

PBK/TOPK在乳腺癌细胞中介导MEK非依赖性ERK激活中作用机制分析

李晓勇¹ 刘涛¹ 李建¹ 刘超¹ 刘宇宏^{2*}

(¹延安大学附属医院普外科, 延安 716000; ²延安大学附属医院风湿免疫科, 延安 716000)

摘要 该文探讨了乳腺癌细胞中表皮生长因子(EGF)介导的MEK非依赖性ERK激活通路。Western blot检测EGF刺激下, siRNA抑制MEK1/2后的T47D细胞的p-ERK水平, 以验证T47D细胞中存在EGF介导的MEK非依赖性ERK激活的通路。接着使用可能参与MEK非依赖性ERK激活的激酶的小分子抑制剂抑制相关激酶(AC、PKC、Src、PI3K、PDK1和Akt)活性后, 检测T47D细胞EGF介导ERK的磷酸化水平。siRNA抑制MEK1/2表达后, T47D细胞在EGF刺激后的仍保留部分p-ERK, 即在T47D细胞中, 存在EGF介导的MEK非依赖性的ERK磷酸化通路。小分子抑制剂抑制AC、PKC、Src对MEK非依赖性ERK激活途径影响不大。而使用小分子抑制剂抑制PI3K、PDK1和Akt后, ERK的磷酸化水平显著降低, 提示PI3K/Akt通路下游的激酶参与T47D中EGF介导的MEK非依赖性ERK激活途径。siRNA干扰PI3K/Akt通路下游PBK/TOPK后并使用U0126抑制MEK功能后, 几乎检测不到p-ERK, 提示PBK/TOPK参与T47D细胞中EGF介导的MEK非依赖性ERK激活途径。乳腺癌抗雌激素药物耐药株T47D细胞存在EGF介导的MEK非依赖性ERK激活途径, 且该途径受PI3K/Akt下游的PBK/TOPK调控。

关键词 乳腺癌细胞; MEK; ERK; PBK/TOPK

Mechanism of PBK/TOPK in Mediating MEK-Independent ERK Activation in Breast Cancer Cells

LI Xiaoyong¹, LIU Tao¹, LI Jian¹, LIU Chao¹, LIU Yuhong^{2*}

(¹Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China;

²Department of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract The aim of this article was to investigate the EGF (epidermal growth factor)-mediated MEK-independent ERK activation pathway in breast cancer cells. Under the stimulation of EGF detected by Western blot, siRNA inhibited the p-ERK level of T47D cells after MEK1/2 treatment. This article was to confirm the presence of EGF-mediated MEK-independent ERK activation in T47D cells. The phosphorylation level of ERK mediated by EGF in T47D cells was then measured after inhibition of the activity of related kinases (AC, PKC, SRC, PI3K, PDK1 and Akt) by small molecular inhibitors of kinases that may be involved in MEK independent ERK activation. After MEK1/2 inhibition, T47D cells retained partial p-ERK under the stimulation of EGF, EGF-mediated MEK-independent ERK phosphorylation pathway in T47D cells. The AC, and PKC and Src inhibition by small molecule

收稿日期: 2019-09-03 接受日期: 2019-11-06

陕西省重点研发计划(批准号: 2019SF-121)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15911133306, E-mail: wangphy871@163.com

Received: September 3, 2019 Accepted: November 6, 2019

This work was supported by the Key Basic Research and Development Program of Shaanxi Province (Grant No.2019SF-121)

*Corresponding author. Tel: +86-15911133306, E-mail: wangphy871@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5153>

inhibitors have little effect on MEK-independent ERK activation pathway. The phosphorylation level of ERK was significantly decreased after inhibition of PI3K, PDK1 and Akt by small molecule inhibitors, suggesting that the kinase downstream of the PI3K/Akt pathway was involved in the EGF-mediated MEK-independent ERK activation pathway in T47D cells. After PBK/TOPK downstream of PI3K/Akt pathway interfered by siRNA and MEK1/2 function inhibited treated by U0126, p-ERK was almost undetectable, suggesting that PBK/TOPK was involved in EGF-mediated MEK-independent ERK activation pathway in T47D cells. EGF-mediated MEK-independent ERK activation pathway is present in breast cancer anti-estrogen drug-resistant strain T47D cells, and this pathway is regulated by PBK/TOPK downstream of PI3K/Akt.

Keywords breast cancer cells; MEK; ERK; PBK/TOPK

表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)是ErbB(ErbB1~4)家族的一员,即ErbB1,是一种跨膜酪氨酸激酶受体,其通过调节细胞分化及细胞形态参与正常乳腺的生长及发育过程^[1-2]。超过15%乳腺癌患者的癌组织中有EGFR基因的过度表达。近年来,越来越多的临床和实验结果提示,EGFR信号通路与乳腺癌内分泌治疗耐药密切相关^[3-4]。Ras/Raf/MEK[mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase]/ERK通路和PI3K/PDK1/Akt(又名protein kinase B, PKB)通路是EGF/EGFR下游的两条主要的经典通路。磷酸化的ERK、Akt及其底物向细胞核内的移位导致特定基因的表达,从而调控细胞的增殖、分化、黏附、迁移、细胞骨架重排、代谢变化等。本课题组在研究EGF/EGFR与内分泌治疗耐药相关性时,发现一个有趣的现象:EGF能提高小分子抑制剂抑制MEK1/2后的T47D细胞的ERK磷酸化水平,而MCF7细胞则无该现象。雌激素受体阳性乳腺癌T47D和MCF7细胞常常作为对照模型用于乳腺癌内分泌治疗研究,其中T47D为抗雌激素药物耐药株,而MCF7为抗雌激素药物敏感株^[5]。故推测在T47D细胞中,有一个由EGR介导的MEK非依赖的ERK激活途径。为深入了解该EGR介导的MEK非依赖的ERK激活途径,本课题组进行了以下研究。

1 材料与方法

1.1 细胞系与细胞培养

本实验使用的人乳腺导管癌细胞T47D和MCF7均购于上海斯信生物科技有限公司。其中T47D细胞用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 µg/mL)、20 µg/mL牛胰岛素的RPMI 1640培养基培养。MCF7细胞用含10%胎牛血清、青霉素

(100 U/mL)和链霉素(100 µg/mL)的DMEM/F-12培养基培养。所有细胞均在37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.2 配体刺激实验

细胞在培养皿中用完全培养基培养至对数生长期,以 1×10^6 个/孔接种于6孔板,完全贴壁后,更换无血清培养基饥饿细胞24 h。加入相应浓度的EGF等配体,在37 °C条件下培养指定的时间间隔。

1.3 小分子抑制剂抑制实验

本研究所使用的小分子抑制剂均购于中国爱必信生物有限公司,各小分子抑制剂的名称及其对应靶蛋白名称如表1所示。细胞在培养皿中用完全培养基培养至对数生长期,小分子抑制剂处理组细胞更换含有相应浓度的小分子抑制剂的新鲜培养基培养;对照组细胞则更换新鲜培养基。小分子抑制后若需进行配体刺激实验则在加入小分子抑制剂3 h后加入配体。

1.4 siRNA干扰实验

本研究中使用siRNA均购于赛默飞世尔科技公司,siRNA序列为经验证的序列。取对数生长期的细胞,胰酶消化后用不含抗生素的完全培养基重悬细胞,把细胞悬液以 8×10^5 个/管的浓度加入EP管,分装3管,室温下 $90 \times g$ 离心10 min。去上清后,分别用100 µL含有20 nmol/L siRNA的Nucleofector V溶液(购于上海翊圣生物科技有限公司)重悬细胞。将重悬后的细胞加入转染杯并置入转染仪转染10 s,取出细胞继续培养。

1.5 蛋白提取及Western blot

细胞用预冷的PBS清洗3遍, RAPI裂解,收集各组细胞裂解物,离心后收集上清液。BCA法测定样品蛋白质浓度,加入4×上样缓冲液煮沸5 min,于4 °C条件下保存。依据蛋白质浓度测定结果上等量

表1 本研究使用的小分子抑制剂及其对应靶蛋白的名称

小分子抑制剂	靶蛋白
Small molecule inhibitor	Target proteins
U0126	MEK [mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase]
WT (wortmannin)	PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)
OSU-03012	PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1)
Akt-VIII	Protein kinase B (eg. Akt1~3)
SQ22536	AC (adenylate cyclase)
Gö6850	PKC (protein kinase C)
Gö6983	PKC (protein kinase C)
Su6656	Src-family protein kinases

样品, 进行SDS-PAGE(10%或12%)后, 恒流350 mA, 100 min, 将蛋白转至PVDF膜上。用含5%脱脂奶粉的TBS封闭液, 将膜室温封闭1 h, 加入一抗4 °C孵育过夜, 用TBST洗3遍, 每遍10 min, 加入荧光标记二抗室温孵育1 h, 用TBST洗3遍后, 滴加化学发光剂溶液(electrochemiluminescence, ECL)在显影仪上进行显影。

1.6 数据处理

采用SPSS 25软件对实验数据进行分析统计, 实验结果重复3次, 以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)来表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGF诱导的T47D细胞ERK磷酸化仅部分依赖于MEK活性

EGF介导的MEK/ERK 和 PI3K/Akt信号通路应答及各种小分子抑制剂的靶蛋白位点如图1所示。

为验证T47D细胞中存在EGF介导的MEK非依赖性ERK激活的通路。利用siRNA抑制T47D细胞MEK1/2表达, 阴性对照采用scrambled siRNA干扰(Scr siRNA), Western blot检测p-ERK与MEK1/2蛋白水平。结果如图2所示, 在野生型组(WT)没有EGF刺激时, 几乎检测不到p-ERK。转染MEK1/2 siRNA的细胞中MEK1/2的表达明显被抑制, 较阴性对照组(Scr siRNA) MEK1/2表达量被抑制90%以上, 差异有统计学意义($P<0.01$)。而MEK1/2 siRNA组的ERK磷酸化水平仅比Scr siRNA组低10%, 差异有统计学意义。即MEK1/2表达水平与ERK的磷酸化水平呈现出非等比例的下降。结果提示, 尽管MEK1/2 siRNA抑制了大部分的MEK1/2表达, 但是ERK磷酸化水平

却没有伴随着MEK1/2大幅下降, 即T47D细胞中存在EGF介导的MEK非依赖性ERK磷酸化途径。

2.2 T47D细胞中MEK非依赖性ERK激活仅由ErbB家族配体触发

上述结果表明, T47D细胞中存在一条由EGF介导的MEK非依赖性的ERK激活途径。为进一步验证这种MEK非依赖性的ERK激活途径是否为ErbB受体家族特异性。ErbB家族受体除了受EGF调控外, 还受另外10种配体调控, 如转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)、HRG- β (heregulin- β)、双调蛋白(amphiregulin)、epigen等。分别用EGF、TGF- α 和HRG- β 刺激T47D细胞不同时间, 并检测p-ERK, 结果如图3所示, 在没有U0126时, 3种ErbB家族受体的配体(EGF、TGF- α 和HRG- β)均能显著引起ERK磷酸化, 而在U0126抑制MEK1/2后, 也能明显检测到p-ERK。

分别用PDGF、FGF、PRL与乳腺癌发生发展密切相关的非ErbB家族受体的配体刺激T47D细胞, Western blot检测p-ERK水平。结果如图3所示, PDGF、FGF和VEGF组, 即使没有U0126抑制MEK1/2功能, p-ERK的水平也均很低。在U0126存在时, p-ERK显著降低($P<0.01$)。上述结果说明, T47D细胞中MEK非依赖性ERK激活仅由ErbB家族配体触发。

2.3 MEK非依赖性ERK激活受PI3K/Akt下游的激酶调控

为进一步探究T47D细胞中EGF介导的MEK非依赖性ERK激活途径, 使用可能参与MEK非依赖性ERK激活的激酶的小分子抑制剂抑制相关激酶活性后, 检测T47D细胞EGF介导ERK的磷酸化水平。相关小分子抑制剂及其抑制的激酶如表1所示。结果

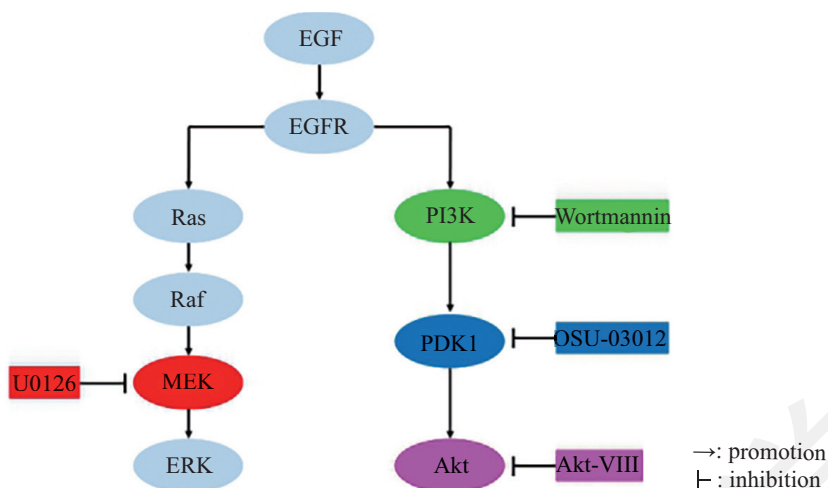


图1 EGF介导的MEK/ERK和PI3K/Akt信号通路应答及对应小分子抑制剂作用位点示意图

Fig.1 Schematic diagram of EGF-mediated response to MEK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways and corresponding sites of small molecule inhibitors

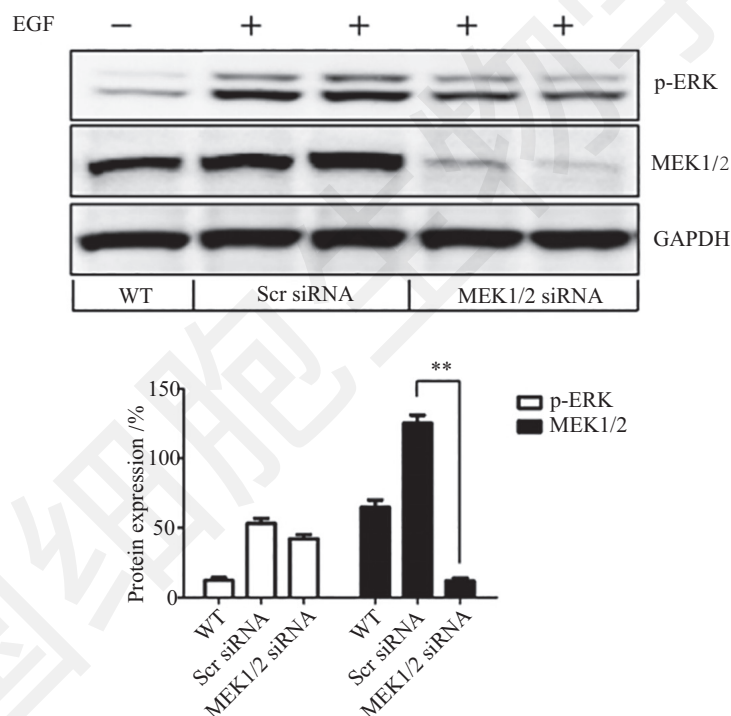


图2 siRNA干扰MEK1/2后, EGF刺激T47D细胞后的ERK磷酸化水平

Fig.2 EGF stimulates ERK phosphorylation in T47D cells after MEK1/2 interfered by siRNA

如图4所示, 分别使用多种小分子抑制剂抑制AC、PKC、Src后, ERK磷酸化水平与单独使用U0126无显著差异, 即AC、PKC、Src等对MEK非依赖性ERK激活途径影响不大。然而, 使用小分子抑制剂抑制PI3K、PDK1和Akt后, ERK的磷酸化水平显著降低。结果提示, PI3K/Akt通路下游的激酶参与T47D中EGF介导的MEK非依赖性ERK激活途径。

2.4 MEK非依赖性的ERK激活依赖于PBK/TOPK激酶

上述结果提示, ERK的MEK非依赖性的ERK激活途径受PI3K/Akt下游的激酶调控。

根据文献报道, 其中涉及到ERK激活的Akt下游激酶主要有胆绿素还原酶(biliverdin reductase, BVR)^[6-7]、PDZ连接激酶/T-LAK细胞源蛋白激酶

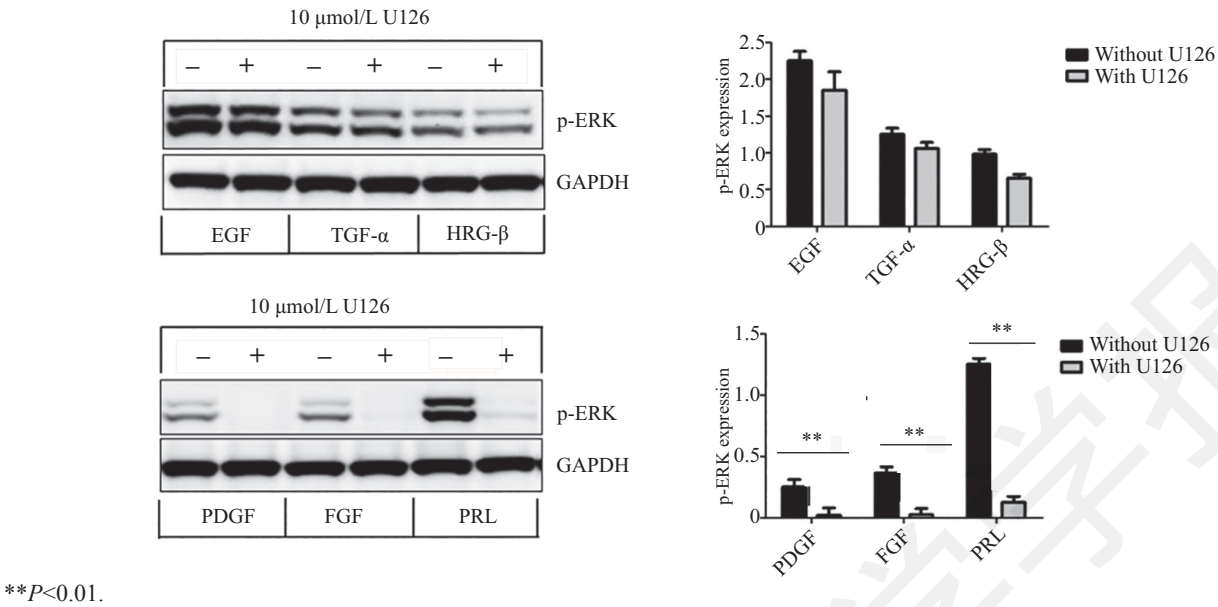


图3 ErbB家族配体与非ErbB家族配体对ERK磷酸化水平的影响
Fig.3 Effects of ErbB family ligands and non-ErbB family ligands on ERK phosphorylation

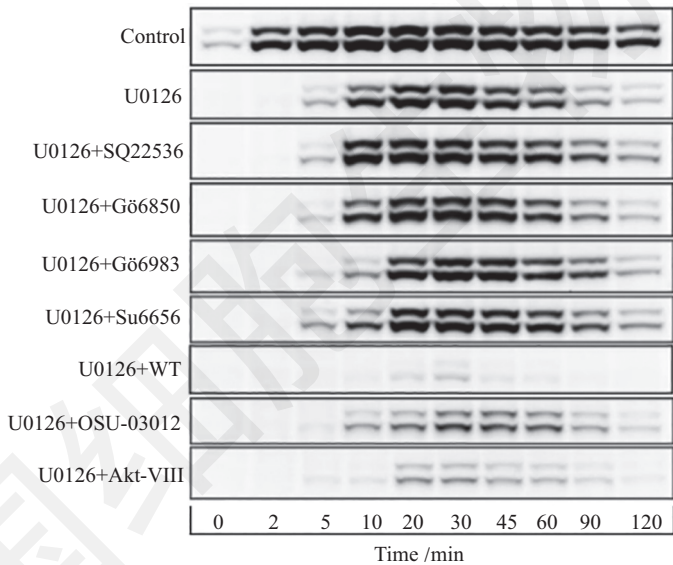


图4 不同抑制剂抑制相应蛋白激酶后对ERK的磷酸化水平的影响
Fig.4 Effects of different inhibitors on the phosphorylation level of ERK after inhibiting corresponding protein kinases

(PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase, PBK/TOPK)^[8-10]、受体相互作用蛋白2(receptor interacting protein 2, RIP2)^[11-12]和Fer激酶(Fer kinase, Fer)^[13]。分别使用对应的siRNA干扰相应的蛋白表达后,检测EGF刺激的ERK磷酸化水平,结果如图5所示,Scr siRNA组中,可检测到明显的磷酸化ERK,此外, BVR、RIP2和Fer siRNA处理组的同样也能检测到明显的磷酸化ERK, Scr siRNA组中无显著差异。然而, PBK/TOPK siRNA组的ERK磷酸化水平

明显较对照组低。

此外,在 PBK/TOPK siRNA组再加入 U0126 抑制剂抑制MEK1/2功能后,几乎检测不到磷酸化ERK。结果提示, U0126通过抑制MEK1/2功能抑制了大部分的ERK磷酸化,然而在T47D细胞中存在MEK非依赖性的ERK激活途径,故仍能检测到磷酸化的ERK。siRNA抑制PBK/TOPK表达和U0126抑制MEK1/2功能双重作用下,几乎检测不到p-ERK,此时的MEK依赖性的ERK激活通路与EGF介导的非

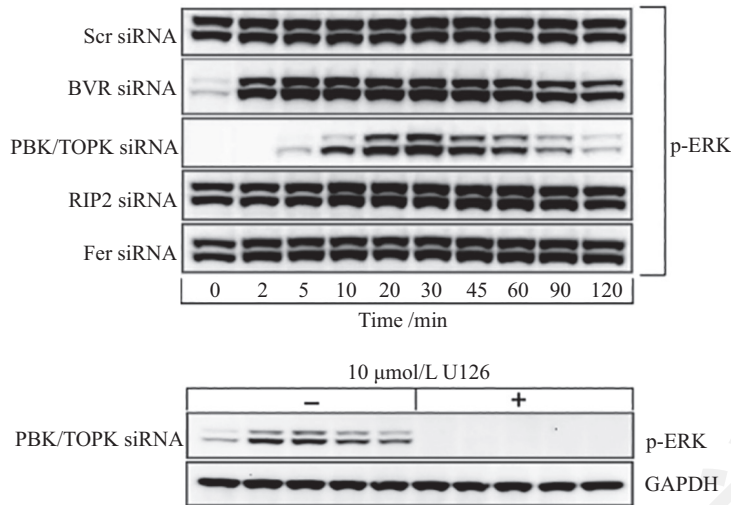


图5 抑制PBK/TOPK激酶对MEK非依赖性的ERK磷酸化水平的影响

Fig.5 Effect of inhibition of PBK/TOPK kinase on MEK-independent ERK phosphorylation

MEK依赖性的ERK激活均被抑制。即PBK/TOPK参与T47D细胞中EGF介导的MEK非依赖性ERK激活途径。

3 讨论

细胞存活(Ras/MAPK)通路和有丝分裂(PI3K/Akt)通路是EGFR等多种膜受体信号向细胞内转导的重要途径,它们调节着细胞凋亡、生长以及一些重要基因的表达。两条信号通路常常会发生复杂的串扰(crosstalk),形成复杂的调控网络^[14-16]。这种复杂的相互作用可使细胞外的致瘤信号增强或提高肿瘤细胞的耐药性。

本课题组在前期实验中发现,EGF均能引起T47D(抗雌激素药物耐药株)和MCF7细胞(抗雌激素药物敏感株)的ERK的磷酸化而形成活化形式的ERK1/2(p-ERK1/2),但其激活模式明显不同。小分子抑制剂U0126抑制MEK1/2功能后,能明显降低MCF7细胞的ERK磷酸化水平。但是在T47D细胞中,使用小分子抑制剂U0126抑制MEK蛋白激酶功能或是直接使用siRNA干扰MEK的表达,仅能降低部分的ERK磷酸化。我们推测,在T47D细胞中或存在EGF介导的非MEK依赖性的ERK激活途径。

EGFR是ErbB家族的一员,在人类中,该家族包括Her1(EGFR、ErbB1)、Her2(Neu、ErbB2)、Her3(ErbB3)和Her4(ErbB4)^[17]。目前研究报道,共有11种生长因子可激活ErbB受体,如EGF、TGF- α 、HB-EGF、amphiregulin、betacellulin等^[18-19]。本研究通过对比EGF、

TGF- α 和HRG- β 等ErbB家族配体与另外PDGF、FGF、PRL等与乳腺癌发生发展相关的非ErbB家族配体对U0126抑制MEK后的T47D细胞ERK的磷酸化水平的影响,发现T47D细胞中MEK非依赖性ERK激活途径为ErbB家族配体特异性的。

通过一组广泛的小分子抑制剂抑制相应蛋白激酶(包括AC、PKC、Src、PI3K、PDK1和Akt)活性后,检测对MEK非依赖性ERK激活途径的影响,发现抑制PI3K、PDK1和Akt活性后,MEK非依赖性ERK激活途径也明显受到抑制。结果提示,这种MEK非依赖性ERK激活途径受PI3K/Akt下游的蛋白激酶调控。PI3K/Akt信号通路参与ERK的激活已有相关文献报道,PI3K/Akt下游的BVR、PBK/TOPK、RIP2和Fer激酶均可能参与MEK非依赖性ERK激活途径。本研究通过siRNA抑制BVR、PBK/TOPK、RIP2和Fer激酶表达后,发现PBK/TOPK为PI3K/Akt信号通路下游参与MEK非依赖性ERK激活途径的关键激酶。

PBK/TOPK是近年来新发现的一种Ser/Thr,最早由GAUDET等^[20]在酵母双杂交筛选中发现,可与人肿瘤抑制因子hDlg的PDZ2结构域结合,故被命名为PDZ-binding kinase。另一个研究小组在淋巴因子激活的杀伤性T细胞中发现了一种类似有丝分裂原活性蛋白激酶激酶(MAPKK)的蛋白激酶^[21]。后面通过序列分析发现两者为同一种基因,故命名为PBK/TOPK。PBK/TOPK在很多肿瘤细胞中高表达,与这些肿瘤细胞的快速增殖和耐药密切相关。本研

究的结果提示, PBK/TOPK参与乳腺癌T47D细胞的MEK非依赖性ERK激活途径, 我们推测, 该途径可能与T47D细胞的抗雌激素药物耐药有关。

综上所述, 本研究发现, 在抗刺激素药物耐药细胞株T47D中存在一条由EGF介导的MEK非依赖性ERK激活通路, 该激活途径受PI3K/Akt下游的PBK/TOPK调控。后续将继续研究该通路与乳腺癌内分泌治疗耐药的相关性, 为逆转乳腺癌内分泌治疗耐药提供一个潜在的靶点。

参考文献 (References)

- [1] TU H Y, KE E E, YANG J J, et al. A comprehensive review of uncommon EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2017, 114: 96-102.
- [2] 杨宇峰, 李锦薇, 林思园, 等. CK5/6、EGFR、p53与Ki67在乳腺癌组织中的表达及其意义[J]. *海南医学*(YANG Y F, LI B W, LIN S Y, et al. Expression of CK5/6, EGFR, p53 and Ki67 in breast cancer and their significance [J]. *Hainan Medical Journal*), 2017, 27(8): 1233-36.
- [3] BALAKRISHNAN S, MUKHERJEE S, DAS S, et al. Gold nanoparticles-conjugated quercetin induces apoptosis via inhibition of EGFR/PI3K/Akt-mediated pathway in breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) [J]. *Cell Biochem Funct*, 2017, 35(4): 217-31.
- [4] 逢晓玲, 王一丁, 朱杰, 等. 乳腺癌ER相关内分泌耐药机制的研究进展[J]. *转化医学电子杂志*(PENG X L, WANG Y D, ZHU J, et al. Research progress on estrogen receptor related drug-resistance mechanisms of endocrine therapy in breast cancer [J]. *E-Journal of Translational Medicine*), 2017, 4(9): 62-5.
- [5] IRAVANI O, BAY B H, YIP G W. Silencing HS6ST3 inhibits growth and progression of breast cancer cells through suppressing IGF1R and inducing XAF1 [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 350(2): 380-9.
- [6] LERNER-MARMAROSH N, MIRALEM T, GIBBS P E, et al. Human biliverdin reductase is an ERK activator; hBVR is an ERK nuclear transporter and is required for MAPK signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(19): 6870-5.
- [7] GIBBS P E, MIRALEM T, LERNER-MARMAROSH N, et al. Formation of ternary complex of human biliverdin reductase-protein kinase Cdelta-ERK2 protein is essential for ERK2-mediated activation of Elk1 protein, nuclear factor-kappaB, and inducible nitric-oxidase synthase (iNOS) [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2): 1066-79.
- [8] 曾晨曦, 袁萍, 孙军. 抗肿瘤药物: PBK/TOPK抑制剂的研究进展[J]. *生命的化学*(ZENG C X, YUAN P, SUN J. The research progress of antitumor drugs: PBK/TOPK inhibitors [J]. *Chemistry of Life*), 2018, 1: 150-5.
- [9] HINDLEY A, KOLCH W. Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 8): 1575-81.
- [10] ISHIKAWA C, SENBA M, MORI N. Mitotic kinase PBK/TOPK as a therapeutic target for adult Tcell leukemia/lymphoma [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(2): 801-14.
- [11] WU X M, CHEN W Q, HU Y W, et al. RIP2 is a critical regulator for NLRs signaling and MHC antigen presentation but not for MAPK and PI3K/Akt pathways [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 726.
- [12] 张莉, 钱后, 徐应杰, 等. 沙眼衣原体质粒蛋白Pgp3经NOD1/RIP2信号通路诱导HeLa细胞产生IL-8[J]. *免疫学杂志*(ZHANG L, QIAN H, XU Y J, et al. Chlamydia trachomatis plasmid-encoded Pgp3 induces IL-8 production in HeLa cells through NOD1/RIP2 signaling pathway [J]. *Immunological Journal*), 2017, 9: 30-4.
- [13] SANGRAR W, SHI C, MULLINS G, et al. Amplified Ras-MAPK signal states correlate with accelerated EGFR internalization, cytostasis and delayed HER2 tumor onset in Fer-deficient model systems [J]. *Oncogene*, 2015, 34(31): 4109-17.
- [14] Borrie S C, Brems H, Legius E, et al. Cognitive dysfunctions in intellectual disabilities: the contributions of the Ras-MAPK and PI3K-AKT-mTOR pathways [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2017, 18(1): 115-42.
- [15] TANG H, XUE G. Major physiological signaling pathways in the regulation of cell proliferation and survival [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2018, 249: 13-30.
- [16] AKSAMITIENE E, KIYATKIN A, KHOLODENKO B N. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance [J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(1): 139-46.
- [17] WANG Z. ErbB receptors and cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1652: 3-35.
- [18] ZHANG Q, JEPPESEN D K, HIGGINBOTHAM J N, et al. Mutant KRAS exosomes alter the metabolic state of recipient colonic epithelial cells [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(4): 627-926.
- [19] ZOU M, SAMIULLAH M, XU P, et al. Construction of novel procoagulant protein targeting neuropilin-1 on tumour vasculature for tumour embolization therapy [J]. *J Drug Target*, 2019, 27(8): 885-95.
- [20] GAUDET S, BRANTON D, LUE R A. Characterization of PDZ-binding kinase, a mitotic kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5167-72.
- [21] ABE Y, MATSUMOTO S, KITO K, et al. Cloning and expression of a novel MAPKK-like protein kinase, lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase, specifically expressed in the testis and activated lymphoid cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21525-31.