

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：HER2 激活 RAS-ERK 等肿瘤相关信号通路的分子机制探究

姓名：董仲正 学号：20300700003

院系：生命科学学院

专业：生物科学

指导教师：孙磊 职称：青年研究员

单位：复旦大学

完成日期：2024 年 5 月 18 日

HER2 激活 RAS-ERK 等肿瘤相关信号通路的分子机制探究

完成人

董仲正

指导小组成员

孙磊 青年研究员

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 研究背景.....	1
1.1.1 癌症.....	1
1.1.2 RAS-ERK 等肿瘤相关信号通路.....	1
1.2 HER2 蛋白.....	2
1.2.1 EGFR 蛋白家族及其激活方式.....	2
1.2.2 HER2 蛋白与癌症的关联.....	2
1.2.3 HER2 下游信号通路的激活.....	3
1.3 IRS4 所在的 IRS 蛋白家族.....	3
1.3.1 IRS 蛋白家族.....	3
1.3.2 IRS 蛋白的下游通路的激活.....	4
1.3.3 IRS 蛋白与癌症的关联.....	4
1.4 结语.....	4
二、材料与方法	6
2.1 材料.....	6
2.1.1 细胞与组织样本.....	6
2.2 试剂.....	6
2.2.1 培养基.....	6
2.2.2 分子克隆与转染相关试剂.....	6

2.2.3	Co-IP 相关试剂.....	6
2.2.4	蛋白质印记相关试剂.....	7
2.3	实验方法.....	7
2.3.1	细胞转染.....	8
2.3.2	Co-IP (Co-immunoprecipitation).....	8
2.3.3	Western blot 检测蛋白质的表达.....	9
三、	研究结果	10
3.1	通过 Co-IP 鉴定与 HER2 互作的蛋白.....	10
3.1.1	验证 IRS 家族成员与 HER2 是否互作.....	10
3.1.2	测定 IRS 家族成员与 HER2 的互作位点或互作区域.....	11
3.2	HER2、IRS4 下游信号通路监测.....	13
3.2.1	IRS4 的表达会下调 HER2 激活的 RAS-ERK 信号通路.....	13
3.2.2	IRS4 对 RAS-ERK 信号通路的下调作用是 IRS 家族中独有的..	14
四、	讨论	15
参考文献	17
致谢	20

摘要

癌症，即恶性肿瘤，是人类的主要死因之一，人类每年近六分之一的死亡直接或间接地由癌症导致。RAS-ERK 等肿瘤相关信号通路的异常激活是肿瘤细胞的显著特征之一，这些信号通路的激活能降低肿瘤细胞对外界生长信号的依赖，并赋予它们抗凋亡的能力。HER2/ErbB2 是表皮生长因子受体（EGFR）家族的成员之一，其过度激活与多种癌症相关，并通常预示着肿瘤具有更高的恶性程度与更糟糕的预后。HER2 过表达能显著激活 RAS-ERK 信号通路，但学界普遍认为 HER2 需要与家族内其他成员（如 HER3）二聚化才能显著激活 PI3K-AKT 信号通路。目前有研究表明，IRS4 能通过组成性地激活 PI3K-AKT 通路诱导乳腺肿瘤发生，并赋予 HER2 靶向治疗耐药性。我们也在对 HER2 过表达细胞株的 IP-MS 筛选中发现，IRS4 蛋白与 HER2 蛋白具有较强的相互作用。因此，本研究旨在通过 Co-IP 实验验证 IRS4 蛋白与 HER2 蛋白的互作关系，并通过转染和蛋白免疫印迹的方法探究 IRS4 蛋白对于 HER2 下游 RAS-ERK 信号通路及其他肿瘤相关信号通路的影响，试图解释其对于肿瘤发生发展的意义。这项研究将为 HER2 下游信号通路提供新的认识，并对乳腺癌治疗具有潜在价值。

关键词： HER2 蛋白，IRS4 蛋白，RAS-ERK 信号通路

Abstract

Cancer, also known as malignant tumors, is one of the main causes of death for humans, with nearly 1/6 of deaths each year directly or indirectly caused by cancer. The abnormal activation of tumor related signaling pathways such as RAS-ERK is one of the significant characteristics of tumor cells, which can reduce the dependence of tumor cells on external growth signals and endow them with the ability to resist apoptosis. HER2/ErbB2 is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family, and its excessive activation is associated with various cancers, often indicating higher malignancy and poorer prognosis of tumors. Overexpression of HER2 can significantly activate the RAS-ERK signaling pathway, but it is widely accepted that HER2 needs to dimerize with other members of the family (such as HER3) to significantly activate the PI3K-AKT pathway. Currently, a study has shown that IRS4 can induce tumorigenesis in breast by constitutive activation of the PI3K-AKT pathway and endow it with HER2-targeted therapeutic resistance. In the IP-MS screening of HER2 overexpressing cell lines, we also discovered the relatively strong interaction between IRS4 and HER2 protein. Therefore, this study aims to verify the interaction between IRS4 and HER2 protein through Co-IP experiments, and explore the impact of IRS4 on RAS-ERK signaling pathway downstream of HER2 and other tumor-related signaling pathways through transfection and western-blot, attempting to explain its significance for tumor development. This study will provide a new understanding of HER2 downstream signaling pathway and have potential value for the treatment of breast cancer.

Key words: HER2 protein, IRS4 protein, RAS-ERK signaling pathway

一、前言

1.1 研究背景

1.1.1 癌症

癌症，即恶性肿瘤，是正常细胞失去控制，转化为能够持续生长与分裂的细胞的一种疾病，具有侵袭性和转移性。生长信号的自给自足（self-sufficiency in growth signals）与逃避细胞凋亡（evading apoptosis）是癌细胞的两大显著特征^[1]。

与正常细胞形成鲜明对比的是，肿瘤细胞对生长信号的依赖性大大降低。除了通过自分泌刺激（autocrine stimulation）大量合成所需的生长因子，受体的过度表达以及下游通路成分的改组是肿瘤摆脱环境生长信号依赖的重要手段。例如，表皮生长因子受体（EGFR）在部分胃癌和乳腺癌中上调，而 Ras 蛋白的组成性激活能够持续促进细胞有丝分裂而不需要上游信号的刺激^[2, 3]。在相关信号通路中，RAS-ERK 信号通路的异常激活在许多人类癌症中经常出现，并显著促进了独立于生长因子的增殖和存活等致癌特性^[4]。

降低细胞凋亡是维持肿瘤细胞快速增殖的重要手段之一。肿瘤细胞可以通过干扰凋亡过程中的相关蛋白来规避细胞凋亡，例如 p53 的失活和 myc 蛋白的过表达都可以破坏或抑制凋亡过程的发生^[5, 6]。此外，抗凋亡生存信号通路的激活也可以减少一部分肿瘤细胞的凋亡，如 PI3K-AKT 信号通路的激活^[7]。

1.1.2 RAS-ERK 等肿瘤相关信号通路

Ras-细胞外信号调节激酶（RAS-ERK）信号通路和三磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B-雷帕霉素靶点（PI3K-AKT-mTOR）信号通路是响应细胞外信号控制细胞存活、分化、增殖、代谢和运动的主要机制，也是肿瘤细胞最常激活的两条通路。

在 RAS-ERK 信号通路中，细胞外信号调节激酶（ERK）是一种丝裂原活化蛋白激酶（MAPK），即 Ras 蛋白的主要效应物。这条信号通路可以归结为经典的 MAPK 途径，即磷酸化的 GTP 酶调节激酶（MAPKKK）激活中间激酶（MAPKK），再由该中间激酶磷酸化并激活效应激酶（MAPK）。在 RAS-ERK 通路中，这些成分分别是 Ras、Raf、MEK 和 ERK^[8]。在细胞质内，活化的 ERK 会磷酸化核糖体 S6 激酶（RSK），同时 ERK 也会进入细胞核，调节几种转录因子

的活性，从而诱导生存和增殖所需的多种基因的表达^[9]。除此之外，一些研究表明，RAS 通过磷酸戊糖途径（PPP）促进无氧糖酵解、葡萄糖摄取、巨噬、脂质合成和核苷酸合成，在肿瘤细胞的代谢重编程中发挥重要作用^[10-12]。

PI3K-mTOR 途径是控制细胞存活、分裂和代谢的另一个关键机制。PI3K-mTOR 途径下游的 mTOR 是一种对营养水平和生长信号作出反应的蛋白激酶，是整合生长和代谢的中心信号分子^[13]。其中，mTOR 复合物 1（mTORC1）能够响应生长因子、能量状态、氨基酸水平和细胞应激的变化。mTORC1 能磷酸化一系列分子，包括真核细胞起始因子 4E（eIF4E）结合蛋白（4E-BP）和 p70 核糖体 S6 激酶（S6K），进而促进核糖体产生和细胞生长和分裂^[8]。除此之外，有证据表明，胰岛素等因素刺激引起的 PI3K 和 AKT 分子的上调可促进整个 PI3K-AKT 信号通路的传递，进而通过一系列级联反应激活包括葡萄糖转运蛋白、糖原合成酶激酶、叉头转录因子和内皮一氧化氮合酶在内的多种底物受体分子，从而增加葡萄糖摄取和脂质代谢^[14, 15]，这一作用同样有助于肿瘤细胞保持能量与物质的代谢平衡。

1.2 HER2 蛋白

1.2.1 EGFR 蛋白家族及其激活方式

HER2/ErbB2 是表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）家族的成员之一。该家族由四种受体酪氨酸激酶组成，包括 EGFR/ErbB1、HER2/ErbB2、HER3/ErbB3 和 HER4/ErbB4，在胚胎及成体细胞的增殖与分化中发挥着关键的作用^[16]。EGFR 家族成员的活性通过配体诱导的同源二聚化或异源二聚化进行调节，结合生长因子能将受体从非活性单体构象转化为活性二聚化构象^[17]。随后，受体细胞内结构域上的酪氨酸残基被反式磷酸化，并作为各种信号分子的对接位点向下游传递信号^[18]。

与家族其他成员不同的是，HER2 是一种“孤儿受体”（orphan receptor），从未报道过有任何一种配体可以直接与 HER2 结合^[19]，其胞外结构域不会在活性构象和非活性构象之间转换，而是持续处在活性构象的状态下^[20, 21]。基于这个原因，其他 EGFR 家族成员（EGFR、HER3 和 HER4）更倾向于与 HER2 形成异源二聚体，这使得 HER2 成为了 EGFR 家族成员共同的首选二聚化伙伴^[19]。

1.2.2 HER2 蛋白与癌症的关联

HER2 的过度激活与多种癌症相关，如乳腺癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌、肺癌等^[22]。20-30%的乳腺癌存在 HER2 过表达的现象，并且这一现象通常预示着肿瘤具有更高的恶性程度与更糟糕的预后^[23]。有证据表明，HER2 扩增是人类乳腺肿瘤发生的早期事件，在近一半的非侵袭性的原位导管癌（ductal carcinoma in situ, DCIS）中都观察到 HER2 基因的扩增，并伴随着 HER2 蛋白过表达，这表明 HER2 基因的变异是人类乳腺癌中最早和最常见的遗传损伤之一^[24]。同时，基因表达谱研究显示，HER2 基因扩增的乳腺癌组成了一个具有特定分子特征的疾病亚群，并且在肿瘤进展过程中保持稳定^[25, 26]。

1.2.3 HER2 下游信号通路的激活

HER2 蛋白的致癌能力与其自身及异源二聚化伙伴的下游信号通路息息相关。然而，目前仅筛选到了少量与 HER2 有相互作用的蛋白，其中包括 Shc 与 Grb2。在其他 EGFR 成员中，HER4 和 EGFR 具有多个结合 Grb2 或 Grb2 和 Shc 的磷酸化酪氨酸位点，而 HER3 有大量能与磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3K）结合的位点^[27]。RAS-ERK 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路是肿瘤中最常见的发生改变的信号通路，其中 PI3K-AKT 通路的激活可促进肿瘤细胞存活，这是肿瘤细胞永生所必需的^[28]。HER2 过表达能显著激活 RAS-ERK 信号通路，但学界普遍认为 HER2 需要与家族内其他成员（如 HER3）二聚化才能显著激活 PI3K-AKT 信号通路^[18, 28]。尽管有少数研究报道了 HER2 能直接结合 p85 α ，以不依赖于 HER3 的方式激活 PI3K-AKT 信号^[29]，但是暂时没有其他研究重复出相同的结果。

1.3 IRS4 所在的 IRS 蛋白家族

1.3.1 IRS 蛋白家族

胰岛素受体底物（insulin receptor substrate, IRS）是一种细胞质内的衔接蛋白，能将信号从受体酪氨酸激酶（receptor protein kinase, RTK）传递到具有 SH2 结构域的细胞内蛋白，其中 IRS 上游的 RTK 主要包括胰岛素受体（insulin receptor, IR）和胰岛素样生长因子 1 受体（Insulin-like Growth Factor I Receptor, IGF-1R）^[30]。IRS 蛋白家族共有 6 个成员，包括相似性更好的 IRS1、IRS2、IRS3、IRS4，以及关系较远的 IRS5/DOK4 和 IRS6/DOK5。IRS1 和 IRS2 是目前研究最深入的成员，在细胞增殖、存活、迁移、代谢和分化中发挥重要作用，并与癌症有关^[31]。Irs3 基因只在啮齿类动物中存在，在人类中是假基因^[32]。IRS4 首先在 HEK293 人

胚胎肾细胞系中发现, 在该细胞系中, IRS4 能快速响应胰岛素刺激而酪氨酸磷酸化^[33]。在成体组织内, IRS-1 和 IRS-2 在组织中广泛表达, 包括大脑、肌肉、心脏脂肪细胞、肾脏、卵巢和乳腺^[34]等, 而 IRS-4 仅限于大脑和胸腺^[33]。

1.3.2 IRS 蛋白的下游通路的激活

在经典模型中, RTK 结合配体后激活, 随后 IRS 蛋白的 C 末端区域中的许多酪氨酸残基被磷酸化。这些磷酸化的酪氨酸位点随后可以作为下游含有 SH2 结构域的细胞质效应蛋白 (包括 p85 和 GRB2) 的结合位点, 可分别导致 PI3K-AKT 和 RAS-MAPK 信号通路的激活^[31]。目前, 有关 IRS1 和 IRS2 的下游信号通路的研究较清晰。IRS1 和 IRS2 不仅参与 IGF-1R 和 IR 介导的经典 IRS 信号通路, 还参与其他非经典途径, 例如, 细胞因子受体 (cytokine receptor) 可以通过激活 JAK 激酶, 进而磷酸化并激活 IRS 蛋白^[35]。此外, 据报道, IRS1 和 IRS2 的 C 末端具有两个特殊的酪氨酸残基, 它们的磷酸化可导致酪氨酸磷酸酶 SHP2 的结合, 通过去磷酸化负责蛋白 (如 p85) 结合的酪氨酸残基来提供负反馈回路^[36]。然而, 与 IRS1 和 IRS2 不同的是, IRS4 并不具有 SHP2 结合的区域, 这使得其不受负反馈机制的调控, 并可以组成性地激活 PI3K-AKT 信号通路^[37]。

1.3.3 IRS 蛋白与癌症的关联

已有许多证据表明, IRS1 和 IRS2 功能异常与几种不同癌症的发生和发展有关, 并且通常是因为二者在调控机制失灵的情况下持续地激活了 PI3K-AKT 信号通路^[38, 39]。与之相对应的是, IRS4 天生缺少 SHP2 介导的负调控机制, 且通常局限在胚胎期或少数成体器官中表达。已有研究显示, 染色体易位事件可激活 IRS4 表达, 导致多种癌症的发生, 如子宫平滑肌瘤、T 细胞急性淋巴细胞白血病等^[40, 41]。在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中, IRS4 也被发现有过度表达, 并通过激活 PI3K-AKT 和 RAS-MAPK 信号通路提高了癌细胞对 EGFR 的特异性抑制剂吉非替尼 (gefitinib) 的抗性^[42]。类似的, 有报道称 IRS4 能通过组成性地激活 PI3K-AKT 通路诱导乳腺肿瘤发生, 并赋予 HER2 靶向治疗耐药性。在该报道中, IRS4 被认为是一种致癌基因且可作为预后较差的癌症标志物, 并被认为与 HER2 具有协同效应^[37]。

1.4 结语

此处我们简要综述了关于 HER2 蛋白及 IRS 蛋白家族在肿瘤相关信号通路

方面的研究，其中包括了两个关键的信号通路：**RAS-ERK** 和 **PI3K-mTOR**。癌症的研究是一项复杂而又迫切的任务，因为它涉及到细胞的异常生长和转移，而这些过程常常与多个信号通路的交互相关。与其强调肿瘤细胞与正常细胞的不同点，不如说肿瘤细胞在这种异常状态下达成了一种与正常细胞截然不同的能量与物质代谢的稳态。**RAS-ERK** 信号通路以及 **PI3K-mTOR** 途径是癌症细胞最常激活的两个信号通路，它们的异常激活与癌症的发生和发展密切相关。这些通路在肿瘤细胞中的活化，通常是经由自给自足的生长信号和抑制凋亡等机制而发挥作用，二者的串扰与平衡也为癌细胞的快速增殖和存活提供了条件。而在 **EGFR** 家族中，**HER2** 作为一个关键的“孤儿受体”，其过度表达已被发现与多种癌症的发生相关，尤其是乳腺癌，其扩增和过表达预示着肿瘤的恶性程度和预后。同时，我们也详细研究了 **IRS** 家族中的 **IRS4**，它在癌症中的异常表达与多种癌症的发生和耐药性相关，其在 **PI3K-AKT** 信号通路中的持续激活被认为是癌细胞生长和存活的关键因素之一。总的来说，这些研究为我们更深入地理解癌症的发生和发展提供了重要线索，也为未来癌症治疗的靶向策略提供了有力的支持。然而，我们仍然需要进一步的研究来揭示这些信号通路和蛋白家族之间的复杂相互作用，以及它们在不同类型的癌症中的具体作用机制。因此，本研究将深入探究 **IRS4** 与 **HER2** 的关系，以及二者在下游信号通路中的作用，为 **HER2** 下游信号通路提供新的认识。这将有助于我们开发更有效的癌症治疗方法，为患者带来更好的预后和生活质量。

二、材料与amp;方法

2.1 材料

2.1.1 细胞与组织样品

2.1.1.1 细胞

2.1.1.1.1 293T 细胞系

本研究使用的 293T 细胞系来源于我们实验室的细胞库。

2.2 试剂

2.2.1 培养基

2.2.1.1 DMEM（高糖）培养基

用于培养 293T 细胞。使用时加入 10%胎牛血清、1%双抗、1%谷氨酰胺。

2.2.2 分子克隆与转染相关试剂

2.2.2.1 同源重组克隆试剂盒

Hieff Clone® Universal One Step Cloning Kit Cat#10922

2.2.2.2 质粒抽提试剂

TIANprep Mini Plasmid Kit Cat#CP103-02

QIAGEN Plasmid Midi Kit Cat#12143

2.2.2.3 质粒转染试剂

PolyJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent Cat# SL100688

2.2.3 Co-IP 相关试剂

2.2.3.1 0.5% NP-40 Lysis Buffer

表 1 0.5% NP-40 Lysis Buffer

组成	0.5% NP-40 Lysis Buffer (500 ml)
1M Tris-HCl (pH=8.0)	25 ml
NaCl	4.383 g
EDTA	0.9306 g
NP-40	2.5 ml
加水定容至	500 ml

2.2.3.2 蛋白酶抑制剂

cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Cat# 04693132001

PMSF Cat# ST505

2.2.3.3 PBS 溶液

表 2 10x PBS

组成	10x PBS (500 ml)
NaCl	40.03 g
KCl	1.01 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	17.91 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g
加水定容至	500 ml

2.2.4 蛋白质印迹相关试剂

2.2.4.1 2x Laemmi Buffer

表 3 2x Laemmi Buffer

组成	2x Laemmi Buffer (100 ml)
1M Tris-HCl (pH=6.8)	6.58 ml
Glycerol	26.4 g
SDS	2.1 g
Bromophenol blue	0.1 g
加水定容至	100 ml

2.2.4.2 SDS-PAGE 胶

表 4 SDS-PAGE 胶

组成	10% 分离胶(10ml)	4% 浓缩胶(4 ml)
ddH ₂ O	4.8 ml	2.42 ml
40% 丙烯酰胺	2.5 ml	0.5 ml
Tris-HCl	2.5 ml(1.5M, pH=8.8)	1 ml(1.0M, pH=6.0)
10% SDS	100 μl	40 μl
10% APS	100 μl	40 μl
TEMED	4 μl	4 μl

2.2.4.3 TBST 溶液

表 5 10X TBST

组成	10X TBST (500 ml)
1M Tris-HCl (pH=7.6)	100 ml
5M NaCl	137 ml
Tween-20	10 ml
加水定容至	500 ml

2.3 实验方法

2.3.1 细胞转染

2.3.1.1 细胞铺板

在转染前 18-24 小时进行细胞铺板，使 293T 细胞的单层细胞密度在转染时达到 40~50%融合度。转染前 30~60 分钟，将含有血清和抗生素的完整培养基新鲜加入每个孔中。

2.3.1.2 PolyJet™ DNA 复合物的制备及转染

以下方案中的试剂配比适用于在六孔板的一个孔内转染 1 μg DNA，实验中按照该比例调整用量。

对于每个孔，在转染前 30~60 分钟将培养基更换为 1ml 含有血清和抗生素的完全培养基。将 1 μg DNA 稀释到 50 μl 无血清高糖 DMEM 中，短暂地涡旋混合。将 3 μl PolyJet™ 试剂稀释到 50 μl 无血清高糖 DMEM 中，轻轻地上下吸 3~4 次，使其混合。立即将稀释后的 PolyJet™ 试剂加入稀释的 DNA 中，注意不能以相反的顺序混合。在室温下孵育约 15 分钟，形成 PolyJet™/DNA 复合物。最后，将 50 μl PolyJet™/DNA 混合物均匀滴加到每个孔中，轻摇混匀。

转染后 12~18 小时，移除含有 PolyJet™/DNA 复合物的培养基，并更换为新鲜的完全培养基。转染后 24-48 小时检查转染效率。

2.3.2 Co-IP (Co-immunoprecipitation)

2.3.2.1 细胞裂解与免疫沉淀

将六孔板置于冰上预冷；1x PBS 溶液，0.5% NP-40 Lysis Buffer 同样在冰上预冷。弃去培养基，加入 1 ml 预冷过的 PBS，用细胞刮刀收集细胞并加到 EP 管中，4°C，10000rpm，离心 3 min。弃去上清，加入 1 ml 0.5% NP-40 Lysis Buffer（使用前添加 Protease Inhibitor 和 PMSF），轻轻吹散，4°C 翻转 30 min。取下 EP 管，4°C，15000 rpm，离心 10min；吸出 100 μl 存于 -20°C 备用，作为 Input 组样品；剩余 900 μl 吸到新的 EP 管中，然后加入 3 μl Anti-Flag M2 magnetic beads，4°C 翻转过夜。

2.3.2.2 样品制备

取下翻转摇床上的 EP 管，在预冷的磁力架上吸附 1 min，吸弃上清，加入 1 ml 0.5% NP-40 Lysis Buffer（使用前添加 PMSF），从磁力架上取下后轻轻颠倒混匀几次，4°C 翻转 5 min，再磁吸后弃去上清，共洗 3 遍。最后一遍吸弃上清

后，加入 200 μ l 1x Laemmi Buffer (with BME)，作为 IP 组样品；向前一天的 Input 组样品中加入 100 μ l 2x Laemmi Buffer (with BME)。将加好 Laemmi Buffer 的 IP 组和 Input 组样品放在 95 $^{\circ}$ C 金属恒温器上煮 15 min。冷却后，将煮好的 IP 组样品放在磁力架上吸附 1 min，将其中的样品转移到新的 EP 管中。

样品冻存于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.3 Western blot 检测蛋白质的表达

2.3.3.1 蛋白的抽提

对于 6 孔板的细胞，加入 300 μ l 的 1x Laemmi Buffer，转移至洁净的 EP 管中，95 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟，即完成细胞样品全蛋白的提取。

2.3.3.2 蛋白免疫印迹 (Western Blot)

处理好的蛋白样品通过 SDS-PAGE (4%的浓缩胶和 10%的分离胶) 电泳分离，再通过 Bio-rad 公司的蛋白质转印仪转移至 PVDF 膜 (Millipore) 上。转膜结束后将 PVDF 膜放置于含 5%脱脂奶粉的 1x TBST 溶液中封闭 1 小时，封闭完成后用 1x TBST 溶液清洗，之后用一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。一抗孵育后的 PVDF 膜放入 1x TBST 溶液中洗膜 10 分钟，重复三次；放入二抗中常温孵育 1 小时，之后将 PVDF 膜放入 1x TBST 溶液中洗膜 10 分钟，重复三次。孵育均在摇床上进行。最后进行显影。

三、研究结果

3.1 通过 Co-IP 鉴定与 HER2 互作的蛋白

3.1.1 验证 IRS 家族成员与 HER2 是否互作

在前期筛选中，我们用慢病毒感染法在 293T 细胞系上分别构建了 FLAG-HER2、HA-HER2、HER2 过表达稳定转染细胞株，用来评估 293T 细胞系中 HER2 蛋白与内源性蛋白互作。分别裂解构建好的过表达细胞系，并用 anti-FLAG 磁珠进行纯化。免疫复合物被洗净、洗化、分离，用高效液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）鉴定样品中的蛋白。其中，FLAG-HER2 过表达细胞株的样品为实验组，HA-HER2 和 HER2 过表达细胞株的样品为两组阴性对照。通过质谱筛选，我们发现 IRS4 是 HER2 潜在的结合蛋白，其评分甚至高于明确能与 HER2 结合的蛋白 Grb2。因此，我们决定探究 IRS4 与 HER2 的关联。

为了确定 IRS4 蛋白是否在细胞内与 HER2 有相互作用，我们决定检测 IRS 家族蛋白是否与 HER2 蛋白有相互作用。我们在 293T 细胞系中通过质粒的瞬时转染过表达了带有 FLAG 标签的 FLAG-IRS 家族蛋白以及带有 HA 标签的 HA-HER2 蛋白，通过 Co-IP 以及 WB 实验鉴定其相互作用。除此之外，我们还通过同样的方法检测了 PI3K-AKT 通路相关的三种蛋白 PIK3R1/2/3 与 HER2 的互作关系。其中，IRS5-v1 和 IRS5-v2 为 IRS5 蛋白的两种剪接异构体。已知 Grb2 蛋白与 HER2 有互作，因此 FLAG-Grb2 蛋白为该实验的阳性对照，而 FLAG-eGFP 为该实验的阴性对照。

实验结果显示，HER2 与 Grb2 的互作为强阳性，HER2 与 IRS1/2/4/5-v2 的互作为弱阳性，其余为阴性（图 1）。该实验结果基本证实了 IRS4 与 HER2 存在互作关系，但其结合力可能弱于 Grb2。该实验结果也基本证实了 IRS1、IRS2 和 IRS5-v2 与 HER2 具有互作关系。IRS5-v1 和 IRS5-v2 与 HER2 的结合能力不同，可能与二者不同的蛋白结构有关，暂时不清楚其生理意义。

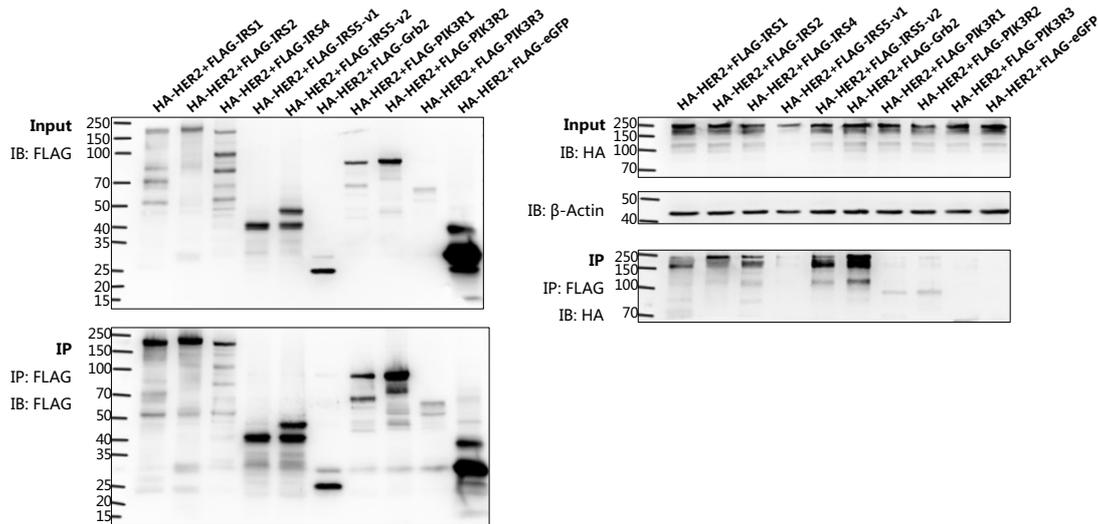


图 1. 通过 Co-IP 鉴定与 HER2 互作的蛋白

通过 Co-IP 与 WB 实验鉴定与 HER2 的相互作用的结果图。HER2 与 Grb2 的互作为强阳性，HER2 与 IRS1/2/4/5-v2 的互作为弱阳性，其余为阴性。在 293T 细胞内同时用质粒瞬时转染 HA-HER2 蛋白与带 FLAG 标签的待测蛋白，培养 48h 后收集细胞，裂解，离心。取 100 μ L 上清作为 Input 组，另取 900 μ L 上清作为 IP 组，用 anti-FLAG 磁珠免疫沉淀细胞提取物上清液，在 4 $^{\circ}$ C 摇床上翻转过夜，最后用 1x Laemmi Buffer 洗脱。如图所示，通过免疫印迹分析免疫复合物。

3.1.2 测定 IRS 家族成员与 HER2 的互作位点或互作区域

为了测定 IRS1/2/4 与 HER2 蛋白的互作位点或互作区域，我们对 HER2 蛋白进行了多个位点突变以及截短突变，并对突变后的蛋白进行了互作能力鉴定。目前已知 HER2 与下游蛋白的互作位点主要集中在其羧基末端尾部（Carboxy-terminal tail）的磷酸化酪氨酸位点（图 2C）^[27]。

为了测定 IRS1/2/4 与 HER2 的互作位点或互作区域，我突变了 HER2 的羧基末端尾部所有已知能与蛋白质结合的磷酸化酪氨酸位点，将其由酪氨酸突变为苯丙氨酸。其中 HA-HER2(7YF)包含以下 7 个突变位点：Y1005F，Y1023F，Y1139F，Y1196F，Y1221F，Y1222F，Y1248F；HA-HER2(4YF)包含以下 4 个突变位点：Y1023F，Y1139F，Y1221F，Y1222F。同样的，我们在 293T 细胞

系中通过质粒的瞬时转染过表达了 FLAG-IRS 家族的蛋白以及带有 HA 标签的 HA-HER2 蛋白及其突变体，通过 Co-IP 以及 WB 实验鉴定其相互作用。蛋白质免疫印迹结果显示，HA-HER2 与三者的互作均为阳性，而 HA-HER2(7YF)仅与 IRS4 的互作为阳性，与 IRS1/2 的互作仅有极微弱的条带（图 2A）。这一结果说明，IRS1/2 与 HER2 的互作主要依赖于 HER2 的羧基末端尾部的磷酸化酪氨酸位点，而 IRS4 与 HER2 的互作不依赖于这 7 个酪氨酸磷酸化位点。

为了进一步确认 IRS4 与 HER2 的互作区域，我对 HER2 进行了截短突变，即构建了一种缺失了 1030-1255 号氨基酸残基的 HA-HER2(Δ tail)突变体。HA-HER2(Δ tail)不仅切除了几乎整个羧基末端尾部，还包含了两个突变位点 Y1005F 和 Y1023F，排除了羧基末端尾部上的所有酪氨酸位点的影响。同时，我们构建了 HA-HER2(9YF)突变体，该突变体将 HER2 的羧基末端尾部所有已知的磷酸化酪氨酸位点突变为苯丙氨酸，即同时包含突变位点 Y1005F, Y1023F, Y1112F, Y1127F, Y1139F, Y1196F, Y1221F, Y1222F, Y1248F。我们再次用 Co-IP 实验鉴定了突变蛋白与 IRS4 的互作能力。蛋白质免疫印迹结果显示，FLAG-IRS4 与 HA-HER2、HA-HER2(9YF)、HA-HER2(Δ tail)三者的互作均为阳性，其中与 HA-HER2(Δ tail)的互作为强阳性，暗示二者的相互作用非常强（图 2B）。这一结果表明 IRS4 与 HER2 的互作位点并不在 HER2 的羧基末端尾部，且羧基末端尾部的存在对二者的结合具有阻碍作用。换言之，该实验确定了 IRS4 与 HER2 的互作区域在 HER2 的激酶区（L720-V987）。

值得注意的是，虽然质粒转染量、细胞数量等实验条件都是相同的，检测到的 HA-HER2(Δ tail)的蛋白表达量明显高于 HER2 及 HER2 突变体。一方面，这可能是由于截短蛋白的表达效率更高，另一方面，这可能暗示了 HER2 的羧基末端尾部上具有负调控位点，如与蛋白降解相关的泛素化位点，从而导致截短后 HA-HER2(Δ tail)的稳定性增强。

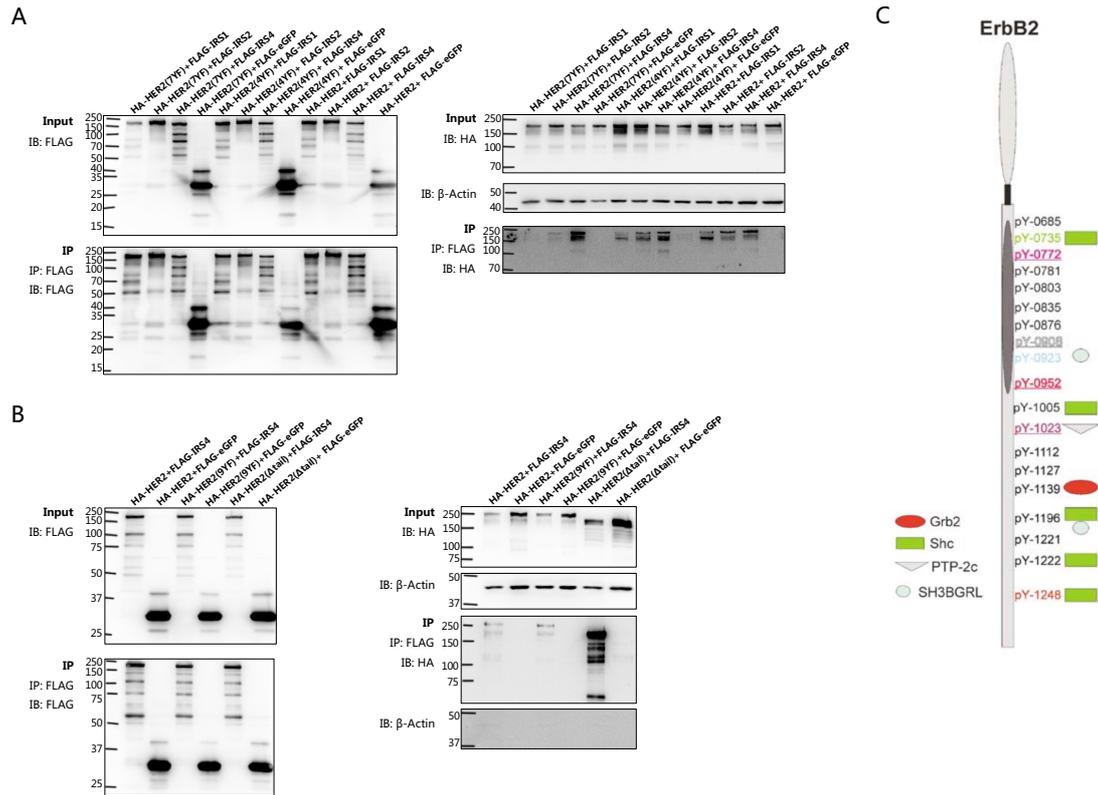


图 2. 通过突变分析鉴定 IRS 家族蛋白与 HER2 的互作位点或区域

IRS4 与 HER2 的互作区域在 HER2 的激酶区。(A) 通过 HER2 点突变鉴定 IRS1/2/4 与 HER2 的互作位点。HA-HER2 和 HA-HER2(4YF)与三者的互作均为阳性，而 HA-HER2(7YF)仅与 IRS4 的互作为阳性，与 IRS1/2 的互作仅有极微弱的条带。(B) 通过 HER2 突变体鉴定 IRS4 与 HER2 的互作区域。FLAG-IRS4 与 HA-HER2、HA-HER2(9YF)、HA-HER2(Δtail)三者的互作均为阳性，其中与 HA-HER2(Δtail)的互作为强阳性。(C) HER2 蛋白的磷酸化酪氨酸位点与已知的具有结合能力的蛋白^[27]。

3.2 HER2、IRS4 下游信号通路监测

3.2.1 IRS4 的表达会下调 HER2 激活的 RAS-ERK 信号通路

为了探究 IRS4 对 HER2 下游信号通路的影响，我们检测了瞬时转染后 293T 细胞下游通路的变化。其中，HA-HER2 (10YF)包含突变位点 Y0735F, Y1005F, Y1023F, Y1112F, Y1127F, Y1139F, Y1196F, Y1221F, Y1222F, Y1248F, 即突变了 HER2 上所有与 RAS-ERK 信号通路的激活相关的位点 (图 2C)。实验结果显示，相比于仅转染 HER2 的细胞株，同时转染 IRS4 和 HER2 能显著下调 HER2 激活的 ERK1/2 磷酸化水平。对于三种点突变 HER2——HA-HER2 (7YF)、HA-HER2 (9YF)、HA-HER2 (10YF)，IRS4 也能显著下调 ERK1/2 磷酸化水平。除此之外，Akt (pan)和 S6 蛋白的磷酸化水平没有显著差异 (图 3A)。这一结果说明，当 IRS4 和 HER2 在 293T 细胞系内同时过表达时，IRS4

能抑制 HER2 下游 RAS-ERK 信号通路的激活。我们还发现，单独转染 HA-HER2 (10YF)仍能微弱地磷酸化 ERK，说明 HER2 还有其他未知的位点能激活 RAS-ERK 信号通路（图 3A）。

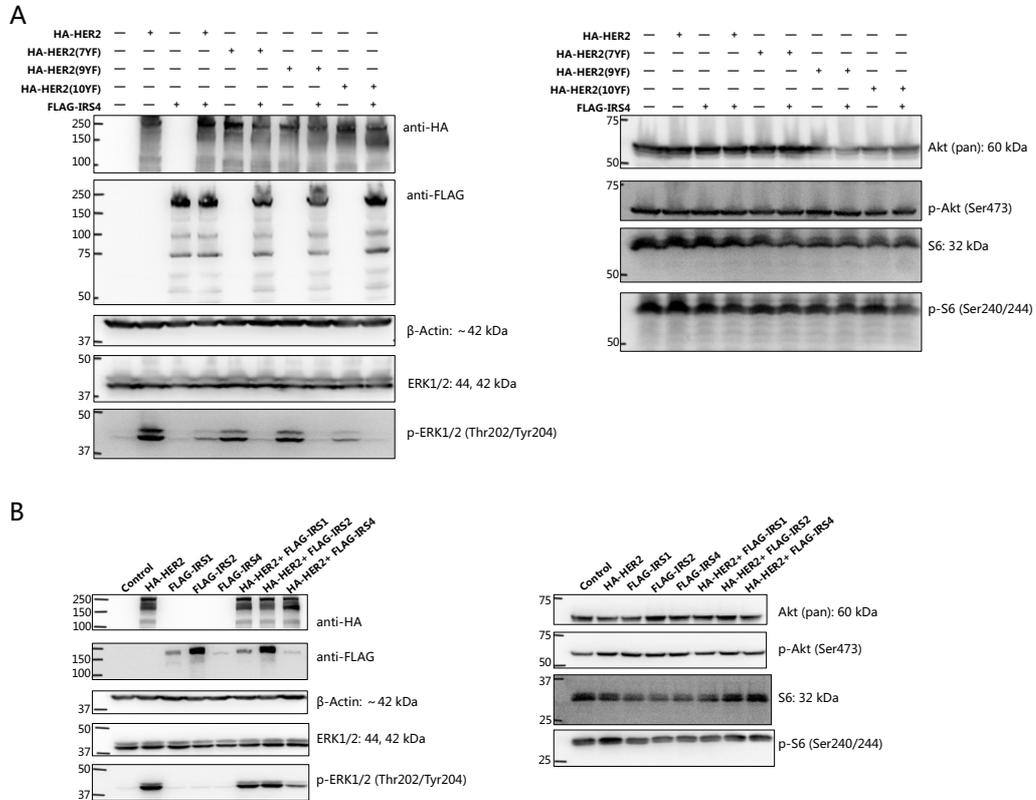


图 3. 检测 HER2 下游信号通路的变化

IRS4 的表达会下调 HER2 激活的 RAS-ERK 信号通路。(A) 在 293T 细胞内瞬时转染两种质粒，或用对应质粒的空载体补齐，转染 36h 后用 1x Laemmi Buffer 裂解细胞。蛋白质免疫印迹法检测瞬时转染后细胞下游信号通路的变化。(B) 在 293T 细胞内瞬时转染两种质粒，或用对应质粒的空载体补齐，转染 36h 后用 1x Laemmi Buffer 裂解细胞。蛋白质免疫印迹法检测瞬时转染后细胞下游信号通路的变化。

3.2.2 IRS4 对 RAS-ERK 信号通路的下调作用是 IRS 家族中独有的

为了进一步探究 IRS4 对 RAS-ERK 信号通路的下调作用是否是 IRS 家族中特有的，我们检测了 IRS1/2/4 三种蛋白对 HER2 下游信号通路的影响。蛋白质免疫印迹结果显示，IRS1/2 均不能显著下调 HER2 诱导的 ERK 磷酸化水平，只有 IRS4 能显著下调 HER2 诱导的 ERK 磷酸化水平。除此之外，Akt (pan)和 S6 蛋白的磷酸化水平也没有显著差异（图 3B）。这一结果说明，IRS4 对 HER2 下游 RAS-ERK 信号通路中 ERK 磷酸化水平的下调在 IRS 家族中是特有的，暗示了 IRS4 对于 HER2 的特殊性。

四、讨 论

本研究探究了 IRS4 蛋白对 HER2 下游 RAS-ERK 等肿瘤相关信号通路的影响。目前已有研究显示，IRS4 与 HER2 在肿瘤的发生发展中具有关联性。首先，IRS4 的过表达与乳腺癌的不良预后有关，并且在多个 HER2 过表达的人类乳腺癌样本中也发现了 IRS4 过表达的现象^[29]。其次，有研究表明 IRS4 能组成性地激活 PI3K-AKT 通路，并赋予 HER2 阳性乳腺癌靶向治疗耐药性^[37]。然后，我们的研究表明 HER2 蛋白与 IRS4 蛋白在细胞内有相互作用，并且结合的区域位于 HER2 蛋白的激酶区，而非常规的羧基末端尾部。最后，我们证明了 IRS4 的过表达能够显著下调 HER2 下游 RAS-ERK 信号通路的激活，并且这种下调作用是 IRS 家族中特有的。种种迹象表明，IRS4 蛋白与 HER2 蛋白具有特殊的关联性，并且很可能在肿瘤的发生发展中具有协同效应。

研究结果虽然阐述了 IRS4 与 HER2 存在的关联性，但有一些疑问仍待解决。第一，虽然 CoIP-WB 实验能检测到 IRS1/2/4 都和 HER2 有相互作用，但是 IP-MS 实验只能检测到 IRS4 与 HER2 有相互作用。可能的原因是，在慢病毒稳定转染的条件下，HER2 的表达量相对较低，HER2 蛋白的丰度、整体构象和瞬时转染下的状态有一定差异，这种差异造成了 IRS1/2 与 HER2 互作的假阳性。

第二，本研究发现，过表达 IRS4 蛋白并未对细胞内的 PI3K-AKT 通路产生影响。这可能是因为，在适宜的培养条件下，293T 细胞内的 PI3K-AKT 通路本身就处于持续地、高水平地激活的状态，从而导致 IRS4 的过表达并不会对这一通路造成显著的影响。

第三，IRS4 抑制 ERK1/2 磷酸化是一个全新的发现，但这无法解释部分研究在肿瘤中观察到的 IRS4 蛋白与 HER2 蛋白的协同效应。我们通常认为，RAS-ERK 信号通路是肿瘤中最常见的发生改变的信号通路，其激活往往具有致癌性。然而，RAS-ERK 信号通路的激活是一把“双刃剑”。例如，该信号通路的激活可以诱导自噬，从而为位于肿瘤中心区域缺乏营养的癌细胞提供生存优势^[43]。但也有部分研究认为自噬可以抑制肿瘤细胞，即自噬通过抑制基因组损伤和染色体不稳定而发挥肿瘤抑制机制的作用，并可能会诱导自噬的细胞死亡

[44, 45]。从这一角度出发，IRS4 下调 RAS-ERK 通路可能会促进肿瘤细胞的的发生发展，并有助于肿瘤细胞在营养状况改变后建立新的物质与能量代谢稳态。当然，这也可能是因为 HER2 或 IRS4 下游仍有许多未知的通路，弥补了 RAS-ERK 信号通路下调所带来的损害。

总而言之，IRS4 下调 HER2 下游 RAS-ERK 信号通路的具体分子机制，以及二者在肿瘤发生发展中的作用，仍有待进一步的研究探索。在未来，我们会继续这项研究，一方面，我们将通过更为细致的生化实验探究二者互作的具体分子机理；另一方面我们将进一步探究 IRS4 下调 HER2 下游 RAS-ERK 信号通路的生理意义，尤其是在细胞生长、耐受营养缺乏、自噬调控等方面的影响。我们在 HER2 下游信号通路中的研究将为癌症（尤其是 HER2 阳性乳腺癌）的病理机制提供新的见解，这将有助于我们开发更有效的癌症治疗方法，为患者带来更好的预后和生活质量。

参考文献

1. HANAHAAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
2. YARDEN Y, ULLRICH A. Growth factor receptor tyrosine kinases[J]. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57: 443-78.
3. MEDEMA R H, BOS J L. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling[J]. *Crit Rev Oncog*, 1993, 4(6): 615-61.
4. SHIELDS J M, PRUITT K, MCFALL A, et al. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'[J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(4): 147-54.
5. SYMONDS H, KRALL L, REMINGTON L, et al. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo[J]. *Cell*, 1994, 78(4): 703-11.
6. STRASSER A, HARRIS A W, BATH M L, et al. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2[J]. *Nature*, 1990, 348(6299): 331-3.
7. EVAN G, LITTLEWOOD T. A matter of life and cell death[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1317-22.
8. MENDOZA M C, ER E E, BLENIS J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36(6): 320-8.
9. YOON S, SEGER R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions[J]. *Growth Factors*, 2006, 24(1): 21-44.
10. TIAN W N, BRAUNSTEIN L D, PANG J, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(17): 10609-17.
11. HAY N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(10): 635-49.
12. KIMMELMAN A C. Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(8): 1828-34.
13. SZWED A, KIM E, JACINTO E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2[J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(3): 1371-426.
14. BITAR M S, AYED A K, ABDEL-HALIM S M, et al. Inflammation and apoptosis in aortic tissues of aged type II diabetes: amelioration with alpha-lipoic acid through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- dependent mechanism[J]. *Life Sci*, 2010, 86(23-24): 844-53.
15. HU X, WANG S, XU J, et al. Triterpenoid saponins from *Stauntonia chinensis* ameliorate insulin resistance via the AMP-activated protein kinase and IR/IRS-1/PI3K/Akt pathways in insulin-resistant HepG2 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 10446-58.
16. OLAYIOYE M A, NEVE R M, LANE H A, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer[J]. *EMBO J*, 2000, 19(13): 3159-67.
17. YARDEN Y, SCHLESSINGER J. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation[J]. *Biochemistry*, 1987, 26(5): 1434-42.

18. MOASSER M M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis[J]. *Oncogene*, 2007, 26(45): 6469-87.
19. TZAHAR E, YARDEN Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1377(1): M25-37.
20. CHO H S, MASON K, RAMYAR K X, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab[J]. *Nature*, 2003, 421(6924): 756-60.
21. GARRETT T P, MCKERN N M, LOU M, et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(2): 495-505.
22. MENARD S, PUPA S M, CAMPIGLIO M, et al. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(42): 6570-8.
23. SLAMON D J, CLARK G M, WONG S G, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene[J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177-82.
24. LIU E, THOR A, HE M, et al. The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast[J]. *Oncogene*, 1992, 7(5): 1027-32.
25. PEROU C M, SORLIE T, EISEN M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-52.
26. WEIGELT B, HU Z, HE X, et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9155-8.
27. SCHULZE W X, DENG L, MANN M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family[J]. *Mol Syst Biol*, 2005, 1: 2005 0008.
28. BASELGA J, SWAIN S M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(7): 463-75.
29. RUIZ-SAENZ A, DREYER C, CAMPBELL M R, et al. HER2 Amplification in Tumors Activates PI3K/Akt Signaling Independent of HER3[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13): 3645-58.
30. HAKUNO F, TAKAHASHI S I. IGF1 receptor signaling pathways[J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 61(1): T69-T86.
31. CHAN B T, LEE A V. Insulin receptor substrates (IRSs) and breast tumorigenesis[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008, 13(4): 415-22.
32. BJORNHOLM M, HE A R, ATTERSAND A, et al. Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans[J]. *Diabetologia*, 2002, 45(12): 1697-702.
33. LAVAN B E, FANTIN V R, CHANG E T, et al. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(34): 21403-7.
34. WU X, SALLINEN K, ANTTILA L, et al. Expression of insulin-receptor substrate-1 and -2 in ovaries from women with insulin resistance and from controls[J]. *Fertil Steril*, 2000, 74(3): 564-72.

35. BURFOOT M S, ROGERS N C, WATLING D, et al. Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(39): 24183-90.
36. MYERS M G, JR., MENDEZ R, SHI P, et al. The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(41): 26908-14.
37. IKINK G J, BOER M, BAKKER E R, et al. IRS4 induces mammary tumorigenesis and confers resistance to HER2-targeted therapy through constitutive PI3K/AKT-pathway hyperactivation[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13567.
38. MCCORMICK S M, GOWDA N, FANG J X, et al. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)1 Regulates Interleukin-4 (IL-4)-activated Insulin Receptor Substrate (IRS)-2 Tyrosine Phosphorylation in Monocytes and Macrophages via the Proteasome[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(39): 20574-87.
39. QIU N, HE Y F, ZHANG S M, et al. Cullin7 enhances resistance to trastuzumab therapy in Her2 positive breast cancer via degrading IRS-1 and downregulating IGFBP-3 to activate the PI3K/AKT pathway[J]. *Cancer Lett*, 2019, 464: 25-36.
40. MEHINE M, MAKINEN N, HEINONEN H R, et al. Genomics of uterine leiomyomas: insights from high-throughput sequencing[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(3): 621-9.
41. KANG D H, KIM S H, JUN J W, et al. Simultaneous translocation of both TCR Loci (14q11) with rare partner loci (Xq22 and 12p13) in a case of T-lymphoblastic leukemia[J]. *Ann Lab Med*, 2012, 32(3): 220-4.
42. HAO P, HUANG Y, PENG J, et al. IRS4 promotes the progression of non-small cell lung cancer and confers resistance to EGFR-TKI through the activation of PI3K/Akt and Ras-MAPK pathways[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 403(2): 112615.
43. DEGENHARDT K, MATHEW R, BEAUDOIN B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(1): 51-64.
44. KARANTZA-WADSWORTH V, PATEL S, KRAVCHUK O, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(13): 1621-35.
45. MATHEW R, KONGARA S, BEAUDOIN B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(11): 1367-81.

致 谢

首先，我要特别感谢我的导师孙磊老师！在整个本科生阶段，他以无比的耐心和细致的态度指导我。他每周都不厌其烦地与我讨论实验结果，并且组织线下会议，督促我的实验进度。在他的悉心指导下，我深刻感受到了研究生级别的科研氛围，从他那里不仅学到了科研方法和实验技巧，更学会了严谨求实的科研态度。孙磊老师不仅在学术上对我悉心指导，而且在生活中也给予了我无微不至的关怀和帮助。他的启发和鼓励让我对科研充满了热爱，并激励我在科研的道路上不断前行。

其次，我要感谢申思仙师姐和姚颖老师。她们在我整个研究过程中给予了我无私的帮助和指导。申思仙师姐耐心教导我许多生化细胞实验以及实验设计和数据分析的技能，她的细致讲解和实践示范使我能够迅速掌握这些实验技术。姚颖老师则在小鼠实验方面给予了我极大的帮助，她的专业知识和经验使我在实验过程中避免了许多弯路，并提高了我的科研效率。没有她们的指导和帮助，我不可能顺利完成这项课题。

此外，我还要感谢韦晔师兄和汪正宇师姐。在实验过程中，他们不仅传授了许多实用的实验技能，还耐心与我讨论课题，提供了许多宝贵的建议。他们的经验和智慧让我在科研道路上少走了很多弯路，帮助我更好地理解实验的内在逻辑和科学意义。同时，他们在实验室中的言传身教，让我学习到了如何更有效地进行科研工作，如何在实验中保持严谨和创新的精神。

同时，我要感谢王雪琳师姐、李名亚师姐、郭惠敏师姐和郭纬娜师姐。她们在实验过程中对实验细节的把控和理解都堪称一流。每当我在实验上遇到问题时，她们总能提供完美的解答和解决方案。她们的帮助不仅使我在实验中得以顺利进行，也让我学到了许多关于实验设计和操作的宝贵经验。

此外，我还要感谢实验室的其他成员、医院体系的发育所成员、其他实验室的师兄师姐以及发育所全体工作人员。他们在实验过程中给予了我许多帮助和支持，我们一起探讨问题，分享经验，共同进步，他们的支持和鼓励让我感受到集体的力量和温暖。发育所全体工作人员的辛勤工作和无私奉献为我的实验提供了坚实的后勤保障，正是有了他们的默默付出，我才能全身心地投入到

科研工作中。

最后，我要感激在我本科攻读学士学位时期给予过我帮助和支持的所有人。你们的关怀与帮助让我能够顺利完成这项课题，并让我在科研的道路上不断成长和进步。感谢你们！