

*Cdc42*表达载体构建及协同药物对细胞迁移的影响

武诺帆, 罗苗苗, 陈尧禹, 汪香荣, 陈雯雯, 王 鹏, 陈 俊*

武汉科技大学生物工程系, 湖北 武汉
Email: *celljun@163.com

收稿日期: 2021年6月11日; 录用日期: 2021年6月25日; 发布日期: 2021年7月29日

摘 要

为了研究*Cdc42*协同拟肽化合物对A549细胞迁移的影响, 构建携带红、绿荧光报告基因的*Cdc42*真核表达载体, 转染293T细胞, 观察基因表达情况; 测定实验用化合物(PMC4)对A549细胞的毒性; 进一步将*Cdc42*转染高迁移率的A549细胞, 然后用拟肽化合物刺激, 通过细胞划痕实验, 初步检测*Cdc42*协同拟肽化合物对A549细胞迁移的影响。结果表明: 本实验成功构建了*Cdc42*异构体基因的真核表达载体 pGFP-cdc42-2、pGFP-cdc42-3、pRed-cdc42-2、pRed-cdc42-3, 转染293T细胞效率约为90%; 10 $\mu\text{mol/L}$ 的拟肽化合物对A549细胞毒性微弱, 拟肽药物分子末端对位上的取代基为氟时, 其对细胞迁移具有促进作用, 过表达*Cdc42*时, *Cdc42*协同药物使细胞迁移进一步增加, 具体机制有待进一步研究。

关键词

*Cdc42*基因, A549细胞, 细胞划痕实验, 细胞迁移, 拟肽化合物

Construction of *Cdc42* Expression Vector and the Effect of It Coordinating with the Peptidomimetics on Cell Migration

Nuofan Wu, Miaomiao Luo, Yaoyu Chen, Xiangrong Wang, Wenwen Chen, Peng Wang, Jun Chen*

Bioengineering Department, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan Hubei
Email: *celljun@163.com

Received: Jun. 11th, 2021; accepted: Jun. 25th, 2021; published: Jul. 29th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 武诺帆, 罗苗苗, 陈尧禹, 汪香荣, 陈雯雯, 王鹏, 陈俊. *Cdc42* 表达载体构建及协同药物对细胞迁移的影响[J]. 生物医学, 2021, 11(3): 176-185. DOI: 10.12677/hjbm.2021.113023

Abstract

In order to study the effect of *Cdc42* coordinating with the peptidomimetics on the migration of A549 cells, the *Cdc42* eukaryotic expression vectors harboring fluorescent reporter genes were constructed and transfected into 293T cells. The expression of *Cdc42* was observed by fluorescence microscopy. The cytotoxicity of the compound (PMC4) on A549 cells was tested. The *Cdc42* genes were further expressed in the high mobility cells A549 and the compound was added. The cooperation effect of *Cdc42* with the compound on the cell migration was investigated by cell wound scratch assay. The results showed that the eukaryotic expression vectors of *Cdc42* isoform genes were successfully constructed named pGFP-cdc42-2, pGFP-cdc42-3, pRed-cdc42-2, pRed-cdc42-3 respectively. These recombinants plasmids were transfected into 293T cells and the transfection efficiency was about 90%. 10 $\mu\text{mol/L}$ peptidomimetic compounds showed weak toxicity to A549 cells. When the substituent group at the terminal para-position of the peptidomimetic drug molecule is F (fluorin), it can increase the migration of A549 cells. While the *Cdc42* gene was over-expressed in A549 cells and the cell migration rate was enhanced furtherly. More studies and results need to be carried out to reveal the detail mechanism.

Keywords

Cdc42 gene, A549 Cells, Cell Wound Scratch Assay, Cell Migration, Peptidomimetic Compounds

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

Cdc42 全称为细胞分裂周期蛋白(cell division cycle 42, *Cdc42*), 属于 Rho GTPases 家族蛋白之一, 在肿瘤转移和恶化中扮演极其重要的角色。由于 *Cdc42* 在细胞分裂调节和肌动蛋白细胞骨架重排中起重要作用, 因此细胞生长、迁移、侵袭、极性和粘附都与 *Cdc42* 相关[1] [2]。*Cdc42* 在细胞信号通路中充当分子开关, 在细胞皮层之间从非活性的 GDP 结合形式转化为有活性的 GTP 结合形式, 进而激活下游效应分子, 以此对细胞外信号做出生理学应答[3] [4]。在癌细胞细胞中过表达 *Cdc42* 突变体 *Cdc42G12V*, 会造成细胞生长阻滞, 这说明 *Cdc42* 致细胞恶性转化的潜能与 *Cdc42*-GTP 和 *Cdc42*-GDP 之间的动态平衡有关[5]。另外, *Cdc42* 也参与了抗癌药物抗性的产生, 例如乳腺癌[6]。与 GTPases 家族的 Rho 和 Rac 蛋白一样, *Cdc42* 也是潜在的研发抗癌药物的靶标[7] [8] [9], MiRNA 和靶向 *Cdc42* 的小分子药物以及关联的信号通路, 通过抑制 *Cdc42* 异常的过表达从而减缓癌细胞转移, 为抗肿瘤药物的开发提供新的策略[10]。近年来针对乳腺癌的治疗, 已研发数种以 *Cdc42* 为靶标的治疗药物[11]-[18]。拟肽是一类利用人工合成的物质模拟天然多肽的结构, 或者利用构象性模板诱导相邻的多肽序列而形成的具有特异结构的化合物[19]。我们前期药物合成实验, 获得了一些拟肽化合物。本研究拟构建含荧光报告基因的 *Cdc42* 真核表达载体, 并初步探讨 *Cdc42* 协同拟肽化合物对细胞迁移的影响。

2. 实验材料与方法

2.1. 试剂和细胞

真核表达载体 pDsRed-C1、pEGFP-C1、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、A549 细胞和 293T 细胞均为本

实验室保存。培养细胞所用材料均购自 Gibico 公司；限制性核酸内切酶购自 Thermo 公司；T4 DNA ligase 购自 Takara 公司；Ex Taq master Mix 购自康为世纪生物公司；CCK8 试剂盒购自日本同仁化学研究所，质粒提取及胶回收试剂盒均为 Omega 公司产品；PCR 引物合成及 DNA 测序由擎科生物公司完成。PMC4 为我们前期合成，其结构如图 1，在 R1 位置处为-F 取代基。

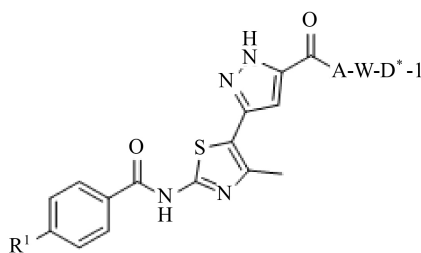


Figure 1. The molecular Structure PMC4
图 1. PMC4 分子结构示意图

2.2. 携带红、绿荧光报告基因的真核表达载体的构建

以 pT-cdc42-2/3 质粒为模板，分别使用其对应的引物(表 1) PCR 扩增目的基因 *Cdc42-2/3*，PCR 产物经 *EcoR* I 和 *BamH* I 两种酶消化后，连接到经相同酶切的真核质粒载体 pEGFP-C1 和 pDsred-C1 中，所得质粒命名为 pGFP-cdc42-2、pGFP-cdc42-3、pRed-cdc42-2、pRed-cdc42-3。经菌液 PCR、质粒 PCR 以及重组质粒双酶切鉴定分析其正确性。最后将鉴定成功的重组质粒送去测序公司精确鉴定。

Table 1. Main primers
表 1. 主要引物

引物名称	引物序列(5'→3')
Red-cdc42-2-F Red-cdc42-3-F	GGAGAAATTCATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTG <i>EcoR</i> I
Red-cdc42-2-R Red-cdc42-3-R	CGGGATCCTCATAGCAGCACACACCTGCGG <i>BamH</i> I
GFP-cdc42-2-F	GGAGAAATTCATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTG <i>EcoR</i> I
GFP-cdc42-2-R	CGGGATCCTTAGAATATACAGCACTTCCTTTTGG <i>BamH</i> I
GFP -cdc42-3-F	GGAGAAATTCATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTG <i>EcoR</i> I
GFP-cdc42-3-R	CGGGATCC TCATAGCAGCACACACCTGCGG <i>BamH</i> I

2.3. 重组质粒转染 293T 细胞

提取去内毒素的超纯重组质粒。将生长状态良好的 293T 细胞以每孔 2×10^5 个细胞种于 6 孔细胞培养板，37℃ 培养过夜后使用聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)作为转染试剂，转染试剂用量 DNA:PEI = 3:1，将重组质粒转染至 293T 细胞。转染 6 h 后换液，继续培养 24 h。在 454 nm 波长蓝光激发下观察绿荧光，在 556 nm 波长的绿光激发下观察红荧光。

2.4. CCK-8 法检测拟肽化合物细胞毒性

用 CCK-8 法测定化合物对细胞的毒性，将 A549 细胞以每孔 5×10^4 个细胞种于取 96 孔板，37℃ 过

夜培养。待细胞完全贴壁后,在对照组加入 1 μL DMSO 溶液,在实验组加入 1 μL 不同浓度化合物溶液,控制终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$,每组三个复孔。继续培养 48 h,在每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,再次放入细胞培养箱中孵育 1 h~2 h。取出细胞培养板,用多功能酶标仪在 450 nm 下测定吸光值。

2.5. 细胞划痕法研究 *Cdc42* 协同化合物对细胞迁移的影响

培养 A549 细胞,种于 6 孔板,转染重组质粒,转染 12 h 后,用枪头尖端在细胞孔板中划 3 条平行直线,PBS 冲洗去悬浮的细胞。添加化合物,控制试验浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。分别在 0 h, 24 h, 48 h 于显微镜下观察细胞迁移情况,并拍照记录迁移距离,以便后期计算迁移率。

3. 实验结果与分析

3.1. 真核表达载体构建结果与分析

Cdc42 基因扩增结果见图 2,获得的基因片段长度与预期(576 bp)一致。扩增得到的目的片段、载体 pEGFP-C1、pDsred-C1 均用 *EcoRI* 和 *BamHI* 进行双酶切,检测结果见图 3。双酶切后的目的基因在 500 bp~750 bp 之间,双酶切载体条带在 5000 bp 附近,初步判断双酶切是正确的。

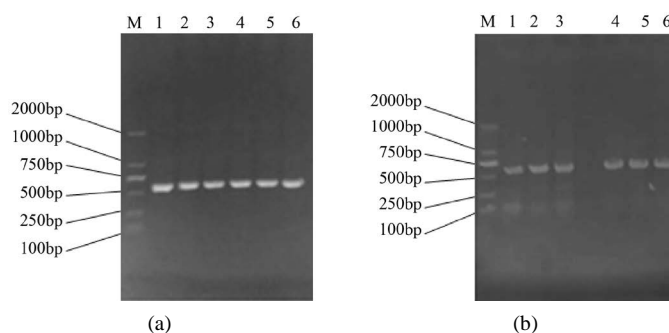


Figure 2. Amplification of the target gene *Cdc42*-2/3. (a): Amplification of *Cdc42*-2/3 gene for pEGFP-C1 vector from pT-*cdc42*-2/3; (b): Amplification of *Cdc42*-2/3 gene for pDsred-C1 vector from pT-*cdc42*-2/3; M: DNA maker; 1~3: *Cdc42*-2 gene; 4~6: *Cdc42*-3 gene

图 2. 目的基因 *Cdc42*-2/3 的扩增。(a): 从 pT-*Cdc42*-2/3 中扩增用于连接 pEGFP-C1 载体的 *Cdc42*-2/3 目的基因;(b): 从 pT-*Cdc42*-2/3 中扩增用于连接 pDsred-C1 载体的 *Cdc42*-2/3 目的基因; M: DNA Maker 2000; 1~3: *Cdc42*-2 基因; 4~6: *Cdc42*-3 基因

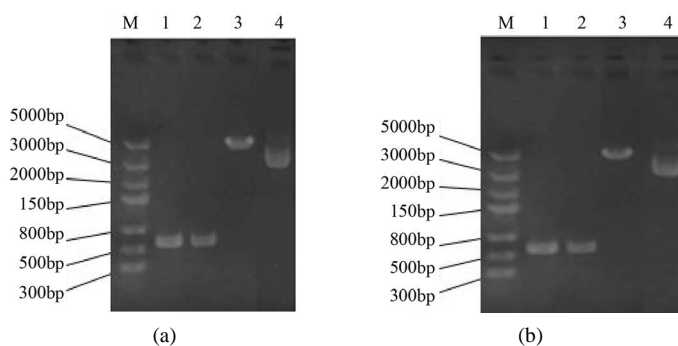


Figure 3. Double digestion of target gene and expression vector. (a): Double-digested gene and pEGFP-C1; (b): Double-digested gene and pDsred-C1; M: DNA Maker 5000; 1: Double digestion of *Cdc42*-2; 2: Double digestion of *Cdc42*-3; 3: Double digestion of pEGFP-C1, pDsred-C1; 4: pEGFP-C1, pDsred-C1

图 3. 目的基因和载体的双酶切。(a): 目的基因和载体 pEGFP-C1 的双酶切;(b): 目的基因和载体 pDsred-C1 的双酶切; M: DNA Maker 5000; 1: 双酶切 *Cdc42*-2; 2: 双酶切 *Cdc42*-3; 3: 双酶切 pEGFP-C1 (a 图)、pDsred-C1 (b 图); 4: pEGFP-C1 (a 图)、pDsred-C1 (b 图)

回收酶切产物，连接转化大肠杆菌，分别挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定，结果如图 4，所构建的重组子均能扩增出目的大小的片段(576 bp)。提取重组质粒，结果见图 5，重组质粒 pGFP-cdc42-2、pGFP-cdc42-3、pRed-cdc42-2 和 pRed-cdc42-3 均提取成功(重组质粒大小为 5276 bp)，然后以重组质粒为模板，进行质粒 PCR 鉴定，结果见图 6，均能扩增出目的大小的片段(576 bp)。

重组质粒进一步进行双切分析，结果如图 7，可以看出，成功的切出了大小在 567 bp 左右的目的基因条带，可以得出 *Cdc42-2/3* 成功克隆到 pEGFP-C1 和 pDsred-C1 载体上。构建好的表达载体送去测序，

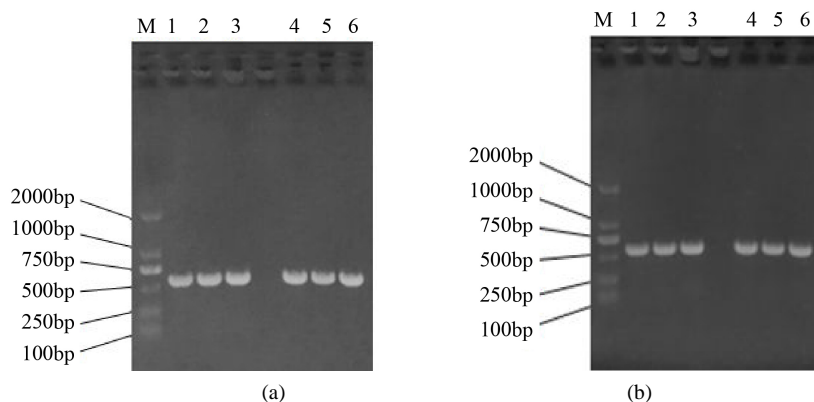


Figure 4. Identification of recombinants by cloning PCR. (a): Identification of pGFP-cdc42-2 and pGFP-cdc42-3 recombinant colonies by PCR; (b): Identification of pRed-cdc42-2 and pRed-cdc42-3 recombinant colonies by PCR; M: DNA Maker 2000; (a1)~(a3): pGFP-cdc42-2 recombinant colony PCR; (a4)~(a6): pGFP-cdc42-3 recombinant colony PCR; (b1)~(b3): pRed-cdc42-2 recombinant colony PCR; B4~B6: pRed-cdc42-3 recombinant colony PCR

图 4. 重组子菌落 PCR 鉴定。(a): pGFP-cdc42-2、pGFP-cdc42-3 重组子菌落 PCR 鉴定; (b): pRed-cdc42-2、pRed-cdc42-3 重组子菌落 PCR 鉴定; M: DNA Maker 2000; (a1)~(a3): pGFP-cdc42-2 重组子菌落 PCR; (a4)~(a6): pGFP-cdc42-3 重组子菌落 PCR; (b1)~(b3): pRed-cdc42-2 重组子菌落 PCR; (b4)~(b6): pRed-cdc42-3 重组子菌落 PCR

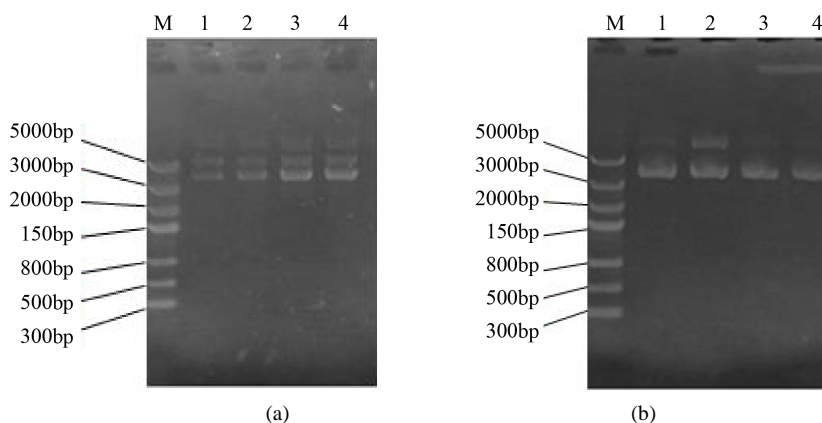


Figure 5. Extraction of recombinant plasmids DNA. (a): Isolation the recombinant plasmids pGFP-cdc42-2 and pGFP-cdc42-3; (b): Isolation the recombinant plasmids pRed-cdc42-2 and pRed-cdc42-3; M: DNA Maker 5000; (a1) & (a2): The recombinant plasmid pGFP-cdc42-2; (a3) & (a4): The recombinant plasmid pGFP-cdc42-3; (b1) & (b2): The recombinant plasmid pRed-cdc42-2; (b3) & (b4): The recombinant plasmid pRed-cdc42-3

图 5. 提取重组质粒 DNA。(a): 提取 pGFP-cdc42-2、pGFP-cdc42-3 重组质粒 DNA; (b): 提取 pRed-cdc42-2、pRed-cdc42-3 重组质粒 DNA; M: DNA Maker 5000; (a1) & (a2): 重组质粒 pGFP-cdc42-2; (a3) & (a4): 重组质粒 pGFP-cdc42-3; (b1) & (b2): 重组质粒 pRed-cdc42-2; (b3) & (b4): 重组质粒 pRed-cdc42-3

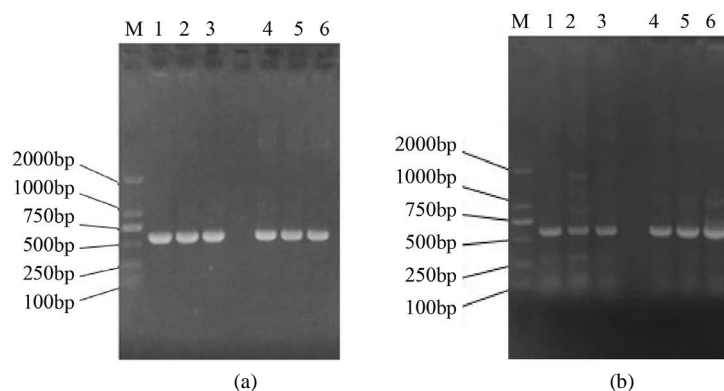


Figure 6. PCR identification with the recombinant plasmids used as template. (a): PCR identification with the recombinant plasmids pGFP-cdc42-2 and pGFP-cdc42-3 used as template; (b): PCR identification with the recombinant plasmids pRed-cdc42-2 and pRed-cdc42-3 used as template; M: DNA Maker 2000; (a1) & (b1): PCR with pT-cdc42-2 used as template; (a2) & (a3): PCR with pGFP-cdc42-2 used as template; (a4) & (b4): PCR with pT-cdc42-3 used as template; (a5) & (a6): PCR with pGFP-cdc42-3 used as template; (b2) & (b3): PCR with pRed-cdc42-2 used as template; (b5) & (b6): PCR with pRed-cdc42-3 used as template

图 6. 以重组质粒为模板进行 PCR 鉴定。(a): 以 pGFP-cdc42-2、pGFP-cdc42-3 重组质粒 DNA 为模板进行 PCR 鉴定; (b): 以 pRed-cdc42-2、pRed-cdc42-3 重组质粒 DNA 为模板进行 PCR 鉴定; M: DNA Maker 2000; (a1) & (b1): 以 pT-cdc42-2 为模板做 PCR; (a2) & (a3): 以 pGFP-cdc42-2 为模板做 PCR; (a4) & (b4): 以 pT-cdc42-3 为模板做 PCR; (a5) & (a6): 以 pGFP-cdc42-3 为模板做 PCR; (b2) & (b3): 以 pRed-cdc42-2 为模板做 PCR; (b5) & (b6): 以 pRed-cdc42-3 为模板做 PCR

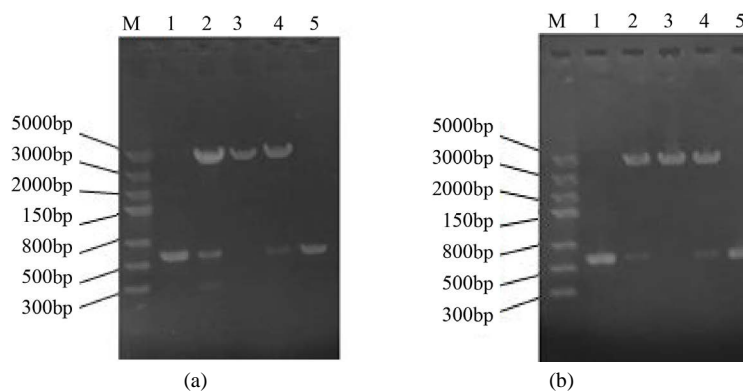


Figure 7. Identification of recombinant plasmids by double enzyme digestion. (a): Double enzyme digestion of the recombinants pGFP-cdc42-2 and pGFP-cdc42-3; (b): Double enzyme digestion of the recombinants pRed-cdc42-2 and pRed-cdc42-3; M: DNA Maker 5000; (a1) & (b1): Double enzyme digestion of *Cdc42-2* fragments; (a2): Double enzyme digestion of the recombinant plasmid pGFP-cdc42-2; (a3): Double enzyme digestion of pEGFP-C1 vector; (a4): Double enzyme digestion of the recombinant plasmid pGFP-cdc42-3; (a5) & (b5): Double enzyme digestion of *Cdc42-3* fragments; (b2): Double enzyme digestion of the recombinant plasmid pRed-cdc42-2; (b3): Double enzyme digestion of pDsRed-C1 vector; (b4): Double enzyme digestion of the recombinant plasmid pRed-cdc42-3

图 7. 重组质粒双酶切鉴定。(a): 重组质粒 pGFP-cdc42-2、pGFP-cdc42-3 双酶切鉴定; (b): 重组质粒 pRed-cdc42-2、pRed-cdc42-3 双酶切鉴定 M: DNA Maker 5000; A1&B1: *Cdc42-2* 片段双酶切; (a2): pGFP-cdc42-2 重组质粒双酶切; (a3): pEGFP-C1 空载体双酶切; (a4): pGFP-cdc42-3 重组质粒双酶切; (a5) & (b5): *Cdc42-3* 片段双酶切; (b2): pRed-cdc42-2 重组质粒双酶切; (b3): pDsRed-C1 空载体双酶切; (b4): pRed-cdc42-3 重组质粒双酶切

测序结果与 NCBI 里面 *Cdc42* 比对分析, 序列一致, 没有碱基缺失与突变。通过以上鉴定分析可以得出, 目的基因已经成功插入荧光表达载体中。

3.2. 重组质粒转染 293T 细胞实验结果与分析

将重组质粒分别转染 293T 细胞, 转染结果见图 8, 单独的 pEGFP-C1 转染见图 8(b), 转染效率高达 90%。pGFP-cdc42-2、pGFP-cdc42-3 单独转染 293T 细胞见图 8(d)、图 8(f), 均能有效表达。没有单独的 pEGFP-C1 亮(见图 8(b)), 这可能是 *Cdc42-2/3* 蛋白与 GFP 蛋白形成融合蛋白折叠的过程中, *Cdc42-2/3* 遮盖了部分 GFP 所致。

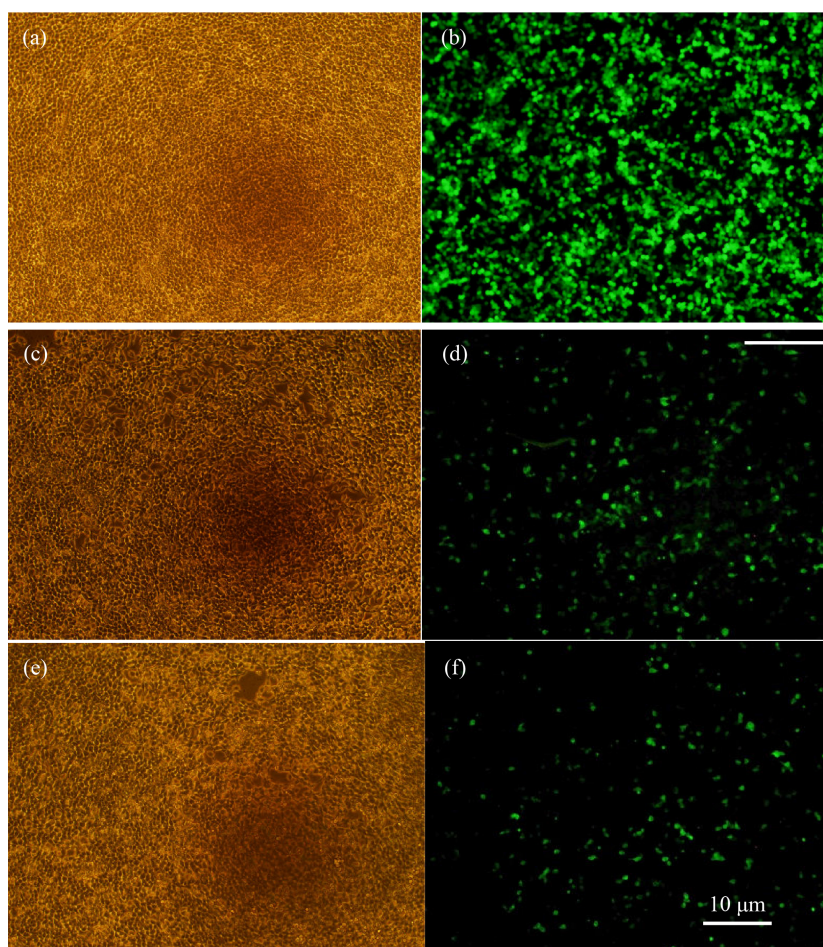


Figure 8. Transfection of 293T Cells with Recombinant Plasmids. (a) & (b): Transfection of 293T cells with pEGFP-C1; (c) & (d): Transfection of 293T cells with pGFP-cdc42-2; (e) & (f): Transfection of 293T cells with pGFP-cdc42-3; (a), (c), (e): At common optical path; (b), (d), (f): At fluorescence optical path

图 8. 重组质粒转染 293T 细胞。(a) & (b): pEGFP-C1 转染 293T 细胞; (c) & (d): pGFP-cdc42-2 转染 293T 细胞; (e) & (f): pGFP-cdc42-3 转染 293T 细胞; (a)、(c)、(e) 图为白光; (b)、(d)、(f) 图为激发光

携带红荧光基因报告基因的质粒转染 293T 细胞结果见图 9, 图 9(h) 是 pDsRed 单独转染 293T 细胞的情况。pRed-cdc42-2、pRed-cdc42-3 分别转染 293T 细胞见图 9(j) 和图 9(l), 观察到比较亮的红色荧光, 与 pGFP-cdc42-2 (见图 9(d)) 相比, pRed-cdc42-2/3 更有利于 *Cdc42* 的表达。

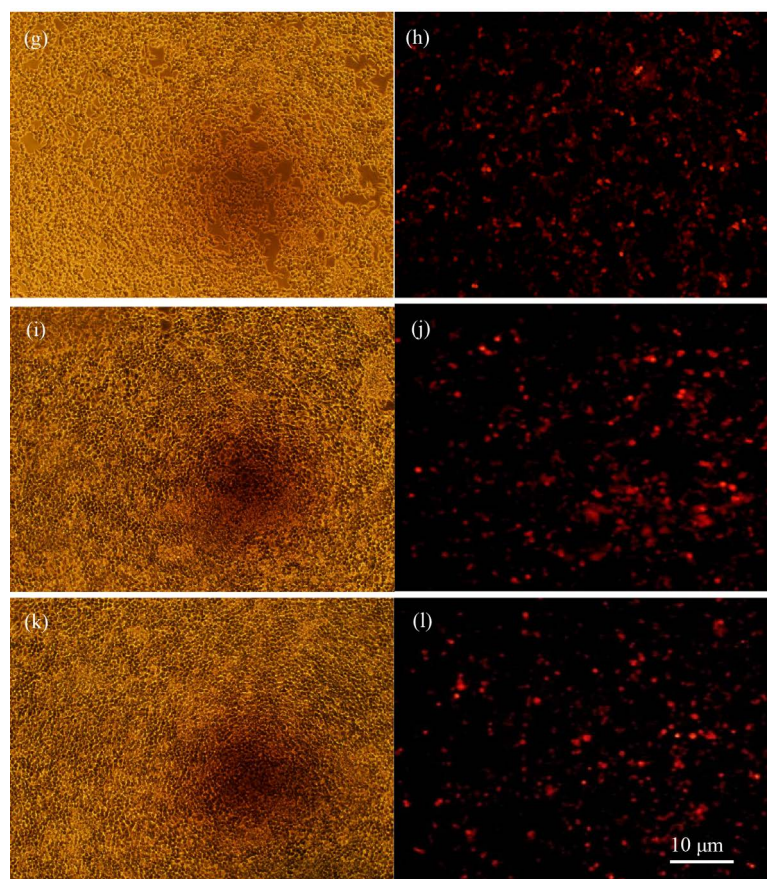


Figure 9. Transfection of 293T Cells with Recombinant Plasmids. (g) & (h): Transfection of 293T cells with pDsRed-C1; (I) & (J): Transfection of 293T cells with pRed-cdc42-2; (K) & (L): Transfection of 293T cells with pRed-cdc42-3; (a), (c), (e): At common optical path; (b), (e), (f): At fluorescence optical path

图 9. 重组质粒转染 293T 细胞。(g) & (h): pDsRed-C1 转染 293T 细胞; (i) & (j): pRed-cdc42-2 转染 293T 细胞; (k) & (l): pRed-cdc42-3 转染 293T 细胞; (a)、(c)、(e)图为白光; (b)、(e)、(f)图为激发光

由图 8 和图 9 可以看出, *Cdc42* 的同源异构体基因克隆至 pDsRed-C1 载体上的表达量要高于该基因克隆至 pEGFP-C1 载体, 这表明后续实验可以采用红荧光报告基因系列重组质粒。

3.3. CCK-8 法测定化合物细胞毒性实验结果与分析

在不同拟肽化合物浓度下, 用 CCK-8 法测定的细胞活度结果见表 2。所以后续细胞实验时, 选择了对细胞毒性较弱的 10 $\mu\text{mol/L}$ 拟肽化合物浓度, 作为试验工作浓度。

Table 2. Cell viability assay by CCK-8

表 2. CCK-8 法测定细胞活度表

拟肽化合物 4 浓度	0 $\mu\text{mol/L}$ (DMSO 对照)	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$
A549 细胞活度	1.00	0.98	0.95	0.82

3.4. *Cdc42* 协同化合物对细胞迁移的影响实验结果与分析

将重组质粒转染至迁移能力较强的 A549 细胞, 进行细胞划痕实验。根据细胞划痕实验结果, 制作

细胞迁移对比图，如图 10 所示。通过对比分析表 3 和图 10，可以得出以下结论：

- ① 细胞中过表达基因 *Cdc42* 后，细胞迁移率提高；
- ② 加拟肽化合物刺激细胞后，细胞迁移率同样是升高的；
- ③ 细胞中过表达基因 *Cdc42*，同时用化合物刺激，细胞迁移率更大。

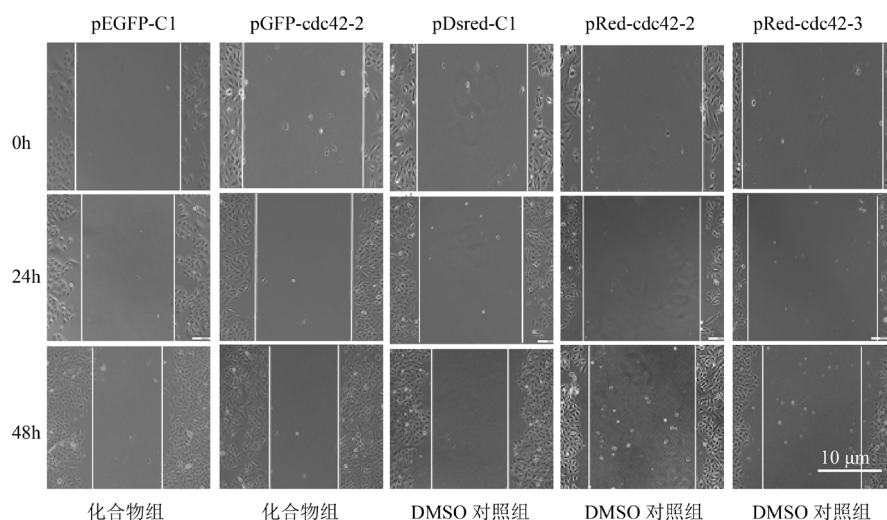


Figure 10. Cell wound scratch assay
图 10. 细胞划痕实验

Table 3. The results of Cell wound scratch assay

表 3. 细胞划痕实验结果

是否加化合物	转染质粒	48 h 细胞迁移率(%)	促进系数
是	pEGFP-C1	44.27	1.18
是	pGFP-cdc42-2	47.79	1.27
否	pDsred-C1	37.67	1.00
否	pRed-cdc42-2	39.13	1.04
否	pRed-cdc42-3	39.59	1.05

4. 讨论

Cdc42 作为一类小 GTPases，参与了众多的细胞生理过程。当有胞外信号刺激细胞时，胞内的 GEFs 会被激活，活化的 GEFs 催化 GDP 从 *Cdc42* 上解离，GTP 与 *Cdc42* 结合，*Cdc42* 由于 GTP 的结合而被活化，活化的 *Cdc42* 与效应分子结合，导致多种信号级联的激活，调节细胞的增殖、存活、侵袭和迁移等过程[2]。本研究中用的拟肽化合物 PCM4，由本实验合成，针对的靶标是细胞膜上的整联蛋白。实验结果表明，过表达 *Cdc42* 后，细胞迁移率提高，当添加 PCM4 后，细胞迁移率进一步增强，推测 PCM4 可能在胞外与膜整联蛋白结合，刺激胞内 *Cdc42* 的活化，进而通过 *Cdc42* 与效应分子结合，引起通过 *Cdc42* 介导的信号通路的开启，进而使细胞迁移率增强，具体机制有待于进一步研究。

致 谢

感谢全国大学生创新创业大赛项目(201710488013)的资助；感谢武汉科技大学大学生创新创业大赛项

目(201710488013)的资助;感谢湖北大学生物催化与酶工程国家重点实验室开放基金(SKLBEE2018002)的资助。

参考文献

- [1] Maldonado, M.D.M., Medina, J.I., Velazquez, L., *et al.* (2020) Targeting Rac and *Cdc42* GEFs in Metastatic Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**, 201. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00201>
- [2] Melendez, J., Grogg, M. and Zheng, Y. (2011) Signaling Role of *Cdc42* in Regulating Mammalian Physiology. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 2375-2381. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.200329>
- [3] Stengel, K. and Zheng, Y. (2011) *Cdc42* in Oncogenic Transformation, Invasion, and Tumorigenesis. *Bone*, **23**, 1415-1423. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.04.001>
- [4] Sinha, S. and Yang, W. (2008) Cellular Signaling for Activation of Rho GTPase *Cdc42*. *Cell Signal*, **20**, 1927-1934. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.05.002>
- [5] Xiao, X.H., Lv, L.C., Duan, J., *et al.* (2018) Regulating *Cdc42* and Its Signaling Pathways in Cancer: Small Molecules and MicroRNA as New Treatment Candidates. *Molecules*, **23**, 787-808. <https://doi.org/10.3390/molecules23040787>
- [6] Zhang, Y., Li, J., Lai, X.N., *et al.* (2019) Focus on *Cdc42* in Breast Cancer: New Insights, Target Therapy Development and Non-Coding RNAs. *Cells*, **8**, 146. <https://doi.org/10.3390/cells8020146>
- [7] Aspenström, P. (2018) Activated Rho GTPases in Cancer—The Beginning of a New Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 3949. <https://doi.org/10.3390/ijms19123949>
- [8] Svensmark, J.H. and Brakebusch, C. (2019) Rho GTPases in Cancer: Friend or Foe? *Oncogene*, **38**, 7447-7456. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0963-7>
- [9] Porazinski, S., Parkin, A. and Pajic, M. (2020) Rho-ROCK Signaling in Normal Physiology and as a Key Player in Shaping the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1223**, 99-127. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35582-1_6
- [10] Zhang, M., Guo, W., Qian, J., *et al.* (2016) Negative Regulation of *Cdc42* Expression and Cell Cycle Progression by miR-29A in Breast Cancer. *Open Medicine*, **11**, 78-82. <https://doi.org/10.1515/med-2016-0015>
- [11] Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., *et al.* (2000) Translocation of SAPK/JNK to Mitochondria and Interaction with Bcl-x(L) in Response to DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 322-327. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.322>
- [12] Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., *et al.* (1999) Control of Cell Cycle Progression by c-Jun Is p53 Dependent. *Genes & Development*, **13**, 607-619. <https://doi.org/10.1101/gad.13.5.607>
- [13] Zhang, Y., Jiang, L., Qu, X.C., *et al.* (2010) Expression of *Cdc42* in Adriamycin-Sensitivity and Adriamycin-Resistance MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *Chinese Journal of General Surgery*, **19**, 493-496.
- [14] Schiff, R., Massarweh, S.A., Shou, J., *et al.* (2004) Cross-Talk between Estrogen Receptor and Growth Factor Pathways as a Molecular Target for Overcoming Endocrine Resistance. *Clinical Cancer Research*, **10**, 331s-336s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-031212>
- [15] Azios, N.G., Krishnamoorthy, L., Harris, M., *et al.* (2007) Estrogen and Resveratrol Regulate Rac and *Cdc42* Signaling to the Actin Cytoskeleton of Metastatic Breast Cancer Cells. *Neoplasia*, **9**, 147-158. <https://doi.org/10.1593/neo.06778>
- [16] Gao, Y., Xing, J., Streuli, M., *et al.* (2001) Trp(56) of rac1 Specifies Interaction with a Subset of Guanine Nucleotide Exchange Factors. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 47530-47541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108865200>
- [17] Humphries-Bickley, T., Castillo-Pichardo, L., Hernandez-O'Farrill, E., *et al.* (2017) Characterization of a Dual Rac/*Cdc42* Inhibitor MBQ-167 in Metastatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, **16**, 805-818. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0442>
- [18] Frost, J.A., Swantek, J.L., Stippec, S., *et al.* (2000) Stimulation of NFkappa B Activity by Multiple Signaling Pathways Requires PAK1. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 19693-19699. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909860199>
- [19] 涂国刚, 李少华, 黄惠明, 等. 小分子拟肽类氨肽酶 N 抑制剂的合成及初步活性[J]. 中国药物化学杂志, 2008(5): 345-349.