



空军军医大学

Air Force Medical University

分类号 R734.2

UDC 616.2

密级 公开

# 硕士学位论文

FBW7 泛素化修饰 Snail 抑制 NSCLC 转移的  
实验研究

张勇

培养类别 全日制

学位类型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 内科学(呼吸系病)

研究方向 肺癌的转移与治疗

指导教师 张艰 教授(主任医师)

培养单位 西京医院呼吸内科

二〇一八年五月

# 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

本人完全了解空军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空军军医大学。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空军军医大学。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 .....	2
ABSTRACT .....	5
前 言 .....	8
文献回顾 .....	9
正 文 .....	18
第一部分 FBW7 在非小细胞肺癌中的表达及意义 .....	18
1 实验材料 .....	18
2 实验方法 .....	21
3 实验结果 .....	26
4 讨论 .....	30
第二部分 FBW7 表达变化对 NSCLC 侵袭转移能力的影响 .....	32
1 实验材料 .....	32
2 实验方法 .....	34
3 实验结果 .....	40
4 讨论 .....	46
第三部分 FBW7 泛素化修饰降解 SNAIL 的分子机制 .....	48
1 实验材料 .....	48
2 实验方法 .....	50
3 实验结果 .....	51
4 讨论 .....	54
小 结 .....	56
参考文献 .....	57
个人简历和研究成果 .....	64
致 谢 .....	66

## 缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
AP	ammonium persulfate	过硫酸铵
ATCC	American type culture collection	美国模式培养研究所
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
EMT	epithelial-mesenchymal transition	上皮间质转化
ERK	extracellular regulated protein kinases	胞外调节蛋白激酶
FBW7	F-box/WD repeat-containing protein 7	泛素连接酶
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学染色
miRNA	Micro-RNA	微小 RNA
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
OS	overall survival	总生存期
PBS	phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
PFS	progression-free survival	无进展生存期
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3 激酶
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
SDS	sodium dodecylsulfate	十二烷基硫酸钠
TBST	Tris-buffered saline with Tween-20	含吐温-20 缓冲盐溶液
TFs	Transcription factors	转录因子
TKIs	tyrosine-kinase inhibitors	酪氨酸激酶抑制剂

# FBW7 泛素化修饰 Snail 抑制 NSCLC 转移的 实验研究

硕士研究生：张勇

导 师：张 艰 教 授

辅 导 教 师：张 健 副 教 授

空军军医大学西京医院呼吸内科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（81272518）

## 中文摘要

作为泛素连接酶 SCF 复合体中的一种 F-box 分子，FBW7（F-box/WD repeat-containing protein 7）在调控细胞周期、细胞增殖、分化、凋亡和转移等细胞生物学过程中起到重要作用。FBW7 在人体组织内广泛存在。FBW7 作为重要的抑癌蛋白参与多种细胞生理和病理活动。FBW7 表达含量的降低可促使某些癌蛋白不能被降解继而引起细胞和组织正常功能的变化，诱导癌症的发生。这一现象在许多不同类型肿瘤中广泛存在。此外，FBW7 表达降低可促使某些肿瘤发生远处转移。由此可见，作为抑制癌症发生发展的新兴靶点，在一定范围内提高体内 FBW7 表达水平可能在延缓癌症进展和避免肿瘤晚期转移等方面发挥关键作用。本实验从肿瘤侵袭转移角度入手，以 NSCLC 为研究对象，探讨 FBW7 在参与转录抑制因子 Snail 蛋白的泛素化修饰和降解过程并抑制上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）和肿瘤转移的机制研究。

**第一部分：目的：**明确 NSCLC 组织中 FBW7 的表达水平，探索 FBW7 在正常肺组织和 NSCLC 中的表达差异，从组织水平研究 FBW7 与 NSCLC 在转移作用中的相关性并从 EMT 角度阐释 FBW7 在肺癌中引起转移的作用。**方法：**通过临床数据库分析 FBW7 在 NSCLC 中的表达差异和突变类型，将组织芯片进行免疫组织化学染

色明确 FBW7 的表达情况，在 NSCLC 样本中通过 Western blot 方法检测 FBW7 和 E-cadherin 的表达水平并进行统计学分析。**结果：**FBW7 基因在 mRNA 水平的变化主要集中于 NSCLC 中的腺癌，其变异程度呈多样性，但以点突变为主；FBW7 高表达患者总生存期（overall survival, OS）和无进展生存期（progression free survival, PFS）均较 FBW7 低表达患者明显延长；患者肿瘤组织标本中的 FBW7 表达水平较其正常肺组织明显降低；肿瘤组织内 FBW7 表达水平明显高于肿瘤组织，作为上皮间质转化的标志物之一的 E-cadherin 的变化与 FBW7 表达一致且两者间存在相关性。**结论：**FBW7 可作为抑癌基因在细胞组织内发挥作用，其表达增高提示良好的远期预后，患者的 OS 及 OFS 较 FBW7 低表达患者显著延长；肿瘤组织中 FBW7 蛋白表达明显低于正常肺组织，且 FBW7 表达的变化可能是引起肿瘤侵袭转移能力变化的一个重要原因；可将 FBW7 表达水平作为评价 NSCLC 患者预后的临床参考指标。

**第二部分：目的：**明确 FBW7 与 Snail 间的相关性；FBW7 表达降低对细胞侵袭转移能力的影响；下调 FBW7 表达水平引起细胞侵袭转移能力的变化与 Snail 蛋白稳定性间的关系。**方法：**给予 FBW7 激动剂处理并导入相关质粒从内源性和外源性角度探索 FBW7 与 Snail 间的作用关系；获取转基因小鼠 MEF 细胞并通过下调表达明确 FBW7 与肿瘤转移之间的关系；构建低表达 FBW7 的稳定细胞系通过平板克隆形成实验观察细胞形态并经 Transwell 实验检测细胞侵袭转移能力变化；对小鼠进行尾静脉注射并经小动物成像检测不同 FBW7 表达水平的肺癌细胞转移能力和细胞成瘤性的影响。**结果：**在黑色素瘤细胞系中，上调 FBW7 表达后 Snail 表达水平降低且其半衰期较正常组明显缩短；提高 FBW7 表达后 Snail 蛋白含量明显降低，而给予 MG132 处理后 Snail 表达升高；导入 Cre 质粒后可敲除 MEF 细胞中 FBW7 的表达，内源性 Snail 表达明显升高，间质细胞标记物 Vimentin 表达上升；A549 和 H1299 肺癌细胞系中 Snail 呈高表达状态，下调两株细胞 FBW7 水平可使细胞形态发生变化且侵袭转移能力发生改变；下调 FBW7 的 Lewis 肺癌细胞成瘤性和转移能力明显增强。**结论：**上调 FBW7 可通过蛋白酶体途径引起 Snail 蛋白稳定性下降；下调 FBW7 可引起 Snail 表达上升，导致 EMT 过程的发生，使上皮来源肿瘤细胞获得间质细胞特性，并可在体内引起肿瘤转移能力和成瘤性的升高。

**第三部分：目的：**明确 Snail 氨基酸序列内 PEST 结构域的保守性；探索 FBW7 降解 Snail 的潜在分子机制；研究 FBW7 与 Snail 的结合方式和降解作用机制。**方法：**

通过分析不同种属 Snail 氨基酸序列并分析 PEST 结构域的保守性；将不通过质粒导入细胞给予蛋白酶体抑制剂处理并通过 Western blot 方法检测相关分子表达水平；运用 co-IP 方法研究 FBW7 与 Snail 分子间的相互作用关系。**结果：** Snail 蛋白的氨基酸序列中存在 PEST 结构域，且无种属特异性；随着 FBW7 表达升高，Snail 表达水平下降；与 FBW7 FL 组相比，FBW7 $\Delta$ F 组 Snail 蛋白表达升高；内源性和外源性水平证实 FBW7 与 Snail 存在相互作用关系。**结论：** Snail 可通过某种方式被磷酸化修饰进而被泛素化降解，且这种作用依赖于 FBW7 的表达水平和结构完整性，两者间可通过直接的相互作用结合实现 Snail 蛋白的降解。

因此，临床工作中可将 FBW7 作为评价患者预后的指标之一，FBW7 可通过与 Snail 的直接结合并进行泛素化修饰和降解抑制上皮间质转化过程，进而抑制 NSCLC 的侵袭转移作用。在一定范围内提高 FBW7 表达可抑制晚期 NSCLC 患者远处转移并提高患者无进展生存期和总生存期。FBW7 可能成为临床预防和治疗 NSCLC 侵袭和转移的新靶点。

**关键词：** FBW7；EMT；Snail；肿瘤侵袭转移

# The Ubiquitination of Snail by FBW7 inhibits NSCLC metastasis

Candidate for master: Zhang Yong

Supervisor: Pro. Zhang Jian

Tutor: Pro. Zhang Jian

Department of Pulmonary Medicine, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China

Sponsored programs: the National Natural Science Foundation of China (81272518)

## Abstract

As a member of F-box proteins in SCF complex E3 ligase, FBW7 (F-box/WD repeat-containing protein 7) plays an important role in modulate cell biological process, such as cell cycle, proliferation, differentiation, apoptosis and metastasis. FBW7 is extensively expressed in normal tissues, which is performing as a tumor suppressor protein to regulate biological activities. Depression of FBW7 is liable to block the degradation of oncoproteins, in turn to deteriorate normal functions of cell and lead to tumorigenesis. This phenomenon exists in different types of cancer. Furthermore, depression of FBW7 may facilitate distant metastasis. Thus, acting as a brand new target to inhibit tumor, escalation of FBW7, to some extent, is of vital significance to delay the progression of cancer and prevent metastasis. In this study, we preliminarily explore the mechanism of which FBW7 participates the ubiquitination and degradation of transcription inhibitory factor, Snail, leading to NSCLC metastasis by EMT (epithelial-mesenchymal transition) from the point of tumor invasion and migration.

**Section One: Objects:** we aim to explore the expression FBW7 in NSCLC and the difference of FBW7 among the normal and NSCLC. Furthermore, we tend to study the



relationship of FBW7 and metastasis in NSCLC and in perspective of EMT to illustrate the role of FBW7 in NSCLC metastasis. **Methods:** clinical database of lung cancer is applied to explore the expression of FBW7 and variants types, which is further confirmed by immunohistochemical analysis. Western blot assay is performed to detect the expression FBW7 and E-cadherin in NSCLC samples and analysed in statistical methods. **Results:** FBW7 variation in mRNA level often occurs in adenocarcinoma of NSCLC, and point mutation is the main variation manner. Overall survival and progression free survival is extended in FBW7 high-expression group. In NSCLC samples, FBW7 expresses in high level and is in accordance with E-cadherin, a EMT biomarker on epithelial cell membrane, which exists a correlation between the two molecules. **Conclusions:** FBW7 functions as a tumor suppressor and its escalation illustrates benign prognosis, of which OS and PFS are evidently prolonged compared with normal group. Then, the expression of FBW7 decreases in tumor and its variation determines the change of capacity to metastasis, so FBW7 could be regarded as a clinical marker to determine prognosis of NSCLC.

**Section Two: Objects:** we aim to illustrate the correlation of FBW7 and Snail and further explore the exact role of FBW7 in tumor metastasis. The relationship between stability of Snail and tumor metastasis fluctuation aroused by down-regulation of FBW7 is ought to be verified. **Methods:** to explore the exact relation between FBW7 and Snail, we transfect corresponding plasmids into cells with FBW7 agonist treatment endogenously and exogenously. Then, we extracted MEF cell from transgenic mice and down-regulated FBW7 expression to confirm its relation with metastasis. We next constructed low-expressed FBW7 cell lines, which underwent plate colon formation and transwell assay to test capacity of metastasis. To further explore the ability to metastasis and tumorigenicity, tail vein injection and bioluminescence imaging were performed using corresponding cells. **Results:** in melanoma cell lines, up-regulation of FBW7 weakened Snail expression and shortened its half-life. Snail was decreasing after escalation of FBW7, which could be blocked by MG132. After transfected with Cre to down-regulate FBW7, MEFs exhibited high Snail and mesenchymal cell biomarker vimentin protein. Owing to abundant Snail protein in A549 and H1299, down-regulation of FBW7 could trigger

morphology changes and capacity of invasion and migration. Lewis lung cancer cell line was liable to perform enhanced tumorigenicity and metastasis capacity. **Conclusion:** stability of Snail is down-regulated by up-regulation of FBW7 via proteasome pathway. Down-regulation of FBW7 enriches Snail, leading to the development of EMT, conferring mesenchymal traits to epithelial-oriented cells and facilitating tumor metastasis and tumor formation.

**Section Three: Objects:** we aim to confirm the conservatism of PEST motif in Snail and explore the potential mechanism of FBW7 degrading Snail. We also tend to study the combination of FBW7 and Snail, coupled with degradation pathway. **Methods:** sequence analysis in database was performed to test conservatism of Snail PEST sequence in different species. Then, corresponding plasmids were transfected into cells with MG132 to test expression of corresponding proteins. Co-IP assay was inevitable to confirm the direct relationship between FBW7 and Snail. **Results:** PEST motif in Snail protein exhibited no specificity in different species and escalation of FBW7 down-regulated FBW7 expression. Compared with FBW7-full-length group, Snail expressed in a high level in FBW7  $\Delta$ F (without F-box protein) group. FBW7 had a direct relationship between Snail in endogenous and exogenous. **Conclusion:** Snail has the potential to be degraded by FBW7 in an ubiquitin-proteasome-dependent pathway, based on the expression of FBW7 and structural integrity. Direct interaction between FBW7 and Snail leads to the degradation of Snail.

In a word, FBW7 is liable to be regarded as one of biomarkers to evaluate prognosis of patients and it mediates the degradation of Snail in an ubiquitin-proteasome dependent pathway by direct interaction with Snail, leading to inhibit EMT process and NSCLC metastasis. To some extent, up-regulation of FBW7 inhibits tumor metastasis of advanced NSCLC and prolongs overall-survival and progression-free survival, which is able to be a new target to prevent and overcome NSCLC invasion and metastasis in clinical.

**Key words:** FBW7; EMT; Snail; tumor invasion and migration

## 前 言

近年来，由于社会经济发展的迫切需要和环境污染问题的日益突出，肺癌的发病率呈逐年增高的趋势。约 80% 的肺癌患者在就诊时已处于晚期（即临床诊断为 III/IV 期），手术和放化疗对治愈这部分患者已无明显作用，部分患者由于转移病灶广泛而失去治疗机会。虽然针对 EGFR 突变的靶向药物的应用对治疗 NSCLC 患者发挥显著地作用，但部分患者在应用后存在耐药的问题，疾病进展迅速且广泛转移的晚期肺癌患者仍难逃死亡的厄运。因此，从源头上抑制 NSCLC 的进展，延缓肿瘤转移病灶的形成对延长患者生存时间，提高患者生存质量，节约社会医疗卫生资源都具有重要的现实意义。

目前，在肺癌研究领域针对肿瘤转移的研究多集中在上皮间质转化，即上皮来源的肺癌细胞在获得间质细胞特性后具备侵袭和转移能力，并可随血液在全身多数组织定值增生，最终发育为肺癌来源的转移灶。因此，深入研究 EMT 过程的调控机制，探索抑制上皮间质转化过程关键分子的途径，对抑制肿瘤细胞 EMT 的发生发展和晚期 NSCLC 患者肿瘤转移具有重要价值。

Snail 是上皮细胞标记物 E-cadherin 上游的转录抑制因子之一，可结合在其启动子上游特定序列抑制后者转录，并引起 E-cadherin 表达减少从而引起 EMT 并最终介导肿瘤细胞转移。Snail 蛋白主要依靠泛素化修饰并通过蛋白酶体实现最终的降解。我们前期研究中发现，FBW7 可泛素化修饰 Mcl-1，通过蛋白酶体途径对其降解，并参与到 NSCLC EGFR TKIs 耐药过程。另有部分文献报道，FBW7 可与多种底物结合并参与肿瘤细胞的转移过程。其含量减少可促进肿瘤发生上皮间质转化过程并引起细胞转移能力变化。因此，本课题旨在探索 FBW7 对 EMT 转录因子 Snail 的降解作用，初步探索 FBW7 在介导肿瘤细胞转移过程中的分子机制，并从临床应用角度探索 FBW7 治疗晚期 NSCLC 转移的意义和价值。

# 文献回顾

## 1 肺癌简述

作为发病率和死亡率增长最快的恶性肿瘤之一，肺癌（lung cancer）对人类健康和生命的威胁日益严峻。根据美国权威杂志 *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 报道，全美范围内约有 52.65 万例患者曾患肺癌，仅在 2016 年有 22.43 万例患者新被确诊为肺癌（美国男性癌症发病率第一位为前列腺癌，女性癌症发病率第一位为乳腺癌）<sup>[1]</sup>。虽然早期诊断和筛查技术水平不断发展加之靶向药物和免疫治疗等新兴治疗手段的更新，肺癌的预防和治愈已经都达到了新的水平，从一定程度上可以控制肺癌的发生和进展。然而预测至 2026 年，美国仍有 14.68 万例患者被新确诊为肺癌（图 1A）<sup>[1]</sup>。在我国，随着工业生产的不断发展和经济发展的迫切需求，环境污染等现实问题加剧了我国肺癌患者的发生。根据对中国肺癌数据最新统计，仅 2015 年我国新发肺癌 73.33 万例，其中男性患者 20.93 万例，女性患者 22.40 万例（图 1B）<sup>[2]</sup>。由此可见肺癌已经成为我国的最常见癌症之一，也因此成为癌症致死的重要原因。这对我国在肺癌预防、诊断和治疗领域的基础研究和临床研究提出了严峻考验。预防肺癌发生，早期诊断和及时治疗并制定个体化治疗方案对控制肺癌发生发展，节省社会医疗卫生公共资源，促进社会经济发展具有重要意义。

A

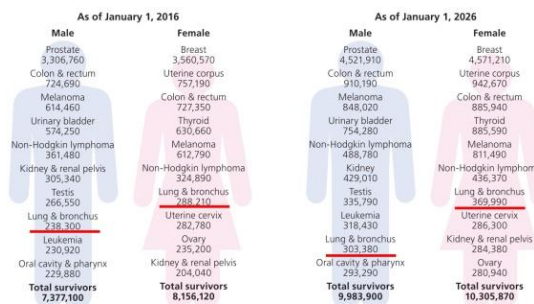


FIGURE 1. The Estimated Number of US Cancer Survivors.  
Note: Estimates for specific cancer types take into account the potential for a history of more than one cancer type.  
Source: Surveillance Research Program, Division of Cancer Control and Population Sciences, National Cancer Institute, Bethesda, MD.

B

SITE	ICD-10	INCIDENCE			MORTALITY		
		TOTAL	MALE	FEMALE	MALE	FEMALE	
Lip, oral cavity, & pharynx (except nasopharynx)	C00-C10, C12-C14	48.1	31.1	16.9	22.1	15.3	6.8
Nasopharynx	C11	60.6	43.3	17.3	34.1	24.9	9.2
Esophagus	C15	477.9	320.8	157.2	375.0	253.8	121.3
Stomach	C16	679.1	477.7	201.4	498.0	339.3	158.7
Colon & rectum	C18-C21	376.3	215.7	160.6	191.0	111.1	80.0
Liver	C22	466.1	343.7	122.3	422.1	310.6	111.5
Gallbladder	C23-C24	52.8	24.5	28.3	40.7	18.8	21.8
Pancreas	C25	90.1	52.2	37.9	79.4	45.6	33.8
Larynx	C32	26.4	23.7	2.6	14.5	12.6	1.9
Lung	C33-C34	733.3	509.3	224.0	610.2	433.4	177.8
Other thoracic organs	C37-C38	13.2	8.2	5.0	6.5	4.1	2.3
Bone	C40-C41	28.0	16.4	11.6	20.7	12.4	8.3
Melanoma of the skin	C43	8.0	4.3	3.7	3.2	1.8	1.5
Breast	C50	272.4	3.8	268.6	70.7	1.2	69.5
Cervix	C53	98.9	—	98.9	30.5	—	30.5
Uterus	C54-C55	63.4	—	63.4	21.8	—	21.8
Ovary	C56	52.1	—	52.1	22.5	—	22.5
Prostate	C61	60.3	60.3	—	26.6	26.6	—
Testis	C62	4.0	4.0	—	1.0	1.0	—
Kidney	C64-C66, C68	46.8	43.2	23.6	23.4	15.2	8.2
Bladder	C67	80.5	62.1	18.4	32.9	25.1	7.8
Brain, CNS	C70-C72	101.6	52.3	49.3	61.0	35.8	25.2
Thyroid	C73	90.0	22.2	67.9	6.8	2.5	4.3
Lymphoma	C81-C85, C88, C90, C96	88.2	53.0	35.2	52.1	32.7	19.4
Leukemia	C91-C95	75.3	44.4	30.9	53.4	33.0	21.3
All other sites and unspecified	A, D	178.1	95.5	82.6	94.0	55.0	39.0
ALL		4291.6	2512.1	1779.5	2814.2	1809.9	1004.4

CNS, central nervous system; ICD-10, International Classification of Diseases, 10th revision.

\*The total number of cases projected for 2015 are based on the average incidence rates for the most recent 3 years (2009 to 2011) of data from 72 population-based cancer registries.

图 1. 美国 (A) 与中国 (B) 癌症发病率数据统计

根据国际抗癌联盟 (UICC) 和美国癌症联合委员会 (AJCC) 对肺癌的分类，通

常将肺癌分为两大类，即小细胞肺癌（small cell lung cancer, SCLC）和非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC），并根据细胞形态和来源将后者进一步分为腺癌（adenocarcinoma）、鳞癌（squamous cell carcinoma）、腺鳞癌（adenosquamous carcinoma）、大细胞肺癌（large cell carcinoma）及其他类型，在实际临床工作中以 NSCLC 患者多见，约占全部肺癌患者的 85%<sup>[3]</sup>。因此我们将重点关注这种类型肺癌患者。针对 NSCLC 患者的临床治疗有多种形式，对于早期 NSCLC 患者的治疗多采用手术或联合放化疗方案获得根治<sup>[4]</sup>。而对于存在远处转移的晚期 NSCLC 患者，目前多采用化疗、放疗、免疫以及靶向治疗等方案，部分患者则无法进行医疗干预<sup>[5]</sup>。肺癌靶向治疗药物的推广和免疫治疗的广泛应用可在一定程度上延缓晚期患者生存时间<sup>[6, 7]</sup>。

## 2 EMT

### 2.1 EMT 概述

上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）作为近十年来的研究热点已成为癌症研究领域的重要方向。其基本含义是上皮来源的细胞在某些生理或病理情况下可向某些具有间质特性的细胞转化，这种由上皮向间质的转化过程成为 EMT<sup>[8]</sup>。从细胞形态学角度看，这一过程主要表现为细胞失去极性，细胞间黏附能力下降，呈梭形或纺锤状改变。这些形态变化可使细胞失去彼此联系，获得突破基底膜进入血液及其他组织的能力，从而实现肿瘤细胞的侵袭转移<sup>[9]</sup>。大量研究证实，EMT 参与的细胞生理过程主要包括以下几个方面：1) 胚胎产生与组织发育：上皮组织来源细胞获得间质细胞特性并表现出不同的组织细胞类型，此过程不会引起组织的纤维性变化，也不会赋予细胞侵袭转移能力，主要表现为细胞类型的改变，同时具有一定的间质上皮转化能力（mesenchymal-epithelial transition, MET）为后续胚胎发育成不同组织来源细胞提供可能<sup>[10, 11]</sup>。尤其在原肠胚与神经嵴的形成过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>；2) 组织修复与器官纤维化：组织损伤后引起炎症因子的释放，后者在一系列介质的参与下引起组织的炎症反应，由此启动 EMT 过程促进损伤组织的修复和再生<sup>[13]</sup>，长期炎症刺激等病理过程可持续活化 EMT 最终引起组织器官的纤维化<sup>[14, 15]</sup>。值得注意的是，在组织损伤后位于边缘的角化细胞表现为具有转移特性的中间状态，这使得细胞间失去紧密连接并获得转移特性<sup>[16]</sup>；3) 肿瘤进展和转移：具有癌变倾向的异常细胞内，部分癌蛋白和抑癌蛋白存在基因水平改变与表观遗传学变化，

这些变化可调控 EMT 上游信号并引起 E-cadherin<sup>[17]</sup>和 Vimentin<sup>[10]</sup>表达变化，从而使细胞获得侵袭转移能力（图 2）<sup>[18]</sup>。

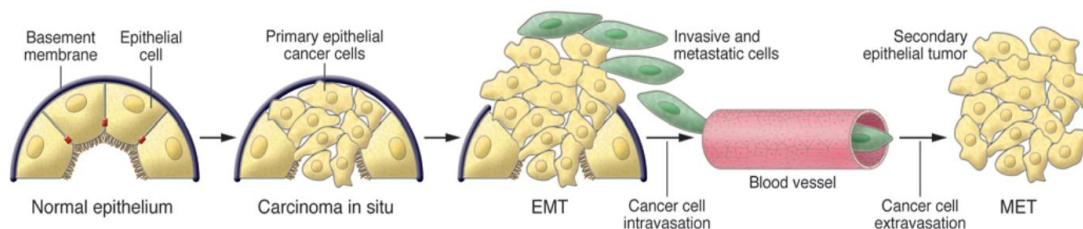


图 2 EMT 介导的肿瘤进展和转移

## 2.2 EMT 的调节

针对 EMT 过程的发生发展涉及复杂的调控网络，主要包括表观遗传学修饰、转录水平调控、基因的选择性剪接、蛋白稳定性以及亚细胞结构定位等多种修饰途径（图 3）<sup>[9]</sup>。因此涉及 EMT 上游调控并非简单的线性关系。尽管涉及正常组织的发育和肿瘤的发生发展的 EMT 过程存在普遍的调控机制，但在一些特定组织和肿瘤细胞背景下存在部分的异质性。因此，进一步研究 EMT 过程的调控机制，从多角度解释 EMT 过程在肿瘤细胞癌变中的调控机制对解释肿瘤的发生发展具有重要意义。

在 EMT 调控机制中，E-cadherin 处于核心地位，即经典的 EMT 过程调节主要由各种转录因子作用于 E-cadherin 基因上游启动子，抑制或促进其基因转录和表达并最终调节 EMT 过程<sup>[17, 19]</sup>。在这些上游的 EMT 转录因子 (EMT-TFs) 中，针对 Snail、Slug、ZEB1 和 Twist1 等蛋白质的研究较为深入，加之 miRNA 和可变剪接对基因遗传修饰作用研究的异军突起<sup>[20]</sup>，使得转录因子对 E-cadherin 表达水平以及整个 EMT 过程的调控变得更为复杂。研究表明，miR-200 与 miR-34 参与 ZEB1 和 Snail 转录水平表达<sup>[21, 22]</sup>，通过特定序列的特异结合抑制其转录从而降低蛋白表达水平，起到负性调节作用。后者可负反馈作用于 miRNA 影响其与 EMT-TFs 基因的结合从而将上皮细胞稳态维持在正常水平。值得注意的是，这种 miRNA 的干扰作用并非简单的线性关系，许多分子间存在交叉影响并与其他分子产生交互作用，鉴于其调控通路的复杂性和多样性，本文在此不做详述。此外，由上皮特异性调节蛋白（epithelial-specific regulatory protein 1 and 2, ESRP1 and ESRP2）介导的可变剪接可维持上皮细胞特性，通过对 FGFR2、CD44 以及 p120-catenin 等与细胞黏附和转移相关的靶蛋白的剪接作用促进 E-cadherin 等上皮细胞特性基因的表达<sup>[23]</sup>。同时 QKI

(Quaking) 等因子通过介导 circRNAs、RonTK 以及 Dynamin 等蛋白的可变剪接促进间质性基因的转录和翻译过程, 进而促进细胞的侵袭转移过程<sup>[24]</sup>。从另一个角度讲, 组蛋白的乙酰化修饰和甲基化修饰可对上皮及间质细胞标记物进行表观遗传学修饰<sup>[25]</sup>, 从而调节细胞黏附作用并导致 EMT 过程。

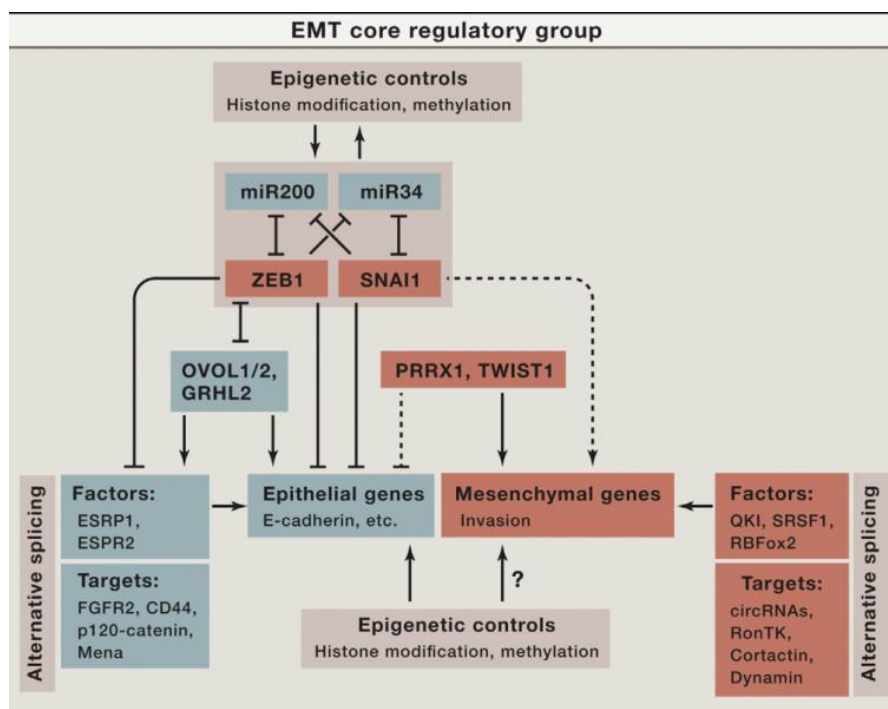


图 3 EMT 调控网络示意图

EMT-TFs 是作为启动 EMT 过程的关键分子, 其主要通过与 E-cadherin 和 vimentin 等标记物基因的启动序列结合, 抑制基因的转录和表达, 从而使其蛋白表达水平降低, 导致细胞黏附分子减少和间质细胞特性分子表达增多, 进一步介导细胞的 EMT 过程。对转录因子的研究主要从三个方面着手: 即定位、含量以及活性: 1) 定位: 由于 EMT-TFs 主要调控转录过程, 因而其主要存在于细胞核内, 但在某些生理病理条件下, 对这些因子的磷酸化、乙酰化等修饰过程会引起其在细胞内的定位, 介导其向核外转移并被进一步修饰或降解; 2) 含量: EMT-TFs 蛋白含量的多少直接影响其下游 E-cadherin 等分子的转录进而调节表达含量, 两者间存在明显的负性调节关系; 3) 活性: 转录因子的活性受诸多因素调节, 翻译后修饰过程是控制蛋白分子生物学活性的一个重要途径, 针对蛋白氨基酸序列内不同位点的磷酸化、乙酰化及泛素化等修饰形式对蛋白体细胞内的生物学活性进行调节, 从而发挥生物学功能。

作为 E-cadherin 上游主要的转录抑制因子之一, 针对 Snail 的研究较为深入。其

最早在 2002 年由 Nieto 等人在研究果蝇 shortgun 蛋白（一种 E-cadherin 类似物）时发现，Snail 蛋白增多可抑制 shortgun 转录从而调控果蝇原肠胚形成<sup>[26]</sup>。随后的研究进一步证实了 Snail 作为转录抑制因子广泛存在于人及其他哺乳动物细胞内，并在抑制上皮细胞标记物 E-cadherin 表达并促进上皮间质转化过程中发挥重要作用<sup>[27]</sup>。除此之外，Snail 还参与非 EMT 介导的细胞转移和衰老，Snail 表达含量的增高可通过 TGF- $\beta$  影响细胞周期并延缓细胞衰老，而下调 Snail 可通过 AKT/p16INK4A/RB 信号通路引起细胞衰老<sup>[28]</sup>。针对 Snail 蛋白的降解有很多方式，最为经典的是 GSK3 $\beta$  介导的 Snail 双位点磷酸化。其大致过程为：各种信号分子刺激通过 PI3K/AKT、Wnt 以及 MAPK 等信号通路抑制 GSK3 $\beta$ ，受抑制的 GSK3 $\beta$  进入细胞核，发挥生物学活性对 Snail 位点进行磷酸化修饰并介导其向和外转移，同时 GSK3 $\beta$  再次磷酸化细胞质内 Snail，随后含有双磷酸化位点修饰的 Snail 被  $\beta$ -Trcp 识别通过泛素化修饰进行降解<sup>[29]</sup>。此外，同样作为 F-box 蛋白家族成员，FBXO11<sup>[30]</sup>和 FBXL14<sup>[31]</sup>对 Snail 的泛素化降解则不依赖于 Snail 的磷酸化修饰，两者可直接识别 Snail 并经非依赖的  $\beta$ -Trcp 泛素-蛋白酶体途径对其降解。这些结果表明针对 Snail 降解主要依赖泛素化修饰，但磷酸化修饰在其降解过程更中并非必须，即 Snail 在无 GSK3 $\beta$  介导的磷酸化修饰状态下直接通过 FBXO11 和 FBXL14 进行降解，而在 GSK3 $\beta$  参与条件下则通过双位点的磷酸化修饰并经  $\beta$ -Trcp 进行降解，从而实现 E-cadherin 表达的变化和 EMT 过程。

### 3 蛋白质的泛素化修饰

#### 3.1 概述

泛素化修饰（ubiquitin modification）是细胞内蛋白质翻译后修饰的一种常见形式，参与细胞内约 80% 的蛋白质降解，可对特定蛋白质底物进行识别并通过多种酶将泛素（ubiquitin）整合至蛋白质特定位点的氨基酸残基上，进而通过泛素-蛋白酶体途径（ubiquitin-proteasome pathway, UPP）实现对底物的降解<sup>[32]</sup>。在这一途径中主要由泛素（ubiquitin, Ub）、泛素活化酶（ubiquitin activating enzyme, E1）、泛素结合酶（ubiquitin conjugating enzyme, E2）、泛素连接酶（ubiquitin protein ligase, E3）以及蛋白酶体组成。其大致过程为：泛素活化酶首先将泛素进行活化，使其获得可与底物结合并被蛋白酶体识别的活化状态；随后泛素结合酶识别底物中特定位点并将其与泛素连接酶结合；泛素连接酶将活化的泛素整合至底物特定氨基酸位点



进行泛素化修饰（整合形式多样且泛素可被磷酸化或甲基化修饰，在此不做赘述）；经泛素化修饰的蛋白质则被运输至蛋白酶体经去泛素化酶的去泛素化作用继而实现蛋白质降解。在这一过程中，泛素连接酶主要连接底物与泛素，其结构或功能缺失将直接导致相关蛋白质不能够降解而引起细胞代谢、分化、黏附等方面异常。因此我们的研究将主要集中于泛素连接酶。

### 3.2 泛素连接酶

泛素连接酶是泛素蛋白酶体途径的重要组成部分，起泛素与底物间的连接作用。根据其结构域特征以及泛素传递到底物蛋白的作用机制不同，可将其分为三类：HECT 结构域家族（homologous to E6-APC terminus, HECT）、RING 结构域家族和 U-box 蛋白家族<sup>[33]</sup>。其中以 RING 结构域家族研究较为深入，因这些结构域家族最典型的特点是具有环指结构域（Ring-finger domain）而得名。其主要成员包括：SCF 复合体、APC 复合体以及一些 IAP 家族成员。我们的研究重点将从 SCF 复合体角度进行研究。

SCF 复合体（SKP1-CUL1-F-box complex）是目前研究较为清楚地一种泛素连接酶家族成员，主要由 SKP1（S-phase kinase associated protein 1）、CUL-1（cullin-1）、RBX1（RING box 1）和 F-box 蛋白（F-box protein）四种蛋白质成分构成<sup>[34]</sup>。RBX1 与携带活化状态泛素的泛素结合酶结合，通过 CUL1 和 SKP1 的连接与 F-box 蛋白相互作用，后者的 WD40 结构域（WD40 domain）识别并结合待降解底物，随后通过这种环状结构实现对底物的泛素化修饰（图 4 A）<sup>[35]</sup>。

### 3.3 FBW7

FBW7（F-box/WD repeat-containing protein 7）属 F-box 家族成员之一，作为 SCF E3 泛素连接酶的重要组成部分起底物识别的作用<sup>[36, 37]</sup>。FBW7 又被称为 hCDC4，FBXW7 或 Sel-10，1973 年由 Washington 大学的 Hartwell 等人在研究酵母分裂周期的基因调控中被首次发现<sup>[38]</sup>。此后大量实验数据表明 FBW7 可负性调节多种癌蛋白而发挥肿瘤抑制作用<sup>[39-41]</sup>，同时作为 SCF 复合体重要的组成部分实现对底物的泛素化修饰和降解。

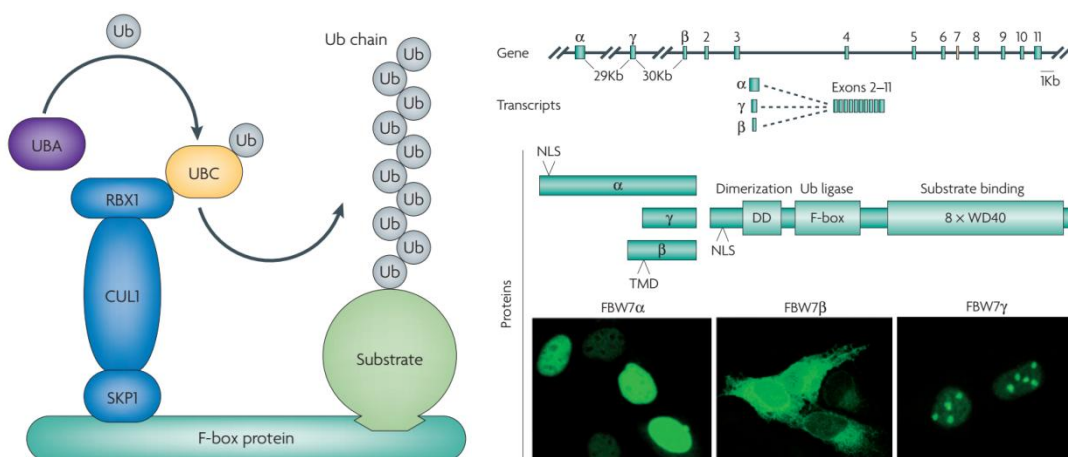


图 4 SCF 复合体 (A) 和 FBW7 结构示意图 (B)

人类 FBW7 基因位于染色体 4q32，约占人类基因组 210kb，包含 4 个未编码和 13 个编码外显子。其编码的蛋白质包含了一段 WD40 重复序列、F-box 结构、5' 尾端和  $\alpha$  螺旋线性结构。其中 WD40 由 4 条反向平行的  $\beta$  链形成亲水的圆柱形空间结构从而决定了此结构可与特定底物的结合<sup>[41, 42]</sup>。人类 FBW7 蛋白质包括 3 中亚型，分别为 FBW7 $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ <sup>[43]</sup>。这 3 种亚型基因均位于 4 号染色体，含有 D-domain、F-box 结构及 WD40 重复序列，且其 C 端均含有编码 F-box 与底物识别序列的 10 个外显子，这保证了每种亚型均可识别特异性底物并进行泛素化修饰（图 4 B）<sup>[35, 44]</sup>。所不同的是，其 N 端特异的结构序列决定了功能定位：FBW7 $\alpha$  主要位于细胞浆，FBW7 $\beta$  位于细胞核，FBW7 $\gamma$  位于核仁。由于其定位不同，因此 3 种 FBW7 亚型在功能上也存在差异：由于 FBW7 $\alpha$  在人体中表达含量最多，其变异几率较高且存在多种变异形式，因而在包括肿瘤组织在内的人类组织中发挥调控细胞周期等作用；FBW7 $\beta$  则仅在非增值性组织（如脑和骨骼肌）和某些肿瘤组织中表达并维持细胞稳定和调控细胞衰老的作用；而对 FBW7 $\gamma$  的研究较少，目前发现其常与其他两种亚型协同对多种底物进行降解<sup>[45]</sup>。

目前针对 FBW7 上游调控的研究主要从转录因子和 microRNAs 两个方面阐释。乳腺癌细胞中，转录因子 CCAAT 增强子结合蛋白  $\delta$  (C/EBP $\delta$ ) 可直接与 FBW7 启动子结合，干扰其转录过程抑制 FBW7 基因表达，同时活化 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，促进 HIF-1 $\alpha$  表达进而介导肿瘤细胞的缺氧适应和侵袭转移<sup>[46]</sup>。另外，人腺病毒产物 E1A 与 PS (Presenilins) 也会在 FBW7 基因转录水平进行调控。相比之下，针对 microRNAs 影响 FBW7 表达与功能的研究则较为深入<sup>[47]</sup>。microRNAs 是平均长度

为 22bps 的短核苷酸序列，其主要与转录产物互补结合抑制目的基因的表达<sup>[48]</sup>。目前已发现 miR-223 和 miR-27a 等 microRNAs 参与 FBW7 的转录调控<sup>[49, 50]</sup>。除上述负性调控外，SGK1 (serum/glucocorticoid-inducible kinase 1) 可通过 Notch 信号通路介导的 FBW7 正性调节作用<sup>[51]</sup>。这些结果表明：FBW7 上游调控信号可有多种分子参与，而这些信号可影响 FBW7 转录、翻译及翻译后修饰等一系列过程进而改变 FBW7 下游的信号分子与靶蛋白，最终引起细胞功能的改变。

作为肿瘤抑制因子之一，FBW7 的表达改变可直接影响下游靶分子的含量并进一步引起细胞功能的改变。明确 FBW7 参与的生物学功能调控对进一步揭示肿瘤的发生发展和演变具有重要意义。其介导的生物学作用主要有以下几个方面：

1) 细胞周期：Cyclin E 可与 Cdk2 结合并调控 G<sub>1</sub> 期向 S 期的转变，而作为细胞周期的主要因子，Cyclin E 蛋白表达水平和激酶活性主要由泛素-蛋白酶体途径调控，p53 与 FBW7 通路的失活可引起 Cyclin E 蛋白的降解进而引起细胞的恶性增殖<sup>[52-54]</sup>；FBW7 介导的 c-myc 蛋白降解可使处于分裂间期的细胞提前进入 S 期进行分裂并影响负性调节细胞糖代谢过程<sup>[55]</sup>；FBW7 同样可负性调节 Notch 蛋白，通过 Notch PEST 结构域磷酸化实现两者间的结合并介导其降解进而调控细胞周期<sup>[56-58]</sup>。此外，KLF5<sup>[59]</sup>、c-myc<sup>[60]</sup>及 c-Jun<sup>[61]</sup>等可作为 FBW7 底物参与其介导的细胞周期调控，引起肿瘤的恶性增殖。

2) DNA 损伤与细胞凋亡：FBW7 可作为 p53 上游信号信号调控有丝分裂并抑制细胞的增殖<sup>[62]</sup>；FBW7 可将磷酸化修饰的 TGIF1 (TGF $\beta$ -induced factor 1) 进行泛素化修饰并降解，后者可负性调控 TGF $\beta$  信号通路引起细胞凋亡和分化<sup>[63]</sup>；Mcl-1 属抗凋亡蛋白 Bcl-2 家族成员，通过阻断促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 实现细胞的抗凋亡作用，FBW7 可将 GSK3 $\beta$  磷酸化修饰的 Mcl-1 降解并促进细胞凋亡<sup>[64, 65]</sup>。

3) 肿瘤细胞耐药：NSCLC 中 FBW7 介导的肿瘤细胞耐药主要通过 Mcl-1 实现，即对于 EGFR TKIs 耐药的 NSCLC 不依赖于经典的 PI3K/AKT 与 MEK/ERK 信号通路，而通过抑制 Mcl-1 蛋白的降解阻断细胞的凋亡，实现肿瘤细胞的耐药<sup>[65, 66]</sup>。

4) 细胞侵袭转移：目前 FBW7 在肿瘤细胞中的细胞侵袭转移作用存在争议，在成神经管细胞瘤中，FBW7 可在 GSK3 $\beta$  的参与下通过对 SOX9 的降解实现肿瘤的侵袭转移<sup>[67]</sup>；下调肝外胆管癌细胞中 FBW7 表达水平可促进肿瘤细胞获得干性并引起 EMT 过程，实现肿瘤的侵袭和转移<sup>[68]</sup>。然而有实验表明 FBW7 表达降低可抑制细胞

转移<sup>[69]</sup>。因此，进一步阐释 FBW7 在肿瘤细胞中的侵袭转移作用，明确 FBW7 引起细胞转移的信号通路和作用机制对抑制肿瘤转移具有重要意义。

# 正文

## 第一部分 FBW7 在非小细胞肺癌中的表达及意义

### 1 实验材料

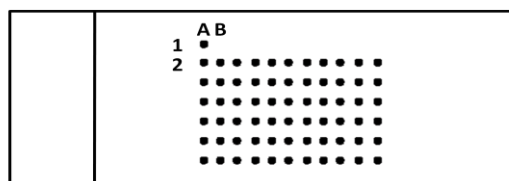
#### 1.1 NSCLC 大体组织标本

所有组织来自于第四军医大学唐都医院胸外科，经充分检查后确诊或部分疑似病例，行开胸或胸腔镜下取得肺癌手术标本组织，手术时间为 2015-2017。肺癌组织为术中可见病变部位（借助 CT 进行定位及定性）；正常组织为术中切除肿瘤组织旁 2cm 肺组织。取少许术中组织进行病理学检查，均证实为非小细胞肺癌组织及正常肺组织。本实验涉及大体组织均经第四军医大学伦理委员会批准，充分告知患者及其家属后获取。男性病例 3 人，女性病例 5 人，平均年龄为 57.4 岁，病理类型均为腺癌。将组织标本储存于液氮中用于后续 Western blot 实验。

#### 1.2 NSCLC 组织芯片

非小细胞肺癌组织芯片有第四军医大学唐都医院胸外科景鹏宇博士提供（图 1-1），芯片中所含组织标本来自开胸或胸腔镜下取得的肺癌组织，手术时间在 2010-2017 年之间，并经病理组织染色证实为 NSCLC。将肿瘤组织和正常肺组织固定包埋，制成组织芯片用于后续研究。组织芯片包含 64 例 NSCLC 标本，每例含 2 组肿瘤组织和 1 组正常肺组织（肿瘤组织旁 2cm 肺组织定义为正常肺组织，与肿瘤组织进行对比）。本芯片用于回顾性分析非小细胞肺癌患者肿瘤分期分级、淋巴结转移、预期预后和相关分子表达水平。

Raw : Column=7:11  
 1placenta spot as a positive control  
 Total cases: 64  
 Paired cases: 61



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Blank										
2	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor
3	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor
4	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	
6	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	
7	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	

图 1-1 NSCLC 组织芯片示意图

### 1.3 细胞

Beas2B	购自 ATCC (美国)
H345	购自 ATCC (美国)
H446	购自上海细胞库 (中国)
H520	购自 ATCC (美国)
H460	购自 ATCC (美国)
H358	购自 ATCC (美国)
A549	购自 ATCC (美国)
H1299	购自 ATCC (美国)

### 1.4 试剂、设备及耗材

RPMI 1640 培养液	Hyclone 公司 (美国)
DMEM 培养液	Hyclone 公司 (美国)
胰酶	Hyclone 公司 (美国)
胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)	Gibco 公司 (美国)
青霉素/链霉素	Hyclone 公司 (美国)
RIPA 裂解液 (强效)	碧云天生物技术研究所 (中国)
蛋白酶/磷酸酶抑制剂 (Cocktail)	Roche 公司 (瑞士)
BCA 蛋白定量试剂盒	Takara 公司 (日本)
5×上样缓冲液	碧云天生物技术研究所 (中国)

Tris	MP Biomedicals 公司 (美国)
甘氨酸	MP Biomedicals 公司 (美国)
SDS	MP Biomedicals 公司 (美国)
丙烯酰胺	MP Biomedicals 公司 (美国)
甲双叉丙烯酰胺	碧云天生物技术研究所 (中国)
过硫酸铵	碧云天生物技术研究所 (中国)
TMEMD	MP Biomedicals 公司 (美国)
甲醇	天津富宇精细化工有限公司 (中国)
预染蛋白 Marker	Fermentas 公司 (加拿大)
NC 膜 (硝酸纤维素膜)	Millipore 公司 (美国)
Tween20	科昊生物工程有限责任公司 (中国)
BSA	MP Biomedicals 公司 (美国)
发光试剂盒	Millipore 公司 (美国)
兔抗 FBW7 抗体	Santa Cruz 公司 (美国)
兔抗 E-cadherin 抗体	Cell Signaling Technology 公司 (美国)
鼠抗 $\beta$ -actin 抗体	Sigma 公司 (美国)
HRP 标记羊抗兔 IgG	Cell Signaling Technology 公司 (美国)
HRP 标记羊抗鼠 IgG	Cell Signaling Technology 公司 (美国)
发光用胶片	Canon 公司 (日本)
显影粉	科昊生物工程有限责任公司 (中国)
定影粉	科昊生物工程有限责任公司 (中国)
超净工作台	亚泰科隆仪器技术有限公司 (中国)
细胞培养箱	Thermo 公司 (美国)
细胞培养皿 (6cm)	Thermo 公司 (美国)
细胞培养皿 (10cm)	Thermo 公司 (美国)
移液器	Gilson 公司 (美国)
负压吸引泵	其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)
高压灭菌锅	TOMY 公司 (日本)

电子天平	上海良平仪器仪表有限公司（中国）
磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司（中国）
纯水净化仪	Millipore 公司（美国）
WB 电泳仪	上海天能科技有限公司（中国）
SDS-PAGE 电泳槽	上海天能科技有限公司（中国）
SDS-PAGE 转膜槽	上海天能科技有限公司（中国）
玻璃板	上海天能科技有限公司（中国）

## 2 实验方法

### 2.1 FBW7 生物信息学分析

分析 FBW7 在 NSCLC 蛋白水平表达差异, 从 Kaplan Meier-plotter 网站获取数据, 回顾性分析 1145 例患者的总生存期 (Overall Survival, OS) 及 596 例患者的无进展生存期 (Progression-Free Survival, PFS), 评估患者预后与 FBW7 蛋白表达差异间的关系及相关性。因本部分涉及生物信息学相关知识, 专业性较强, 故本部分内容由第四军医大学西京医院肿瘤科张潇怡硕士协助完成。

### 2.2 NSCLC 组织芯片免疫组织化学染色

#### 2.2.1 免疫组织化学实验操作步骤, 具体如下:

- (1) 制片: 获取临床标本并有效保存, 由第四军医大学病理教研室完成制片;
- (2) 烤片: 将制备完成的芯片平置于烤片机上, 65-70℃烤片 30min;
- (3) 脱蜡: 按不同浓度配置二甲苯 I/II 溶液, 通风橱中室温静置备用。将烤干的组织芯片置于二甲苯 I/II 溶液中过缸, 每次 15min, 然后依次放入浓度分别为 100%、95%、75% 和 50% 的乙醇溶液中水化, 每次 5min;
- (4) 抗原修复:
- (5) 封闭: 因修复抗原后内源性过氧化物酶对实验结果产生影响, 故将抗原修复后的芯片置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中室温孵育 30min 以封闭内源性过氧化物酶;
- (6) 血清封闭: 用 PBS 溶液轻柔冲洗芯片 3 次, 每次 5min, 用免疫组化专用记号笔圈出带有组织标本的区域以防止液体外流, 在区域内滴加正常山羊血清, 左右轻柔晃动以均匀覆盖标本, 室温孵育 30min;



(7) 一抗杂交: 根据所选用抗体公司推荐的 IHC 抗体应用浓度进行本步骤。轻柔去除玻片上的山羊血清, 滴加 BSA 稀释的 FBW7 抗体 (1:100-1:200), 均匀覆盖芯片中的标本组织, 放入玻片槽中移入 4℃ 冰箱中低温过夜保存;

(8) 二抗杂交: 将玻片取出后用 PBS 室温冲洗 3 次, 每次 5min, 滴加 SP 试剂盒中的抗兔二抗及辣根过氧化物酶底物, 室温孵育 60min;

(9) 显色: 运用 DAB 显色法进行显色。用 PBS 室温冲洗 3 次, 每次 5min, 在标本区域内逐滴滴加 DAB 显色液, 并在显微镜下观察, 待达到预期显色程度时及时终止显色;

(10) 复染: 为增加目的蛋白分子与背景间的对比, 对芯片进行苏木素复染。在冲洗净的芯片组织中滴加苏木素染液, 室温孵育 3min, 用自来水轻柔冲洗玻片背面及两侧, 洗去多余染液;

(11) 脱水: 将玻片依次通过 75%、95% 和 100% 的乙醇溶液以去除组织内多余的液体;

(12) 透明: 依次通过二甲苯 I/II 溶液透明并在组织一侧滴加中性树胶, 将盖玻片轻柔放置在一侧缓慢盖住组织, 去除气泡, 完成封片。

## 2.2.2 免疫组织化学实验结果判读

本部分芯片处理由谷歌生物科技有限公司完成, 涉及芯片染色剂扫描、软件分析和相应结果判读均由该公司提供技术支持。。

## 2.3 细胞实验相关方法

### 2.3.1 细胞复苏

用 75% 酒精擦拭细胞培养所用材料和耗材, 将其置于细胞超净台中紫外灯灭菌 30min 以上。从液氮中取出所用细胞, 认真核对后立即放入 37℃ 水浴锅中迅速复温。待细胞悬液变为液态时放入离心机内 800rpm 离心 5min。将离心后的细胞冻存管移入细胞超净工作台中, 取酒精棉球擦拭冻存管, 用镊子小心拧开冻存管盖, 吸除管内多余液体。用移液器吸取 1ml 含有 10% 胎牛血清和青霉素/链霉素双抗的细胞培养液 (根据不同细胞选用不同的细胞培养液) 吹悬冻存管底的细胞沉淀, 轻柔吹打数次制成单细胞悬液, 将无细胞团块的复苏细胞悬液移至 6cm 细胞培养皿中, 添加 3ml 细胞培养液, 十字交叉摇晃轻柔混匀细胞。做好标记后置于含 5%CO<sub>2</sub> 的 37℃ 细胞培养箱中常规培养。次日观察细胞培养液颜色并在显微镜下观察细胞形态、活力及贴

壁情况，更换培养液继续培养。

### 2.3.2 细胞培养

因本课题所用细胞来源明确，故采用 ATCC 推荐的细胞培养方法进行细胞培养。Beas2B 为正常肺支气管上皮细胞，使用含 10%FBS 和 1%双抗的 DMEM 培养液进行培养。H345、H446、H520、H460、H358、A549 和 H1299 等 7 中 NSCLC 细胞系均使用 10%FBS 和 1%双抗的 RPMI1640 培养液进行培养。待细胞融合度达到 80%-90% 时，用预冷的 PBS 缓冲液轻柔冲洗细胞 2-3 次以去除死亡细胞和背景，加入 1-2ml 预冷的 0.05%胰酶并放入细胞培养箱内消化。1-2 分钟后镜下观察细胞形态呈圆形且漂浮后，加入适量细胞培养液轻柔吹打，制备成单细胞悬液，以 1:3 比例进行传代。传代比例可根据细胞生长状态和实验需要调整。

### 2.3.3 细胞冻存

为保证细胞复苏的成功率，冻存时应确保细胞良好状态。细胞培养至良好状态时，提前更换细胞培养液。次日待细胞长至 80%-90%时，用预冷 PBS 冲洗 2-3 次，加入 1-2ml 胰酶静置于孵箱中消化细胞。3-5min 后轻轻摇晃培养皿，待细胞悬浮后加入含血清培养液终止消化，将细胞悬液移至 15ml 无菌离心管中，做好标记后放入离心机内 800rpm 离心 5min。将离心管转移至细胞操作台内，酒精擦拭后将离心管管盖打开，吸除上清液后，用移液器加入 1-2ml 细胞冻存液，轻柔吹悬制成单细胞悬液，移至干净的冻存管中，盖紧冻存管盖并做好标记后迅速移至-20℃冰箱，采用阶梯降温法进行细胞冻存。待 2h 后，将冻存管移至-80℃保存至少 24h 并尽快置于液氮中长期保存。

## 2.4 Western blot

### 2.4.1 细胞蛋白的提取和保存

为明确细胞内某些分子在蛋白水平的表达差异和含量变化，遂裂解细胞并提取细胞蛋白进行 western blot 检测。选取处于对数生长期的状态良好的细胞，用预冷的 PBS 冲洗 2-3 次以去除培养液对后续试验的影响。向细胞培养皿中加入 1ml 预冷的 PBS，用干净刮匙刮取贴壁细胞。将细胞转移至干净的 2mlEP 管中，置于 4℃离心机中，12000rpm 离心 1min。将 EP 管中的细胞上清液吸净，根据细胞沉淀的量加入适量含 cocktail 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，轻柔吹打重悬细胞，置于冰上裂解 20min。以 40-50Hz 强度超声裂解后继续冰上静置 10min。将 EP 管置于 4℃离心机中，

12000rpm 离心 10min，上清液即为提取的细胞裂解液。可置于-80℃保存 1-3 天。

#### 2.4.2 组织蛋白的提取和保存

从液氮中取出待检测的肺组织，室温融化后置于电子天平上称取适量组织块，去除多余脂肪组织和血凝块，用眼科剪将组织剪碎后置于研磨器内，加入适量含有 cocktail 的强效 RIPA 充分研磨。待基本无肉眼可见组织时将裂解液移至 EP 管中，冰上裂解 20min。以 40-50Hz 强度超声裂解后继续冰上静置 10min。将 EP 管置于 4℃离心机中，12000rpm 离心 10min，上清液即为提取的细胞裂解液。可置于-80℃保存 1-3 天（注：因取材等问题，组织中可能含有较多的脂肪组织影响后续试验，因此吸取上清时尽量避免吸取脂肪等杂质）。

#### 2.4.3 蛋白制样

采用 TaKara 公司的 BCA 蛋白定量试剂盒进行本操作。将预冷的试剂盒中的 A 试剂和 B 试剂按 50:1 的比例均匀混合，根据提取蛋白样品数量向清洁的 96 孔板中各加入 200 $\mu$ l 混合液，置于冰上备用。向其中 5 个孔内依次加入 0mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml 和 2 mg/ml 蛋白标准品各 10 $\mu$ l，其余孔内加入提取的蛋白样品 2 $\mu$ l，置于 37℃孵箱中反应 30min。在酶标仪上读取待测样品在 550nm 处的吸光值，并根据标准蛋白样品的吸光度值绘制蛋白标准曲线，计算各蛋白样品的蛋白浓度。向各组蛋白样品中加入总体积 1/5 的 5 $\times$ loading buffer，充分震荡混匀后置于 100℃环境中煮沸变性 10min，冷却至室温后低速离心，保存于-20℃冰箱或-80℃长期保存。

#### 2.4.4 缓冲液制备

缓冲液	试剂制备比例	备注
PBS	NaCl(8.0g)+KCl(0.2g)+Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1.44g)+ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.24g)	pH7.4，定容至 1L
电泳缓冲液	Tris (3.02g)+甘氨酸(14.4g)+SDS (4.0g)	定容至 1L
转膜缓冲液	Tris (3.02g)+甘氨酸(14.4g)	定容至 1L
30%AB	丙烯酰胺(29g)+甲双叉丙烯酰胺(1g)	定容至 100ml
10%SDS	SDS (5g)	定容至 50ml
10%AP	过硫酸铵(1g)	定容至 10ml

#### 2.4.5 凝胶制备

分离胶（下层）	1.5M Tris	1ml	将各溶液混匀后迅速向玻璃板内灌胶，加入适宜量后异丙醇压低液面，静置 10-30min（环境温度不同，凝胶速度各异）
	H <sub>2</sub> O	1.62ml	
	30%AB	1.34ml	
	10%SDS	40μl	
	10%AP	40μl	
	TEMED	6μl	
浓缩胶（上层）	1M Tris	0.5ml	将异丙醇倒净，将各溶液混匀后立即加入并迅速插入相应孔道的梳子，室温静置 10-30min 待凝固。4℃湿润保存。
	H <sub>2</sub> O	1ml	
	30%AB	0.4ml	
	10%SDS	20μl	
	10%AP	20μl	
	TEMED	3μl	

#### 2.4.6 蛋白电泳

将蛋白电泳装置按要求组装，将电泳缓冲液倒入装置中（注：内外层应无液体接触以防止短路），沿垂直方向拔出梳子。从冰箱中取出待检测蛋白样品，室温融化，低速离心。上样前轻弹管壁以充分混匀，每孔道内加入总量 20-30μg 样品及预染的蛋白 marker 以标记分子量大小，各孔以 1×loading buffer 补齐。插好电极盖好电泳槽，打开电泳仪开关进行电泳。采用恒压电泳，即 120V 电压。待肉眼可见蓝色标记物（loading 中的溴酚蓝染液）移动至凝胶适宜位置时关闭电源，准备进行后续实验操作步骤。

#### 2.4.7 转膜

打开电泳槽，将电泳液倒出后取下玻璃板，用薄板轻柔取下凝胶。打开转膜夹，按照黑面在下白面在上的顺序摆放，依次将海绵垫、4 层滤纸、SDS-PAGE 凝胶、NC 膜、4 层滤纸和海绵垫压紧，各层间不留气泡。固定转膜夹并移至转膜槽中，向转膜槽中加入冰盒并倒满转膜液，插好电极盖好转膜槽，向转膜槽四周填充冰块后以 300mA 恒流转膜，转膜 1.5h 后准备进行后续实验操作步骤。

#### 2.4.8 封闭及抗体杂交

将转膜槽取出后小心打开，逐层取出 NC 膜，将其置于配置好的丽春红染色液中 3-5min 以显示相应蛋白条带。根据预染 marker 位置及目的蛋白分子量大小裁剪适宜大小。将裁剪好的 NC 膜置于 TBST 中洗涤 1-2 次，每次 3min。将膜取出置于 5%BSA 溶液室温封闭 1h。用过 TBST 再次洗涤 NC 膜，1-2 次，每次 3min。将膜置于含有目的蛋白抗体的塑封袋中（注：抗体浓度根据抗体说明书中建议的最佳浓度配置），平放于 4℃冰箱内过夜保存。次日将抗体回收，取出 NC 膜用 TBST 洗涤 3 次，每次 3min。将漂洗过的 NC 膜置于含有相应二抗的塑封袋中，置于摇床上室温孵育 1-1.5h（注：二抗孵育时间过长会导致发光时背景过强，影响目的条带的显影）。

#### 2.4.9 发光显影

将 NC 膜从二抗中取出，置于 TBST 中漂洗 3 次，每次 3min。避光条件下将发光试剂盒中的 A 液和 B 液等体积混合，置于冰上。将 NC 膜、发光液、胶片及其他材料一同带入暗室进行曝光。将膜置于发光盒上滴加发光液黑暗中观察显影，待观察到目的条带后压片显影，将 X 线片一次放入显影液和定影液中，得到预期条带。将 X 线片流水冲洗并烘干。用电子扫描仪获取图像，ImageJ 软件分析所得目的条带灰度并进行统计。

#### 2.5 统计学分析

本部分涉及实验均重复 3 次，组间差异比较采用 t 检验。\*P<0.05 认为有统计学意义。

### 3 实验结果

#### 3.1 FBW7 在 TCGA 数据库中的表达和变异

为明确 FBW7 在 NSCLC 中的表达和变异情况，我们在 TCGA 数据库中查询了 FBW7 在 mRNA 水平的变化情况（图 1-2）。结果显示：FBW7 在 mRNA 水平的变化主要包括以下 4 种变化，即点突变、缺失、扩增和多种变异同时存在的情况。FBW7 基因的点突变主要集中在肺癌腺癌，突变频率约为 5%。而基因的扩增和缺失也多见于肺腺癌。这说明 FBW7 基因在 mRNA 水平的变化主要集中于 NSCLC 中的腺癌，其变异程度呈多样性，但以点突变为重。此结论可在多种数据库内得到验证，因此我们将后续研究重点集中在肺腺癌。

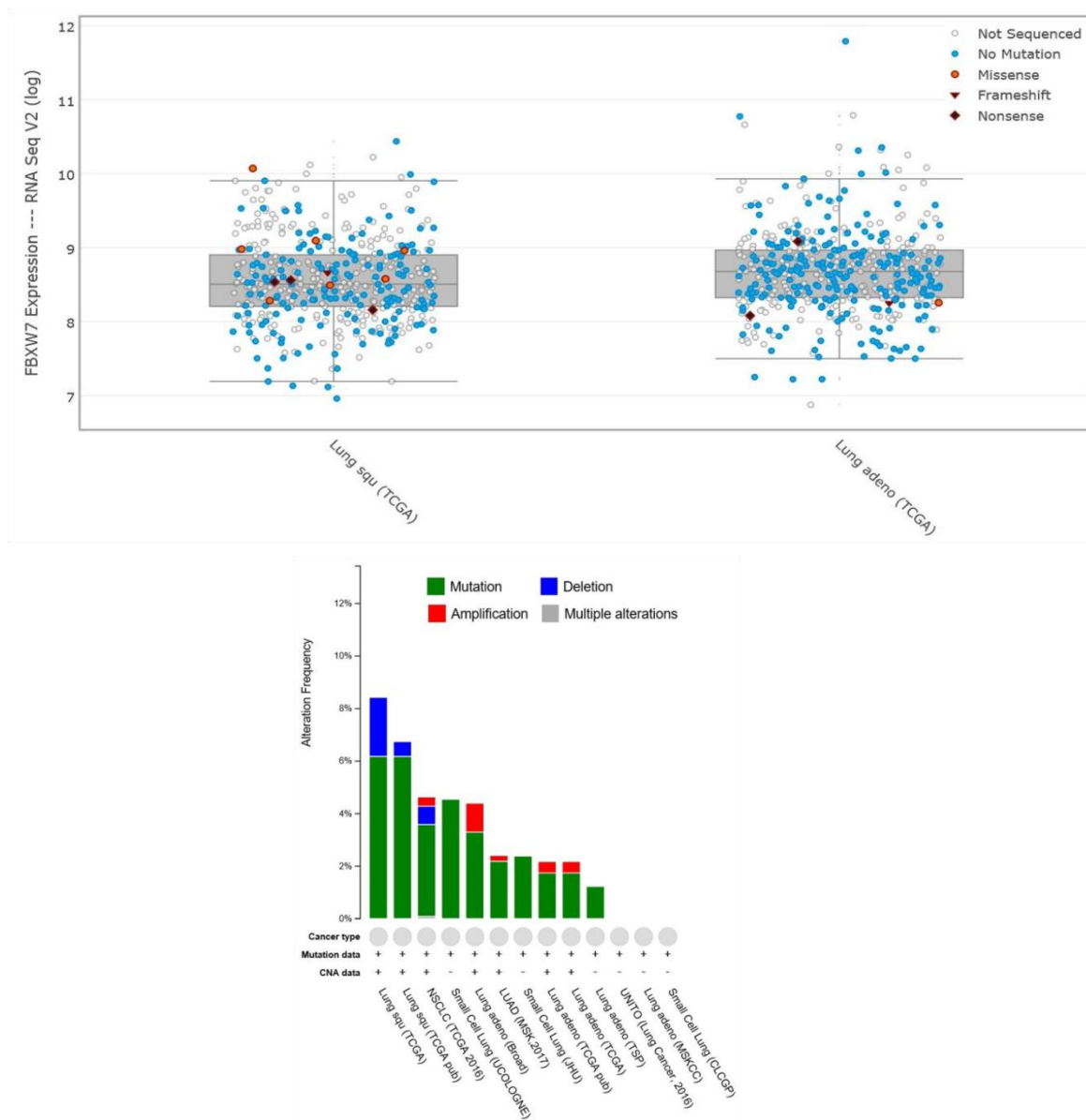


图 1-2 TCGA 数据库分析 FBW7mRNA 在 NSCLC 中表达和变异

### 3.2 FBW7 蛋白水平表达差异与 NSCLC 患者生存及远期预后的关系

由于 FBW7 在 NSCLC 中作为抑癌基因发挥作用，既往研究也证实了 FBW7 的抑癌作用，因此 FBW7 表达变化可作为 NSCLC 患者远期预后的评价指标。由于 TCGA 数据库在 mRNA 水平对各分子的表达差异进行分析，因此我们在 [www.kmplot.com](http://www.kmplot.com) 网站进行 FBW7 蛋白表达差异分析（图 1-3）。结果显示：对 1145 例 NSCLC 患者进行 FBW7 检测及总生存期（overall survival, OS）分析，FBW7 高表达患者总生存期较 FBW7 低表达患者明显延长。对 596 例 NSCLC 患者的无进展生存期（progression free survival, PFS）分析，可得到相似的结论。这些结果与既往研究一致，FBW7 可

作为抑癌基因在细胞组织内发挥作用，其表达增高提示良好的远期预后，患者的 OS 及 PFS 较 FBW7 低表达患者显著延长。这为我们进一步的研究提供较为充分的依据。

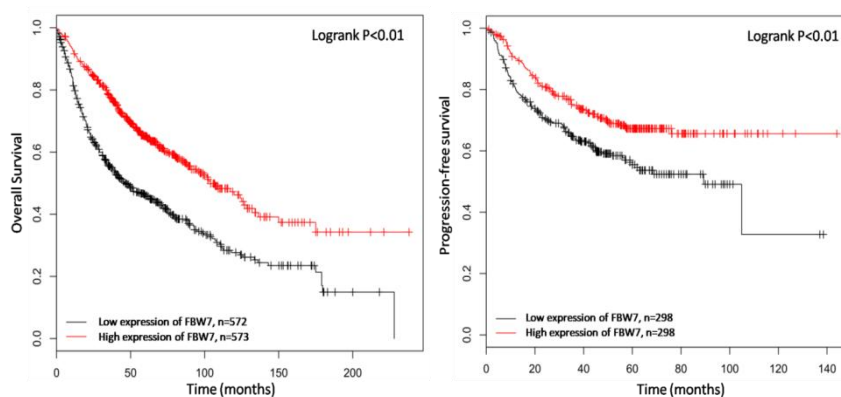
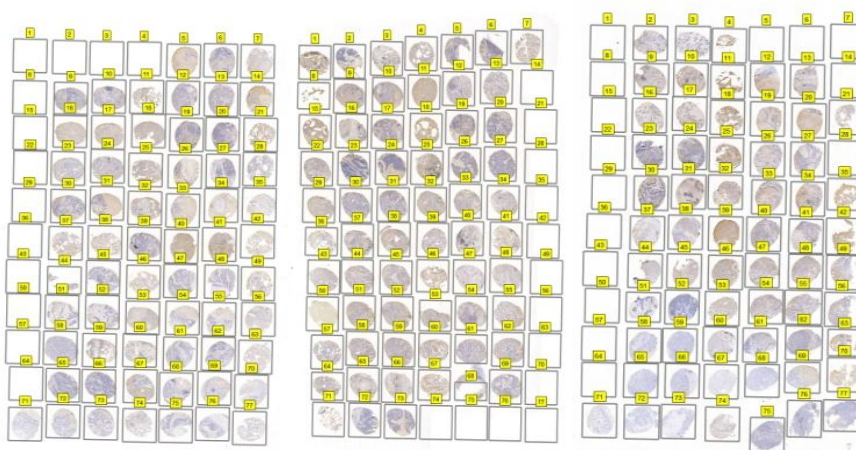


图 1-3 FBW7 表达差异与 NSCLC 患者远期预后的关系

### 3.3 NSCLC 组织芯片中 FBW7 的表达

我们接下来利用 NSCLC 组织芯片对肿瘤组织和正常肺组织中的 FBW7 蛋白进行检测。由第四军医大学唐都医院胸外科景鹏宇博士提供组织芯片标本，共 64 例 NSCLC 患者的标本，每例肿瘤组织 2 组和正常肺组织 1 组，因 3 例患者的正常肺组织缺失，故通过免疫组化实验实际检测 61 例患者 FBW7 的表达差异，组化结果通过 H-score 进行评分（图 1-4）。结果显示：相当部分患者肿瘤组织标本中的 FBW7 表达水平较其正常肺组织明显降低。对全部 61 例患者 FBW7 表达水平进行统计，FBW7 在正常肺组织与肿瘤组织中表达存在明显差异。组化结果可清晰显示这一结论。但值得注意的是，所有标本中 FBW7 表达水平不高，除去抗体效价和 IHC 操作因素影响，FBW7 在肿瘤组织和正常肺组织内的低表达也会引起这种现象。这对于后续细胞实验提出了挑战。





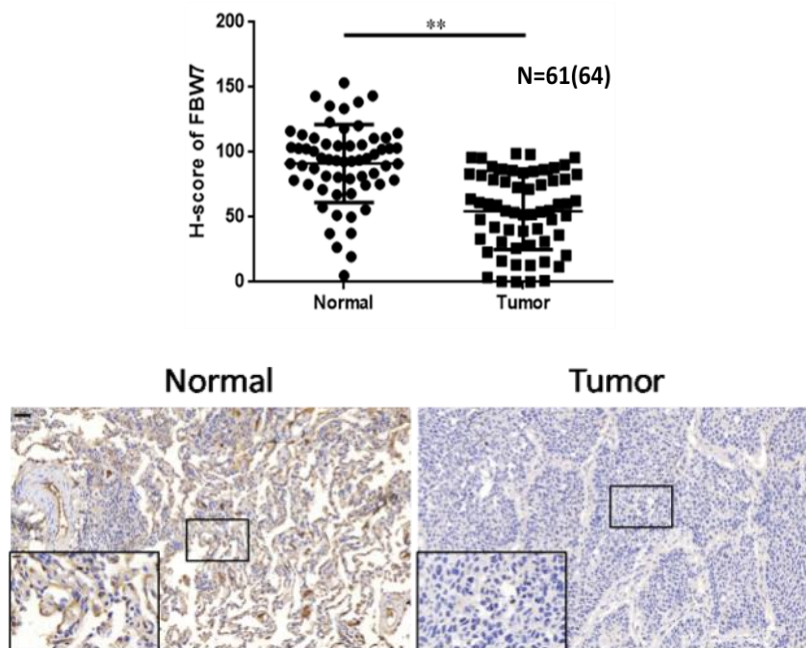


图 1-4 NSCLC 组织芯片中 FBW7 的表达

### 3.4 FBW7 作为抑癌基因在 NSCLC 中的表达差异与肿瘤转移

FBW7 在 mRNA 水平的差异提示在蛋白水平检测 FBW7 表达更具临床实用价值。作为一种潜在的抑癌基因，其表达产物蛋白分子是否也能对肿瘤的发生发展产生影响呢？部分研究证实 FBW7 缺失后肿瘤获得更强的侵袭转移能力，这一现象是否通过 EMT 而发生呢？我们从进行手术的临床 NSCLC 患者肿瘤与正常肺组织进行活组织检查，并将部分标本进行实验室检查。提取蛋白后进行 Western blot 检测(图 1-5)。**结果显示：**在 8 组临床标本中，肿瘤组织内 FBW7 表达水平明显高于肿瘤组织，作为上皮间质转化的标志物之一的 E-cadherin 的变化与 FBW7 表达一致。对 WB 结果进行统计学分析，正常组织（红色）与肿瘤组织（黑色）在同一统计图中展示，两者间存在相关性并绘制出拟合曲线， $r=0.6161$ 。以上结果说明肿瘤组织中 FBW7 蛋白表达明显低于正常肺组织，且 FBW7 表达的变化可能是引起肿瘤侵袭转移能力变化的一个重要原因。但应注意的是，本实验中涉及临床标本较少，难以满足大数据背景下对分子相关性的研究，只能对 FBW7 与 EMT 作相关性的简单分析，两者间具体的相关性需要扩大样本量并从多角度进行统计学分析。



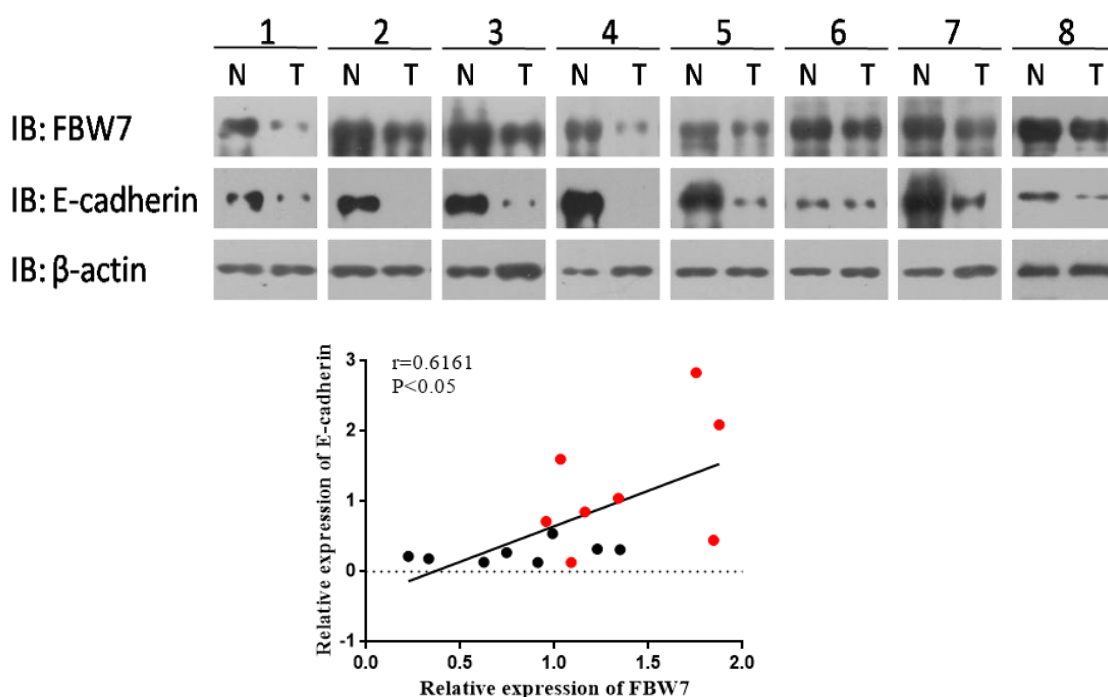


图 1-5 临床标本中 FBW7 与 E-cadherin 间的表达与关系

#### 4 讨论

本部分研究首先阐述了 FBW7 在 NSCLC 中的表达，从 TCGA 数据库入手着重探讨 FBW7 在 mRNA 水平的改变与肿瘤发生发展的关系，发现 FBW7 在 mRNA 水平的变化主要为点突变，在肺腺癌中这一突变率达 5%。但值得注意的是，mRNA 水平的变化不足以解释 FBW7 对远期预后的影响，且从蛋白水平对 FBW7 在 NSCLC 患者的分析中可知，FBW7 蛋白表达水平的高低更可能影响患者的远期预后。运用 Western blot 方法对 NSCLC 患者的大体标本进行分析可知，相较于正常肺组织，肿瘤组织内 FBW7 表达明显降低，且这一过程中提示肿瘤侵袭转移变化的 E-cadherin 蛋白亦发生改变。因此我们将研究重点放在对 FBW7 蛋白水平表达的研究及其与肿瘤侵袭转移功能方面的研究。

作为肿瘤发生发展的抑制因子之一，FBW7 参与到许多重要癌蛋白的修饰和降解过程中。大量研究结果表明，FBW7 可降解多种与细胞周期、增殖和分化有关的癌蛋白。因此，充分了解 FBW7 对这些蛋白分子的作用并阐释其生物学功能对于揭示 FBW7 介导细胞转化和肿瘤发生发展具有重要意义。目前针对 FBW7 引起肿瘤细

胞侵袭转移能力的变化的相关研究存在分歧。在成神经管细胞瘤中，FBW7 可对 SOX9 蛋白进行泛素化修饰，在 GSK3 激酶的参与下通过蛋白酶体途径对其进行降解，下调 FBW7 的表达可促进肿瘤转移。mTOR 可作为上皮间质转化的启动因子之一，下调 FBW7 不仅可以直接引起 mTOR 表达升高，同时也会赋予肿瘤细胞干性潜能从而获得侵袭转移的能力。从其他角度讲，作为 mTOR 下游的信号分子，ZEB1 可直接参与到 E-cadherin 的表达，FBW7/mTOR/ZEB1 信号通路亦可介导 EMT 过程而引起肿瘤的侵袭转移。而另有部分研究证实，FBW7 蛋白的升高对肿瘤细胞的转移能力具有促进作用。研究发现，p65 过表达可以通过抑制 PTENmRNA 的表达使 FBW7 免于降解，从而泛素化修饰并降解 RhoGDI $\alpha$  蛋白并最终促进膀胱癌细胞的转移。因此，针对 NSCLC 中 FBW7 对肿瘤细胞的转移作用的影响仍有待进一步研究。

本课题组在研究过程中发现，FBW7 可以影响 NSCLC 病人的远期预后，与正常组相比，存在 FBW7 变异的 NSCLC 患者的远期预后明显降低，不论是总生存期还是无进展生存期都低于正常组，这表明 FBW7 可以作为评价 NSCLC 患者预后状况的临床参考指标。但在临床应用过程中的准确性和实用性仍需进一步验证。在对肿瘤组织进行蛋白水平验证时，FBW7 在正常组织与肿瘤组织中的表达情况与数据库中获得结果类似，但由于标本数量限制和分析方法的制约，结论有待进一步验证。我们采用 Western blot 方法对正常肺组织和肿瘤组织的 FBW7 和 E-cadherin 水平进行验证发现，正常肺组织内 E-cadherin 表达水平高于肿瘤组织，其变化趋势与 FBW7 一致。这说明 FBW7 表达水平变化引起肿瘤细胞侵袭转移能力的改变与 E-cadherin 有关，而这一过程可能存在上皮间质转化。目前已经开展的研究证实了两者之间存在相关性，在多种肿瘤中已经得到验证，作为泛素连接酶系统中的重要组成部分，FBW7 对底物的识别与结合是多种癌蛋白的降解途径，而这些蛋白有部分参与到 EMT 过程中，包括 c-myc、mTOR、ZEB1 以及许多 E-cadherin 上游的转录抑制因子。这些蛋白的复杂调控过程直接影响了肿瘤细胞的侵袭转移能力变化，这为我们后续的研究提供了新的思路和方向。

## 第二部分 FBW7 表达变化对 NSCLC 侵袭转移能力的影响

### 1 实验材料

#### 1.1 细胞

A375	购自 ATCC 细胞库（美国）
MDA-MB-435S	购自 ATCC 细胞库（美国）
A549	购自 ATCC 细胞库（美国）
H1299	购自 ATCC 细胞库（美国）
HEK293	购自上海细胞库（中国）

#### 1.2 试剂、设备和耗材

RPMI 1640 培养液	Hyclone 公司（美国）
DMEM 培养液	Hyclone 公司（美国）
胰酶	Hyclone 公司（美国）
胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS）	Gibco 公司（美国）
青霉素/链霉素	Hyclone 公司（美国）
细胞培养皿（60mm/100mm）	Thermo 公司（美国）
Transwell 小室及 24 孔板	Corning 公司（美国）
RIPA 裂解液（强效）	碧云天生物技术研究所（中国）
蛋白酶/磷酸酶抑制剂（Cocktail）	Roche 公司（瑞士）
BCA 蛋白定量试剂盒	Takara 公司（日本）
5×上样缓冲液	碧云天生物技术研究所（中国）
Tris	MP Biomedicals 公司（美国）
甘氨酸	MP Biomedicals 公司（美国）
SDS	MP Biomedicals 公司（美国）
丙烯酰胺	MP Biomedicals 公司（美国）

甲双叉丙烯酰胺	碧云天生物技术研究所（中国）
过硫酸铵	碧云天生物技术研究所（中国）
TMEMD	MP Biomedicals 公司（美国）
甲醇	天津富宇精细化工有限公司（中国）
预染蛋白 Marker	Fermentas 公司（加拿大）
NC 膜（硝酸纤维素膜）	Millipore 公司（美国）
Tween20	科昊生物工程有限责任公司（中国）
BSA	MP Biomedicals 公司（美国）
发光试剂盒	Millipore 公司（美国）
兔抗 FBW7 抗体	Santa Cruz 公司（美国）
兔抗 E-cadherin 抗体	Cell Signaling Technology 公司（美国）
兔抗 Snail 抗体	Cell Signaling Technology 公司（美国）
兔抗 Slug 抗体	Cell Signaling Technology 公司（美国）
兔抗 Vimentin 抗体	Cell Signaling Technology 公司（美国）
鼠抗 $\beta$ -actin 抗体	Sigma 公司（美国）
鼠抗 Flag 标签蛋白抗体	Abbkine 公司（美国）
鼠抗 Myc 标签蛋白抗体	Abbkine 公司（美国）
HRP 标记羊抗兔 IgG	Cell Signaling Technology 公司（美国）
HRP 标记羊抗鼠 IgG	Cell Signaling Technology 公司（美国）
发光用胶片	Canon 公司（日本）
显影粉	科昊生物工程有限责任公司（中国）
定影粉	科昊生物工程有限责任公司（中国）
超净工作台	亚泰科隆仪器技术有限公司（中国）
细胞培养箱	Thermo 公司（美国）
Oridonin	Selleckchem 公司（美国）
MG132	Selleckchem 公司（美国）
移液器	Gilson 公司（美国）
负压吸引泵	其林贝尔仪器制造有限公司（中国）

高压灭菌锅	TOMY 公司（日本）
电子天平	上海良平仪器仪表有限公司（中国）
磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司（中国）
纯水净化仪	Millipore 公司（美国）
WB 电泳仪	上海天能科技有限公司（中国）
SDS-PAGE 电泳槽	上海天能科技有限公司（中国）
SDS-PAGE 转膜槽	上海天能科技有限公司（中国）
玻璃板	上海天能科技有限公司（中国）
酶标仪（Model 680 型）	Bio-Rad 公司（美国）
光学显微镜	Olympus 公司（美国）
制冰机	上海斯科茨满公司（中国）
质粒小提试剂盒	天根生化科技有限公司（中国）
Lipofectamine2000	Invitrogen 公司（美国）

## 2 实验方法

### 2.1 FBW7 shRNA 构建

#### 2.1.1 shRNA 质粒构建

shRNA（short hairpin RNA，短发卡 RNA）是下调基因表达的常用手段，在本部分实验中需构建稳定下调 FBW7 表达的相应肺癌细胞系验证 FBW7 的功能，因此构建 FBW7 shRNA 质粒和对照组 GFP shRNA 质粒，载体骨架见图 2-1。

shGFP:

CCGGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCGAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG  
CTTTTTT

shFBW7#1:

CCGGCCTAAAGAGTTGGCACTCTATCTCGAGATAGAGTGCCAACTCTTTAGGTT  
TTT

shFBW7#2:

CCGGTCAAACCAGGTGCAATTATTTCTCGAGAAATAATTGCACCTGGTTTGATT



LB 液态培养基	胰蛋白胨	10g	调节培养基 pH 至 7.2，定容至 1L。 高压锅蒸汽灭菌。
	酵母提取物	5g	
	NaCl	5g	
LB 固态培养基	胰蛋白胨	10g	调节 pH 至 7.2，定容至 1L。高压蒸汽灭菌后备用，待降至 50℃ 后加入抗生素并倒板备用。
	酵母提取物	5g	
	NaCl	5g	
	琼脂粉	30g	
	青霉素 (Amp)	100mg	

#### 2.1.4 单克隆获取及扩增

将 LB 平板取出后在超净工作台中用无菌 10 $\mu$ l 枪头尖端挑取肉眼可见单克隆菌落，将枪头放入 6-8ml 青霉素抗性 LB 液态培养基中，轻轻拧紧菌种盖子并置于 37℃ 摇床以 220rpm 孵育 8-12h。为节省时间，亦可先将单克隆置于 3ml 培养液中扩增，待 3h 后再扩大培养液体积。值得注意的是，挑取适宜大小的细菌菌落且挑取克隆的时间应适宜，否则极易造成质粒提取浓度降低或未能挑取目的菌种，造成时间和试剂的浪费。

#### 2.1.5 质粒提取

根据实验需要采用天根生物科技有限公司质粒小提试剂盒提取质粒，具体步骤如下：

- (1) 平衡吸附柱：向吸附柱中加入 500 $\mu$ l 平衡液 BL，12000rpm 离心 1min，倒掉管中废液，将吸附柱重新放入收集管中备用；
- (2) 裂解：将待提取的菌液依次加入到离心管中，12000rpm 离心 1min，倒净上清液。加入 250 $\mu$ l 含 RNA 酶（去除 RNA 的影响）的 P1 溶液重悬细菌沉淀，充分吹打震荡至无细菌团块；
- (3) 提基因组：向离心管中加入 250 $\mu$ l P2 溶液，轻柔混匀 6-8 次，保证基因组未被打断；
- (4) 提 DNA：向离心管中加入 350 $\mu$ l P3 溶液，轻柔混匀 6-8 次，12000rpm 离心 10min；
- (5) 吸附：将按上述步骤获得的上清液加入到预先处理的吸附柱中，12000rpm 离心 1min，将收集管中的废液倒净，将吸附柱重新置于收集管内；

- (6) 蛋白漂洗：向吸附柱内加入 500 $\mu$ l 去蛋白液 PD，12000rpm 离心 1min，将收集管中的废液倒净，将吸附柱重新置于收集管内；
- (7) 杂质漂洗：向吸附柱内加入 600 $\mu$ l 预先加入无水乙醇的 PW 溶液，12000rpm 离心 1min，将收集管中的废液倒净，将吸附柱重新置于收集管内，并重复操作一次；
- (8) 烘干：吸附柱放入收集管中，12000rpm 离心 2min 以去除吸附柱上残存的乙醇的影响（残留乙醇对后续定量有很大影响），敞开管口室温静置 5min；
- (9) 溶解：将吸附柱置于收集管中，向其中央网膜上加入 50-80 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB 以将所提取的质粒溶解，静置 5min 后，12000rpm 离心 1min，将收集到的质粒重新加入相应的吸附柱膜上再次离心。此时收集管中所得即为质粒 DNA。用酶标仪进行相应浓度测定，做好标记后置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用；
- (10) 测序：根据实验需要对所提质粒进行测序，测序交由公司处理。

## 2.2 FBW7 shRNA 慢病毒包装

为实现细胞能稳定表达下调，我们构建了慢病毒载体的 FBW7 下调 shRNA 病毒，将包装载体质粒导入 HEK293 细胞中，表达的质粒在宿主细胞内完成病毒的组装和复制，通过细胞的裂解释放入培养液中并以病毒颗粒的形式存在，具体操作步骤如下：

- (1) 细胞准备：按前述方法复苏 HEK293 细胞，待细胞密度为 40-60% 时进行后续试验；
- (2) 质粒准备：在超净工作台中准备灭菌 2ml EP 管备用，向其中加入 200 $\mu$ l Opti-MEM 培养液以去除血清影响。向其中一管中加入 4 $\mu$ g shFBW7 干扰质粒、3 $\mu$ g psPAX2 和 1 $\mu$ g pMD2.G 病毒包装质粒，另一管中按 1:2.5 比例加入 lipofectamine2000 脂质体 20 $\mu$ l；
- (3) 融合：将两管液体混合，轻弹混匀，室温静置 5min 以保证脂质体与质粒间的充分接触，尽最大可能保证脂质体将质粒包裹；
- (4) 转染：将上述混合物逐滴加入到生长状态良好的 HEK293 细胞中，轻柔晃动培养皿以防止细胞悬浮死亡，置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中，4-6h 换液并继续培养；
- (5) 获取慢病毒：病毒包装后 48h 达到产毒高峰，此时收集细胞上清液，培养皿



中添加 4ml 培养液继续培养。次日将细胞及培养液冲下与前日所得病毒液混合，轻柔吹打后，1250rpm 离心 5min，0.45 $\mu$ m 滤器过滤以除去细胞沉淀，将滤出液用 2mlEP 管收集，即为病毒液。如 7 日内使用可先置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存，否则封口后置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中长期保存（避免反复冻存影响病毒滴度和活性）；

- (6) 感染：准备待感染的细胞，细胞密度为 50%时，将收集到的病毒液与培养液以 1:1 比例混合加入到细胞培养皿内，培养 48h。值得注意的是，在感染过程中应观察细胞状态，良好的细胞状态可保证病毒感染效率；
- (7) 筛选：根据病毒载体所带标签特性和导入质粒的细胞对筛选和药物的耐受情况，加入含有 1-2 $\mu$ g/ml puromycin 培养液，轻柔混匀后继续培养细胞。维持药物浓度 2 周后，部分细胞仍存活，将次部分细胞传代培养并进行部分冻存，Western blot 检验目的分子下调效率和蛋白表达，并根据需要进行后续实验；
- (8) 注意事项：本部分操作涉及病毒有潜在感染风险，为确保安全应在省公务安全柜中完成。接触的培养皿、枪头和 EP 管等耗材应妥善处理并用次氯酸钠消毒集中丢弃。

### 2.3 Western blot

见前文所述

### 2.4 平板克隆形成实验

平板克隆形成实验是验证细胞增殖能力所采用的方法，通过不同处理检测细胞在不同环境下形成细胞集落的数量，大小和形态，对明确细胞增值能力具有一定意义。本实验中只需探求单个细胞集落的形态学表现，为对其增殖能力进行检测，具体步骤如下：

- (1) 准备：选取对数生长期的细胞，待细胞密度长至 80%时用 PBS 冲洗并常规消化离心；
- (2) 铺板：将离心后的细胞用培养液制成单细胞悬液并进行细胞计数，吸取 1000 个细胞接种于 6 孔板中并加入培养液，常规培养 1 周；
- (3) 染色：在小显微镜下观察细胞集落形态，待细胞长至适宜大小后吸除培养液，向每孔中加入 1ml 固定液，固定 30min 后吸除并加入结晶紫染液进行染色。1h 后将结晶紫染液吸除并用流水轻柔冲洗干净备用；

- (4) 拍照：将 6 孔板自然烘干后擦净底部水渍，置于倒置显微镜下观察单个细胞集落。注意观察细胞染色情况，集落大小及细胞形态。

## 2.5 Transwell 侵袭转移实验

为明确细胞在体外侵袭转移能力的变化，需进行 transwell 实验对肿瘤细胞穿透基底膜等功能进行检测。应用 matrigel 基质胶模拟基底膜结构，以血清内各种细胞因子诱导细胞转移。具体操作步骤如下：

- (1) 准备：将 matrigel 提前置于 4℃ 冰箱融化为液态备用。待检测细胞用无血清培养液培养 24h 以去除血清影响，同时保证后续试验的转移效率；
- (2) 包被：用 50mg/L matrigel 与培养液 1:8 比例稀释，取 100 $\mu$ l 稀释后的混合液加入到 transwell 小室并覆盖住小室底部，将小室置于配套的 24 孔板内，室温静置 30min（有基质胶为检测侵袭能力，无基质胶为检测转移能力）；
- (3) 制样：将待检测细胞消化离心后用无血清培养液按适当比例重悬，吸取 10 $\mu$ l 进行细胞计数。调整细胞密度至 10<sup>3</sup> 个/ml 细胞进行后续试验备用；
- (4) 加样：将小室内未凝的基质胶吸除（注意避免将已经凝固的胶层破坏），向 24 孔板底部加入 500 $\mu$ l 含血清培养液，将 transwell 小室倾斜放入孔内，注意与液面之间不留气泡，以免影响细胞的侵袭转移。在小室内加入 500 $\mu$ l 无血清培养液重悬的单细胞悬液，并置于 37℃ 细胞培养箱内孵育 24-48h；
- (5) 染色：取出 transwell 小室小心吸除上下两层的细胞培养液，并在两层内加入细胞固定液，对穿过小室的细胞进行固定。30min 后，将小室置于 4g/L 的结晶紫溶液内染色。1-2h 将小室取出并用 PBS 轻柔冲洗 1-3 次以淡化染色背景，在通风条件下自然晾干后，置于倒置显微镜下调节适宜视野大小，计数转移至小室外层的细胞个数；
- (6) 统计：每个样本随机计数 5 个视野，取均值后采用 t 检验进行统计学分析。

## 2.6 小鼠尾静脉注射

为明确肿瘤细胞在小鼠体内的侵袭转移能力和成瘤性等问题，我们构建了下调 FBW7 的 Luciferase 标记的小鼠 Lewis 肺癌细胞（具体步骤如前所述），将细胞注入小鼠尾静脉以引起细胞的转移，并观察小鼠的生存及肿瘤转移情况。具体操作如下：

- (1) 准备：从第四军医大学动物实验中心购买 5 周龄雌性 C57/BL 小鼠若干只，分笼饲养备用，构建下调 FBW7 的 luciferase 标记的小鼠 Lewis 肺癌细胞，经

Western blot 检测无误后扩大培养备用；

- (2) 获取细胞：将细胞用 PBS 缓冲液冲洗后消化离心，用培养液重悬后进行细胞计数，将细胞密度调整过至  $2 \times 10^7$  个/ml，吸取 200 $\mu$ l 单细胞悬液置于 EP 管中，冰上保存备用；
- (3) 注射：在超净工作台中，将小鼠固定于小鼠固定器内并使其尾部保持外露状态，准备温开水（水温保持在 37-40 $^{\circ}$ C 最佳）将小鼠尾部置于温水内 30-60sec 以充分扩张尾部静脉血管。尾部常规消毒擦干后，用 1ml 注射器吸取待注射的单细胞悬液，左手固定尾部位置右手持针沿静脉血管走行方向进针。轻轻抽吸未见血液回流后缓慢注射，速度过快会导致循环血量骤升引起小鼠死亡。注射后应观察小鼠状态；
- (4) 小动物成像：常规饲养小鼠，定期更换垫料并观察小鼠状态。注射后第 2 周进行小动物成像。吸取 100 $\mu$ l D-Luciferin（即荧光素酶底物）对麻醉后的小鼠进行腹腔注射，2min 后将小鼠平置于小动物成像仪内进行观察。调整曝光时间可在其尾部见成像荧光。细胞浓度不同，成像强度不同。在注射后的第 5 周重复此步骤观察肿瘤转移情况。
- (5) 组织获取：第 5 周时采用颈部脱臼法处死小鼠，打开胸腔并获取小鼠肺组织，将表面血液冲洗干净后拍照。将肺组织置于 4% 浓度的多聚甲醛溶液中常温摇床固定 1-3 天并定期换液。随后将肺组织进行蜡块包埋切片进行免疫组化染色，具体步骤如前所述。

### 3 实验结果

#### 3.1 上调 FBW7 引起 Snail 蛋白稳定性下降

目前有文献报道称 FBW7 表达降低会引起细胞侵袭转移能力的升高，这一机制与其降解多种底物蛋白有关。根据我们前期的研究，这一过程与 EMT 的发生具有一定的相关性。而作为 EMT 过程核心分子 E-cadherin 上游的 Snail 会因 FBW7 表达差异而变化，因此我们将在此探讨 FBW7 对 Snail 表达的影响。Oridonin 是从自然植物中提取的一种双萜类化合物，在体内外显著降低 c-myc 蛋白表达水平，在细胞内可上调 FBW7 蛋白的表达进而促进 FBW7 与底物的结合介导其对底物的降解<sup>[70]</sup>。同时

选取了两株高表达内源性 Snail 的黑色素瘤细胞系以探究 FBW7 对内源性 Snail 的作用和影响 (图 2-2)。结果发现: 在 A375 和 MDA-MB-435S 细胞系中, 上调 FBW7 表达后 Snail 表达水平降低。给予 20 $\mu$ M CHX (cycloheximide, 放线菌酮) 按不同时间梯度处理检测 Snail 半衰期发现, 上调 FBW7 表达后, 其半衰期明显缩短。在 HEK293 细胞中导入 Flag-Snail 进行相同处理, 其结果与前文所述一致。这说明上调 FBW7 表达可引起转录抑制因子 Snail 蛋白稳定性下降, 而这种稳定性下降可能与蛋白酶体途径有关。

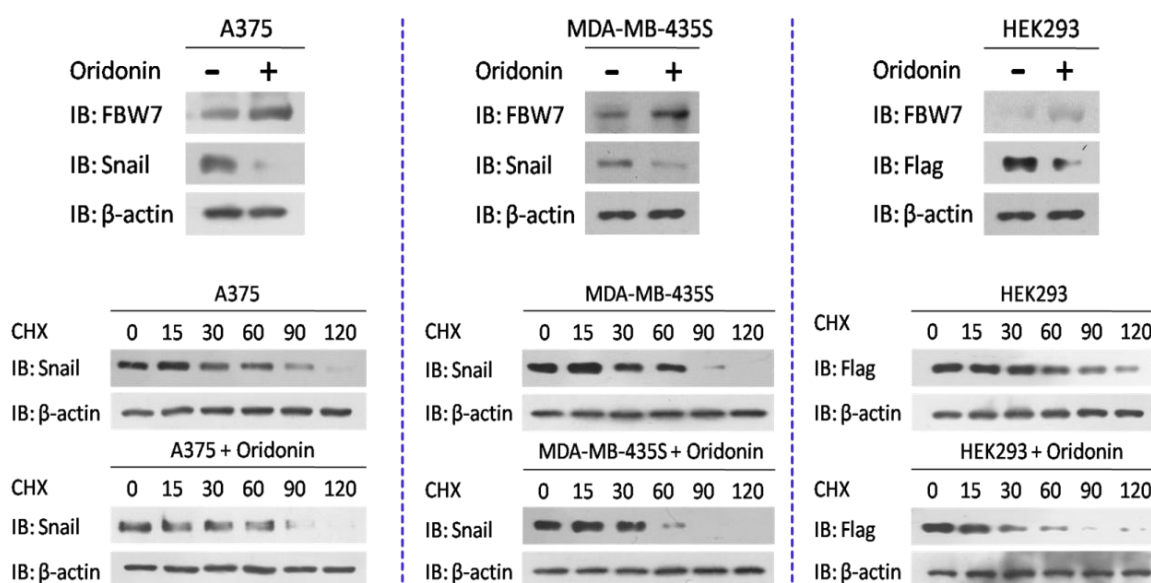


图 2-2 上调 FBW7 引起 Snail 蛋白稳定性下降

### 3.2 Snail 降解依赖于蛋白酶体途径

既往研究证实 Snail 降解依赖于 GSK3 $\beta$  参与的双位点磷酸化并通过  $\beta$ -Trcp 经蛋白酶体进行降解, 这一过程亦经过泛素化修饰。为证明 FBW7 同样存在降解 Snail 的可能性, 我们将 Myc-FBW7 质粒导入两株黑色素瘤细胞中以提高 FBW7 的表达, 同时给予 20 $\mu$ M 蛋白酶体抑制剂 MG132 处理以抑制蛋白酶体途径对 Snail 的降解 (图 2-3)。结果发现: 在两株细胞中, 提高 FBW7 表达后 Snail 蛋白含量明显降低, 而给予 MG132 处理后 Snail 表达升高。这些结果表明: 转录抑制因子 Snail 在进行降解时除了  $\beta$ -Trcp 参与外, FBW7 亦可能发挥了重要作用, Snail 降解很可能依赖 FBW7 参与的蛋白酶体途径。

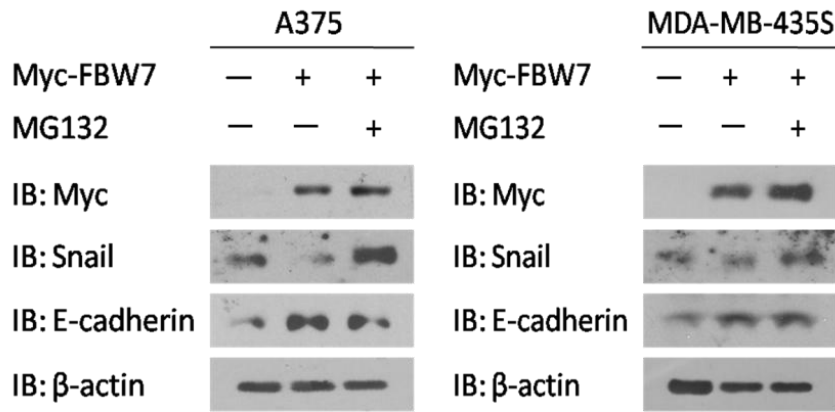


图 2-3 Snail 降解依赖于蛋白酶体途径

### 3.3 MEF 细胞中 Snail 蛋白受 FBW7 影响

肿瘤细胞内存在复杂的变异调控网络，某个分子的改变可能对细胞本身产生很大影响。因此我们选取 Cre/loxp 系统修饰的 FBW7<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠进行 MEF 细胞（mouse embryonic fibroblasts, 小鼠胚胎成纤维细胞）的提取以保证无其他基因突变对其影响。将 Cre 质粒导入 MEF 细胞中以从基因水平敲除内源性 FBW7，并将细胞进行 Transwell 实验以明确敲除 FBW7 后细胞侵袭转移能力的变化（图 2-4）。**结果发现：**导入 Cre 质粒后可敲除 MEF 细胞中 FBW7 的表达，内源性 Snail 表达明显升高，间质细胞标记物 Vimentin 表达上升。Transwell 实验表明敲除 FBW7 后的 MEF 细胞侵袭转移能力增强。以上结果说明，MEF 细胞中 Snail 蛋白受 FBW7 影响，可进一步影响细胞的侵袭转移能力。

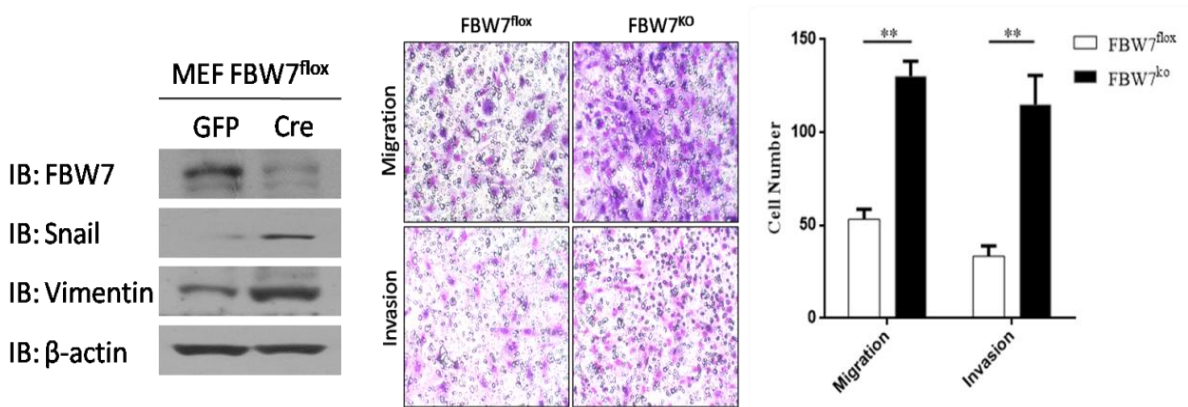


图 2-4 MEF 细胞中 Snail 蛋白受 FBW7 影响

### 3.4 下调 FBW7 引起 Snail 蛋白表达升高及细胞形态改变

为在 NSCLC 细胞系中验证我们之前的猜想，我们对本课题组获得的多种肺癌细胞系进行 Western blot 实验，检测各种细胞内 FBW7 与 Snail 的表达情况，选取高表达内源性 Snail 的两株 NSCLC 进行后续试验。我们通过 shRNA 干扰 FBW7 的表达，通过 Western blot 验证相关蛋白的含量以明确干扰 RNA 的下调效率。同时，通过平板克隆形成实验观察单个细胞集落的形态以明确下调 FBW7 对细胞形态的影响（图 2-5）。**结果发现：**在多种肺癌细胞系中，H460、A549 及 H1299 细胞中 Snail 呈高表达状态，但由于 H460 为大细胞肺癌细胞系，临床出现频率较低，因此本部分实验在另两株细胞系中进行。下调 FBW7 后，两株细胞内 Snail 及 Slug 表达水平均升高，E-cadherin 表达降低，且细胞集落呈离散状，细胞呈梭形和纺锤状，极性增强，形态较前有明显改变。这表明下调 FBW7 可引起 Snail 表达上升，导致 EMT 过程的发生，使上皮来源肿瘤细胞获得间质细胞特性，细胞侵袭转移能力增强。

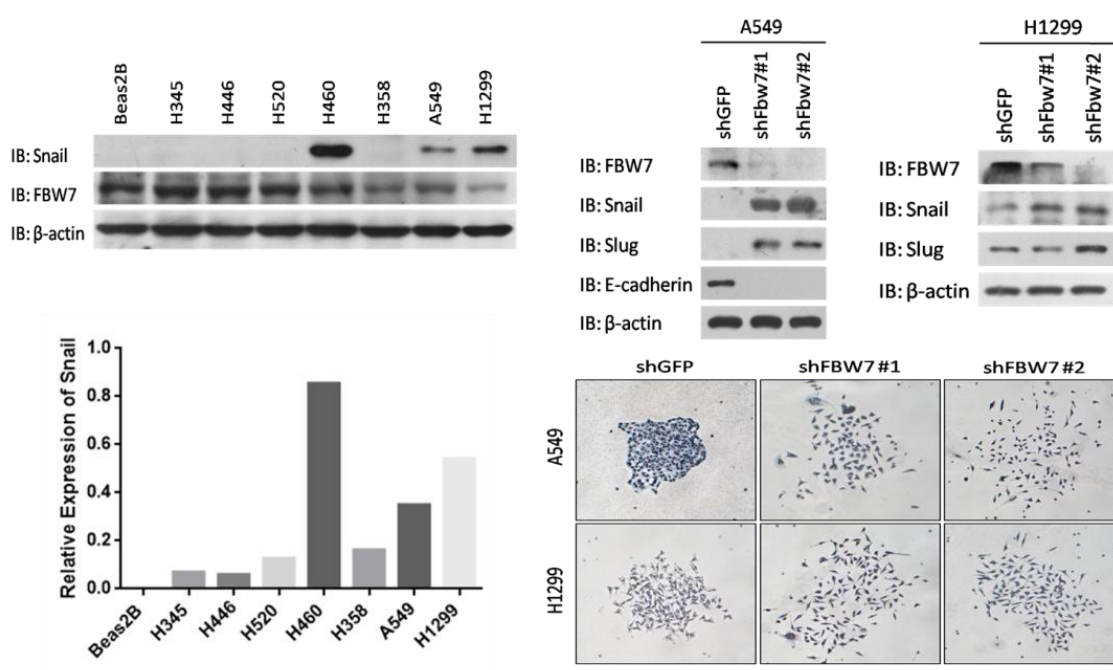


图 2-5 下调 FBW7 引起 Snail 蛋白表达升高及细胞形态改变

### 3.5 Snail 是引起肺癌细胞转移的关键分子之一

如前所述，下调 FBW7 可引起肿瘤侵袭转移能力的变化，但参与此过程的分子有很多，如 Twist、mTOR 及其他信号分子，下调 FBW7 同样可引起这些分子表达变化进而引起肿瘤细胞转移。为验证本实验中下调 FBW7 引起的肿瘤侵袭转移是否有



Snail 参与,我们在下调 FBW7 基础上进一步下调 Snail 表达以明确两者间的相关性。同时进行 transwell 实验检测给予相应处理后细胞侵袭转移能力的变化。**结果发现:**在 A549 细胞中,下调 FBW7 表达后继续下调 Snail 表达,引起肿瘤侵袭转移能力下降(图 2-6),统计学分析存在明显差异。在 H1299 细胞中可以得到相关同的结论(图 2-7)。这些结果说明在本实验下调 FBW7 引起的肿瘤细胞侵袭转移能力变化与 Snail 相关,我们后续的实验在此基础上展开。

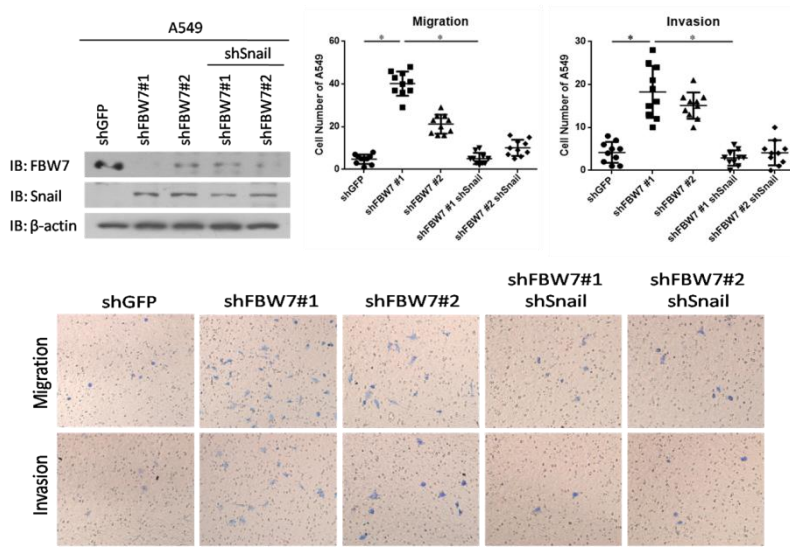


图 2-6 A549 细胞中下调 FBW7 对细胞转移的影响

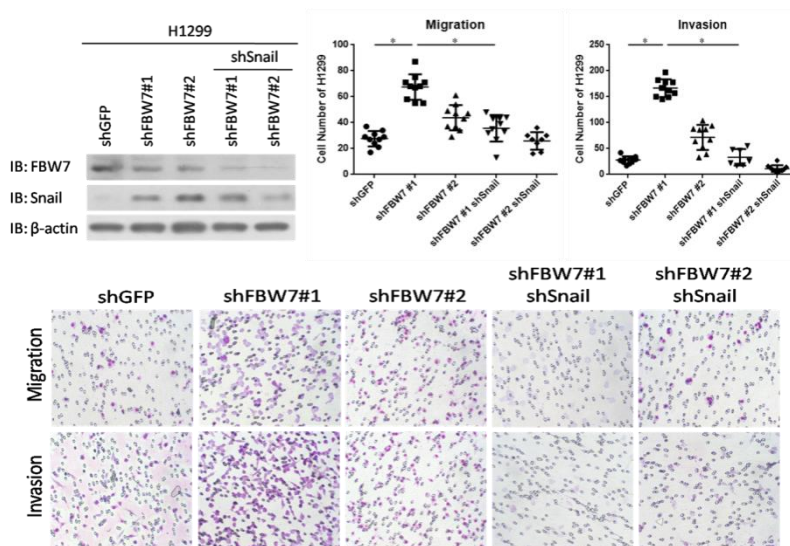


图 2-7 H1299 细胞中下调 FBW7 对细胞转移的影响

### 3.6 下调 FBW7 引起小鼠肺癌细胞转移能力增强

为明确下调 FBW7 在小鼠体内对肿瘤转移的影响,我们首先构建了稳定表达下

调 FBW7 的荧光素酶标记的小鼠 Lewis 肺癌细胞，同时将获得的下调细胞对小鼠进行尾静脉注射（图 2-8），以明确体内水平实验能否进一步证实 FBW7 的致肿瘤转移作用。值得注意的是，尾静脉注射只能模拟肿瘤细胞在体内随血流转运的情况，难以说明上皮来源细胞变为间质细胞并穿透基底膜的过程。所以本部分实验旨在初步说明 FBW7 与肿瘤细胞成瘤性和癌转移的关系。**结果表明：**下调 FBW7 后，Lewis 肺癌细胞成瘤性明显增强。注射后第 5 周小鼠肺部可见明显转移灶形成且肺部转移灶明显增多。部分小鼠颌面部软组织可见赘生物生成，小动物成像可清晰看到此现象。这些结果说明下调 FBW7 可引起小鼠肺癌细胞转移能力增强。

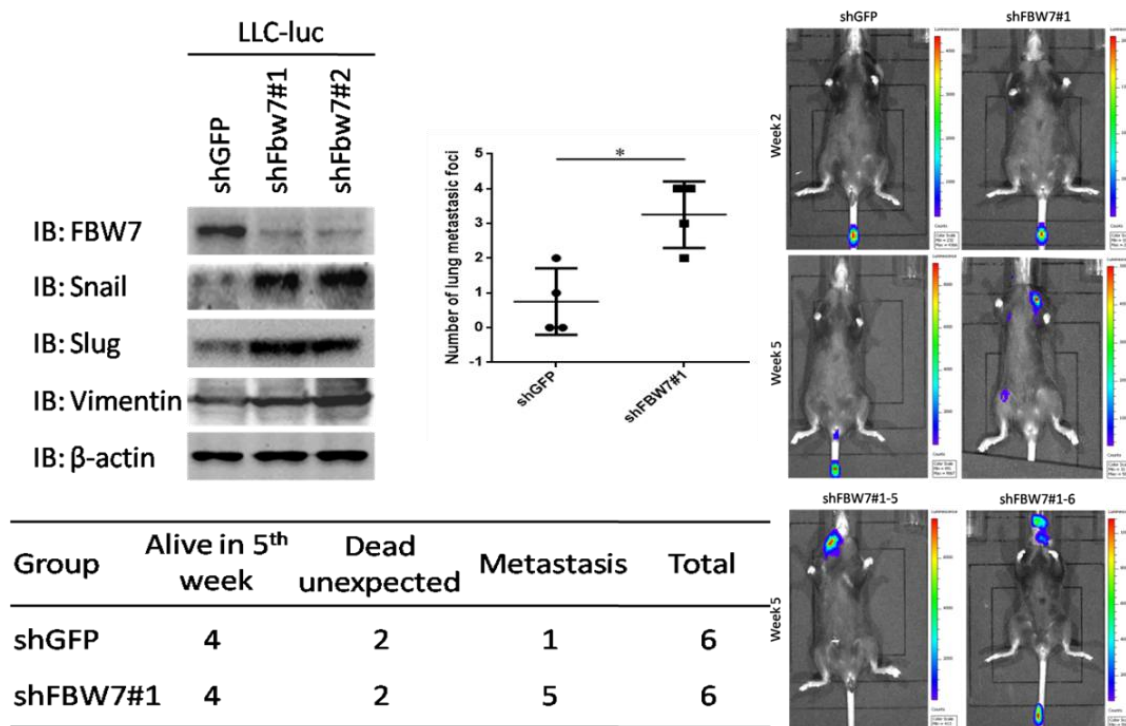


图 2-8 小鼠 Lewis 细胞成瘤及小动物成像

随后为进一步明确相关分子的变化水平，我们将小鼠脱颈椎法处死并将其肺组织取出，固定后行免疫组织化学染色，观察在肿瘤组织、癌旁组织和正常肺组织内 FBW7 和 Vimentin 的表达（因 Lewis 肺癌细胞为间质来源细胞，故 E-cadherin 表达水平极低）明确在转移的组织中相关分子的变化水平（图 2-9）。**结果发现：**下调 FBW7 表达后肺部肿瘤组织内 FBW7 表达较正常肺组织和癌旁组织下降，Vimentin 表达升高。这些结果进一步从分子水平说明下调 FBW7 蛋白表达可引起小鼠肺癌细胞（即 Lewis 肺癌细胞）转移能力增强，而此过程可能涉及上皮间质转化。



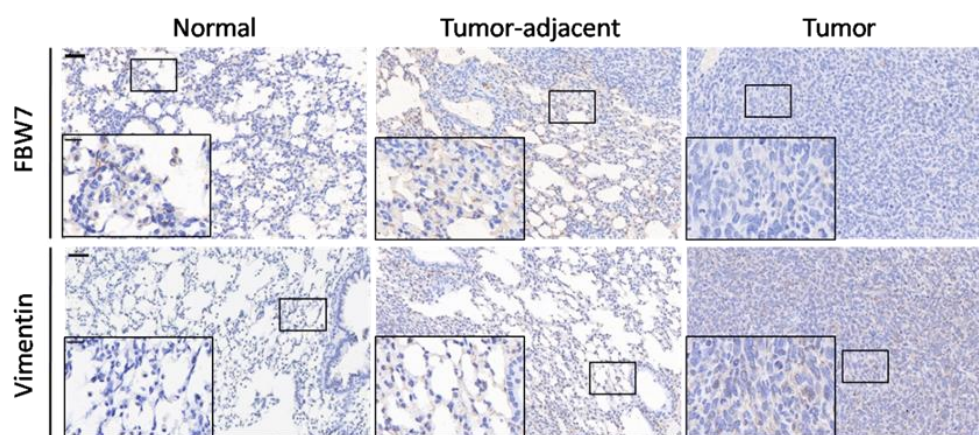


图 2-9 相关分子免疫组织化学染色

## 4 讨论

本部分实验主要从功能学角度对 FBW7 引起的肿瘤细胞侵袭转移作用进行研究。运用 shRNA 干扰 FBW7 基因的表达，下调其表达水平后检测 Snail、E-cadherin 和 Vimentin 与上皮间质转化相关的分子，发现下调 FBW7 后 Snail 蛋白表达升高而处于其下游的上皮细胞标记物 E-cadherin 呈下降趋势。与之相反，部分细胞中间质来源小细胞标记物 Vimentin 表达升高，这符合我们之前的假设，即 FBW7 表达变化引起的肿瘤细胞转移能力变化与 EMT 过程密切相关。这一过程不仅在 NSCLC 中得到验证，在黑色素瘤中也符合预期。同时，在黑色素瘤细胞中上调 FBW7 表达后，Snail 表达下降，此过程可被蛋白酶体抑制剂 MG132 阻断，说明 Snail 是通过蛋白酶体途径进行降解，同时 oridonin 可作为上调 FBW7 的药物从一定程度上抑制肿瘤细胞的转移。为进一步明确 FBW7 介导的肿瘤转移与 Snail 的关系，我们构建了下调 FBW7 的 NSCLC 细胞系并观察其形态学变化。结果表明其一系列形态改变具有上皮间质转化过程的特性。为进一步探究 FBW7 引起的 EMT 过程是否与 Snail 相关，我们在下调 FBW7 的两株 NSCLC 细胞基础上进一步下调 Snail 的表达，经 transwell 实验表明 Snail 确实参与了 FBW7 介导的肿瘤侵袭转移。这些结果说明 Snail 在下调 FBW7 后引起细胞功能和形态学变化中的关键作用，上调 FBW7 表达可以抑制肿瘤转移并可作为治疗晚期 NSCLC 的临床药物。

为进一步在体内水平验证猜想，即低表达 FBW7 可引起肿瘤侵袭转移能力增强和成瘤性增高，我们构建了低表达 FBW7 的小鼠 Lewis 肺癌细胞并用荧光素酶进行

标记,通过尾静脉注射方式将肿瘤细胞注入小鼠体内。5周后进行小动物成像观察发现,下调 FBW7 后肿瘤成瘤性明显增强,且肿瘤细胞会在体内多处进行转移,尤以头面部软组织内明显。将肿瘤组织和正常肺组织进行病理学检测,各种检测分子的表达含量与预期相符,肿瘤组织内 FBW7 含量较正常肺组织明显减少而 Vimentin 表达呈上升趋势。这些结果更加直观的解释了 FBW7 下调后肿瘤细胞侵袭转移能力的变化。本部分研究未验证上调 FBW7 后肿瘤的成瘤性问题,因为我们进行尾静脉注射的 Lewis 肺癌细胞属于肺腺癌,其本身 E-cadherin 表达较低且 Snail 含量在免疫组化试验中难以染色,因此我们只检测了 FBW7 与间质细胞标记物 Vimentin。同时按照我们的猜想,上调 FBW7 后肿瘤侵袭转移能力降低,成瘤性下降,难以满足本实验的实验要求,因此未进行上调体外成瘤实验。

值得注意的是,在研究相关机制和现象的过程中,我们选择高表达内源性 Snail 的两株黑色素瘤细胞系进行下调 FBW7 的相关处理,使 Snail 在蛋白水平变化最为明显。但是为何未从 mRNA 水平对下调 FBW7 后的细胞进行 Snail 表达检测?这是因为 Snail 在非小细胞肺癌中表达含量极低,进行 q-PCR 检测时起峰时间多在 35 个循环以后,从技术角度分析这种差异不具有统计学意义。而且 FBW7 的生物学作用为在蛋白水平对底物进行泛素化修饰并最终介导底物的降解。因此本课题未就 Snail 在 mRNA 水平的变化进行说明。

综上所述,我们就 FBW7 在黑色素瘤细胞和 NSCLC 细胞系中进行功能学的验证,明确了下调 FBW7 后细胞形态和侵袭转移能力的变化情况,初步探讨了下调 FBW7 对 E-cadherin 上游的转录抑制因子 Snail 的作用并通过功能学实验对其进行验证。随后,我们构建了小鼠下调 FBW7 的 Lewis 细胞系并通过尾静脉注射对其致转移作用进行有关研究,表明了 FBW7 确实参与了肿瘤的侵袭转移作用。以上结果说明,针对 FBW7 引起的肿瘤侵袭转移能力变化可能与 EMT 过程有关,而这一过程可能由 FBW7 针对 Snail 的泛素化作用实现。这些结果引起我们对其机制的进一步探索和研究。

## 第三部分 FBW7 泛素化修饰降解 Snail 的分子机制

### 1 实验材料

#### 1.1 细胞

A375	购自 ATCC 细胞库（美国）
MDA-MB-435S	购自 ATCC 细胞库（美国）
HEK293	购自上海细胞库（中国）

#### 1.2 试剂、设备和耗材

RPMI 1640 培养液	Hyclone 公司（美国）
DMEM 培养液	Hyclone 公司（美国）
胰酶	Hyclone 公司（美国）
胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS）	Gibco 公司（美国）
青霉素/链霉素	Hyclone 公司（美国）
细胞培养皿（60mm/100mm）	Thermo 公司（美国）
RIPA 裂解液（强效）	碧云天生物技术研究所（中国）
蛋白酶/磷酸酶抑制剂（Cocktail）	Roche 公司（瑞士）
BCA 蛋白定量试剂盒	Takara 公司（日本）
5×上样缓冲液	碧云天生物技术研究所（中国）
Tris	MP Biomedicals 公司（美国）
甘氨酸	MP Biomedicals 公司（美国）
SDS	MP Biomedicals 公司（美国）
丙烯酰胺	MP Biomedicals 公司（美国）
甲双叉丙烯酰胺	碧云天生物技术研究所（中国）
过硫酸铵	碧云天生物技术研究所（中国）
TMEMD	MP Biomedicals 公司（美国）

甲醇	天津富宇精细化工有限公司（中国）
预染蛋白 Marker	Fermentas 公司（加拿大）
NC 膜（硝酸纤维素膜）	Millipore 公司（美国）
Tween20	科昊生物工程有限责任公司（中国）
BSA	MP Biomedicals 公司（美国）
发光试剂盒	Millipore 公司（美国）
兔抗 FBW7 抗体	Santa Cruz 公司（美国）
兔抗 Snail 抗体	Cell Signaling Technology 公司（美国）
鼠抗 $\beta$ -actin 抗体	Sigma 公司（美国）
鼠抗 Flag 标签蛋白抗体	Abbkine 公司（美国）
鼠抗 Myc 标签蛋白抗体	Abbkine 公司（美国）
HRP 标记羊抗兔 IgG	Cell Signaling Technology 公司（美国）
HRP 标记羊抗鼠 IgG	Cell Signaling Technology 公司（美国）
发光用胶片	Canon 公司（日本）
显影粉	科昊生物工程有限责任公司（中国）
定影粉	科昊生物工程有限责任公司（中国）
超净工作台	亚泰科隆仪器技术有限公司（中国）
细胞培养箱	Thermo 公司（美国）
Oridonin	Selleckchem 公司（美国）
MG132	Selleckchem 公司（美国）
移液器	Gilson 公司（美国）
负压吸引泵	其林贝尔仪器制造有限公司（中国）
高压灭菌锅	TOMY 公司（日本）
电子天平	上海良平仪器仪表有限公司（中国）
磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司（中国）
纯水净化仪	Millipore 公司（美国）
WB 电泳仪	上海天能科技有限公司（中国）
SDS-PAGE 电泳槽	上海天能科技有限公司（中国）

SDS-PAGE 转膜槽	上海天能科技有限公司（中国）
玻璃板	上海天能科技有限公司（中国）
酶标仪（Model 680 型）	Bio-Rad 公司（美国）
光学显微镜	Olympus 公司（美国）
制冰机	上海斯科茨满公司（中国）
质粒小提试剂盒	天根生化科技有限公司（中国）
Lipofectamine2000	Invitrogen 公司（美国）

### 1.3 质粒

本课题组涉及 Flag-Snail、Myc-FBW7 FL 及 Myc-FBW7  $\Delta$ F 质粒均由叶明翔博士构建，质粒序列及引物均经公司检测无误后使用。

## 2 实验方法

### 2.1 质粒转染

如前所述

### 2.2 Western blot

如前所述

### 2.3 免疫共沉淀

免疫共沉淀实验（co-immunoprecipitation assay, co-IP）是研究两种或多种蛋白分子间相互作用关系时常用的分子生物学方法。其原理是运用抗体与抗原的特异性识别，并与 beads 结合形成“抗原-抗体-beads 复合物”，经蛋白变性后进行 Western blot 验证相关分子。具体步骤如下：

- （1）蛋白裂解：常规刮取细胞，将细胞置于冰上备用。根据细胞沉淀量吸取适当细胞裂解液，轻柔吹打并混匀，冰上裂解 30min。应注意的是，此实验应保证相关蛋白分子的相互租用和结合，因此在提取蛋白时除捶打轻柔外，不可进行产生裂解和剧烈震荡，否则部分连接较弱的分子会因此而断开，对后续实验产生较大影响；
- （2）抗原抗体结合：将细胞裂解液进行定量，蛋白与目的抗体按 500:1 比例混合，用封口膜将 EP 管管口封住并置于 4℃ 转盘上过夜转动使抗体与对蛋白充分接触和结合；

- (3) 抗原-抗体-beads 复合物：将 EP 管取出后打开管口并向其中加入 50-80 $\mu$ l agrose-beads（琼脂糖珠）并重新将 EP 管密封，置于 4 $^{\circ}$ C 转盘匀速转动 4-6h。应注意的是琼脂糖珠为细小颗粒，在吸取时应选取 200 $\mu$ l 枪头并将其尖端剪开，将 beads 充分震荡后吸取相应体积，枪头深入液面下缓慢注入 EP 管中；
- (4) 洗脱：将 EP 管取出后 6000rpm 离心 5min，吸弃上清，向其中加入 1ml 预冷的 PBS 缓冲液，并置于 4 $^{\circ}$ C 转盘匀速转动 10min 后取出，重复上述操作 3 次。向最终获得的细胞沉淀内加入等体积的 2 $\times$ loading buffer（体积与加入的 agrose-beads 相同），轻叹混匀后 100 $^{\circ}$ C 110min 煮沸备用；
- (5) 检测：后续检测与 Western blot 相同，具体步骤如前所述。应注意的是，最终获取的蛋白样品中含有目的抗体，为证明抗体有效性和操作无误，在发光检测蛋白时应注意在 55kD 和 25kD 处存在强度较高的条带，此为抗体重链和轻链。

### 3 实验结果

#### 3.1 Snail 序列内存在 PEST 结构域

根据之前的实验结果，我们猜测 Snail 可作为泛素连接酶 FBW7 潜在的底物，可通过对特定磷酸化位点的识别进行修饰并最终通过蛋白酶体途径进行降解。FBW7 的众多底物氨基酸序列中存在 PEST 结构域，即死亡结构域，此结构域的存在标志着该蛋白可通过泛素化途径降解。通过对 Snail 氨基酸序列进行分析和比对（图 3-1），**结果发现：**在 Snail 蛋白的氨基酸序列 98-137 号位点存在 PEST 结构域，且此结构域存在于多种属结构中，无种属特异性。在 Snail 的 PEST 结构域中含有两个磷酸化位点，而在既往的报道中发现 Snail 可被 GSK3 $\beta$  磷酸化。因此我们认为 Snail 可通过某种方式被磷酸化修饰进而被泛素化降解。

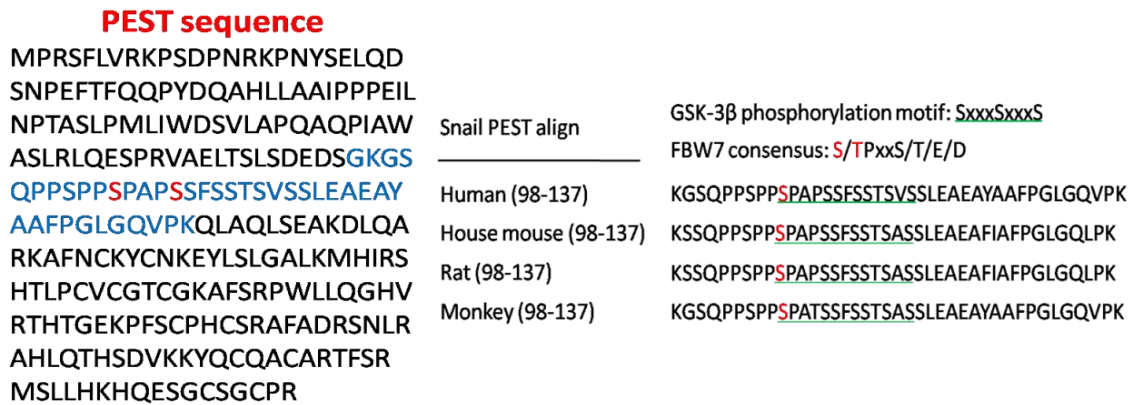


图 3-1 Snail 序列内存在 PEST 结构域

### 3.2 Snail 降解依赖 FBW7 结构完整性

PEST 结构域的存在为研究 FBW7 对其降解作用提供了可能性，我们进一步探索 FBW7 结构完整性对 Snail 降解的影响。我们将 Flag-Snail 质粒与不同浓度的 Myc-FBW7 质粒瞬时导入 HEK293 细胞中，并根据实验目的对不同组别给予 MG132 处理（图 3-2）。**结果发现：**未导入 FBW7 质粒时 Snail 降解可被 MG132 阻断；导入 FBW7 后，Snail 蛋白随 FBW7 含量增多而降低，而给予 MG132 后 Snail 表达升高，即 FBW7 含量越高 Snail 含量越低。这一结果在高表达内源性 Snail 的 A375 细胞中可得到同样验证（图 3-2）。这一结果说明，Snail 可通过泛素化途径降解，这一过程中 FBW7 可作为潜在修饰和降解 Snail 的分子而发挥作用。

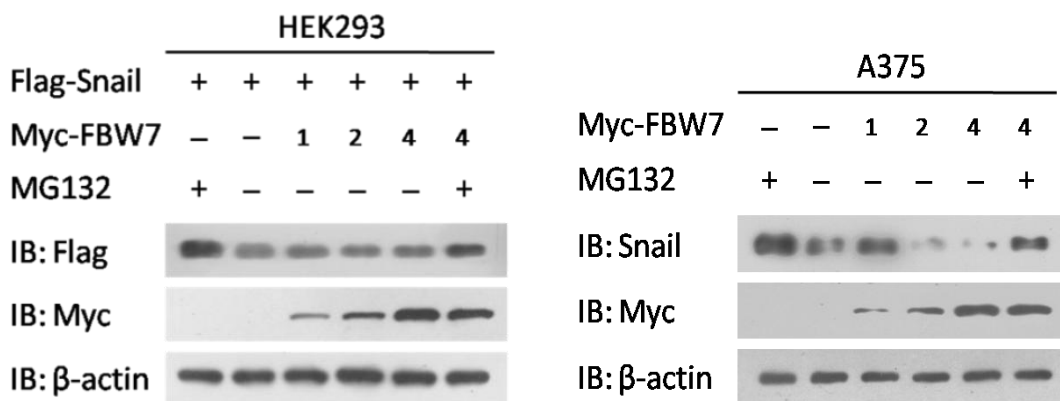


图 3-2 FBW7 表达影响 Snail 蛋白含量

FBW7 作为 SCF 复合体家族成员发挥作用依赖蛋白结构完整性，其组成成分包括与 skp1 结合起连接作用的 F-box 以及与底物连接的 7 个 WD40 重复序列。我们推测

FBW7 结构的缺失会影响其功能的发挥。因此，我们将结构完整的 FBW7 (FL) 与 F-box 结构缺失的 FBW7 ( $\Delta$ F) 导入 HEK23 细胞中，给予相应的 MG132 处理后检测相应的蛋白表达水平(图 3-3)。**结果发现：**与 FBW7 结构完整组相比，FBW7 $\Delta$ F 组 Snail 蛋白表达升高。同样，在黑色素瘤细胞中可得到相同结果(图 3-3)。这说明 FBW7 对 Snail 的降解依赖其结构完整性，部分结构的缺失会影响蛋白稳定性进而导致底物的不会被降解。

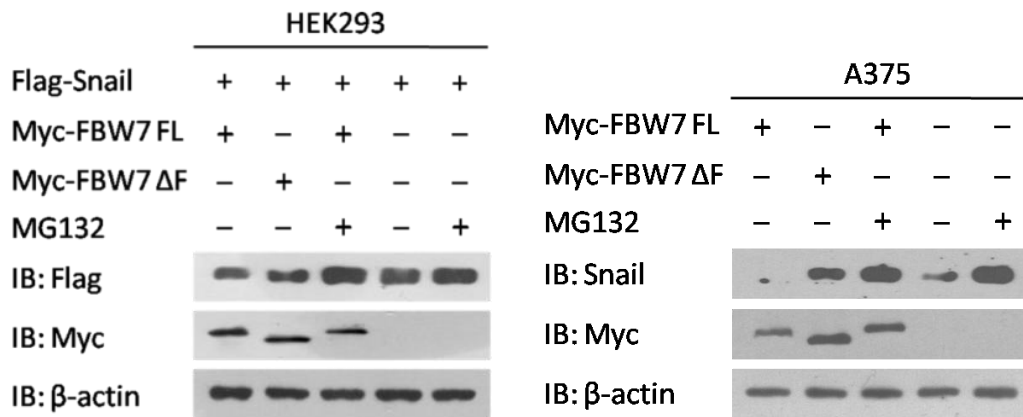


图 3-3 FBW7 结构完整性影响 Snail 蛋白稳定性

### 3.3 细胞内源性 Snail 与 FBW7 存在直接相互作用关系

基于以上研究结果，为验证细胞内源性 Snail 与 FBW7 之间的相互作用，我们选择在 Snail 蛋白高表达的两株黑色素瘤细胞系中进行后续试验。在 A375 和 MDA-MB-435S 细胞系中，预先给予 oridonin 和 MG132 处理(上调 FBW7 同时抑制 Snail 降解)细胞，分别加入 Snail 抗体与 FBW7 抗体，通过 co-IP 实验验证我们的猜想(图 3-4)。**结果发现：**两株细胞内均表达 Snail 与 FBW7 蛋白，且两者间存在直接相互作用关系。这些结果说明 Snail 可作为 FBW7 降解的底物参与 FBW7 介导的肿瘤侵袭转移作用。



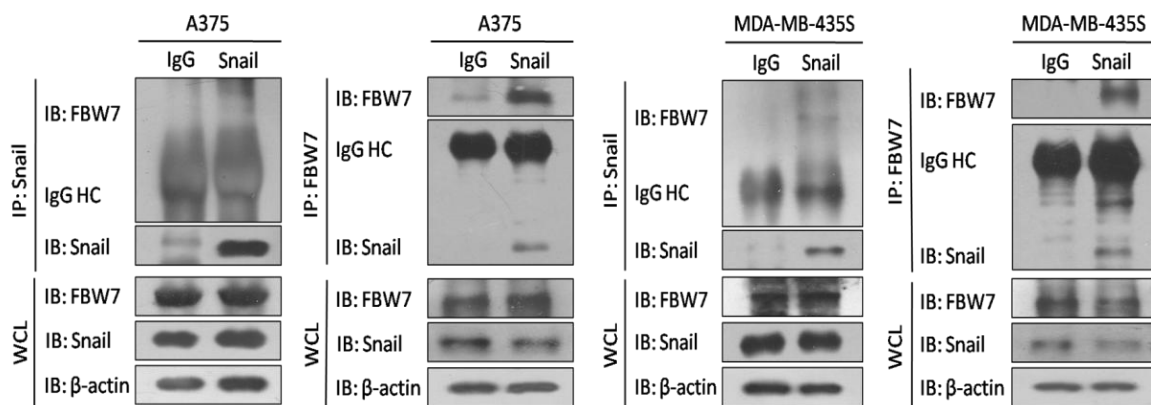


图 3-4 A375 与 MDA-MB-435S 细胞中 Snail 与 FBW7 的相互作用关系

### 3.4 细胞外源性 Snail 与 FBW7 的相互作用

为进一步验证两者间的相互作用关系，我们将 Flag-Snail 与 Myc-FBW7 两种质粒同时导入 HEK293 细胞中，预先给予 MG132 处理后进行 co-IP 实验（图 3-5）。**结果发现：**与内源性检测相同，在外源性检测中两种分子可存在相互作用关系。这进一步说明 Snail 参与了 FBW7 介导的肿瘤细胞侵袭转移过程。

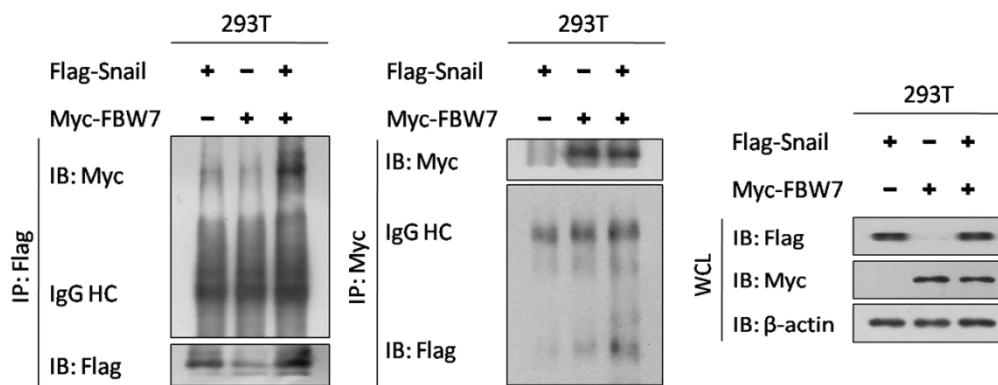


图 3-5 细胞外源性 Snail 与 FBW7 的相互作用

## 4 讨论

本部分实验主要从分子生物学角度对 FBW7 修饰和降解 Snail 的机制进行初步探索和研究。通过对 Snail 蛋白结构域的分析 and 比对，我们发现在 Snail 氨基酸序列的第 98-137 号位点存在一段保守性片段，在多种种属中均有表达且序列高度一致。经阅读文献和结构分析，我们发现此段序列为泛素相关结构域，又称 PEST 结构域，即主要由脯氨酸（P）、谷氨酸（E）、丝氨酸（S）和苏氨酸（T）等氨基酸构成的具有特定空间结构的保守序列。该片段的存在从一定程度上表明该蛋白存在被泛素化修

饰并降解的可能性，从一定程度上可影响蛋白稳定性。而 Snail 中 PEST 结构域的存在表明 Snail 可通过泛素化修饰并降解。同时，该结构中存在两个磷酸化修饰位点（即 108 号和 112 号位点的丝氨酸），这提示 Snail 可被磷酸化修饰从而经蛋白酶体途径降解。

在既往研究中，Snail 的降解主要依赖 GSK3 $\beta$  的双磷酸化位点修饰。GSK3 $\beta$  首先将 Snail 101 号位点的丝氨酸磷酸化修饰，并通过核膜转运至细胞质中，随后 GSK3 $\beta$  再次磷酸化修饰 97 号位点的丝氨酸并经  $\beta$ -TrCP 进行泛素化修饰，最终通过蛋白酶体途径降解。基于此前的研究和 Snail 结构的分析，我们认为 Snail 存在除依赖  $\beta$ -TrCP 外的其他的泛素化降解方式。结合之前的实验发现，我们尝试研究 FBW7 对 Snail 的降解作用。将外源性 Snail 和不同含量 FBW7 质粒同时导入 HEK293 细胞，并在不同组别给予 MG132 处理。我们发现 Snail 的降解有依赖于 FBW7 表达含量，且这种作用可被蛋白酶体抑制剂阻断。随后将构建的 WD 结构缺失的 FBW7 质粒和全长的 FBW7 质粒分别导入 HEK293 细胞中，并根据需要给予 MG132 处理。结果显示 FBW7 部分结构缺失不能降解 Snail，这表明 Snail 的降解依赖于 FBW7 结构完整性。这些结果说明 Snail 的降解依赖于 FBW7 且 FBW7 结构完整性对 Snail 蛋白稳定性具有重要作用。

那么 FBW7 是否直接与 Snail 相互作用而介导其泛素化降解呢？我们在 Snail 高表达的两株黑色素瘤细胞系内进行 co-IP 实验，结果发现不论是 IP: Snail 还是 IP: FBW7，均发现两者间存在直接相互作用。同时我们将 Snail 与 FBW7 质粒同时导入 HEK293 细胞中进行外源性 IP 实验，结果与内源性检测相同。这表明 FBW7 与 Snail 可直接结合并通过泛素化修饰将其降解。这进一步验证了我们之前对 Snail PEST 结构域的分析结果，即 FBW7 对 Snail 特定结构域的磷酸化位点识别。但 FBW7 介导的 Snail 泛素化修饰是否依赖 GSK3 $\beta$  对 Snail 位点的磷酸化修饰仍需进步研究。我们预测 108 号位点的丝氨酸对 FBW7 介导的 Snail 降解具有重要作用，但是否依赖双磷酸化位点的修饰仍有待进一步验证。一般认为对转录因子的调节主要包括三个方面，即含量、定位和功能活性<sup>[71]</sup>，这些位点的作用部分通过听定位点的磷酸化修饰作用，因此对于 Snail 氨基酸序列中的特定位点的作用需要进一步研究。

## 小 结

第一部分：在非小细胞肺癌中 FBW7 表达变化主要以点突变为主。FBW7 表达水平变化可明显影响患者远期预后。FBW7 在肺肿瘤组织中表达明显少于癌旁组织，可作为临床评价 NSCLC 患者恶性程度的重要指标。

第二部分：下调 FBW7 可使细胞侵袭转移能力增强；上调 FBW7 可使肿瘤侵袭转移能力下降。这种作用是通过稳定 E-cadherin 上游转录抑制因子 Snail 蛋白继而引起 EMT 过程来实现的。同时，下调 FBW7 引起的 EMT 可促进肿瘤在体内的侵袭转移作用并提高肿瘤细胞成瘤性。上调 FBW7 可作为临床治疗晚期 NSCLC 转移的重要策略。

第三部分：FBW7 的表达水平与结构完整性参与细胞内 Snail 含量的调控。FBW7 介导的 Snail 降解与 Snail 蛋白内 PEST 结构域的存在密切相关，两者可通过直接的结合，最终通过对 Snail 进行泛素化修饰并降解，介导 EMT 的发生并引起 NSCLC 的转移。

根据以上的实验结果，我们认为 FBW7 参与调节转录抑制因子 Snail 蛋白稳定性，影响上皮细胞标记物 E-cadherin 表达水平，调控上皮间质转化过程并引起 NSCLC 侵袭和转移的一个关键分子。

本课题首次探讨泛素连接酶 FBW7 与转录抑制因子 Snail 间的相互作用关系，在多水平进一步探索 FBW7 引起 EMT 的分子机制，明确 FBW7 在肿瘤转移中的作用并为 NSCLC 患者转移的临床治疗提供可能，为应用 FBW7 激动剂提高晚期 NSCLC 患者生存率，延长患者无进展生存期（PFS）和总生存期（OS）提供理论支持，具有一定的应用价值和现实意义。

## 参考文献

- [1] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Masters G A, Johnson D H, Temin S. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update[J]. J Oncol Pract, 2016, 12(1): 90-93.
- [4] Uramoto H, Tanaka F. Recurrence after surgery in patients with NSCLC[J]. Transl Lung Cancer Res, 2014, 3(4): 242-249.
- [5] Klastersky J, Awada A. Milestones in the use of chemotherapy for the management of non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 81(1): 49-57.
- [6] Scagliotti G V. Potential role of multi-targeted tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer[J]. Ann Oncol, 2007, 18 Suppl 10: x32-41.
- [7] Gettinger S. Targeted therapy in advanced non-small-cell lung cancer[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2008, 29(3): 291-301.
- [8] Vincent C T, Fuxe J. EMT, inflammation and metastasis[J]. Semin Cancer Biol, 2017.
- [9] Nieto M A, Huang R Y, Jackson R A, et al. Emt: 2016[J]. Cell, 2016, 166(1): 21-45.
- [10] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.
- [11] Baggiolini A, Varum S, Mateos J M, et al. Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo[J]. Cell Stem Cell, 2015, 16(3): 314-322.
- [12] Buitrago-Delgado E, Nordin K, Rao A, et al. NEURODEVELOPMENT. Shared regulatory programs suggest retention of blastula-stage potential in neural crest cells[J]. Science, 2015, 348(6241): 1332-1335.
- [13] Shaw T J, Martin P. Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration[J].

- Curr Opin Cell Biol, 2016, 42: 29-37.
- [14]Zeisberg E M, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(8): 952-961.
- [15]Zeisberg M, Yang C, Martino M, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition[J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23337-23347.
- [16]Qian L W, Fourcaudot A B, Yamane K, et al. Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring[J]. Wound Repair Regen, 2016, 24(1): 26-34.
- [17]Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178-196.
- [18]Kalluri R, Weinberg R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [19]Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(6): 415-428.
- [20]Lamouille S, Subramanyam D, Blesch R, et al. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs[J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25(2): 200-207.
- [21]Gregory P A, Bert A G, Paterson E L, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(5): 593-601.
- [22]Park S M, Gaur A B, Lengyel E, et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2[J]. Genes Dev, 2008, 22(7): 894-907.
- [23]Warzecha C C, Sato T K, Nabet B, et al. ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing[J]. Mol Cell, 2009, 33(5): 591-601.
- [24]Conn S J, Pillman K A, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. Cell, 2015, 160(6): 1125-1134.
- [25]Abell A N, Jordan N V, Huang W, et al. MAP3K4/CBP-regulated H2B acetylation

- controls epithelial-mesenchymal transition in trophoblast stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(5): 525-537.
- [26] Nieto M A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3): 155-166.
- [27] Guaita S, Puig I, Franci C, et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(42): 39209-39216.
- [28] Li X, Zhang Z, Zhang Y, et al. Upregulation of lactate-inducible snail protein suppresses oncogene-mediated senescence through p16(INK4a) inactivation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 39.
- [29] Zhou B P, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(10): 931-940.
- [30] Jin Y, Shenoy A K, Doernberg S, et al. FBXO11 promotes ubiquitination of the Snail family of transcription factors in cancer progression and epidermal development[J]. *Cancer Lett*, 2015, 362(1): 70-82.
- [31] Vinas-Castells R, Beltran M, Valls G, et al. The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(6): 3794-3805.
- [32] Bedford L, Lowe J, Dick L R, et al. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(1): 29-46.
- [33] Berndsen C E, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(4): 301-307.
- [34] Weissman A M, Shabek N, Ciechanover A. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(9): 605-620.
- [35] Welcker M, Clurman B E. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(2):

- 83-93.
- [36]Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(9): 739-751.
- [37]Nakayama K I, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 369-381.
- [38]Hartwell L H, Mortimer R K, Culotti J, et al. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants[J]. *Genetics*, 1973, 74(2): 267-286.
- [39]Thompson B J, Buonamici S, Sulis M L, et al. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8): 1825-1835.
- [40]Mavrakis K J, Van Der Meulen J, Wolfe A L, et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL)[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(7): 673-678.
- [41]Wang Z, Inuzuka H, Zhong J, et al. Tumor suppressor functions of FBW7 in cancer development and progression[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(10): 1409-1418.
- [42]Welcker M, Larimore E A, Swanger J, et al. Fbw7 dimerization determines the specificity and robustness of substrate degradation[J]. *Genes Dev*, 2013, 27(23): 2531-2536.
- [43]Spruck C H, Strohmaier H, Sangfelt O, et al. hCDC4 gene mutations in endometrial cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(16): 4535-4539.
- [44]Orlicky S, Tang X, Willems A, et al. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase[J]. *Cell*, 2003, 112(2): 243-256.
- [45]Matsumoto A, Onoyama I, Nakayama K I. Expression of mouse Fbxw7 isoforms is regulated in a cell cycle- or p53-dependent manner[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350(1): 114-119.
- [46]Pawar S A, Sarkar T R, Balamurugan K, et al. C/EBP{delta} targets cyclin D1 for proteasome-mediated degradation via induction of CDC27/APC3 expression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(20): 9210-9215.

- [47]Rocher-Ros V, Marco S, Mao J H, et al. Presenilin modulates EGFR signaling and cell transformation by regulating the ubiquitin ligase Fbw7[J]. *Oncogene*, 2010, 29(20): 2950-2961.
- [48]Kim J, Bartel D P. Allelic imbalance sequencing reveals that single-nucleotide polymorphisms frequently alter microRNA-directed repression[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(5): 472-477.
- [49]Xu Y, Sengupta T, Kukreja L, et al. MicroRNA-223 regulates cyclin E activity by modulating expression of F-box and WD-40 domain protein 7[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(45): 34439-34446.
- [50]Lerner M, Lundgren J, Akhoondi S, et al. MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(13): 2172-2183.
- [51]Mo J S, Ann E J, Yoon J H, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) controls Notch1 signaling by downregulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 1): 100-112.
- [52]Clurman B E, Sheaff R J, Thress K, et al. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation[J]. *Genes Dev*, 1996, 10(16): 1979-1990.
- [53]Won K A, Reed S I. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E[J]. *EMBO J*, 1996, 15(16): 4182-4193.
- [54]Spruck C H, Won K A, Reed S I. Deregulated cyclin E induces chromosome instability[J]. *Nature*, 1999, 401(6750): 297-300.
- [55]Ji S, Qin Y, Liang C, et al. FBW7 (F-box and WD Repeat Domain-Containing 7) Negatively Regulates Glucose Metabolism by Targeting the c-Myc/TXNIP (Thioredoxin-Binding Protein) Axis in Pancreatic Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(15): 3950-3960.
- [56]Fryer C J, White J B, Jones K A. Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover[J]. *Mol Cell*, 2004, 16(4):



- 509-520.
- [57]Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, et al. Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34371-34378.
- [58]Wu G, Lyapina S, Das I, et al. SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(21): 7403-7415.
- [59]Zhao D, Zheng H Q, Zhou Z, et al. The Fbw7 tumor suppressor targets KLF5 for ubiquitin-mediated degradation and suppresses breast cell proliferation[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4728-4738.
- [60]Kitagawa K, Hiramatsu Y, Uchida C, et al. Fbw7 promotes ubiquitin-dependent degradation of c-Myb: involvement of GSK3-mediated phosphorylation of Thr-572 in mouse c-Myb[J]. *Oncogene*, 2009, 28(25): 2393-2405.
- [61]Nateri A S, Riera-Sans L, Da Costa C, et al. The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling[J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1374-1378.
- [62]Kimura T, Gotoh M, Nakamura Y, et al. hCDC4b, a regulator of cyclin E, as a direct transcriptional target of p53[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(5): 431-436.
- [63]Bengoechea-Alonso M T, Ericsson J. Tumor suppressor Fbxw7 regulates TGFbeta signaling by targeting TGIF1 for degradation[J]. *Oncogene*, 2010, 29(38): 5322-5328.
- [64]Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, et al. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction[J]. *Nature*, 2011, 471(7336): 104-109.
- [65]Ye M, Zhang Y, Zhang X, et al. Targeting FBW7 as a Strategy to Overcome Resistance to Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): 3527-3539.
- [66]Tong J, Wang P, Tan S, et al. Mcl-1 Degradation Is Required for Targeted Therapeutics to Eradicate Colon Cancer Cells[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2512-2521.
- [67]Suryo Rahmanto A, Savov V, Brunner A, et al. FBW7 suppression leads to SOX9 stabilization and increased malignancy in medulloblastoma[J]. *EMBO J*, 2016, 35(20):

2192-2212.

- [68] Hui Yang X L, Ziming Liu, Lili Chen, Yunfei Xu, Yuli Wang, Guangwei Wei, Yuxin Chen. FBXW7 suppresses epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastatic potential of cholangiocarcinoma cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 6310-6325.
- [69] Zhu J, Li Y, Chen C, et al. NF-kappaB p65 Overexpression Promotes Bladder Cancer Cell Migration via FBW7-Mediated Degradation of RhoGDIalpha Protein[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(9): 672-683.
- [70] Huang H L, Weng H Y, Wang L Q, et al. Triggering Fbw7-mediated proteasomal degradation of c-Myc by oridonin induces cell growth inhibition and apoptosis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(5): 1155-1165.
- [71] Muratani M, Tansey W P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(3): 192-201.

## 个人简历和研究成果

### 个人简历:

张勇, 男, 1991年11月出生, 黑龙江哈尔滨人, 中共党员。2010年9月至2015年7月, 空军军医大学(原第四军医大学)学员旅临床医学专业, 获学士学位; 2015年9月至2018年6月经全国硕士研究生入学考试考入空军军医大学(原第四军医大学)西京医院呼吸内科攻读硕士研究生, 导师张艰教授, 主要研究方向为肺癌早期筛查、诊断和靶向治疗。

### 研究成果:

1. 张勇, 叶明翔, 张信信, 常宁, 韩志萍, 熊洁, 张艰. FBW7 泛素化修饰 Snail 促进上皮间质转化的实验研究. 现代生物医学进展. 文章编号: 1673-6273 (2017) 30-5844-05
2. Y. Zhang\*, X. Zhang\*, M. Ye, P. Jing, J. Xiong, Z. Han, J. Kong, M. Li, X. Lai, N. Chang, J. Zhang, J. Zhang, FBW7 loss promotes epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer through the stabilization of Snail protein, *Cancer letters*, 419 (2018) 75-83. (IF=6.375)
3. M. Ye\*, Y. Zhang\*, H. Gao, Y. Xu, P. Jing, J. Wu, X. Zhang, J. Xiong, C. Dong, L. Yao, J. Zhang, J. Zhang, Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Leads to Resistance to EGFR TKIs in Non-Small-Cell Lung Cancer by Activating Src-Mediated Bypass Signaling, *Clinical Cancer Research*, (2017) clincanres.0396.2017. (IF=9.619)
4. M. Ye\*, Y. Zhang\*, X. Zhang, J. Zhang, P. Jing, L. Cao, N. Li, X. Li, L. Yao, J. Zhang, J. Zhang, Targeting FBW7 as a Strategy to Overcome Resistance to Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer, *Cancer research*, 77 (2017) 3527-3539. (IF=9.122)
5. J. Yin, W.Q. Xu, M.X. Ye, Y. Zhang, H.Y. Wang, J. Zhang, Y. Li, Y.S. Wang, Up-regulated basigin-2 in microglia induced by hypoxia promotes retinal angiogenesis, *Journal of cellular and molecular medicine*, (2017). (IF=4.499)

6. X. Zhang, N. Chang, **Y. Zhang**, M. Ye, Z. Han, J. Li, J. Zhang, Bakuchiol Protects Against Acute Lung Injury in Septic Mice, *Inflammation*, 40 (2017) 351-359. (IF=2.955)
7. M. Ye\*, X. Zhang\*, N. Li, **Y. Zhang**, P. Jing, N. Chang, J. Wu, X. Ren, J. Zhang, ALK and ROS1 as targeted therapy paradigms and clinical implication to overcome crizotinib resistance, *Oncotarget*, 7 (2017) 12289-12304. (IF=5.168)
8. X. Zhang, N. Chang, G. Yang, **Y. Zhang**, M. Ye, J. Cao, J. Xiong, Z. Han, S. Wu, L. Shang, J. Zhang, A comparison of ARMS-Plus and droplet digital PCR for detecting EGFR activating mutations in plasma, *Oncotarget*, 8 (2017) 112014-112023. (IF=5.168)
9. M. Li, X. Lai, Y. Zhao, Y. Zhang, M. Li, D. Li, J. Kong, **Y. Zhang**, P. Jing, H. Li, H. Qin, L. Shen, L. Yao, J. Li, K. Dou, J. Zhang, Loss of NDRG2 in liver microenvironment inhibits cancer liver metastasis by regulating tumor associate macrophages polarization, *Cell Death and Disease* (2018) 9:248. (IF=5.965)
10. X. Lai, H. Zhao, **Y. Zhang**, K. Guo, Y. Xu, S. Chen, J. Zhang, Intranasal Delivery of Copper Oxide Nanoparticles Induces Pulmonary Toxicity and Fibrosis in C57BL/6 mice, *Scientific reports*, 8 (2018) 4499. (IF=4.259)

## 致 谢

三年的研究生阶段学习即将结束，回顾过去的三年，从收到硕士研究生录取通知书时的欣喜若狂到如今即将毕业时的惴惴不安，心态的变化使我更加理解了研究生阶段培养的意义，更加懂得了团结协作在科研领域的重要作用，深刻体会到科研思维在个体走向成熟过程中具有举足轻重的地位。硕士阶段基本课程和专业课程学习为临床思维的初步建立和科研思维的培养提供支撑，这些都使我获益匪浅。当然，纸上得来终觉浅，学以致用才能将所知所学转化为一生受用的本领。掌握基本的临床操作技能，建立正确的临床诊治思维，树立端正的科研态度和严谨的科研风格，凡此种种均会对我以后的工作生活产生积极影响。

三年的学习时光漫长而短暂，一路走来心怀感激，他们在工作学习和生活上对我的支持和帮助都作为前进的动力促使我不断努力。首先，要感谢我的导师张艰教授。在科研工作上的耐心指导，在学习生活上的悉心帮助以及在未来人生规划上的竭尽全力，她为我所做的不仅是传授临床专业知识，拓展思维眼界，更是在用实际行动证明老师与学生间浓浓的师生情谊。当我每一次面临关键的人生选择，她都能及时地给予中肯的建议。当我每一次面临困境而感到彷徨迷茫时，她总能及时地为我开导心结并教会我做人做事的道理。学生所得即为恩师所授，溢美之词不便多言，这份难得宝贵的师生情谊和您教给我的全部定当留在心底，将此化作人生接下来面临的每一次考验的勇气，继续向着梦想和远方迈进。

当然，攻读研究生阶段在实验方面给予我支持和帮助的老师 and 同学是不能忽略的。感谢生物化学教研室的张健老师，在我实验遇到困境时凭借他丰富的科研储备知识和活跃的科研思维为我提供专业的建议，并指导我在研究生阶段能顺利完成课题内容。在生活上的支持和理解为我能够全身心投入科研工作提供不竭动力。在此向他表示由衷的谢意。感谢叶明翔博士在科研过程中的真诚帮助和支持，他的真心付出和耐心教导为我能顺利完成学业发挥重要作用。本人实验技能的培养和临床思维的建立与他的无私奉献是分不开的。感谢景鹏宇博士、葛英为博士、孔静博士、赖晓凤博士、李梦阳博士、秦娜博士、马勇政博士和王哲硕士在课题研究中给予的

帮助和支持，在实验遇到困境和瓶颈时向他们寻求帮助总是明智的。感谢张信信、李楠、熊洁、常宁、曹晶和韩志萍师姐在工作和学习中的不吝赐教，帮助我顺利完成学业，生活中给予理解和支持使我铭记于心。感谢颜泽栋和赵承磊同学陪伴我度过那些艰难的日子，遇到的困难和挫折在沟通倾诉中变得微不足道，彼此分享的泪水和笑声都使那段时光变得熠熠生辉。感谢王丽亚、王亚翠实验员和全体生化老师们对我工作和生活中的帮助，感谢科室秘书孙婧和吴朔为我学习中提供的方便和支持，研究生阶段的顺利结束与她们的努力和理解密不可分。

最后，我要感谢我的父母和家人，他们对我生活上无微不至的关心和照顾让我深感愧疚，离家千里在外求学的日子因为他们的挂念和期待变得更加有意义。多年来疏于对父母和家人的照顾使我久不能释怀。在临近毕业的今天，只能在此向他们表达我最真诚的歉意，并再次由衷的感谢他们多年的记挂，本人学业的完成与他们的理解是分不开的。

岁月悠长，前路漫远，我心归处恰逢佳期盼，只待初梦还……