基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003589

建立稳定敲减MINK1表达的肺腺癌细胞系及对其初步分析

张 涛[1]，张 莲[2]，张春冬[1]

（1.重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室，重庆 400016；
2.重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：构建稳定敲减 Misshapen/NIK-related kinase（MINK1）表达肺腺癌细胞系，并检测稳定敲减其表达后对细胞增殖、迁移运动及顺铂治疗的影响。**方法：**利用肺腺癌 A549 和 PC-9 细胞，基于 pLKO.1-shRNA 慢病毒基因敲减表达系统构建稳定敲减 MINK1 表达细胞系，分别通过 qRT-PCR 和 Western bolt 在 mRNA 和蛋白水平检测敲减效率。CCK-8 和 Transwell 检测稳定敲减 MINK1 表达对细胞增殖和迁移运动的影响，流式细胞检测细胞周期与凋亡变化情况；分析稳定敲减 MINK1 表达对顺铂治疗敏感性变化情况，并通过免疫荧光染色 DNA 损伤标志物 γH2AX 检测细胞 DNA 损伤水平。**结果：**qRT-PCR 和 Western bolt 分析结果显示 2 个特异 shRNA 均可显著下调 MINK1 表达。稳定敲减 MINK1 表达的肺腺癌细胞增殖能力降低，迁移运动能力下降；且敲减 MINK1 表达明显增强化疗药物顺铂对癌细胞杀伤作用，并诱导 DNA 损伤水平增加。**结论：**利用肺腺癌 A549 和 PC-9 细胞成功构建稳定敲减 MINK1 肺腺癌细胞系，而稳定敲减其表达可抑制癌细胞增殖及迁移运动，且可能通过调节 DNA 损伤修复过程促肺癌细胞耐药。

【关键词】肺腺癌；MINK1；细胞增殖；迁移运动；DNA 损伤修复

【中图分类号】R735.7 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2024-03-13

Establishment and preliminary analysis of lung adenocarcinoma cell lines with stable MINK1 knockdown

Zhang Tao[1]，*Zhang Lian*[2]，*Zhang Chundong*[1]

（*1. Department of Biochemistry and Molecular Biology，School of Basic Medical Sciences，Chongqing Medical University；2. Department of Histology and Embryology，School of Basic Medical Sciences，Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To establish lung adenocarcinoma cell lines with stable knockdown of the expression of encoding Misshapen/NIK-related kinase（MINK1）and analyze the effects of stable MINK1 knockdown on cell proliferation，migration，and cisplatin treatment. ***Methods*：**In lung adenocarcinoma A549 and PC-9 cells，cell lines with stable MINK1 knockdown were constructed based on the pLKO.1-shRNA lentiviral expression system. The knockdown efficiency was detected at the mRNA and protein levels using qRT-PCR and Western blot. CCK-8 and Transwell assays were used to assess the effects of stable MINK1 knockdown on cell proliferation and migration. Flow cytometry was used to detect changes in cell cycle and apoptosis. The sensitivity of cells with stable MINK1 knockdown to cisplatin treatment was analyzed. The level of DNA damage in cells was detected by immunofluorescence staining of the DNA damage marker γH2AX. ***Results*：**qRT-PCR and Western blot showed that shRNA significantly downregulated the expression of MINK1. Proliferation and migration were reduced in lung adenocarcinoma cells with stable MINK1 knockdown. MINK1 knockdown significantly enhanced the cytotoxic effect of the chemotherapy drug cisplatin on cancer cells and induced an increase in the level of DNA damage. ***Conclusion*：**Lung adenocarcinoma cell lines with stable MINK1 knockdown were successfully established using A549 and PC-9 cells. Stable MINK1 knockdown can inhibit cancer cell proliferation and migration and may reduce the drug resistance of lung cancer cells by regulating the DNA damage repair process.

【Key words】lung adenocarcinoma；MINK1；cell proliferation；cell migration；DNA damage repair

作者介绍：张 涛，Email：taozyunlife@163.com，研究方向：分子肿瘤学。

通信作者：张春冬，Email：zhangcd@cqmu.edu.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：82173243）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240926.1021.022（2024-09-27）

肺癌是目前全世界发病率及致死率均高居肿瘤谱前列的恶性肿瘤，肺癌包括小细胞肺癌（约占15%）及非小细胞肺癌（约占85%），其中肺腺癌与肺鳞癌是非小细胞肺癌的主要亚型[1]。由于肺癌具有高度异质性，其发生发展的具体分子机制尚不完全清楚；且因缺乏早期诊断指标，其确诊时往往在中晚期且伴随转移，导致5年生存率仍然较低[2]。近年来虽然治疗手段有所进步，但手术切除后联合化疗治疗仍是主要策略[3-6]。顺铂是一种铂类广谱抗癌药物，临床上广泛应用于肺癌、卵巢癌等多种实体肿瘤，且均有一定作用[7-8]。顺铂与多种DNA损伤诱导化疗药物作用机理类似，细胞内可通过直接与DNA结合诱导DNA损伤导致增殖抑制及细胞凋亡而产生抗肿瘤作用[9]。但临床实践中随着顺铂用药时间推移，癌细胞易对治疗产生耐药而复发，是导致患者生存率低的原因之一[10]。因此，鉴定新的潜在耐药关键基因并阐明其在肿瘤耐药复发中的关键分子机制，对寻找新的药物靶点及提高治疗敏感性具有重要意义。

Misshapen/NIK-related kinase（MINK1）是Ste20激酶家族成员之一，具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性[11-12]。文献报道显示MINK1广泛参与细胞内多种信号通路的调节，作为经典MAPK信号通路上游激酶，MINK1可调节小G蛋白（small G protein，Ras）、氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase，c-Jun）、磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidyl-inositol 3-kinase，PI3K）及Wnt/β-catenin等信号通路[13-14]；同时MINK1作为MST1/2同源物，其激酶活性亦能直接磷酸化修饰LAT1/2，从而影响Hippo信号通路活性，最终控制细胞生长、细胞骨架重排、细胞运动、细胞衰老、血小板等生理病理过程[15]。有报道显示MINK1在恶性肿瘤发生发展中具有重要作用，如MINK1高表达可促乳腺癌转移[16]。但目前关于MINK1在肺癌中的作用及机制仍不明确。

本研究中利用肺腺癌A549和PC-9细胞构建稳定敲减MINK1表达细胞系，并检测敲减其表达对癌细胞增殖与迁移运动的影响，以及其对于化疗药物顺铂的响应情况。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌A549、PC-9和人胚肾293T细胞由本实验室保存。pLKO.1-Puro-shRNA质粒由本课题组保存。转染试剂Lipofectamine3000和Opti-MEDTM培养基均购于Thermo Scientific公司；胎牛血清和青霉素-链霉素溶液购自百赛生物；DMEM高糖培养基、DMEM/F12培养基购于Gibco公司；RNA提取试剂盒购于碧云天生物技术公司；逆转录试剂和TB Green™ Premix Ex Taq™ RT-PCR试剂均购买于TaKaRa公司；引物由擎科生物科技有限公司合成；BCA蛋白浓度检测试剂、蛋白裂解液RIPA、蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟（PMSF）和聚偏二氟乙烯膜（0.45 μm）均购于鼎国昌盛生物技术公司；SDS-PAGE凝胶试剂盒购于雅酶生物医药科技公司；CCK-8试剂盒购于Dojindo Laboratories Japan；基质胶（matrigel）和Transwell小室（24孔板，0.8 μm）购自corning公司。MINK1抗体购于abcam公司；γH2AX抗体购于CST公司；GAPDH抗体和辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗Proteintech公司；顺铂购买于sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549、PC-9细胞和293T细胞分别培养于含10% FBS和1%双抗的DMEM/F12培养基和DMEM高糖培养基。

1.2.2 构建pLKO.1-Puro-shMINK1载体及慢病毒包装 *MINK1*基因的shRNA靶向序列通过在线（www.sigmaaldrich.cn）设计，1#：GCTACTGAAGTTTCCCTTCAT；2#：GCGGATTAAGTTCCTGGTCAT；由擎科公司合成shRNA引物序列。质粒测序确认后命名为shMINK1-1#和shMINK1-2#，对照质粒为pLKO.1-Puro，命名为shCtrl。病毒包装使用3质粒PMD2G和PSPAXL系统。

1.2.3 稳定敲减MINK1细胞系构建 各组病毒分别感染A549和PC-9细胞，使用嘌呤霉素筛选获得稳定敲减表达细胞。

1.2.4 qRT-PCR法检测细胞MINK1 mRNA的转录水平 qRT-PCR参照文献进行操作[17]。qRT-PCR引物序列为：MINK1上游引物为5'-GCTGAGGTCAAGCTAGTGGAT-3'，下游引物为5'-CCAATGAAAGTGTTCCGTCTGC-3'；内参基因GAPDH上游引物5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'，下游引物5'-GGCTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.2.5 Western blot检测 参照文献进行操作[17]。一抗稀释比例为Anti-MINK1（1∶500），Anti-GAPDH（1∶5 000）。

1.2.6 流式细胞术分析细胞周期与凋亡 通过PI染色法分析细胞周期，Annexin-VFITC标记法检测细胞凋亡。

1.2.7 CCK-8细胞增殖实验 CCK-8检测参照说明书进行。各组细胞浓度为30 000个/mL，每组设立0~96 h共5个时间点，每孔加100 μL细胞悬液。分别在各时间点加入CCK-8检测试剂，450 nm处检测吸光度（absorbance，A）值。顺铂联合处理癌细胞，设置不同浓度顺铂A549细胞（0、1、2、4、6 μmol/L）及PC-9细胞（0.0、0.1、0.2、0.4、0.6 μmol/L）处理3 d，酶标仪450 nm处检测A值。

1.2.8 划痕实验 参照文献进行操作[18]。待各组细胞生长密度达到95%左右时，在培养板上划出细线并标志出要观察的位置。在0 h及24 h时分别拍照观察划痕愈合情况

1.2.9 Transwell侵袭实验 参照文献进行操作[18]。将细胞接种于含Matrigel小室的上层进行细胞的侵袭（1×10^5个/孔）实验。在培育24 h后进行结晶紫染色及拍照分析。

1.2.10 免疫荧光检测 对照组和稳定敲减组细胞铺板后，利用顺铂处理A549细胞（1 μmol/L）及PC-9细胞（0.1 μmol/L），24 h后4%多聚甲醛固定细胞。随后进行一抗及二抗染色，DAPI进行核染色，共聚焦显微镜采图（Leica SP8）。

1.3 统计学方法

实验独立重复3次，采用GraphPad Prism 8.0软件分析作图。计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，2组间比较采用t检验，检验水准α=0.05。

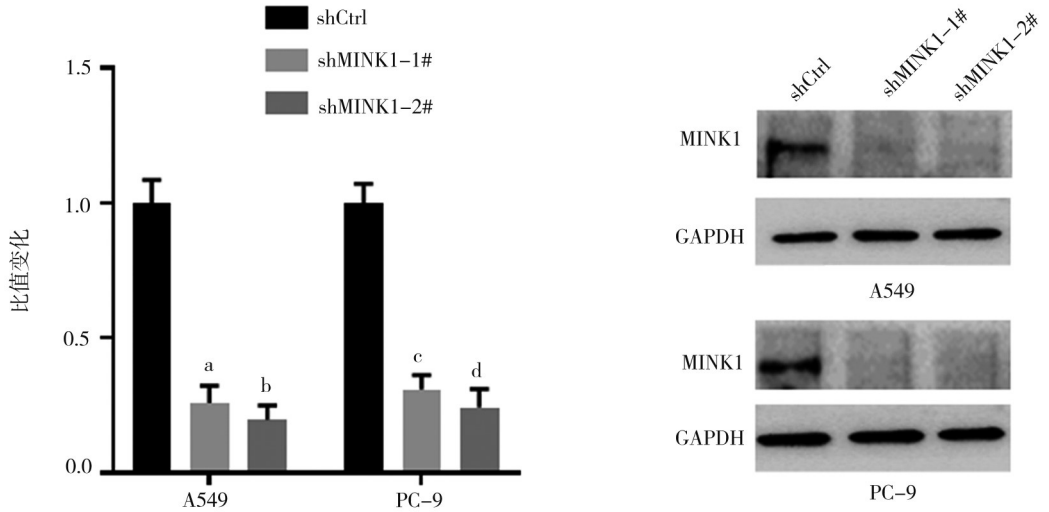
2 结 果

2.1 稳定敲减MINK1表达A549和PC-9细胞构建及敲减效率检测

慢病毒感染A549和PC-9细胞后利用嘌呤霉素筛选获得稳定敲减MINK1表达细胞，通过qRT-PCR和Western blot进行检测。结果显示与shCtrl组相比，shMINK1-1#（A549：0.26±0.06，*P*=0.000；PC-9：0.31±0.05，*P*=0.000）和shMINK1-2#（A549：0.19±0.05，*P*=0.000；PC-9：0.24±0.06，*P*=0.000）组细胞mRNA及蛋白表达水平明显下调（图1A和B）。这表明，MINK1在肺癌A549和PC-9细胞中实现稳定敲减，可以用于后续实验。

2.2 稳定敲减MINK1表达A549和PC-9细胞构建及对细胞增殖的影响

利用流式细胞术检测肺腺癌细胞中稳定敲减MINK1表达对细胞周期的影响。检测结果表明，与shCtrl组相比，敲减MINK1表达后G_1期（A549-shMINK1-1#：72.86±5.72，*P*=0.023；A549-shMINK1-2#：68.24±3.97，*P*=0.049；PC-9-shMINK1-1#：63.71±4.64，*P*=0.048；PC-9-shMINK1-2#：68.93±4.95，*P*=0.015）细胞均显著增加，而S期（A549-shMINK1-1#：24.82±4.96，*P*=0.031；A549-shMINK1-2#：30.36±5.15，*P*=0.021；PC-9-shMINK1-1#：34.16±3.63，*P*=0.034；PC-9-shMINK1-2#：27.52±3.1，*P*=0.016）与G_2/M期细胞减少（A549-shMINK1-1#：2.47±1.09，*P*=0.049；A549-shMINK1-2#：1.54±0.98，*P*=0.016；PC-9-shMINK1-1#：2.26±0.51，*P*=0.044；PC-9-shMINK1-2#：3.68±0.75，*P*=0.043）（图2A），这表明敲减MINK1表达影响肺腺癌细胞周期进程。进一步通过CCK-8实验检测稳定敲减MINK1表达后肺腺癌细胞增殖能力。如图2B所示，细胞培养96 h后，A549和PC-9细胞中敲减MINK1表达组与shCtrl（A549：2.18±0.22；PC-9：1.87±0.25）相比，shMINK1-1#（A549：1.07±0.13，*P*=0.001；PC-9：1.14±0.12，*P*=0.010）和shMINK1-2#（A549：0.89±0.16，*P*=0.001；PC-9：0.92±0.14，*P*=0.004）组的生长速度明显降低。同时，通过克隆形成实验进步一步证明肺腺癌细胞中敲减MINK1表达抑制细胞增殖（A549-shCtrl：98.52±10.93；A549-shMINK1-1#：38.66±5.31，*P*=0.001；A549-shMINK1-2#：34.29±6.28，*P*=0.000；PC-9-shCtrl：87.34±13.41；PC-9-shMINK1-1#：26.73±4.26，*P*=0.001；PC-9-shMINK1-2#：30.17±4.92，*P*=0.009）（图2C）。这些实验表明肺腺癌A549和PC-9细胞中MINK1表达对维持癌细胞增殖具有重要作用。

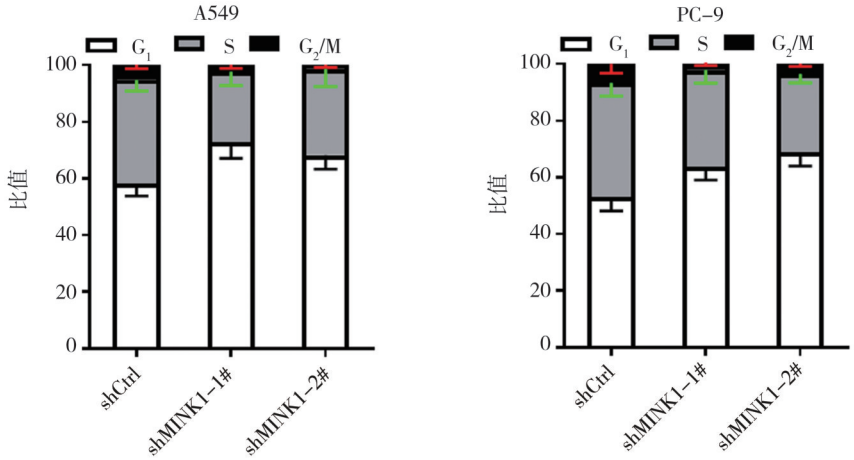


A. 慢病毒shRNA表达下调A549和PC-9细胞MINK1的mRNA表达

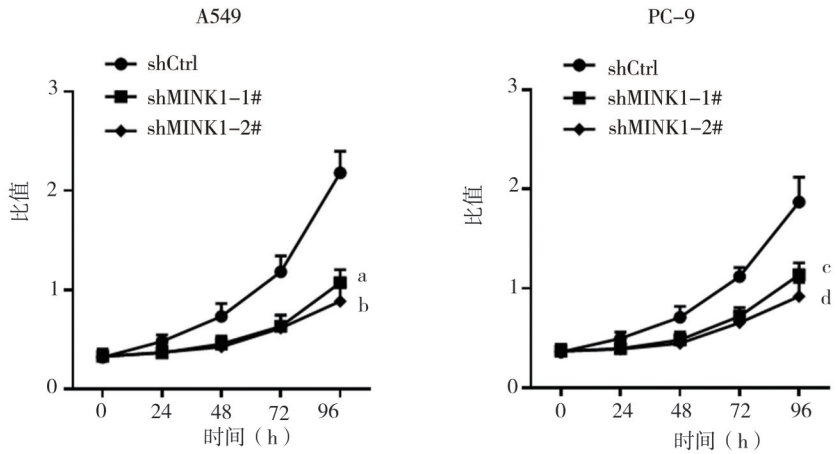
B. 慢病毒shRNA表达下调A549和PC-9细胞中MINK1蛋白表达水平

注：a，与A549-shCtrl相比，*P*<0.001；b，与A549-shCtrl相比，*P*<0.001；c，与PC-9-shCtrl相比，*P*<0.001；d，与PC-9-shCtrl相比，*P*<0.001

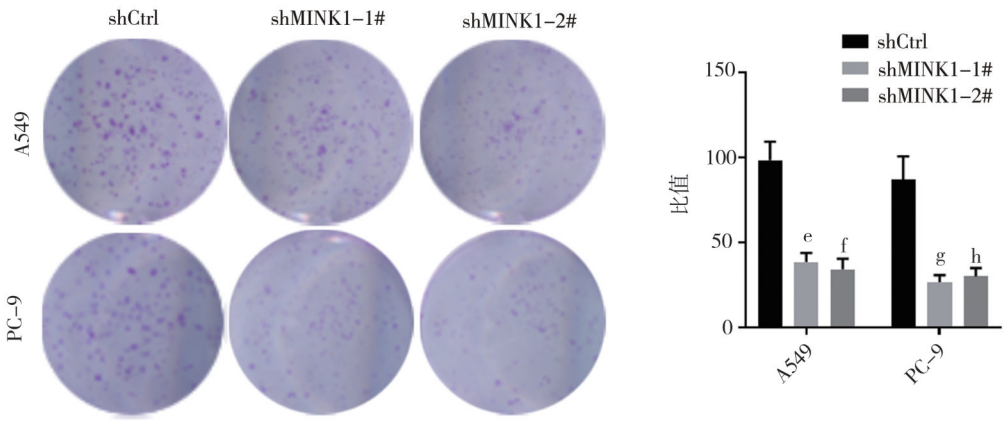
图1 慢病毒载体介导的稳定敲减MINK1肺腺癌细胞系构建



A. 流式细胞检测稳定敲减MINK1表达对A549和PC-9细胞周期的影响



B. CCK-8检测稳定敲减MINK1表达对A549和PC-9细胞增殖影响情况



C. 克隆形成实验检测稳定敲减MINK1表达对A549 和PC-9细胞增殖抑制作用

注：a，与 A549-shCtrl 相比，P=0.001；b，与 A549-shCtrl 相比，P=0.001；c，与 PC-9-shCtrl 相比，P=0.01；d，与 PC-9-shCtrl 相比，P=0.004；e，与 A549-shCtrl 相比，P=0.001；f，与 A549-shCtrl 相比，P=0.001；g，与 PC-9-shCtrl 相比，P<0.001；h，与 PC-9-shCtrl 相比，P=0.009

图2　肺腺癌细胞中稳定敲减 MINK1 对细胞增殖的影响

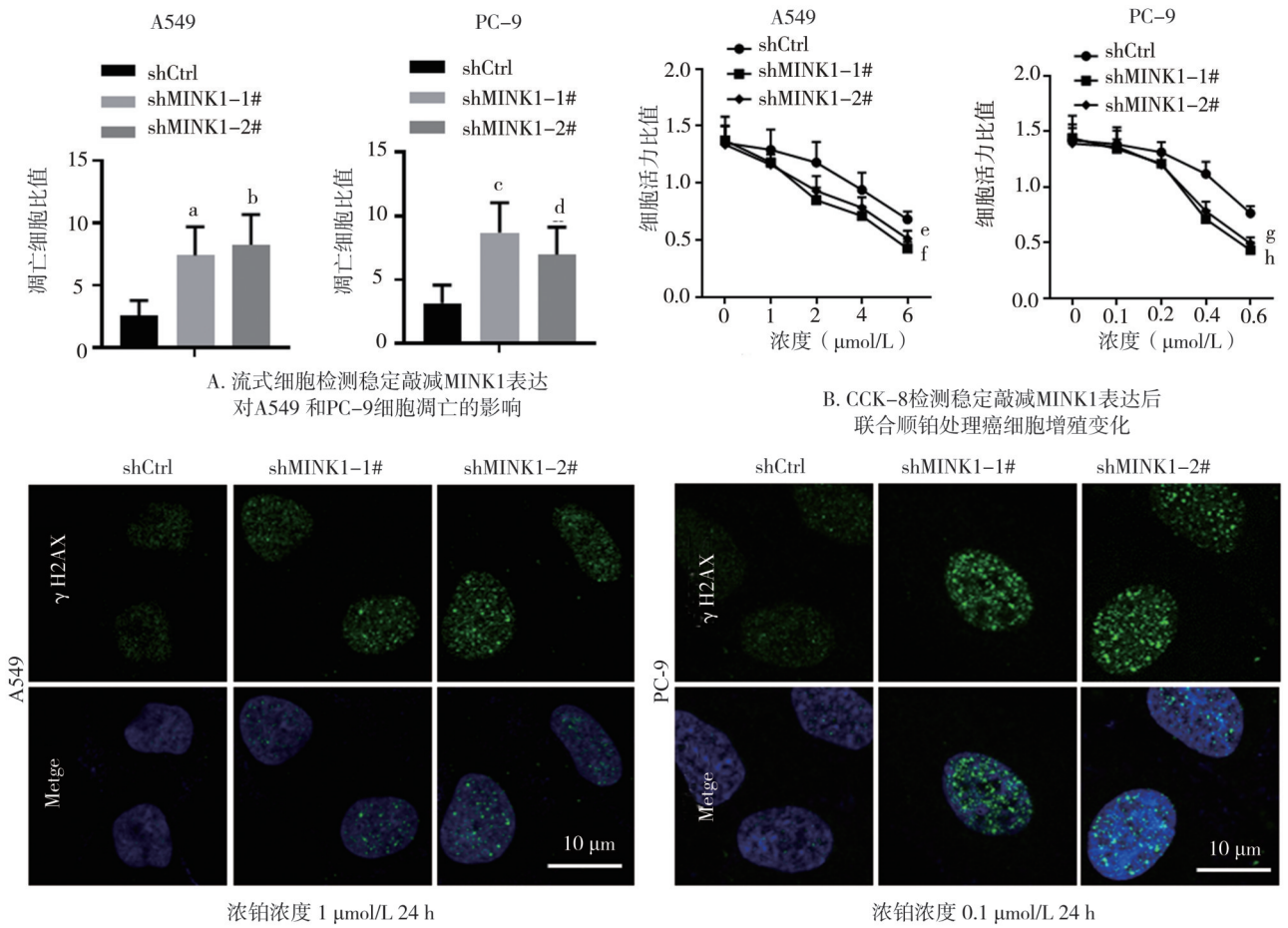
2.3　肺腺癌细胞中稳定敲减 MINK1 表达增强顺铂治疗敏感性

肺腺癌细胞中敲减 MINK1 表达阻滞细胞中周期进程并抑制细胞增殖，随后通过流式细胞检测细胞凋亡变化情况。结果显示，与 shCtrl 相比，稳定敲减 MINK1 表达组细胞凋亡比率上升（A549-shCtrl：2.56 ± 1.22；A549-shMINK1-1#：7.41 ± 2.30，P=0.032；A549-shMINK1-2#：8.25 ± 2.43，P=0.022；PC-9-shCtrl：3.17 ± 1.42；PC-9-shMINK1-1#：8.69 ±

2.34，*P*=0.025；PC-9-shMINK1-2#：6.97 ± 1.85，*P*=0.046）（图3A）。已有研究表明，癌细胞凋亡抑制与化疗药物耐药密切相关。随后通过联合顺铂处理shCtrl组及稳定敲减MINK1表达组检测细胞增殖变化情况。采用较低浓度剂量顺铂联合处理分析MINK1敲减细胞增殖变化情况。如图3B所示，当shMINK1-1#和shMINK1-2#组的A549和PC-9细胞接受浓度梯度的顺铂处理时，沉默MINK1表达的shMINK1-1#和shMINK1-2#组的细胞存活率明显降低（A549-shCtrl：0.68 ± 0.07；A549-shMINK1-1#：0.42 ± 0.06，*P*=0.008；A549-shMINK1-2#：0.51 ± 0.07，*P*=0.001；PC-9-shCtrl：0.76 ± 0.06；PC-9-shMINK1-1#：0.43 ± 0.08，*P*=0.003；PC-9-shMINK1-2#：0.49 ± 0.05，*P*=0.005）。化疗药物顺铂杀伤癌细胞由于其与DNA结合而诱导DNA损伤从而引发细胞凋亡。为进一步分析MINK1敲减细胞联合顺铂处理后DNA损伤变化情况，通过免疫荧光染色DNA损伤标志物γH2AX变化情况。如图3C所示，较低浓度顺铂处理24 h后shMINK1-1#和shMINK1-2#组细胞中γH2AX应该信号显著增强，表明敲减MINK1表达癌细胞对顺铂诱导的DNA损伤敏感。这些研究结果表明，在肺腺癌细胞中稳定敲减MINK1表达可能通过诱导DNA损伤增强其对顺铂的敏感性，增强顺铂对癌细胞杀伤。

2.4 肺腺癌细胞中稳定敲减MINK1表达抑制肺腺癌细胞的迁移及侵袭

最后利用划痕和Transwell侵袭实验检测稳定敲减MINK1表达对于A549和PC-9细胞迁移侵袭能力的影响。细胞划痕实验结果显示：在24 h后shMINK1-1#和shMINK1-2#组A549和PC-9细胞中的迁移区域明显小于shCtrl组（图4A和B）。另外，对shMINK1-1#和shMINK1-2#穿过小室的细胞进行统计分析，结果显示，与shCtrl组相比，shMINK1-1#和shMINK1-2#组穿过小室的细胞数目明显减少（A549-shMINK1-1#：0.28 ± 0.04，*P*=0.000；A549-shMINK1-2#：0.29 ± 0.07，*P*=0.000；PC-9-shMINK1-1#：0.25 ± 0.08，*P*=0.000；PC-9-shMINK1-2#：0.32 ± 0.06，*P*=0.000）（图4C和4D）。结果表明下调MINK1的表达可以显著抑制肺腺癌细胞的迁移及侵袭能力。



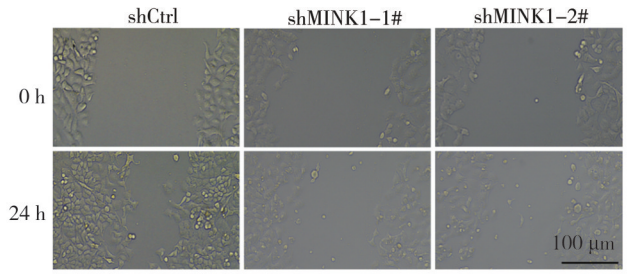
A. 流式细胞检测稳定敲减MINK1表达对A549和PC-9细胞凋亡的影响

B. CCK-8检测稳定敲减MINK1表达后联合顺铂处理癌细胞增殖变化

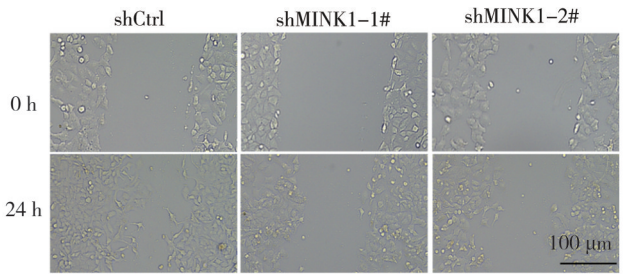
C. 免疫荧光检测稳定敲减MINK1表达联合顺铂处理12 h后DNA损伤情况

注：a，与A549-shCtrl相比，*P*=0.032；b，与A549-shCtrl相比，*P*=0.022；c，与PC-9-shCtrl相比，*P*=0.025；d，与PC-9-shCtrl相比，*P*=0.046；e，与A549-shCtrl相比，*P*=0.008；f，与A549-shCtrl相比，*P*=0.001；g，与PC-9-shCtrl相比，*P*=0.003；h，与PC-9-shCtrl相比，*P*=0.005

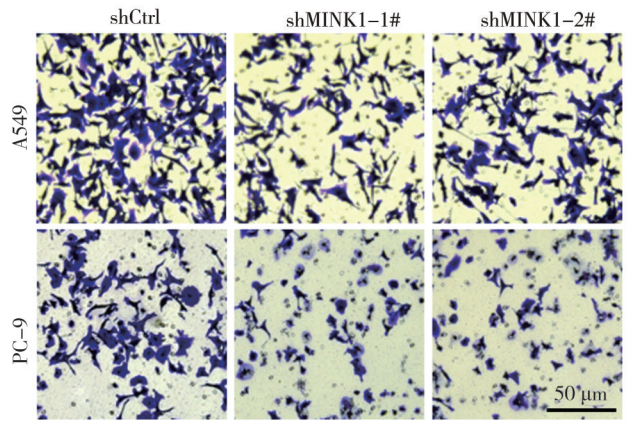
图3 敲减MINK1表达对A549和PC-9细胞凋亡及DNA损伤的影响



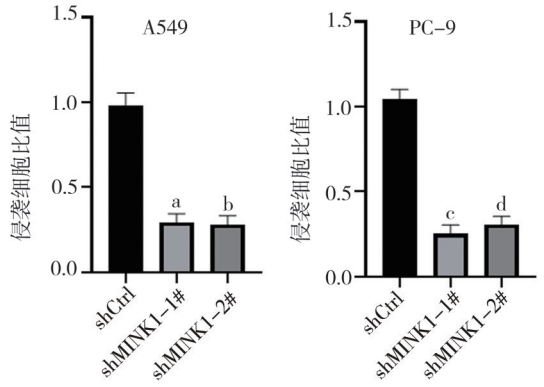
A. 划痕实验检测稳定敲减MINK1表达对A549 细胞迁移的影响



B. 划痕实验检测稳定敲减MINK1表达对PC-9细胞迁移影响



C. Transwell检测稳定敲减MINK1表达对 A549和 PC-9细胞侵袭的影响



D. Transwell实验检测侵袭细胞统计

注：a，与 A549-shCtrl 相比，$P<0.001$；b，与 A549-shCtrl 相比，$P<0.001$；c，与 PC-9-shCtrl 相比，$P<0.001$；d，与 PC-9-shCtrl 相比，$P<0.001$

图 4　稳定敲减 MINK1 表达对肺腺癌细胞运动能力的影响

3　讨　论

肺癌是全世界发病率和死亡率最高的恶性肿瘤，其中常见的属非小细胞肺癌，主要包含肺腺癌和肺鳞癌两种亚型[19]。随着传统放化疗及分子靶向治疗和免疫治疗技术的发展与应用，目前非小细胞肺癌患者的预后和生存有了明显改善；但仍有部分患者对治疗药物不敏感，且大部分患者在治疗后易出现耐药，导致治疗失败而复发[8,20]。因此，进一步寻找筛选非小细胞肺癌发生发展关键基因及鉴定化疗治疗的相关标志物，为耐药机制的研究及开发提供分子靶点，对于患者风险分层及耐药进展监测具有重要意义，可望指导耐药易感患者的后续治疗方案改善。

促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶激酶（mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinases，MAPKKKKs，MAP4Ks）丝氨酸/苏氨酸激酶家族包含 7 个成员，分别为 MAP4K1-7，其蛋白结构保守，均由 N 端的丝氨酸/苏氨酸磷酸化激酶结构域，C 端与微丝骨架调控密切相关的 Citron 同源结构域（C-terminal citron-homology domain）及中间可变连接区组成[11,21-22]。其中 MAP4K4、MAP4K6（MINK1）与 MAP4K7（TNIK）3 个蛋白成员序列相似性高，可执行相似功能。如在调控神经元中应急诱导的 JNK 通路活性过程中 MAP4K4、MINK1 与 TNIK 具有相似作用[13,23]。同时，MAP4K4、MINK1 及 TNIK 与 Hippo 通路关键激酶 MST1/2 具有相似功能，可直接磷酸化修饰 LATS1/2，在控制细胞感受胞外基质机械应力传导及 DNA 损伤修复中起关键作用[23-24]。但报道显示 MAP4K4、MINK1 与 TNIK 生理及病理条件下亦可通过各自独立下游通路执行不同功能，如 MINK1 不仅对于辅助性 T 细胞 17（T helper cell 17，Th17）分化及功能具有关键作用[25-26]，且 MINK1 可通过 mTOR 通路促乳腺癌发生[16]；而 MAP4K4 则通过调节 EB2 与 IQSEC1 控制黏着斑动态更新影响细胞迁移运动[27]；另外，肺鳞癌中 TNIK 通过 Merlin 控制 FAK 通路活性从而促肿瘤发生[28]。但迄今为止，关于 MINK1 在肺癌等其他恶性肿瘤中的具体作用机制仍未见报道。前期研究在肺腺癌细胞中通过对 MAP4K4 及 TNIK 进行敲减分别构建稳定敲减表达细胞系，发现稳定敲减 MAP4K4 表达诱导 A549 细胞成簇生长[29]，而稳定敲减 TNIK 表达未检测到癌细胞成簇生长表型，但检测到黏着斑 FAK 信号通路显著变化[30]。本研究利用 A549 及 PC-9 2 个肺腺癌细胞建立稳定敲减 MINK1 表达细胞系，并对其进行初步分析发现肺腺癌细胞中稳定敲减 MINK1 表达抑制

细胞增殖、迁移侵袭能力，且影响DNA损伤修复而增强化疗药物顺铂杀伤效用。通过观察稳定敲减MAP4K4、MINK1及TNIK表达A549细胞形态发现敲减3个基因表达表型差异明显，表明在恶性肿瘤中MAP4K4、MINK1及TNIK可能具有不同功能，但潜在的具体分子机制仍有待进一步探索。

参 考 文 献

[1] Khwaja RM, Chu QS. Present and emerging biomarkers in immunotherapy for metastatic non-small cell lung cancer: a review[J]. Curr Oncol, 2022, 29(2): 479-489.

[2] Calvayrac O, Pradines A, Pons E, et al. Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma[J]. Eur Respir J, 2017, 49(4): 1601734.

[3] Pu JY, Shen JF, Zhong ZH, et al. *KANK1* regulates paclitaxel resistance in lung adenocarcinoma A549 cells[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 639-647.

[4] Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCARE-4 data[J]. Lancet Oncol, 2007, 8(9): 784-796.

[5] Yu SH, Zhang CL, Dong FS, et al. miR-99a suppresses the metastasis of human non-small cell lung cancer cells by targeting AKT1 signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(2): 268-276.

[6] Chalela R, Curull V, Enríquez C, et al. Lung adenocarcinoma: from molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(7): 2142-2158.

[7] Vassel FM, Bian K, Walker GC, et al. Rev7 loss alters cisplatin response and increases drug efficacy in chemotherapy-resistant lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(46): 28922-28924.

[8] Marine JC, Dawson SJ, Dawson MA. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(12): 743-756.

[9] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. Oncogene, 2012, 31(15): 1869-1883.

[10] Saleh AH, Samuel N, Juraschka K, et al. The biology of ependymomas andemerging novel therapies[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(4): 208-222.

[11] Hu YM, Leo C, Yu S, et al. Identification and functional characterization of a novel human misshapen/Nck interacting kinase-related kinase, hMINK beta[J]. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54387-54397.

[12] Nicke B, Bastien J, Khanna SJ, et al. Involvement of MINK, a Ste20 family kinase, in Ras oncogene-induced growth arrest in human ovarian surface epithelial cells[J]. Mol Cell, 2005, 20(5): 673-685.

[13] Larhammar M, Huntwork-Rodriguez S, Rudhard Y, et al. The Ste20 family kinases MAP4K4, MINK1, and TNIK converge to regulate stress-induced JNK signaling in neurons[J]. J Neurosci, 2017, 37(46): 11074-11084.

[14] Daulat AM, Luu O, Sing A, et al. Mink1 regulates β-catenin-independent Wnt signaling via Prickle phosphorylation[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(1): 173-185.

[15] Meng ZP, Moroishi T, Mottier-Pavie V, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway[J]. Nat Commun, 2015, 6: 8357.

[16] Daulat AM, Bertucci F, Audebert S, et al. PRICKLE1 contributes to cancer cell dissemination through its interaction with mTORC2[J]. Dev Cell, 2016, 37(4): 311-325.

[17] Zhang L, Zhang Y, Lei YL, et al. Proline-rich 11(PRR11)drives F-actin assembly by recruiting the actin-related protein 2/3 complex in human non-small cell lung carcinoma[J]. J Biol Chem, 2020, 295(16): 5335-5349.

[18] Zhou J, Liu H, Zhang L, et al. DJ-1 promotes colorectal cancer progression through activating PLAGL2/Wnt/BMP4 axis[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 865.

[19] Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma[J]. Lancet Oncol, 2015, 16(7): e342-e351.

[20] Meric-Bernstam F, Mills GB. Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2012, 9(9): 542-548.

[21] Dan I, Watanabe NM, Kusumi A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades[J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(5): 220-230.

[22] Miller CJ, Lou HJ, Simpson C, et al. Comprehensive profiling of the STE20 kinase family defines features essential for selective substrate targeting and signaling output[J]. PLoS Biol, 2019, 17(3): e2006540.

[23] Meng ZP, Qiu YJ, Lin KC, et al. RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway[J]. Nature, 2018, 560(7720): 655-660.

[24] Deng M, Lin J, Nowsheen S, et al. Extracellular matrix stiffness determines DNA repair efficiency and cellular sensitivity to genotoxic agents[J]. Sci Adv, 2020, 6(37): eabb2630.

[25] 代娟丽，王 臻，董超雄，等. RVM致炎细胞因子上调导致5-HT释放参与调控慢性术后疼痛[J]. 中山大学学报(医学科学版)，2024，45(1)：54-62.

Dai JL, Wang Z, Dong CX, et al. Up-regulation of proinflammatory cytokines in rostral ventromedial medulla contributes to chronic postsurgical pain by promoting 5-HT release[J]. J Sun Yat Sen Univ Med Sci, 2024, 45(1): 54-62.

[26] Fu GT, Xu Q, Qiu YJ, et al. Suppression of Th17 cell differentiation by misshapen/NIK-related kinase MINK1[J]. J Exp Med, 2017, 214(5): 1453-1469.

[27] Yue JP, Xie M, Gou XW, et al. Microtubules regulate focal adhesion dynamics through MAP4K4[J]. Dev Cell, 2014, 31(5): 572-585.

[28] Torres-Ayuso P, An E, Nyswaner KM, et al. TNIK is a therapeutic target in lung squamous cell carcinoma and regulates FAK activation through merlin[J]. Cancer Discov, 2021, 11(6): 1411-1423.

[29] 王 茹，尹 讯，张 涛，等. 建立稳定敲减MAP4K4表达的A549细胞系及初步分析[J]. 四川大学学报(医学版)，2022，53(4)：611-618.

Wang R, Yin X, Zhang T, et al. Establishment and preliminary analysis of lung cancer cell line A549 with stable MAP4K4 knockdown[J]. J Sichuan Univ Med Sci, 2022, 53(4): 611-618.

[30] 孙雪花，尹 讯，王 茹，等. 建立稳定敲减TNIK表达的A549细胞系及对其初步分析[J]. 中国细胞生物学学报，2022，44(3)：421-428.

Sun XH, Yin X, Wang R, et al. Establishment and preliminary analysis of cell line A549 with stable knockdown of TNIK expression[J]. Chin J Cell Biol, 2022, 44(3): 421-428.

（责任编辑：曾 玲）