhorst, L., Rescher, U., Gerke, V., and Paulus, W. (2006) Knockdown of annexin 2 decreases migration of human glioma cells in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol* **32(3)**, 271-277
- [187] Chung, C. Y., Murphy-Ullrich, J. E., and Erickson, H. P. (1996) Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell* **7(6)**, 883-892
- [188] Liu, J. W., Shen, J. J., Tanzillo-Swarts, A., Bhatia, B., Maldonado, C. M., Person, M. D., Lau, S. S., and Tang, D. G. (2003) Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. *Oncogene* **22(10)**, 1475-1485
- [189] Balch, C., and Dedman, J. R. (1997) Annexins II and V inhibit cell migration. *Exp Cell Res* **237(2)**, 259-263
- [190] Nakayama, H., Fukuda, S., Inoue, H., Nishida-Fukuda, H., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Higashiyama, S. (2012) Cell surface annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin. *Mol Biol Cell* **23(10)**, 1964-1975
- [191] Chen, Q., Peto, C. A., Shelton, G. D., Mizisin, A., Sawchenko, P. E., and Schubert, D. (2009) Loss of modifier of cell adhesion reveals a pathway leading to axonal degeneration. *J Neurosci* **29(1)**, 118-130
- [192] Namekata, K., Enokido, Y., Iwasawa, K., and Kimura, H. (2004) MOCA induces membrane spreading by activating Rac1. *J Biol Chem* **279(14)**, 14331-14337
- [193] Takahashi, K. (2012) WAVE2 Protein Complex Coupled to Membrane and Microtubules. *J Oncol* doi: 10.1155/2012/590531
- [194] Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2009) Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene* **28(13)**, 1570-1583
- [195] Jiang, J. L., Zhou, Q., Yu, M. K., Ho, L. S., Chen, Z. N., and Chan, H. C. (2001) The involvement of HAb18G/CD147 in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells. *J Biol Chem* **276(50)**, 46870-46877

- [196] Dai, J. Y., Dou, K. F., Wang, C. H., Zhao, P., Lau, W. B., Tao, L., Wu, Y. M., Tang, J., Jiang, J. L., and Chen, Z. N. (2009) The interaction of HAb18G/CD147 with integrin alpha6beta1 and its implications for the invasion potential of human hepatoma cells. *BMC Cancer* **9**(337), doi: 10.1186/1471-2407-9-337
- [197] Tang, J., Wu, Y. M., Zhao, P., Yang, X. M., Jiang, J. L., and Chen, Z. N. (2008) Overexpression of HAb18G/CD147 promotes invasion and metastasis via alpha3beta1 integrin mediated FAK-paxillin and FAK-PI3K-Ca²⁺ pathways. *Cell Mol Life Sci* **65**(18), 2933-2942

附 录

个人简历和研究成果

个人简历:

崔洪勇, 男, 汉族, 1985年10月生, 中共党员。第四军医大学基础部细胞生物学教研室助教。2003年9月就读于第四军医大学临床医学专业, 2008年6月毕业获医学学士学位。2008年9月考入第四军医大学基础部细胞生物学教研室攻读硕士学位, 导师陈志南院士, 辅导教师余晓玲副教授, 硕士学位论文《基于结构的HAb18G/CD147同性相互作用的突变研究及其在肝癌侵袭中的功能》。2012年9月起攻读博士学位, 导师陈志南院士, 辅导教师蒋建利教授。

研究成果:

1. Wang, S. J. *, **Cui, H. Y. ***, Liu, Y. M. *, Zhao, P., Zhang, Y., Fu, Z. G., Chen, Z. N., and Jiang, J. L. (2015) CD147 promotes Src-dependent activation of Rac1 signaling through STAT3/DOCK8 during the motility of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* 6, 243-257 (co-first author)
2. **Cui, H. Y. ***, Wang, S. J. *, Miao, J. Y. *, Fu, Z. G., Feng, F., Wu, J., Yang, X. M., Chen, Z. N., and Jiang, J. L. CD147 regulates cancer migration via direct interaction with Annexin A2 and DOCK3- β -catenin-WAVE2 signaling. (under review)
3. **Cui, H. Y. ***, Guo, T. *, Wang, S. J., Zhao, P., Dong, Z. S., Zhang, Y., Jiang, J. L., Chen, Z. N., and Yu, X. L. (2012) Dimerization is essential for HAb18G/CD147 promoting tumor invasion via MAPK pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 419, 517-522

致 谢

本课题是在导师陈志南院士的悉心指导下完成的。衷心感谢导师给予我的亲切关怀、指导和支持。导师渊博的学识、孜孜以求的敬业精神、富有前瞻性的敏锐眼光、统观全局的决策能力、求真务实的严谨学风都是我终生学习的榜样。

衷心感谢蒋建利教授、李玲副教授在课题设计、实验进展以及论文完成中给予的细心指导和无私帮助。

真诚感谢边惠洁教授、李郁副教授、徐静副教授、杨向民副教授、唐娟副教授在学习期间给予的热心指导和帮助。

衷心感谢张征讲师、张阳实验师、黄婉讲师、孔令敏讲师、尉丁讲师、吴俊讲师、赵蒲博士、廖成功博士、李勇博士、南刚助理实验师、冯飞助理实验师、孙秀璇助理实验师、王彬助理实验师、王莉娟助理实验师、尚玉奎博士、缪吉玉硕士研究生、付之光博士研究生、吴波硕士研究生、梦遥博士研究生、林鹏博士研究生、徐宝卿博士研究生、罗丹博士研究生、荆琳硕士研究生、姚西英实验师、徐力青实验师，及其他各位研究生和工作人员在本课题完成中给予的热情关怀、支持和帮助。

衷心感谢 Louis Hodgson 教授的慷慨馈赠。

感谢所有曾经关心、帮助过我的老师和朋友，你们是我生命中的宝贵财富，虽然在此无法一一致谢，但我都铭记于心，愿你们能接受来自我心底的一份谢意。

最后，特别感谢我的家人，你们无时无刻的无私关怀和全力奉献，是我求学的最大精神支柱，也是我可以依偎的温馨港湾。你们是我永远的牵挂和眷恋！